

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА THYMUS VULGARIS, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ТАДЖИКИСТАНЕ, ЭМУЛЬСИОННЫМ СПОСОБОМ

С.Р. Усманова, З.У. Шерова, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов

Институт химии им В.И. Никитина НАН Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан

Управление лекарственными растениями – одна из важнейших стратегий развития биотехнологии и фармацевтики. Понимание взаимосвязи между различными биологическими активными веществами и их функциональными свойствами как лекарство имеет решающее значение для создания новых, эффективных и экологически безопасных препаратов.

Тот факт, что эфирные масла проявляют сильную антимикробную активность, вызвало значительный интерес к их потенциалу в качестве лекарственных средств и натурального консерванта. Однако прямое включение эфирных масел в продукты питания и напитки по-прежнему ограничено из-за их гидрофобности и сильного запаха. Минимизация его негативного влияния на органолептические свойства пищевых продуктов при сохранении высокой антимикробной активности является серьёзной проблемой для пищевой промышленности [1, 2].

Благодаря уникальным природно-климатическим условиям, Республика Таджикистан является производителем широкой номенклатуры эфирноносных растений: герани, лимонника, душицы, тимьяновых и др. содержащие эфирные масла.

Растения рода *Thymus* (Тимьян) хорошо известны своим приятным ароматом и вкусом, а также источниками биоактивных соединений, поэтому они очень популярны в качестве лекарственных средств и ароматизаторов [3, 4]. В высокогорьях Таджикистана растут различные виды этого растения под местным названием «Кокути», внешне схоже с известным видом *Thymus vulgaris*, цветки мелкие, имеют лилово-фиолетовый оттенок обладающие приятным запахом, которые используются в народной медицине в качестве средств выводящие токсические метаболиты и отхаркивающего для лечения заболеваний лёгких, желудка, печени, а также как обезболивающего средства при зубной боли. В настоящее время, чай из «Кокути» часто применяют для понижения артериального давления.



Рис. 1. *Thymus vulgaris* (слева, https://en.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris) и сухие ветки «Кокути» (справа)

В Иране он известен как *Thymus daenensis* Celak, Тимьян Денайский, является эндемичным и находящимся под угрозой исчезновения лекарственным растением, обладающим ценными терапевтическими свойствами в иранской традиционной медицине [3].

Композиции эфирных масел, полученные из надземных частей Тимьяна Денайского, представлены как монотерпены, такие как тимол, карвакрол, α -терпинен, п-цимен, γ -терпинен, 1, 8-цинеол и сесквитерпены, подобные (E) – кариофиллену [3,4].

Эфирное масло *T. daenensis* обладает различными фармакологическими свойствами, в том числе противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми, противораковыми и иммуномодуляторными свойствами [3–5]. Химический состав и выход масла вида *Thymus vulgaris* зависит от ряда факторов, таких как окружающая среда, регион выращивания и методы выращивания. В её составе обнаружены, в основном, гераниол, линалоол, гамма-терпинеол, карвакрол, тимол и транс-туян-4-ол / терпинен-4-ол [6].

Благодаря своим отхаркивающим, спазмолитическим и антисептическим свойствам он особенно широко используется для лечения различных заболеваний дыхательных путей, таких как грипп, простуда, синусит, хронический и острый бронхит, туберкулез, успокаивающий судорожный кашель, а также раздражительный и спазматический кашель. Экстракт тимьяна может быть эффективным средством лечения хронических заболеваний, основанных на воспалительных процессах, когда гиперсекреция слизи подавляет цилиарный просвет и закупоривает дыхательные пути, вызывая заболеваемость и смертность, что может быть применён при профилактике и лечении заражённых вирусом COVID-19. Благодаря своим стимулирующим свойствам он также действует как тонизирующее средство для нервов и используется при астенических состояниях [7].

Для масляных растворов эфирных масел с учётом возможной области медицинского применения в качестве лекарственной формы используют мягкие желатиновые капсулы, чтобы сохранить и доставить липофильные вещества в легкодоступной форме – растворе [8]. Однако такая форма создаёт неудобства пациентам и не пригодна для включения эфирных масел в пищевые продукты. Это недостаток можно исправить нано-и микрокапсулированием компонентов эфирных масел эмульсией масла в воде стабилизированной биополимерами [9,10].

Интерес фармацевтической и пищевой промышленности к нанотехнологиям в последние годы значительно повысился, в связи с новыми достижениями науки в этой области. В недалёком будущем, нанотехнологии будут играть одну из ведущих ролей в качестве движущей силы инноваций в медицине. Более 50 % фармацевтических компаний-производителей, которые активно работают в области наномедицины, используют нанобиотехнологии для разработки систем доставки активных лекарственных веществ к органам и тканям-мишеням. Эти препараты дают сегодня 80 % оборота в мировой наномедицине. Мировой рынок наномедицинских услуг в 2016 году оценивался в 134,4 миллиарда долларов. Прогнозируется, что этот рынок будет расти с совокупным годовым темпом роста (CAGR) в 14,0 % с 2017 по 2022 год и должен достичь 293,1 миллиарда долларов к 2022 году [11].

Небольшой размер наночастиц и изменения их физико-химических свойств по сравнению с их макромолекулярными аналогами предлагают много преимуществ для современной медицины, включая улучшенную доставку лекарств, возможности для лучшей и неинвазивной диагностики и целенаправленное лечение с уменьшенным количеством побочных и системных последствий [12]. Микро- и наночастицы действуют в качестве защищенного транспортного средства для гидрофобных лекарств или терапевтических средств, таких как мРНК, миРНК и ДНК, которые обычно не являются биодоступными.

