

香茅草精油微乳液的构建及其抗氧化活性分析

陶紫, 赵振刚

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究的目的是构建一种改善香茅草精油在水相环境中应用的微乳体系。以香茅草为原料, 采用水蒸汽蒸馏法提取香茅草精油以及 GC-MS 联用技术对精油成分进行定性分析。通过绘制伪三元相图选择合适的微乳液组分制备香茅草精油微乳液, 考察不同表面活性剂、助表面活性剂、 K_m 值、pH 值和离子强度等因素对微乳区域面积的影响。最终制备以 Tween 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 去离子水为水相的 O/W 型香茅草精油微乳液。其理化性质为: pH 为 6.73 ± 0.02 、黏度为 15.50 ± 0.11 mPa/s、电导率为 108.90 ± 0.21 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 、平均粒径为 16.50 ± 0.53 nm。最后, 通过用 DPPH, ORAC 和 PSC 方法测定及比较香茅草精油与香茅草精油微乳液的抗氧化活性。结果表明, 香茅草精油微乳液在水相环境中的抗氧化活性显著优于香茅草精油的效果 ($p < 0.05$)。

关键词: 香茅草精油; 微乳液; 伪三元相图; 理化性质; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2018)10-156-164

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.022

Preparation of Microemulsion of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf Essential Oil and Analysis of Antioxidant Activity

TAO Zi, ZHAO Zhen-gang

(College of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study aimed to prepare a microemulsion system that could improve the application of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf essential oil in aqueous environments. The essential oil was extracted by hydrodistillation and the volatile compounds in the extract (CEO) were analyzed by GC-MS. Pseudo-ternary phase diagrams were constructed to select suitable ingredients for preparation of microemulsions. The effects of surfactants, co-surfactant, K_m value, pH value, ionic strength and other factors on the microemulsion existing area in the pseudo ternary diagram were investigated, to prepare a C.EO O/W microemulsion using Tween 80 (surfactant), anhydrous ethanol (co-surfactant), and deionized water (aqueous phase). Its physicochemical properties were as follows: pH 6.73 ± 0.02 , viscosity 15.50 ± 0.11 $\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$, conductivity 108.90 ± 0.21 $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$, and average particle diameter 16.50 ± 0.53 nm. Finally, the antioxidant activities of CEO and CEO microemulsion were determined by DPPH, ORAC and PSC assays. The obtained results showed the antioxidant activity of CEO microemulsion was significantly higher than that of CEO ($p < 0.05$).

Key words: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil; microemulsion; pseudo-ternary phase diagram; physicochemical properties; antioxidant activities

香茅草 (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) 属禾本科香茅属 (*Cymbopogon*), 是著名草本香种, 含天然柠檬香味, 主要分布在东半球热带及亚热带国家。我国的香茅属植物有 8 种, 主要分布在南部地区^[1]。因其具有和胃通气、健胃消脂和降压利尿等功效, 香茅草在医药、日化、香精香料和饲料添加剂等行业应用广泛^[2]。

香茅草精油 (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

收稿日期: 2018-03-05

基金项目: 中央高校基础科研业务费基金项目 (G200203; 201)

作者简介: 陶紫 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 轻工技术与工程

通讯作者: 赵振刚 (1979-), 男, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 植物天然产物活性研究

天然产物活性研究

essential oil, C-EO)具有广泛的药理活性: 如, 因具有一些香叶醛和橙花醛等醛类物质, 常作为抑菌材料^[3]; 有研究表明其主要成分中的柠檬醛物质具有较理想的抗氧化能力, 其清除 O_2 , OH 有显著效果^[4]。但因植物精油具有挥发性, 对光线、氧气、温度敏感, 且难溶于水, 其在水环境中的运用受限。因此, 本研究拟通过选用合适的表面活性剂、助表面活性剂和水相, 在一定比例条件下制备精油微乳体系, 使其具有较精油本身更稳定, 更显著的抗氧化活性。

微乳液 (Microemulsion), 由水、油、表面活性剂和助表面活性剂在适当比例下自发形成, 表现为透明或半透明、低粘度且各向同性^[5]。因其稳定性好、光散射弱、可设计成高粘性或者凝胶状的流变性质,

并且可用来包埋亲脂性活性成分的特点,微乳液在食品、制药和化妆品行业均有广泛的应用价值^[6,7]。而香茅草因其生长周期短,管理粗放,投资小见效快,且其精油在国际市场上价格较高,因此是一种极具商业价值的常绿草本作物。本文结合 C-EO 和微乳技术,制备香茅草精油微乳体系 (*Cymbopogon citratus* (DC.) *Stapf* essential oil Microemulsion, M-EO) 来克服精油本身因稳定性差,难溶于水的弊端。通过绘制伪三元相图考察各因素对微乳液形成的影响来优化 M-EO 形成的工艺条件,寻找尽可能用更少的表面活性剂和助表面活性剂制备更稳定的微乳液。最后采用 DPPH, ORAC 和 PSC 法测定并比较 C-EO 及 M-EO 的抗氧化活性,以期找到一种提高 C-EO 稳定性和增加其应用范围的方法,为拓展其商业化发展提供技术支持。

1 实验与方法

1.1 材料与试剂

植物材料:香茅草购于广州市一德路大型批发市场。

试剂:香茅草精油,自制;香茅草精油微乳液,自制;去离子水,自制;无水乙醇,广东光华股份有限公司;丙二醇,天津大茂化学试剂公司;甘油,天津启轮化学科技有限公司;Tween 80, Aladdin 公司; Tween 60, Aladdin 公司; Tween 20, Aladdin 公司; 2,2-二苯基-1-三硝基苯肼 (DPPH), 西格玛奥德里奇上海贸易公司; Trolox, Sigma 公司; 没食子酸, Sigma 公司; 2,7-二氯二氢荧光素二乙酯 (DCFH-DA), Sigma 公司; 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸 (ABAP), Sigma 公司; 抗坏血酸 (Vc), Aladdin 公司; 荧光素钠, Sigma 公司; 氢氧化钾, 国药集团; 磷酸氢二钾, 上海生工生物工程有限公司; 磷酸二氢钾, 上海生工生物工程有限公司; 本实验中选用的其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

