

## 牛至精油 $\beta$ 环糊精微胶囊的制备及其抑菌效果研究

卢燕霞, 田永强, 刘惠琴, 张阿强, 徐力  
(兰州交通大学, 兰州 730070)

**摘要:** **目的** 制备牛至精油  $\beta$  环糊精( $\beta$ -CD)微胶囊, 并研究其抑菌效果。 **方法** 首先, 选用  $\beta$ -CD 包埋牛至精油, 通过扫描电镜观察该包埋物的外部形貌特征。其次, 通过薄层色谱、红外光谱等2种方法考察是否已成功制备牛至精油  $\beta$  环糊精的微胶囊。然后, 通过紫外分光光度计测定该包埋物的吸光度, 按照一定的方法计算其包埋率。最后, 选用大肠杆菌、米曲霉菌作为供试菌株, 研究该包埋物的抑菌效果。 **结果** 牛至精油  $\beta$  环糊精微胶囊得到成功制备, 其包埋率为73%, 并且该包埋物具有较好的抑菌效果。 **结论** 实验达到了预期目的, 即在保留牛至精油抑菌性能的同时, 也使得液体的牛至精油固体粉末化。

**关键词:**  $\beta$ -CD; 牛至精油; 微胶囊; 抑菌

**中图分类号:** TS225.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2016)05-0084-05

## Preparation of Oregano Essential Oil / Beta-cyclodextrin Microcapsule and Its Antimicrobial Activity

LU Yan-xia, TIAN Yong-qiang, LIU Hui-qin, ZHANG A-qiang, XU Li  
(Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

**ABSTRACT:** The objective of the test was to prepare the microcapsule of beta-cyclodextrin / oregano essential oil and study its antimicrobial activity. First, Beta-cyclodextrin was selected as the embedding material to get the oregano oil microcapsule. Second, SEM was used to observe the external appearance of the inclusion complex. Next, the two methods of TLC and IR were used to check whether the complex was successfully prepared or not. Then the embedding rate was determined with the help of UV spectrophotometer and some certain processions. Last, significant antimicrobial activities of the microcapsule were tested against Escherichia coli and Aspergillus oryzae. The microcapsule of beta-cyclodextrin / oregano essential oil was successfully prepared with an embedding rate of 73%, and it had a good antimicrobial effect. The experiment has achieved its expecting purpose, i.e., preparing the liquid of oregano essential oil into be solid power and meanwhile keeping the oil' s antimicrobial activity.

**KEY WORDS:** beta-cyclodextrin; oregano essential oil; microcapsule; antimicrobial activity

牛至精油是一种含有30多种抗菌物质的淡黄色透明液体, 其主要成分是香芹酚和百里香酚<sup>[1]</sup>。香芹酚和百里香酚都是能够抑菌抗菌的物质<sup>[2-5]</sup>, 因此被广泛应用于医药界和食品防腐保鲜等领域<sup>[6-7]</sup>。牛至精油是液态物质, 挥发性强<sup>[8-9]</sup>, 稳定性比较差, 药物持效

性短, 不宜贮藏保存, 这在一定程度上限制了它的应用<sup>[10]</sup>。对于存在的这种问题, 微胶囊技术在很大程度上表现出了它的优越性。微胶囊技术是近些年来兴起的一种新型技术, 它是利用天然的或是半合成的物质作为囊壁材料来包裹液体或是粉末状物质<sup>[11]</sup>。这里

收稿日期: 2015-07-14

基金项目: 甘肃省农业科技支撑项目(1304NKCA156)

作者简介: 卢燕霞(1989—), 女, 甘肃人, 兰州交通大学硕士生, 主攻精油微胶囊的制备及性能研究。

通讯作者: 田永强(1972—), 男, 甘肃人, 兰州交通大学教授, 主要研究方向为生物化学与微生物工程。

采用饱和水溶液法对牛至精油进行包埋,使液体物质固体粉末化,为牛至精油的应用奠定一定的基础。

## 1 实验

### 1.1 材料与设备

实验材料:牛至精油,购于华美天然植物油提炼厂,江西省吉安市青原区值夏开发区;大肠杆菌、米曲霉菌由兰州交通大学化学与生物工程学院毒理学实验室提供;无水乙醇、二甲基亚砜、正己烷、丙酮、磷钼酸等药品,均为分析纯。

