

肉桂醛微乳的制备及其抑菌活性研究

吴敬超¹, 欧阳五庆^{1*}, 芮弦¹, 刘梅雪¹, 宋冰¹, 张倩倩²

1. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100

2. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 目的 制备肉桂醛微乳并考察其溶解量、稳定性和抑菌活性。方法 采用相转化法初步筛选出可行的表面活性剂, 再采用伪三元相图法选择最佳的表面活性剂并制样, 用 UV 法测定肉桂醛最大溶解量。用透射电子显微镜观察其形态, 纳米粒度分析仪测量其粒径及分布。在不同处理条件下观察变化以评价其稳定性。通过测定其对不同细菌及真菌的最小抑菌浓度 (MIC) 评价其抑菌活性。结果 制备出澄清透明的肉桂醛微乳, 最佳表面活性剂是聚氧乙烯氢化蓖麻油-40 (RH40); 肉桂醛的最大溶解量是 (98.88±0.31) mg/mL; 肉桂醛微乳的稳定性良好, 在本实验的处理条件下均保持澄清透明; 肉桂醛微乳对所选细菌的 MIC 集中在 125 μg/mL, 对所选真菌的 MIC 介于 16~62 μg/mL。结论 制备的肉桂醛微乳具有较大的载药量、良好的稳定性和较好抑菌效果, 达到预期目标。

关键词: 肉桂醛; 微乳; 抑菌活性; 相转化法; 伪三元相图

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1310-04

Studies on cinnamaldehyde microemulsion preparation and its antibacterial activity

WU Jing-chao¹, OUYANG Wu-qing¹, RUI Xian¹, LIU Mei-xue¹, SONG Bing¹, ZHANG Qian-qian²

1. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Objective To develop cinnamaldehyde microemulsion (CME), study its stability and antibacterial activity, and determine the dissolved amount of cinnamaldehyde in the CME as well. **Methods** The phase inversion method was applied to selecting the feasible surfactants preliminarily, then the pseudoternary phase diagram method was adopted to choose the optimal surfactant, and the maximum absorption of cinnamaldehyde in CME samples was measured by ultraviolet spectrophotometry. The shape of CME was observed by transmission electron microscope (TEM), and the average size and distribution of CME were examined by nanoparticle size analyzer. The stability of CME was evaluated in different conditions. The antibacterial and antifungal activities were determined by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) on different species of pathogenic bacteria and fungi, respectively. **Results** A clear and transparent formulation of CME was developed. RH40 was the optimal surfactant for CME that could contain the maximum cinnamaldehyde at (98.88 ± 0.31) mg/mL. The CME had an excellent stability as it could always keep clear under all the test conditions. The MICs of the CME on bacteria were mainly at 125 μg/mL, while MICs of the CME on fungi were between 16 and 62 μg/mL. **Conclusion** The CME has a relatively high content of cinnamaldehyde with excellent stability and antimicrobial activity, which implies that this study has basically achieved the desired goal.

Key words: cinnamaldehyde; microemulsion; antibacterial activity; phase inversion method; pseudoternary phase diagram

肉桂醛, 又名苯丙烯醛, 是中药肉桂的主要活性成分, 具有良好的抑菌、抗氧化、抗肿瘤等药理活性^[1-2]。由于肉桂醛是难溶于水的易氧化易挥发的油状液体^[3], 影响其保存和临床使用, 使其在医学上的应用受到限制。

微乳 (microemulsion) 是由油相、水相、表面活性剂和/或助表面活性剂组成的粒径在 1~100 nm、热力学稳定且各向同性的透明体系^[4]。微乳能够提高疏水性药物的溶解度, 增强药效和生物利用度, 减少不良反应, 改善药物剂型^[5-6]。本实验在制

收稿日期: 2011-12-14

基金项目: 陕西省重大科技创新专项基金资助项目 (K332020916)

作者简介: 吴敬超 (1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事纳米药物学、细胞生物学研究。E-mail: wujingchao1987@126.com

*通讯作者 欧阳五庆 Tel: (029)87091201 E-mail: oywq506@sina.com

网络出版时间: 2012-04-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120423.1121.001.html>