水蒸汽蒸馏装置,常州普天仪器制造有限公司;气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用仪 (7890A-5975C DB-5ms), 美国 Agilent 公司;气相色谱毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) (Basis), 美国 Agilent 公司; Hei-VAP Value 旋转蒸发器, 德国 Heidolph 公司; SHZ-D(III)循环水式真空泵, 巩义市予华仪器公司; BSA2202S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; MS-H280-PRO 磁力搅拌器, 大龙磁力搅拌器有限公司; DDS-11A 5424R 电导率仪, 上海雷磁创益仪器仪表有限公司; Nano-ZS 纳米粒度仪 (ZETASIZER-HT),

英国 Malvern 公司; DU730 分光光度计, 美国 Beckman Coulter 公司; Filter Max F5 多功能酶标仪, 美国 Molecular 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 C-EO 的提取

参照魏娟^[8]等提取姜黄精油的方法稍作修改,用水蒸气蒸馏法对香茅草进行蒸馏提取。采用水蒸汽蒸馏装置,将自然风干的香茅草剪切成 5 cm 左右长度,取 10 kg 原料于物料锅中,以 1:10 的料液比加入 100 kg 水蒸馏。收集冷凝液得精油粗提物后,用石油醚萃取,加适量氯化钠促进水油分层,取上层液,重复萃取 2 次。将所有上层液用无水硫酸钠干燥,再用旋转蒸发器除去石油醚得澄清透亮的金黄色香茅草精油,最后密封于棕色玻璃瓶中避光保存。

1.3.2 C-EO 成分气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析

采用安捷伦 7890A-5975C 气质联用仪;色谱柱: Agilent DB-5 ms (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度: 250 °C; 载气: 高纯氦气 (99.999%); 柱流速: 1 mL/min; 进样量 0.2 μL; 分流比 30:1; 程序升温: 50 °C, 保持 3 min, 3 °C/min 升到 120 °C, 4 °C/min 升到 180 °C, 15 °C/min 升到 292 °C, 保持 15 min。

质谱条件: 电子轰击 (EI) 离子源, 电离能量: 70 eV; 接口温度: 280 °C; 离子源温度: 230 °C; 四级杆温度: 150 °C; 质量扫描范围: 33~450 u; 检索谱库: Nist08, 最后用峰面积计算各成分占的百分比含量。

1.3.3 香茅草精油微乳液 (M-EO) 制备及优化

参照 GUO Ruixue 和 MA Qiumin 等^[9,10]人制备微乳液的方法,并稍作修改。首先配置表面活性剂与助表面活性剂的混合液 (混合活性剂, S+Cos), 两者的质量比为 K_m , 用磁力搅拌器搅拌均匀,静置平衡。再往混合活性剂中加入精油搅拌均匀作为油相,混合活性剂与精油的质量比表示为 S_{mix} 。随后往油相中边搅拌边滴加水来获得微乳液,通过绘制伪三元相图表明各配方组分形成微乳液的能力。(本实验意得到 O/W 型微乳液,因此在优化微乳液制备工艺时只选择水相占比在 50% 及以上的样品作为实验对象。)

1.3.1.1 表面活性剂对 M-EO 形成的影响

分别用 Tween 80, Tween 60, Tween 20 作为表面活性剂,与无水乙醇配成 $K_m=4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:0$ 比例的混合活性剂,再配置 $S_{mix}=9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9$ 的油相。随后往油相中边搅拌边滴加去离子水,配成水分含量分别为 50%, 60%,

70%, 80%, 90%的配方组分。静置平衡 24 h, 以 4000 g 的速度离心 15 min, 挑选出透明的样品, 绘制伪三元相图。

1.3.3.2 助表面活性剂对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 分别以无水乙醇, 1,2-丙二醇, 甘油作为助表面活性剂, 配成 $K_m=3:1$ 的混合活性剂。其他步骤同 2.3.1。

1.3.3.3 K_m 值对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 以无水乙醇为助表面活性剂, 配成 $K_m=4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:0$ 的混合活性剂。其他步骤同 2.3.1。

1.3.3.4 水相 pH 值对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 以无水乙醇为助表面活性剂, 配成 $K_m=3:1$ 的混合活性剂。用 0.1 M 的盐酸溶液以及 0.1 M 氢氧化钠调节去离子水的 pH 分别为 1.5, 4.0, 9.0, 以之作为水相滴加到混合好的油相中。其他步骤同 2.3.1。

1.3.3.5 水相中离子强度对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 配成 $K_m=3:1$ 的混合活性剂。用氯化钠调节去离子水的离子强度, 分别制成 0.9%, 2.0% 的氯化钠溶液。用该去离子水滴加到油相中。其他步骤同 2.3.1。

1.3.3.6 M-EO 的构型分析和理化性质

电导率变化规律和粘度变化测定是判定微乳液构型的有效方法^[11], 本文测定 $S_{mix}=8:2, K_m=3:1$ 时, 微乳体系电导率和粘度随水分含量增加的变化规律。

将制备好的微乳液平衡 24 h 后, 以 4000 g 的速度离心 15 min。观察其是否分层或浑浊。用 Nano-ZS 激光粒度仪测定微乳液的粒径和分布 (polydispersity index, PDI)。

1.3.4 C-EO 及其微乳液抗氧化活性分析和比较

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参考 Wang 等^[12]方法并稍微修改, 测定 C-EO 及 M-EO 对 DPPH 自由基的清除能力。用无水乙醇溶解 DPPH 粉末并稀释成 2 mM 的储备液。取 2 mL 不同浓度的 C-EO 和 M-EO 溶液加入 2 mL 经稀释后的 DPPH 储备液, 涡旋均匀后, 于室温下避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值 A_i 。以无水乙醇作为空白调零, 以 2 mL 对应浓度的测试样的溶液加上 2 mL 无水乙醇作为对照 (A_j)。2 mL 无水乙醇加 2 mL DPPH 工作液的吸光值为 A_c 。则测试样对 DPPH 自由基的清除能力为:

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

1.3.4.2 氧自由基吸收能力 (Oxygen Radical

Absorption Capacity, ORAC) 的测定

参照 Davalos^[13]的方法, 本实验用磷酸盐作为缓冲液 (PBS, pH 7.4); 以 Trolox 为标准品。用 PBS 配置系列浓度的 Trolox 标准液 (6.25, 12.5, 25, 50 μM); 样品 C-EO 和 M-EO 直接用 PBS 稀释。具体操作流程: 在 96 孔黑色底部透明微孔板中依次加入 20 μL 抗氧化物质 (Trolox 或待测样品), 于 37 $^\circ\text{C}$ 环境下孵育 10 min; 随后往每个孔中加入 200 μL 荧光素钠溶液, 孵育 20 min; 随后每个孔中迅速加入 20 μL 的 ABAP 溶液 (空白对照孔加 20 μL PBS); 最后用多功能酶标仪测定各孔荧光度变化 (激发光波长 485 nm, 发射光波长 538 nm, 每 5 min 测定一次, 测定时长 150 min)。所有测试样均做三次平行。

标品或者样品的荧光保护面积 (Net AUC) 等于标品或样品作用下的衰退曲线面积 (AUC) 减去空白对照作用的荧光衰退 AUC 而得的荧光熄灭曲线的延迟部分面积 ($\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$)。样品的氧自由基清除能力 ORAC 值, 由其荧光衰退曲线的保护面积与标品 Trolox 的保护面积相比而得 [$\text{ORAC} = (\text{Net AUC}_{\text{sample}} / \text{Net AUC}_{\text{trolox}}) \times (\text{M}_{\text{trolox}} / \text{M}_{\text{sample}})$]。即, 最后样品的 ORAC 值表示为每毫克样品的 Trolox 当量 ($\mu\text{M Trolox equiv/mg, DW}$)。

1.3.4.3 过氧自由基清除能力 (Rapid peroxy radical scavenging capacity, PSC) 的测定

参照 Adom 等^[14]对天然提取物过氧自由基清除能力的分析方法。以没食子酸和抗坏血酸为标准品, 分别用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释为 5 个系列浓度梯度; 测试样为 C-EO 或 M-EO, 用 PBS 稀释成 5 个系列梯度; DCFH-DA 在使用前用 1 mM 的氢氧化钾水解, 并用 PBS 稀释。具体操作步骤为: 在 96 孔黑色底部透明微孔板的微孔中依次加入 100 μL 抗氧化物质 (PBS (空白组), 标准品或者测试样), 100 μL 水解后的 DCFH-DA, 50 μL ABAP 溶液。最后用多功能酶标仪测定各孔荧光度变化 (激发光波长 485 nm, 发射光波长 538 nm, 每 5 min 测定一次, 时常 40 min)。

样品的 PSC 值为每组稀释液的荧光强度变化的时间动力曲线面积。以 SA 为标准品或测试样品的荧光积累量, CA 为空白对照的荧光积累量, $\text{PSC 值} = 1 - (\text{SA} / \text{CA})$ 。以 EC_{50} 值 (即阻止 50% 荧光 ($\text{PSC} = 0.5$) 产生所需要的测试样的浓度) 作为最终比较抗氧化活性的指数。样品的抗氧化能力表示为 $\mu\text{mol Vc equiv/g, DW}$ 。

1.3.5 数据统计分析

文中用 origin 8.5 软件绘制图表, Sigmaplot 12.5 处理曲线面积积分, Calculusyn 2.0 计算浓度效应, IBM

SPSS21.0 对数据进行 AANVOA 显著性比较分析 ($p < 0.05$ 时, 表明具有显著性差异)。所有实验均做 3 个平行, 数据结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 C-EO 的化学成分

采用水蒸气蒸馏法提取得到 C-EO, 利用 GC-MS 技术对精油进行成分分析, 共检测出 M-EO 具有 64 种挥发性组分, 占色谱馏分出峰总面积的 96.60%。其主要成分如表 1 所示。其中相对浓度在 1% 以上的有 16 种, 占总量的 91.78%, 其中超过 60% 成分为醇、醛或者烯类小分子物质。含量最高的 4 种成分分别是 (+)-香茅醛 (35.69%), 香叶醇 (16.56%), D-芳香醇 (12.47%), D-柠檬烯 (3.77%), 分别占其总量 68.49%。

表 1 C-EO 挥发性成分中相对浓度在 1% 以上的化学成分

Table 1 Chemical composition of C-EO in the relative concentration of more than 1%

NO.	Molecule	Compound	Relative content/%
1	C ₆ H ₁₄	2-甲基戊烷	1.85
2	C ₆ H ₁₄	3-甲基戊烷	1.29
3	C ₆ H ₁₄	己烷	3.60
4	C ₅ H ₁₀	环戊烷	2.54
5	C ₆ H ₁₂	环己烷	3.09
6	C ₁₀ H ₁₆	D-柠檬烯	3.77
7	C ₁₀ H ₁₈ O	芳樟醇	1.71
8	C ₁₀ H ₁₈ O	(+)-香茅醛	35.69
9	C ₁₀ H ₂₀ O	D-香茅醇	12.47
10	C ₁₀ H ₁₈ O	香叶醇	16.56
11	C ₁₀ H ₁₈	2,6-二甲基-2,6-辛二烯	1.86
12	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇乙酸酯	1.50
13	C ₁₅ H ₂₄	β -榄香烯	1.51
14	C ₁₅ H ₂₄	D-大根香叶烯	1.31
15	C ₁₅ H ₂₄	δ -葑澄茄烯	1.56
16	C ₁₅ H ₂₆ O	榄香醇	1.47