实验设备:数显恒温水浴锅(HH-4)、真空干燥箱、电子分析天平、生化培养箱(GNP-9080)、立式蒸汽压力灭菌器(LDZX-50FA)、冷场发射型扫描电镜(JSM-6701F)、紫外分光光度计、红外光谱仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牛至精油标准曲线的绘制

用无水乙醇配置一定浓度的牛至精油溶液,进行全波长扫描,已知276 nm为牛至精油的最大吸收波长。精确量取0.5 mL牛至精油至50 mL的容量瓶中,用无水乙醇定容,摇匀,贴上标签“原液”;从原液中分别精确量取0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL于6个50 mL的容量瓶中,依次贴上标签1, 2, 3, 4, 5, 6;将6个容量瓶用无水乙醇定容,摇匀,276 nm处测定牛至精油的无水乙醇溶液中香芹酚的紫外吸光度。

以牛至油中香芹酚的质量浓度为横坐标,牛至油中香芹酚的紫外吸光度标准曲线见图1,得到标准曲线方程为 $y=0.2882x+0.0038$ ,  $R_2=0.9998$ 。

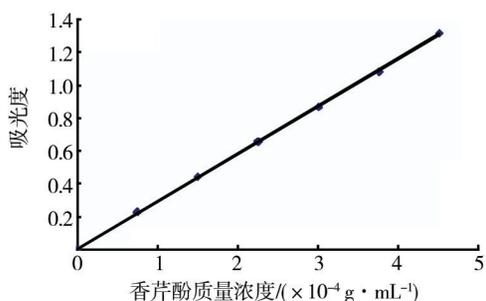


图1 牛至油中香芹酚的紫外吸光度标准曲线

Fig.1 UV absorbance standard curve of carvacrol in oregano oil

#### 1.2.2 牛至精油 $\beta$ -CD微胶囊的制备

称取4 g  $\beta$ -CD,用60  $^{\circ}\text{C}$ 的水将其溶解,制成 $\beta$ -CD的饱和水溶液。量取一定量牛至精油,用无水乙醇将其溶解。将 $\beta$ -CD的饱和水溶液置于45  $^{\circ}\text{C}$ 的

水浴中,在转速为300 r/min的条件下,将牛至精油无水乙醇溶液逐滴滴入 $\beta$ -CD溶液中,搅拌一段时间后,取出置于5  $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中静置过夜。抽滤,用无水乙醇洗涤3次,真空干燥即得微胶囊产品<sup>[12-13]</sup>。

#### 1.2.3 牛至精油 $\beta$ -CD微胶囊包埋率的测定

称取0.1 g微胶囊产品,研碎于10 mL无水乙醇中,浸泡24 h,使牛至精油充分释放,将该液用无水乙醇定容至50 mL,标记为 $P_1$ ,从 $P_1$ 中取10 mL溶液在2000 r/min的条件下离心10 min,取上清液5 mL用无水乙醇定容至50 mL,标记为 $P_2$ ,276 nm下测定该牛至精油包埋物的无水乙醇提取液中香芹酚的紫外吸光度,平行制作3组,求平均值并带入牛至精油标准曲线即得包埋率<sup>[14]</sup>。微胶囊包埋率(%)=(被包裹入微胶囊的精油总量/开始加入精油的总量) $\times 100\%$ <sup>[8]</sup>。

#### 1.2.4 扫描电镜

分别取适量 $\beta$ -CD以及 $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊的粉末,以乙醇分散喷金后进行扫描电镜。

#### 1.2.5 薄层色谱法

以二甲基亚砜( $\beta$ -CD和牛至精油均可被其溶解)为溶剂,分别溶解 $\beta$ -CD、牛至精油、 $\beta$ -CD和牛至精油的物理混合物作为对照组,再以二甲基亚砜为溶剂溶解 $\beta$ -CD/牛至精油的包埋物作为实验组,吸取上述4种溶液5 mL分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷和丙酮体积比为5:1的试剂为展开剂,展开,取出,吹干,以磷钼酸乙醇(5%)溶液为显色剂,显色条件为在110  $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中放置5~10 min至有清晰可见的斑点出现,取出观察<sup>[15-16]</sup>。