备肉桂醛微乳的基础上, 考察了其溶解量和稳定性以及抑菌活性, 以期扩大肉桂醛的临床使用剂型, 增强其溶解性、稳定性和抑菌效果。

1 仪器与材料

JB—FY—900 无菌操作台 (苏州佳宝净化工程设备有限公司), 电热恒温培养箱 (黄石市恒丰医疗器械有限公司), TGL—16B 型台式高速离心机 (湖南星科科学仪器有限公司), BS224S 电子天平 (德国 Sartorius 公司), UV2450 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司), JEM—1230 型电子透射显微镜 (日本 JEOL 公司), Zetasizer Nano ZS 分析仪 (英国 Malvern Instrument 公司)。

肉桂醛 (质量分数 98%, 武汉远成共创科技有限公司); 聚山梨酯 20 (上海山浦化工有限公司, 化学纯); 聚氧乙烯脱水山梨醇油酸酯 (聚山梨酯 80, 天津恒兴化学试剂制造有限公司, 化学纯); 山梨糖醇酐油酸酯 (Span 80, 天津市东丽区天大化学试剂厂, 化学纯); 聚氧乙烯氢化蓖麻油-40 (RH40, 北京凤礼精求商贸有限责任公司, 化学纯); 聚氧乙烯蓖麻油-40 (EL40, 天津市浩元精细化工有限公司, 化学纯); 硫酸新霉素 (石家庄峰华医药化工科技有限公司, 质量分数 99%); 酮康唑 (湖北恒硕化工有限公司, 质量分数 99%)。

大肠杆菌、沙门氏菌、痢疾杆菌、无乳链球菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、青霉菌、酿酒酵母均由西北农林科技大学动物医学院提供。

2 方法与结果

2.1 肉桂醛微乳处方筛选

2.1.1 表面活性剂的初选 以肉桂醛为油相, 在 20 °C 分别与一定量的 EL40、RH40、聚山梨酯 20、Span80、聚山梨酯 80 混合均匀, 应用相转化法^[7]逐滴加入蒸馏水, 并不断搅拌, 观察乳液能否透明,

若最终透明且无分层, 即可认为能形成微乳, 选出表面活性剂。结果表明, 在 20 °C 时 RH40、EL40、聚山梨酯 80 均能与肉桂醛形成微乳, 而聚山梨酯 20 和 Span80 与肉桂醛均不能形成微乳, 所以初选出 RH40、EL40、聚山梨酯 80 为表面活性剂。

2.1.2 伪三元相图优选表面活性剂 将初选出的表面活性剂和肉桂醛按质量比 9.8 : 0.2、9.5 : 0.5、9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9 精密称量, 混合均匀, 在室温条件下, 边搅拌边滴加蒸馏水, 直至形成澄清透明的乳液。随着加水量的增加, 体系由澄清变浑浊, 加水达到一定量后, 体系由浑浊又变澄清。记录此时的临界点加水量, 并计算体系中各成分的质量分数。分别以表面活性剂、肉桂醛、水相作为相图的 3 个顶点, 依据它们的质量分数绘制曲线, 曲线闭合形成乳区, 根据乳区的大小确定最佳表面活性剂^[8]。结果显示, 在 RH40、EL40、聚山梨酯 80 分别与肉桂醛形成的微乳体系所对应的伪三元相图的乳区中, 肉桂醛与 RH40 形成的微乳区最大 (图 1)。

2.2 肉桂醛微乳的制备及配方的确定

按照“2.1.2”项伪三元相图中能形成微乳时肉桂醛的最大比例, 精确称取筛选出的最佳表面活性剂和肉桂醛, 在室温条件下, 在烧杯中将肉桂醛与表面活性剂混合均匀, 再向其中缓慢滴加蒸馏水, 边滴加边搅拌。开始时体系黏稠度较小, 随着水量的增加, 体系渐变黏稠和浑浊, 继续滴加蒸馏水并搅拌, 直至体系由黏稠、浑浊变稀薄、澄清, 称量此时的加水量。计算各组分的质量分数以确定配方。结果表明, 肉桂醛与 RH40 以最大形成比例 2.6 : 7.4 进行制备时可以形成稳定澄清透明黄色的肉桂醛微乳, 形成的肉桂醛微乳的配方为 RH40 37.74%, 肉桂醛 9.43%, 蒸馏水 52.83%。