由表 1 可知, 本次研究对象的主要成分是一些醛、醇、烯和酯类物质。有报道表示, 香茅草中含量较高醛醇物质, 具有显著的抗菌活性, 提高免疫细胞活性以及抗炎作用^[15,16]。更有一些动物实验研究表明, 香茅草提取物可减少体内活性氧含量, 提高血清总抗氧化能力, 同时也可与其他成分作用产生协同效果提高总体抗氧化活性^[17,18]。因此, 香茅草精油成分分析为其之后的活性研究奠定了物质基础。

2.2 M-EO 的制备和条件优化

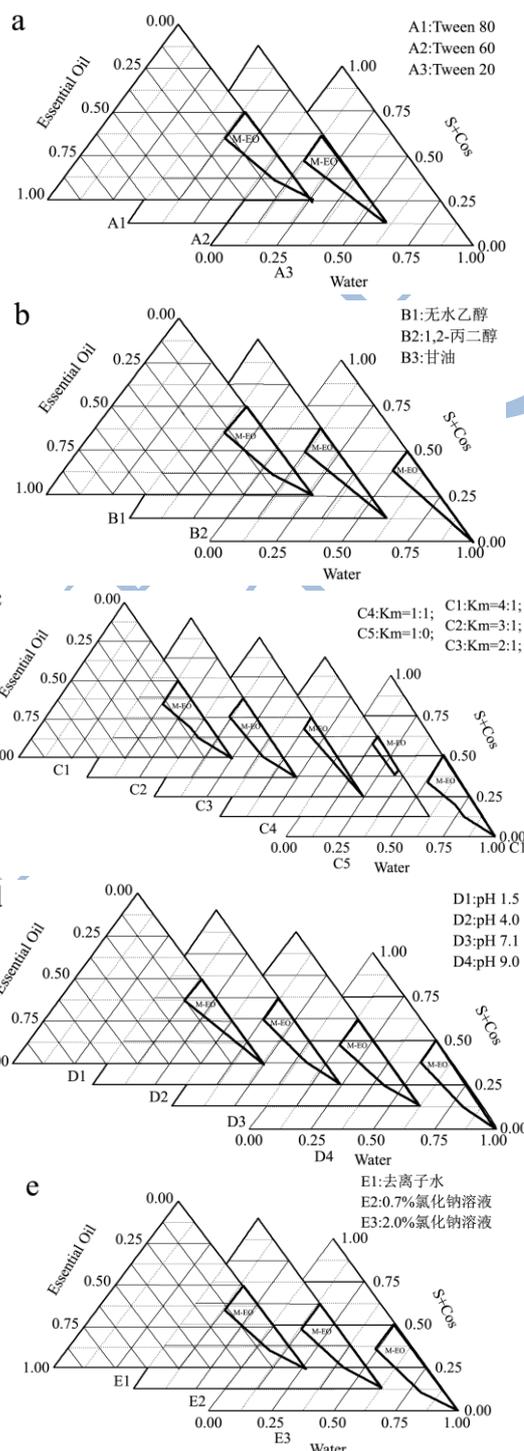


图 1 各组成组分对 M-EO 形成的影响

Fig.1 Effects of various components on pseudo-ternary phase diagrams

Note: (A) Surfactants, $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$. (B) Cosurfactants, $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$. (C) K_m value, $S_{mix}=8:2$. (D) PH value, $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$. (E) Ionic strength, $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$.

2.2.2.1 表面活性剂对 M-EO 形成的影响

表面活性剂是构成微乳液的基本物质, 可降低界

面张力促进微乳形成。因无毒、价格低廉和乳化效果显著等优势, Tween 系列表面活性剂被广泛应用于食品、化妆品以及医药等工业领域^[19]。本实验选用 Tween 80, Tween 60, Tween 20 作为研究对象, 选出较优的表面活性剂。如图 1A 中显示, 当 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$ 时, Tween 80 的微乳区域面积大于 Tween 60, 而 Tween 20 在该体系中不能构成微乳液。该结果由各表面活性剂的理化性质决定: 首先是 HLB 值 (Hydrophile Lipophilic Balance), HLB 值反应表面活性剂中的亲水基团与亲油基团的平衡关系, 值越高, 亲水性越强。在已知选用的表面活性剂中, Tween 80 的 HLB 值最大, Tween 60 次之, Tween 20 最小。因此, 欲要获得 O/W 型微乳液, 应选用 Tween 80 作为表面活性剂。

2.2.2.2 助表面活性剂对 M-EO 形成的影响

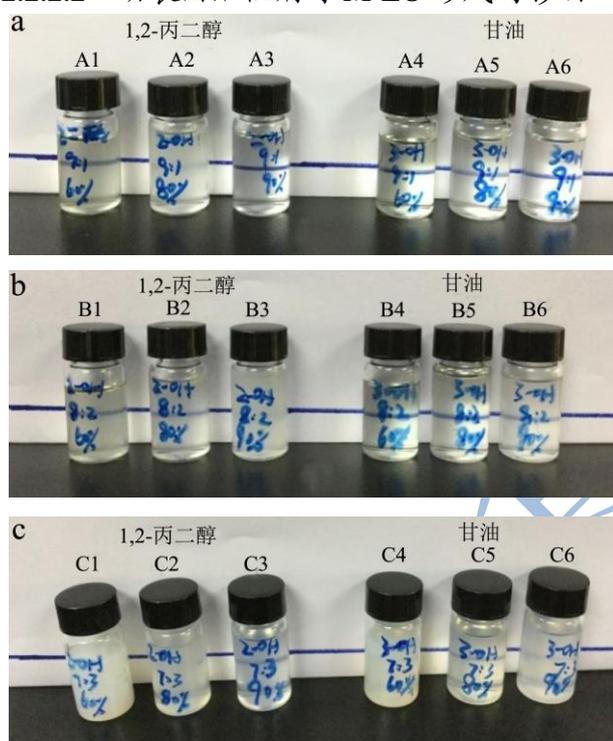


图2 以1,2-丙二醇和甘油为助表面活性剂的临界配方组分
Fig.2 Sample figures in critical conditions with cosurfactants of 1,2-propylene glycol and glycerinum

Note: (a) $K_m=3:1$, $S_{mix}=9:1$. (b) $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$. (c) $K_m=3:1$, $S_{mix}=7:3$.