#### 1.2.6 红外光谱法

取适量干燥的 $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊粉末用KBr研磨,压片后绘制红外光谱图<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.7 培养基

分别制备牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯(PDA)培养基备用<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.8 抑制大肠杆菌和米曲霉菌效果实验

制备一定浓度的大肠杆菌菌悬液将其涂布于溶解有一定量微胶囊的牛肉膏蛋白胨培养基中,湿度一定,37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24~36 h,直接计数法测定大肠杆菌的菌落数,平行制作3组实验。同时进行空白对照实验。

用直径为1 cm的经高温灭菌的打孔器于无菌条件下制备番茄灰霉菌柄,用镊子轻轻夹取菌柄将其轻放于已制备好的溶解有一定量微胶囊的PDA培养基中,并轻轻按压,使菌柄与培养基之间没有空隙。在28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养5~7 d,十字交叉法量取菌落直

径,同时进行空白对照实验,平行制作3组实验,结果取3组实验的平均值,即知该微胶囊的抑菌效果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 包埋率

$P_2$ 溶液的紫外吸光度平均值 $A=0.5243$ ,带入牛至精油中香芹酚的紫外吸光度标准曲线算得 $X_2=1.81 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ ,所以 $P_1$ 中香芹酚的质量浓度 $X_1=1.81 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ ,则 $P_1$ 中香芹酚的质量为 $m=X_1V=0.09 \text{ g}$ ,实验中干燥后所得产品的质量为 $2.4291 \text{ g}$ ,因此干燥产品中香芹酚的质量为 $2.19 \text{ g}$ ,牛至油中香芹酚的质量分数为 $80\%$ ,故该产品中牛至精油的质量为 $2.74 \text{ g}$ ,由包埋率计算公式得知该产品的包埋率为 $73\%$ 。

### 2.2 扫描电镜

$\beta$ -CD的扫描电镜见图2a, $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊的扫描电镜见图2b,可以看出,市售 $\beta$ -CD的结构是不规则、大小不均、块状或片层状的,而微胶囊是小的颗粒状,且其表面近于光滑。

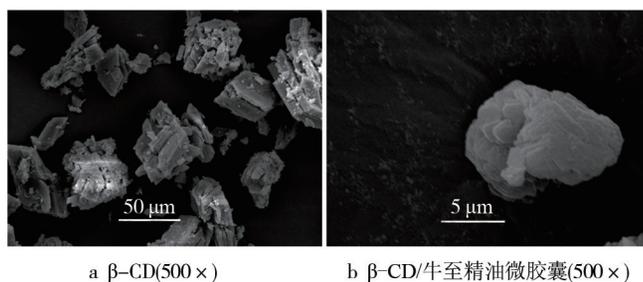


图2 扫描电镜(20 kV)

Fig.2 SEM images of  $\beta$ -CD and  $\beta$ -CD/oregano oil microcapsule

### 2.3 薄层色谱

在薄层色谱层析实验中,牛至精油与物理混合物在相同位置均出现了可见斑点,而包埋物和 $\beta$ -CD在相应位置并没有可见斑点。由此得出结论:牛至精油对照组、牛至精油与 $\beta$ -CD物理混合物对照组中出现的可见斑点是牛至精油作用的效果;包埋物实验组中并没有游离的牛至精油存在, $\beta$ -CD已经将牛至精油包埋,即已成功制得了 $\beta$ -CD/牛至精油的包埋物;二甲基亚砷不会使 $\beta$ -CD/牛至精油包埋物发生解离。

### 2.4 红外光谱

$\beta$ -CD是由7个葡萄糖分子组成的环状中空分

子,若其成功包埋牛至精油形成包埋物,只能是O—H键发生作用。 $3670\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$ 为O—H键的伸缩振动吸收, $1420\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$ 为O—H键的弯曲振动吸收<sup>[19]</sup>。