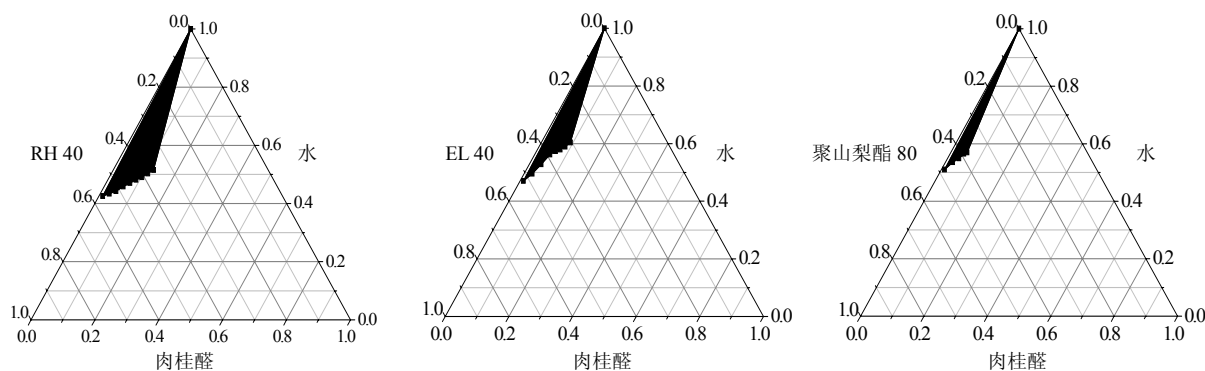


图 1 3 种表面活性剂形成的微乳区面积比较

Fig. 1 Comparison on microemulsion areas formed by three surfactants

2.3 肉桂醛微乳中肉桂醛溶解量的测定

2.3.1 检测波长的选择 称取肉桂醛适量,用无水乙醇溶解后,蒸馏水稀释成 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液;另量取少量的 RH40,用适量蒸馏水溶解。用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 内对此 2 种溶液进行扫描,确定肉桂醛的吸收波长,并观察 RH40 在该波长处是与否有光谱吸收,选定对肉桂醛无影响的吸收波长处为测定肉桂醛的检测波长。扫描的结果是,肉桂醛的最大吸收峰所对应波长是 285.5 nm,且在此波长下 RH40 无紫外吸收,因此,RH40 不干扰肉桂醛的测定。故可以选择 285.5 nm 作为肉桂醛微乳中肉桂醛的检测波长。

2.3.2 线性关系考察 精密称取肉桂醛 100 mg,用无水乙醇定容至 100 mL 量瓶中;精密量取上述溶液,用蒸馏水配成质量浓度为 1、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在 285.5 nm 处测定其吸光度 (A) 值,以 A 值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归,得回归方程 $Y=0.1991X-0.0168$, $r=0.9999$,表明肉桂醛在 1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.3.3 样品中肉桂醛的测定 对“2.2”项所制备的肉桂醛微乳样品用蒸馏水进行适度的稀释后,在 285.5 nm 处测定其 A 值,重复 3 次。根据“2.3.2”项的回归方程,计算出样品中肉桂醛的量,进一步计算出样品中肉桂醛的最大溶解量。测定的结果是用蒸馏水稀释 10 000 倍后的肉桂醛微乳样品,在 285.5 nm 波长下检测的 A 值是 1.952 ± 0.006 ,根据回归方程可知其质量浓度为 $(9.888 \pm 0.031) \mu\text{g}/\text{mL}$,进一步计算可得原肉桂醛微乳样品中肉桂醛的最大质量浓度是 $(98.88 \pm 0.31) \text{mg}/\text{mL}$ 。