本研究选用无水乙醇, 1,2-丙二醇, 甘油作为助表面活性剂。由图 1b 的伪三元相图可知, 无水乙醇对应的微乳区域面积最大, 其余两者无显著区别。根据实际效果观察分析, 甘油的助乳化效果稍强于 1,2-丙二醇 (图 2)。图 2 表示 1,2-丙二醇和甘油制备成微乳液的一些临界条件的配方组成。其中 A2 与 A5, B3 与 B6, C2 与 C5 均是 1,2-丙二醇和甘油在相同 K_m 值, S_{mix} 值以及水分含量条件下的不同表现。从清晰透明

度方面的对比可看出甘油的 A5, B6, C5 分别优于 1,2-丙二醇同一条件下对应的 A2, B3 和 C2。因此, 实验结果表明无水乙醇优于甘油, 1,2-丙二醇的效果最差。助表面活性剂的作用大小跟醇链本身的大小以及所带基团有关。Gradzielski^[20]的报道表明, 在非离子型 O/W 型微乳中加入短链醇可降低界面膜的弯曲系数, 在水油界面上与表面活性剂形成混合吸附膜, 降低表面张力, 增加界面膜的柔性和流动性, 减少微乳液形成所需的弯曲能; 同时还可调节体系中的 HLB 值以利于乳液形成。根据 Garti 等^[21]的解释, 由于乙醇分子量和摩尔体积都较小, 易于穿透微乳液第的栅栏层引起界面膜向油相凸起而利于微乳液的形成。而相同链长的短链醇, 带有的羟基越多, 其亲水性和极性越强, 在一定条件下有利于亲水型微乳液的形成。

2.2.2.3 K_m 值对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 按 $K_m=4:1$, $3:1$, $2:1$, $1:1$, $1:0$ 的比例混合, 绘制伪三元相图, 如图 1C 所示。由图可知, 随着表面活性剂的占比升高, 微乳区域面积增加。其中 $K_m=4:1$ (图 1C1), $1:0$ (图 1C5) 的微乳区域面积最大, $K_m=1:1$ (图 1C4) 的微乳区域面积最小。这是由于 K_m 值减小时, 助表面活性剂含量进一步增加, 油水界面的张力降低, 表面活性剂头基之间的吸引力减小, 体系形成微乳液的能力减弱, 从而微乳区域面积减小^[22]。当 $K_m=4:1$, $3:1$, $1:0$ 时, 三者的微乳区域面积相差不大, 考虑产品最后应用的安全性和可适用性, 优先选用表面活性剂更少的比例组分, 因此本实验筛选出 $K_m=3:1$ 的比例。

2.2.2.4 水相 pH 值对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 其中 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$ 。用 0.1 M 的盐酸和 0.1 M 的氢氧化钠溶液调节去离子水的 pH 作为水相。由图 1D 可知, 直接用去离子水制备的微乳区域面积最大 (图 1D3), 随着 pH 值越低, 其区域面积越小。当 pH 值增加, 体系呈现碱性, 其微乳区域面积也受到影响而减小 (图 1D4)。该结果表明, 中性的水相环境更利于微乳液的形成, 王浩^[23]在制备丁香油微乳体系时得到相似结果。

2.2.2.5 水相中离子强度对 M-EO 形成的影响

以 Tween 80 为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 其中 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$ 。配置 0.9% 和 2% 的氯化钠溶液作为水相。其伪三元相图如图 1E 所示, 微乳区域面积随离子强度的变化相差不大, 但是从临界配方组分的样品中观察可知 (图 3), 实际上 2% 的氯化钠溶液样品的清晰透明度优于 0.9% 的样品, 而去离子

水的清晰度最弱。

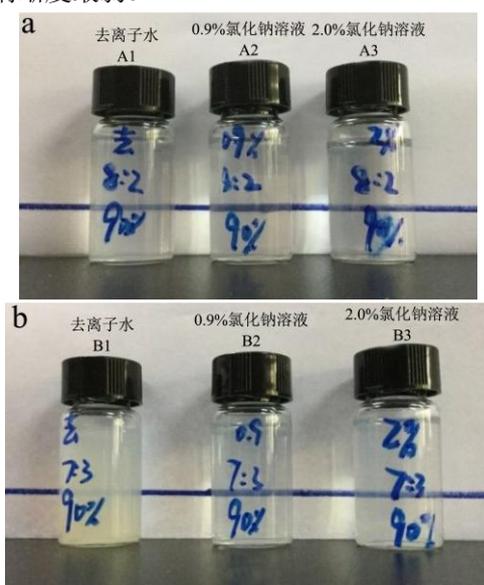


图3 离子强度对M-EO形成的影响

Fig.3 Effects of ionic strength on pseudoternary phase diagrams

Note: (a) $K_m = 3:1$, $S_{mix} = 8:2$, water%=90%. (b) $K_m = 3:1$, $S_{mix} = 7:3$, water%=90%.