红外光谱见图3, $\beta$ -CD中,O—H键的特征伸缩振动吸收峰为 $3388 \text{ cm}^{-1}$ ,而在包埋物中,这个特征峰增加到了 $3394 \text{ cm}^{-1}$ ;另外, $\beta$ -CD中,O—H键的特征弯曲振动吸收峰为 $1411 \text{ cm}^{-1}$ ,而包埋物中相应的特征峰增加到了 $1417 \text{ cm}^{-1}$ 。羟基与氢键的结合导致了振动频率的下降,红外吸收峰向长波移动,羟基与氢键结合强度越大,长波移动越严重<sup>[20]</sup>。物理混合物的红外谱图综合了牛至精油和 $\beta$ -CD的谱图,但是明显区别于包埋物的谱图,由此可见, $\beta$ -CD/牛至精油包埋物已经成功制得。

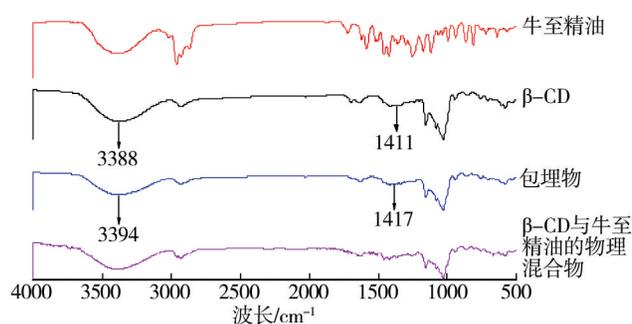


图3 红外光谱

Fig.3 IR spectra

### 2.5 $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊抑制大肠杆菌

$\beta$ -CD/牛至精油微胶囊抑制大肠杆菌结果见表1,可以看出包埋物具有很好的抑菌效果,同时,加入 $\beta$ -CD也表现出了一定的抑菌效果,并且,随着 $\beta$ -CD添加量的增加,抑菌率稍有减小。这是因为随着 $\beta$ -CD的加入,增加了碳源的比例,打乱了大肠杆菌生长所需的正常的营养平衡,所以该组表现出了一定的抑菌效果。

表1  $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊抑制大肠杆菌结果

Tab.1 Antimicrobial Results of the microcapsules on *E. coli*

组别	菌落数/个	菌落平均数/个	抑菌率/%
1.00 g $\beta$ -CD, 100 mL	201 265 284	250	26
1.00 g 包埋物, 100 mL	0 0 0	0	100
2.00 g $\beta$ -CD, 100 mL	140 315 360	272	20
2.00 g 包埋物, 100 mL	0 0 0	0	100
空白组	312 358 347	339	0

## 2.6 $\beta$ -CD/牛至精油微胶囊抑制米曲霉菌

微胶囊抑制米曲霉菌效果见图4,图4a为空白对照,图4b为牛至精油对照组培养了5 d的照片,图4c为牛至精油对照组培养了10 d的照片,图4d为牛至精油包埋物实验组培养了10 d的照片,可以得知添加1.00 g包埋物中所含有的牛至精油量的对照组初始效果好,但随着时间的延长,其效果越来越差(如图4b和4c),而牛至精油经微胶囊化后具有良好而持久的抑菌效果。

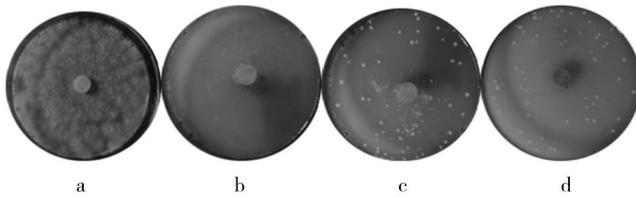


图4 微胶囊抑制米曲霉菌效果

Fig.4 Antimicrobial effects of the microcapsule on *Aspergillus oryzae*

以 $\beta$ -CD为壁材,采用饱和水溶液法制备牛至精油微胶囊,操作简便,易于掌握。 $\beta$ -CD的水溶性不是很好,并且随温度的变化比较大,温度升高时,其溶解性增大,但过高的温度会导致 $\beta$ -CD变性,因此实验选择了在60℃下溶解 $\beta$ -CD。按照此方法制备的微胶囊的包埋率为73%。