2.4 肉桂醛微乳质量评价

2.4.1 肉桂醛微乳形态观察及粒径测定^[9] 取“2.2”项制备的肉桂醛微乳 5 mL,用蒸馏水稀释 5 倍后,经过 2%磷钨酸负染,待样品干燥后在透射电子显微镜下观察其形态。另取肉桂醛微乳 10 mL,用蒸馏水稀释 5 倍后,25 $^{\circ}\text{C}$ 下用纳米粒度分析仪测定其粒径及分布,以上试验重复 3 次。用 Origin Pro 8 软件分析数据。观察结果显示,肉桂醛微乳的形态为球形,乳滴分布均匀,无粘连(图 2);测定结果显示在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,肉桂醛微乳中粒子的粒径在 8.7~24.4 nm,平均粒径为 $(14.0 \pm 0.2) \text{nm}$;多分散系数(PDI)为 0.049 ± 0.006 (图 3)。

2.4.2 肉桂醛微乳稳定性考察 取“2.2”项制备的肉桂醛微乳,在相对湿度 75%时,温度分别为-10、

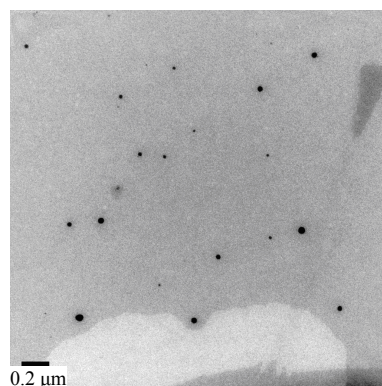


图 2 肉桂醛微乳的透射电镜照片
Fig. 2 TEM micrograph of CME

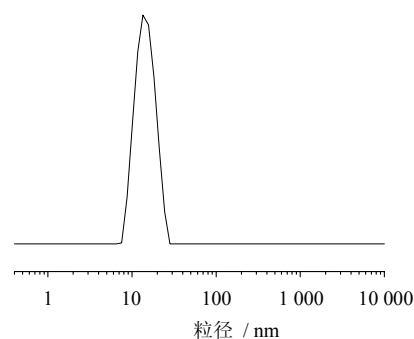


图 3 肉桂醛微乳的粒径分布
Fig. 3 Particle size distribution of CME

4、20、40、60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存^[10],分别在 10、20 d 后观察其外观。另取肉桂醛微乳以 12 000 r/min 离心 30 min,考察其外观变化。在各条件下,每组重复 3 次。结果显示,肉桂醛微乳在温度分别为 4、20、40、60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下经 10、20 d 后仍保持澄清透明,在-10 $^{\circ}\text{C}$ 下冻结,加热融化后能恢复澄清透明。以 12 000 r/min 离心 30 min 后外观无明显可见变化。

2.5 肉桂醛微乳抑菌活性^[11]

2.5.1 药物分组 将“2.2”项所制备的肉桂醛微乳用蒸馏水稀释至质量浓度为 20.00 mg/mL 作为试验组,用 60%乙醇将肉桂醛溶解并稀释至同样质量浓度作为制剂对照组,质量浓度为 1.28 mg/mL 的硫酸新霉素水溶液作为细菌药物对照组,质量浓度为 1.28 mg/mL 的酮康唑作为真菌药物对照组。

2.5.2 对细菌最小抑菌浓度(MIC)的测定 将细菌在普通肉汤培养基中活化并培养至浓度为 9×10^8 cfu/mL,用培养基稀释 10 000 倍。采用二倍稀释法:在 96 微孔培养板的某行第 1 孔加入 180 μL 上述稀释后的菌液,其余孔加入 100 μL 菌液,再向第 1 孔加入待试药物 20 μL ,用微量进样器将第 1 孔吹

打混匀后吸取 100 μL , 加入第 2 孔, 吹打混匀后取 100 μL 加入第 3 孔, 依次重复至第 11 孔, 第 12 孔作为阴性对照。每个药物组重复 3 次。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养 24 h。结果见表 1, 可知肉桂醛微乳对各