图3中,在 $K_m=3:1$ 和 $S_{mix}=8:2$,水分含量为90%的条件下,A2与A3的透明度高于A1;同时,当 $K_m=3:1$ 和 $S_{mix}=7:3$,水分含量为90%时,B2和B3的清晰透明度明显优于B1。因此,在低离子强度下,随着离子强度的升高,体系的微乳化效果更好,这是由于低浓度的氯化钠溶液会迫使表面活性剂与水相分离,而与更多的油相形成反胶束,增加油相的载入,乳化效果更好。但是,当盐度过高,离子强度过大时,其对非离子型微乳液体系影响会较大。这是因为高浓度的盐溶液会产生盐析作用,降低表面活性剂的亲水能力,使其微乳形成能力减弱^[24]。

2.3 M-EO 构型的确定及其理化性质

2.3.1 M-EO 构型的确定

图4表示当 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$ 时,体系中电导率和粘度随水含量增加的变化趋势。

电导率的测定可以揭示微乳液体系的相变转化。由图4可知,体系的电导率在水含量小于30%时缓慢增加;当水含量在30%至60%时,电导率变化曲线斜率最大,随后增加速度减缓;当水含量大于70%,电导率有回落趋势。该变化规律表明,当水含量超过70%时,体系为O/W型微乳液。这是由于在低含水量的非离子型微乳液中,水相为内相,油相为连续相(W/O型)。电场作用下,小液滴在油相中泳动,碰撞时内核中的电解质离子穿过界面膜发生跃迁,随着电解质离

子增加,离子跃迁次数增加,导致电导率逐渐上升。当水含量继续增加,液滴进一步膨胀,界面膜曲率增加,强度降低,电解质离子容易穿透,颗粒间相互距离接近,使得液滴间相互连接,形成导电链,电导急剧上升,使得电导率快速升高(B.C型)。接着导电链发展完善,随水含量继续增加,电导率的缓慢上升仅由于增加电解质溶液的结果。当再增加水含量后,体系中导电离子是O/W型微颗粒,水分的增加导致体系不断被稀释,微乳液滴浓度降低,导致电导率下降^[25]。

同样,图4中的粘度变化规律与电导率变化规律相似。当水分含量低于30%时,体系粘度缓慢增加;当含水量超过30%,粘度上升速度显著提升,在50%处达到最大值,随后急剧降低;当水分含量达到70%后,粘度变化变缓。一开始粘度的缓慢增加是由于W/O型液滴体积增加,液滴间相互作用力增大;随后的急剧增加则是因为随着水含量继续增加,分散颗粒增大,小球团形成,相互作用力增强(B.C型);突然的降低则是因为B.C型乳液向O/W型转变,此时以水相为连续相;水含量超过70%时,体系中的粘度变化则是由于更小的液滴的形成以及O/W型液滴的进一步稀释。通过电导率和粘度的测定可知,O/W型微乳液的水分含量在70%左右。

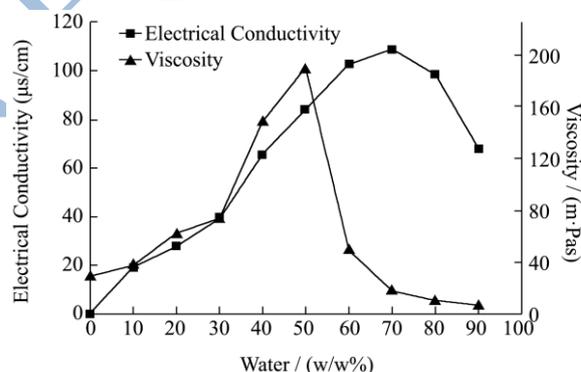


图4 M-EO体系电导率和粘度的变化曲线

Fig.4 The electrical conductivity and viscosity curves of M-EO with different water content

Note: $K_m=3:1$, $S_{mix}=9:1$.

2.3.2 M-EO 的稳定性和理化性质

稳定性是微乳液体系的重要参数,可作为该微乳液体系质量的评价指标。制备好的微乳液在室温下平衡24h,筛选出无可见浑浊或沉淀的样品。随后通过小型高速冷冻离心机在4000g的条件下离心10min,没有分层现象。

2.3.3 M-EO 的理化性质

为了获得O/W型微乳液体系来改善精油水溶性差的问题以及进一步评估所制M-EO的性质,测定了

$K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$, 含水量为 70% 配方组分样品的粘度, 电导率, 粒径, 以及用去离子水稀释 100 倍和 200 倍后其粒径和 PDI 值的变化, 其结果如表 2 所示。微乳液的原始粒径为 16.50 ± 0.53 nm, 经过 100 倍、200 倍稀释后, 粒径均有小幅度减小。样品的 PDI 值变化规律显示原始样和稀释样的 PDI 值约为 0.3, 说明该微乳体系具有较理想的均匀性。由此判断, 所选的 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$, 水分含量为 70% 的香茅草精油配方组分是较稳定、均匀、理想的微乳体系。

表 2 香茅草精油微乳液的理化性质

Table 2 Physicochemical parameters of M-EO

Parameter	Value		
	Initial	100 times	200 times
Viscosity/(mPa/s)	15.50 ± 0.11		
Conductivity/(μ S/cm)	108.90 ± 0.21		
Particle size/nm	16.50 ± 0.53	11.07 ± 0.19	11.66 ± 0.93
PDI	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.03

注: 结果表示为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)。

2.4 C-EO 及其微乳液的体外抗氧化活性研究分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力的测定

本实验选择 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$, 水分含量分别为 15%, 50%, 70% 的微乳体系作为研究 C-EO 及其微乳液 DPPH 自由基清除能力的对象。

C-EO 及其微乳液对 DPPH 自由基的清除能力如图 5 所示。图中表示 C-EO 及其不同水分含量 M-EO 的 DPPH 自由基清除率的 EC_{50} 值, 其中 C-EO 的 EC_{50} 值约为 0.26 mg/mL, 显著低于其微乳液。表明 C-EO 的 DPPH 自由基抑制率优于其微乳液。在其三个配方组分的微乳液中, 70% 组分和 50% 组分均显著优于 15% 的组分。同时, 本实验也采用抗坏血酸作为阳性对照 (图 5B), 以 Vc 当量表示 DPPH 自由基清除效果。其中 C-EO 的 Vc 当量约为 162.88 μ mol Vc equiv/g, 70% 和 50% 水分含量微乳的 Vc 当量相当, 分别约为 23.97 μ mol Vc equiv/g, 22.94 μ mol Vc equiv/g, 而 15% 的组分活性最低。这可能是由于 DPPH 自由基清除实验以无水乙醇溶解样品和标准品, 脂溶性的精油可直接发生反应, 因此优于已组成颗粒的微乳液。而不同水分含量的微乳液的活性差异源于水分含量较高的组分, 其颗粒较均匀, 稳定性好; 而 70% 配方组分与 50% 配方组分活性相当, 主要是因为相对于 O/W 型的 70% 配方组分, 脂溶性环境更利于 50% 配方组分 (B.C 型微乳液); 15% 水分含量的组分由于油相成分过高, 其