实验中,将 $\beta$ -CD溶解在培养基中作为对照组,将牛至精油 $\beta$ -CD微胶囊溶解在培养基中作为实验组,同时设有空白对照,采用直接计数法确定大肠杆菌的数目,进而来观察牛至精油微胶囊对大肠杆菌的抑菌效果,结果证明该微胶囊具有良好的抑菌效果。

## 3 结语

牛至精油微胶囊具有广阔的应用前景,若将以 $\beta$ -CD为壁材通过饱和水溶液法制备的牛至精油微胶囊适量添加到饲料中,从长远看,既经济又高效。目前批量化生产牛至精油微胶囊的实现还存在的问题,有待进一步研究。

### 参考文献:

[1] 何兰花. 新型植物抗生素——牛至油[J]. 饲料研究, 2003(12): 24—25.  
HE Lan-hua. New Plant Antibiotics: Oregano Oil[J]. Feed Research, 2003(12): 24—25.

[2] 朱斌,陈向炜,刘迎新. 牛至油化学成分、药理活性剂提取

方法研究进展[J]. 中药材, 2007, 30(8): 38—41.

- ZHU Bin, CHEN Xiang-wei, LIU Ying-xin. Study on the Chemical Constituents and Pharmacological Agents Extraction of Oregano Essential Oil[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(8): 38—41.
- [3] 顾仁勇,刘莹莹. 牛至精油抑菌及抗氧化性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 50—53.  
GU Ren-yong, LIU Ying-ying. Study on the Anti-oxidation and Bacteriostasis of Origanum Vulgare L Essential Oil[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(10): 50—53.
- [4] 卢立新,王志伟. 气调包装果蔬贮藏寿命预测[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 179—181.  
LU Li-xin, WANG Zhi-wei. Estimation of Shelf Life of Fruits and Vegetables in Modified Atmosphere Packaging[J]. Food Science, 2004, 25(6): 179—181.
- [5] 王太明,孙蕾,刘元铅. 大樱桃微气调贮藏技术研究[J]. 山东林业科技, 2002(1): 1—7.  
WANG Tai-ming, SUN Lei, LIU Yuan-qian. Study on the Micro Controlled Atmosphere Storage Technology of Cherry[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2002(1): 1—7.
- [6] DOMAN H J D, DEANS S G. Antimicrobial Agents from Plants: Antimicrobial Activity of Plant Volatile Oils[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 308—316.
- [7] PASTER N, MENASHEROV M, RAVID U, et al. Antifungal Activity of Oregano and Thyme Essential Oils Applied as Fungicides Against Fungi Attacking Stored Grain[J]. Food Protect, 1995, 58(1): 81—85.
- [8] 张玉玉,孙宝国,祝钧. 牛至精油挥发性成分的GC-MS与GC-O分析[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 275—277.  
ZHANG Yu-yu, SUN Bao-guo, ZHU Jun. Analysis of Volatile Compounds of Essential Oil from Origanum Vulgare L by GC-MS and GC-O[J]. Food Science, 2009, 30(16): 275—277.
- [9] 王建清,赵亚珠,金政伟. 牛至精油涂膜瓦楞纸箱对草莓保鲜效果的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 26—30.  
WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu, JIN Zheng-wei. Study on Fresh-keeping Effect of Strawberry to Red in Corrugated Box Coated with Oregano Oil[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(2): 26—30.
- [10] 刘光发,王建清,赵亚珠. 牛至精油微胶囊的制备及其抑菌效果的研究[J]. 包装工程, 2012, 33(3): 19—22.  
LIU Guang-fa, WANG Jian-qing, ZHAO Ya-zhu. Preparation and Antimicrobial Activity Study of Oregano Oil Microcapsule [J]. Packaging Engineering, 2012, 33(3): 19—22.
- [11] 唐新军. 微胶囊技术在防护服装的应用[J]. 山东纺织科技, 2014(1): 37—39.  
TANG Xin-jun. Application of Microcapsule Technology in Protective Clothing[J]. Shandong Textile Science and Technol-