种细菌的 MIC 约为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 肉桂醛溶液的 MIC 集中在 250~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 两者差异显著 ($P < 0.05$), 说明微乳剂型使肉桂醛的抑菌效果有显著的提高; 但与硫酸新霉素的抑菌效果相比仍有较大差距。

表 1 肉桂醛对细菌的 MIC 测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of MIC values on bacteria ($n=3$)

药 物	MIC / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	大肠杆菌	沙门氏菌	无乳链球菌	痢疾杆菌	金黄色葡萄球菌	巴氏杆菌
肉桂醛微乳	125	125	125	16	125	125
肉桂醛溶液	250	250	1 000	32	250	500
硫酸新霉素	1	2	32	0.25	32	32

2.5.3 对真菌的 MIC 测定 将白色念珠菌在沙保氏固体培养基上培养后挑取菌落用适量无菌生理盐水震荡混悬, 比浊调整菌液至 5×10^6 cfu/mL, 再用 RPMI 1640 培养液稀释至 5×10^3 cfu/mL。青霉菌、酿酒酵母分别在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上培养后按照同样的方法稀释至 5×10^3 cfu/mL。3 种真菌亦分别用“2.5.2”项中二倍稀释法进行试验。结果见表 2, 可知对于 3 种真菌肉桂醛微乳与肉桂醛溶液的 MIC 差异显著 ($P < 0.05$), 且与酮康唑的抑菌效果相似, 说明肉桂醛微乳显著改善肉桂醛的抗真菌效果。

表 2 肉桂醛对真菌的 MIC 测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of MIC values on fungi ($n=3$)

药 物	MIC / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	酿酒酵母	青霉菌	白色念珠菌
肉桂醛微乳	16	62	32
肉桂醛溶液	32	250	62
酮康唑	16	8	32

3 讨论

本研究初步解决了肉桂醛易挥发易氧化变质的问题, 且肉桂醛微乳在本实验中的低温、高温和高强度离心条件下, 均能保持性状不发生变化, 说明微乳剂型能使肉桂醛更稳定的保存, 扩大了肉桂醛的临床应用前景。肉桂醛微乳增加了肉桂醛在水中的溶解性, 溶解量约 100 mg/mL。本实验针对 6 种常见致病性细菌和 3 种真菌的抑菌试验表明, 肉桂醛微乳的抑菌效果比肉桂醛溶液显著增强, 且抗真菌的效果与常用抗真菌药物酮康唑相当。

参考文献

- [1] 吴海波, 方岩雄, 纪红兵. 助溶剂促进的 β -环糊精与肉桂醛的包结性能 [J]. 化工学报, 2011, 62(S1): 168-173.
- [2] Baskaran S A, Amalaradjou M A R, Hoagland T, et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by *trans*-cinnamaldehyde [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 141(1/2): 126-129.
- [3] 谭龙飞, 文 毓, 黄永杰, 等. 以壳聚糖、麦芽糊精和蔗糖为壁材制备肉桂醛微胶囊 [J]. 食品科学, 2006, 27(1): 115-118.
- [4] Hoar T P, Schulman J H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle [J]. *Nature*, 1943, 152: 102-103.
- [5] 杨惊宇, 严 冬, 罗杰英, 等. 新型药物剂型——微乳 [J]. 中国医学工程, 2005, 13(4): 378-381.
- [6] 华海婴, 杨 婷, 赵永星. 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯亚微乳的制备及其性质考察 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2424-2429.
- [7] Fernandez P, André V, Rieger J, et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2004, 251: 53-58.
- [8] Shah D O, Hamlin R M. Structure of water in microemulsions: electrical, birefringence and nuclear magnetic resonance studies [J]. *Science*, 1971, 171(3970): 483-485.
- [9] Rogulski Z, Siwek H, Paleska I, et al. Electrochemical behavior of manganese dioxide on a gold electrode [J]. *J Electroanal Chem*, 2003, 543(2): 175-185.
- [10] 张文娟, 欧阳五庆, 王金虎. 复合维生素纳米乳的制备及其质量评价 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3): 388-392.
- [11] 戴自英. 临床抗菌药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.