流动性和均匀度都低于水分含量较高的组分, 因此 DPPH 自由基清除效果次于 70% 和 50% 的配方组分。

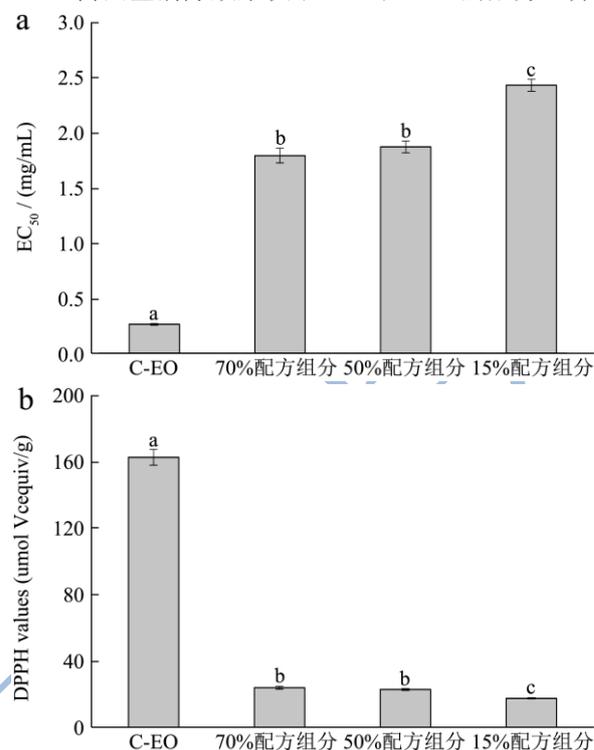


图 5 C-EO 及其微乳液的 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 The DPPH radical scavenging activity of C-EO and its microemulsions. (a) The EC_{50} value of DPPH radical scavenging rate. (b) The ascorbic acidequivalent of DPPH radical scavenging ability.

注: a, b, c 表示不同样品间抗氧化活性的显著性 ($p < 0.05$), 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著性差异。

3.4.2 氧自由基和过氧自由基清除能力的测定 (ORAC 和 PSC 法)

由于本研究是为改善脂溶性精油在水溶性环境中运用, 因此选择水溶性 ORAC 和 PSC 方法比较 C-EO 和 M-EO 的抗氧化活性, 其结果如图 6 所示。

图 6a 表示 C-EO 及其微乳液的 ORAC 值, 前者的 ORAC 值约为 0.35 μ mol Trolox equiv/mg, 显著低于其微乳液的 ORAC 值 (70% 配方组分: 1.94 μ mol Trolox equiv/mg; 50% 配方组分: 1.11 Trolox equiv/mg)。类似的结果也在图 6B 中样品的 PSC 值中体现: C-EO 的 PSC 值为 1.53 Vc equiv/g, 其微乳液中 70% 配方组分的 PSC 值达 32.15 Vc equiv/g, 50% 配方组分达 28.16 Vc equiv/g, 即 M-EO 的活性均显著优于香茅草自身的抗氧化活性。香茅草精油微乳液对氧自由基和过氧自由基的清除能力高于其精油本身, 主要是 ORAC 和 PSC 法是在水溶性体系中进行, 而微乳液的形成克服了精油水溶性差的特点, 提高了精油在水环境中清除自由基的能力。

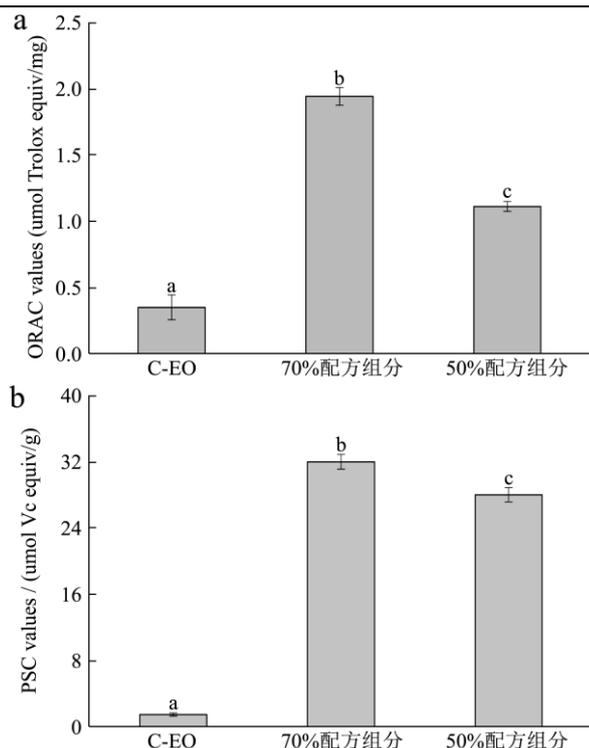


图6 C-EO及其微乳液对氧自由基和过氧自由的基清除能力

Fig.6 The Oxygen radical and peroxy radical scavenging capacity of C-EO and its microemulsions. (a) The ORAC value. (b) The PSC value

注: a, b, c 表示不同样品间抗氧化活性的显著性($p < 0.05$), 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著性差异。