- ogy, 2014(1):37—39.
- [12] 余露,谭书明,王贝贝.复合精油微胶囊化及释放动力学研究[J].食品工业科技,2013(6):31—33.  
YU Lu, TAN Shu-ming, WANG Bei-bei. Microencapsulation and Release Kinetic Equation of Compound Oil[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013(6):31—33.
- [13] 陈燕,陈计峦,田金虎.薄荷精油微胶囊包埋工艺研究[J].食品工业,2014,35(4):32—34.  
CHEN Yan, CHEN Ji-luan, TIAN Jin-hu. Research on Microencapsulation of Peppermint Oil[J]. Food Industry, 2014, 35(4):32—34.
- [14] 徐晶,刘欢,夏光辉.β-环糊精包埋柠檬醛微胶囊工艺优化及其缓释性能[J].食品科学,2014,35(14):82—86.  
XU Jing, LIU Huan, XIA Guang-hui. Optimized Microencapsulation in β-cyclodextrin and Sustained-Release Properties of Citral[J]. Food Science, 2014, 35(14):82—86.
- [15] 宋洪涛,郭涛,赵明宏.苏合香β-环糊精包合物的理化性质考察[J].药剂与工艺,2002,33(6):500—502.  
SONG Hong-tao, GUO Tao, ZHAO Ming-hong. Study on Physicochemical Properties of Storax β-cyclodextrin Inclusion Complex[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(6):500—502.
- [16] 王娣,许晖,汪张贵.百里香精油的微胶囊制备及其缓释性能的研究[J].食品科学,2013(6):60—63.  
WANG Di, XU Hui, WANG Zhang-gui. Microencapsulation and Controlled-Release Properties of Thymus Oil[J]. Food Science, 2013(6):60—63.
- [17] DOBNER M, SCHWAIGER S, JENEWEIN H. Antibacterial Activity of Leontopodium Alpinum[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003(9):301—303.
- [18] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.  
SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [19] 蔡元峰,薛纪越.富镁和贫镁坡缕石及其酸浸蚀产物的红外吸收光谱研究[J].地质论评,2005,51(1):92—99.  
CAI Yuan-feng, XUE Ji-yue. FTIR Spectra of Magnesium-rich, Magnesium-poor and Acid Leached Palygorskites [J]. Geological Review, 2005, 51(1):92—99.
- [20] 赵慧峰,祖成奎,刘永华.铝酸钙玻璃中羟基对红外透过性能的影响[J].硅酸盐学报,2015,43(2):201—204.  
ZHAO Hui-feng, ZU Cheng-kui, LIU Yong-hua. Effect of Hydroxyl Groups on Infrared Transmittance of Calcium Aluminate Glasses[J]. Journal of the Chinese Ceramic Society, 2015, 43(2):201—204.

(上接第54页)

- [9] 杨红,关文强,杨家荣.丁香精油及其与壳聚糖复合物对水果采后病原菌的抑制作用[J].植物保护,2006,32(4):70—73.  
YANG Hong, GUAN Wen-qiang, YANG Jia-rong. Inhibitory Effect of Clove Oil and Its Combination with Chitosan on the Pathogens of Postharvest Fruits[J]. Plant Protection, 2006, 32(4):70—73.
- [10] 周德庆.微生物学实验教学[M].北京:高等教育出版社,2006.  
ZHOU De-qing. Experimental Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [11] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,2002.  
HUANG Wei-kun. Food Testing and Analysis[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2002.
- [12] 黄玲,林桂顺,刘淑芳.单凝聚法制备壳聚糖-艾蒿油微胶囊抗菌剂的研究[J].印染助剂,2006,23(12):13—15.  
HUANG Ling, LIN Gui-shun, LIU Shu-fang. Research on the Preparation of Chitosan-Artemisiaargyllem Oil Microcapsule Anti-Bacterial Agent by Monophase Coagulation[J]. Textile Auxiliaries, 2006, 23(12):13—15.
- [13] 薛琼,邓靖,赵德坚,等.壳聚糖包覆肉桂精油对葡萄保鲜的应用研究[J].包装学报,2015,7(1):12—17.  
XUE Qiong, DENG Jing, ZHAO De-jian, et al. Research on Effects of Chitosan Coated Cinnamon Essential Oil Applied in Grape Storage[J]. Packaging Journal, 2015, 7(1):12—17.