水分含量高的配方组分显示出更高的抗氧化活性是因为70%配方组分的M-EO是O/W型微乳液, 相对于50%配方组分(B.C型)微乳液具有更高均一度的颗粒和均匀的体系, 有利于样品发挥其活性作用。本文是首次采用ORAC值和PSC值方法评价香茅草及其微乳液的抗氧化能力的报道, 因为ORAC和PSC方法均采用ABAP作为自由基, 其产生的自由基性质更接机于生物体内产生的自由基, 其可更好的分析抗氧化物质对由氧或过氧自由基引起的机体损伤的抑制, 为今后开发香茅草精油为功能性食品或者药品提供理论基础^[26]。

3 结论

本文采用水蒸馏法提取C-EO, 并用GC-MS技术分析精油主要挥发性成分。结果表明其主要物质有(+)-香茅醛(35.69%), 香叶醇(16.56%), D-芳香醇(12.47%), D-柠檬烯(3.77%)。随后制备并优化精油的M-EO体系, 最终挑选出由C-EO, Tween 80, 无水乙醇, 去离子水组成, 且 $K_m=3:1$, $S_{mix}=8:2$, 水分含量为70%的O/W型的稳定均一的理想微乳液。本研究最后通过DPPH, ORAC及PSC法分析比较

C-EO及M-EO的体外抗氧化作用。结果显示, M-EO在水相环境中的抗氧化活性显著优于C-EO, 具有开发为天然抗氧化剂的潜力。本文构建的微乳液体系, 解决了C-EO在应用过程中水溶性差等问题, 拓展了其在食品、保健品和化妆品等领域的应用。关于精油其他生物活性是否增强, 则需再进一步的研究。

参考文献

- [1] 王羽梅. 中国芳香植物[M]. 北京: 科学出版社, 2008
WANG Yu-mei. Aromatic plants of China [M]. Beijing: Science Press, 2008
- [2] 张雪梅, 胡志宇. 我国香茅属植物研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(5): 14-15
ZHANG Xue-mei, HU Zhi-yu. The citronium research progress in China [J]. Chinese Journal of Ethno-medicine and Ethnopharmacy, 2009, 18(5): 14-15
- [3] Adukwu E C, Bowles M, Edwards-Jones V, et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(22): 9619-9627
- [4] Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, et al. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(7): 2511-2517
- [5] Prince L. Microemulsions Theory and Practice [M]. NY Academic Press, 1977
- [6] Shakeel F, Ramadan W, Faisal M S, et al. Transdermal and topical delivery of anti-inflammatory agents using nanoemulsion/microemulsion: an updated review [J]. Current Nanoscience, 2010, 6(2): 184-198
- [7] 付婷婷. 番茄红素微乳的制备及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012
FU Ting-ting. Study on the configuration-changing and stability of lycopene in the process of microemulsion preparation and storage [D] Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [8] 魏娟, 苏海兰, 张溪桐, 等. 姜黄精油的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 141-144
WEI Juan, SU Hai-lan, ZHANG Xi-tong, et al. Study on antioxidant activity of turmeric essential oil [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 141-144
- [9] Ma Q, Zhong Q. Incorporation of soybean oil improves the dilutability of essential oil microemulsions [J]. Food Research International, 2015, 71: 118-125
- [10] Guo R X, Fu X, Chen J, et al. Preparation and

- characterization of microemulsions of myricetin for improving its antiproliferative and antioxidative activities and oral bioavailability [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(32): 6286-6294
- [11] Zhang H, Taxipalati M, Que F, et al. Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 3050-3055
- [12] Wang B N, Liu H F, Zheng J B, et al. Distribution of phenolic acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(4): 1288-1292
- [13] Dávalos A, Gámez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(1): 48-54
- [14] Adom K K, Liu R H. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(17): 6572-6580
- [15] 廉晓红,李德山,窦玉琴,等.香茅草提取物的免疫调节作用与肿瘤抑制作用[J].*沈阳药科大学学报*,2005,22(4):295-297
LIAN Xiao-hong, LI De-shan, DOU Yu-qin, et al. The effects of immunomodulation and inhibition on tumor of the extract from *Cymbopogon Titrtus(DC.)* [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2005, 22(4): 295-297
- [16] Olorunnisola S K, Asiyambi H T, Hamed A M, et al. Biological properties of lemongrass: an overview [J]. *International Food Research Journal*, 2014, 21(2): 455-462
- [17] Somparn N, Saenthaweesuk S, Naowaboot J, et al. Effects of *Cymbopogon citratus Stapf* water extract on rat antioxidant defense system [J]. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2014, 97 Suppl 8(4): S57
- [18] Mirghani M E S, Liyana Y, Parveen J. Bioactivity analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil [J]. *International Food Research Journal*, 2012, 19(2): 569-575
- [19] 彭顺金,张贵军,陈正国,等.Span及Tween的组成、性能、表征与应用[J].*表面活性剂工业*,1998,1:12-16
PENG Shun-jin, ZHANG Gui-jun, CHEN Zheng-guo, et al. Composition, properties, characterization and application of the span and the tween [J]. *Journal of Surfactant Industry*, 1998, 1: 12-16
- [20] Gradzielski M. Effect of the cosurfactant structure on the bending elasticity in nonionic oil-in-water microemulsions [J]. *Langmuir*, 1998, 14(21): 6037-6044
- [21] Spemath A, Aserin A, Garti N. Fully dilutable microemulsions embedded with phospholipids and stabilized by short-chain organic acids and polyols [J]. *J Colloid Interface Sci.*, 2006, 299(2): 900-909
- [22] Alany R G, Rades T, Agatonovic-Kustrin S, et al. Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196(2): 141-145
- [23] 王浩.丁香油乳化体系的制备及抗菌特性的研究[D].无锡:江南大学,2014
WANG Hao. Preparation and antimicrobial activities of clove oil emulsion system [J]. Wuxi: Jiangnan University, 2014
- [24] Fanun M. Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2008, 139(1-3): 14-22
- [25] Fang J, Venable R L. Conductivity study of the microemulsion system sodium dodecyl sulfate-hexylamine-heptane-water [J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 1987, 116(1): 269-277
- [26] Dudonnés S, Vitrac X, Coutière P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(5): 1768-1774