Как обсуждалось в обзорах [12, 13], многие механизмы участвуют в проявлении антимикробной активности в случае использования наноэмульсий, например тип или концентрация эфирного масла, тип или концентрация эмульгатора, способ инкапсуляции и штамм бактерий. Поскольку конкретный механизм в антимикробной активности инкапсулированных эфирных масел до сих пор не совсем понятен, необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Цель работы – разработка новой технологии микрокапсулирования эфирных масел растения Кокути (*Thymus vulgaris*), заготовленного в Республике Таджикистан.

Для приготовления эмульсионных наночастиц использовался яблочный пектин (ВМЯ), полученный методом флэш-экстракции [14] и охарактеризованный содержанием галактуроновой кислоты (ГК) – 68 %, степенью этерификации (СЭ) карбоксильной группы, равной 52 % и молекулярной массой (Mw) – 130 КД; высокометилованный цитрусовый пектин (ВМЦ) компании Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG, содержанием ГК 87 %, СЭ 71 % и молекулярной массы 85 КД; концентрата β лактоглобулин (β LgC), выделенного из молочной сыворотки с содержанием общего белка 90 %.

Эфирное масло тимьяна получали из сухих надземных частей растения Кокути гидродиффузионным методом [15] с водяным паром на автоклаве при 90–100° С в течение 0.5 часа и давлением 1.2 атм. Микрокапсулы, в системе эмульсии масло / вода (масло Кокути) на основе комплексообразования пектина с концентратом β LgC, получен по методике описанной в работе [16].

Кроме эфирного масла в составе масла Тимьяна также присутствуют другие биологически активные соединения. В изученном образце масла методом капиллярного электрофореза [17] были обнаружены и фенольные соединения в количестве 266.05 мг/л, которые представлены в основном из: 2-(4-Гидроксифенила) этанола, ванилина, эпикатехина, а также гомованиловой, синаповой и сиринговой кислотами.

Эмульсии готовили следующим образом: брали определённый объём масла и белка, смесь гомогенизировали в течение 15 минут при 1200 об/мин и температуре 60° С. В полученную первичную эмульсию, не прекращая гомогенизацию и не меняя температуру, по каплям добавляли определённый объём раствора пектина и гомогенизировали 10 минут при 6000 об/мин и ещё 10 минут при 1200 об/мин. После приготовления каждой эмульсии, измеряли рН и общий объём после охлаждения, которые приведены в таблице 1.

Стабильность эмульсии определяли при хранении в течение недели, а также центрифугированием. 2–3 мл свежеприготовленной эмульсии после достижения комнатной

температуры центрифугировали при 2500 об/мин⁻¹ в течение 10 мин и измеряли объем образовавшегося крема. Таким образом, стабильность эмульсии определяли по формуле:

$$S = 100(V_0 - V)/V_0 \text{ где } S - \text{стабильность эмульсии, \%}; V_0 - \text{объем эмульсии, см}^3; V - \text{объем крема, см}^3.$$

Для характеристики устойчивости микрокапсул, они были суспендированы в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество микрочастиц в объёме одного миллилитра (N) и их средние размеры (D₄₃) были определены на микроскопе Motic type 102 M с помощью программы Motic Image Advanced 3.2. [15].

Таблица 1. Состав и характеристика эмульсий через день после их получения

Состав микро-капсул	Молярное соотношение белок/пектин (моль)	Объемы эмульсии, мл	Объемы эмульсии через день, мл	S, %	D ₄₃ , um	N, количество частиц в мл эмульсии
LgC/ВМЦ	25.0	27.0	22.0	88.8	4.08	12113818
LgC/ВМЦ	16.0	28.0	24.0	92.5	2.59	18772075
LgC/ВМЦ	6.0	28.0	21.0	87.3	6.02	11069523
LgC/ВМЯ	30.0	29.0	21.0	84.5	7.08	8113818
LgC/ВМЯ	18.0	28.0	20.0	87.7	4.59	11772075
LgC/ВМЯ	5.0	20.5	18.2	75.2	8.02	7069523

Из данных таблицы 1 видно, что полученные микрокапсулы содержащие активный ингредиент (масло Тимьяна) в эмульсии масло в воде стабилизированным белком и пектином показали хорошую стабильность при длительном хранении, более двух недель (18 дней). Показано, что максимальный объем эмульсии получается при мольном соотношении белок / пектин 16.0 и 18.0 для ВМЦ и ВМЯ соответственно, хотя другие изученные соотношения белок / пектин показали также высокую стабильность эмульсии. При этих соотношениях формируются минимальные размеры частиц и наибольшее их количество в объёме одного миллилитра, достигающегося более 1.8 миллионов частиц.

Предыдущие исследования показали, что введение в систему натриевых противоионов может привести к экранированию заряда, предотвращающего образование пектиновых агрегатов в растворе. Однако полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии приводит к флокуляции (прилипанию) частиц, что было принято во внимание.

В качестве примера кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин – цитрусовый пектин и лактоглобулин – яблочный пектин представлены на рисунках 1 и 2. Видно, что полученные эмульсии в системе LgC/ВМЦ проявляют бимодальное распределение частиц плавно переходящие в мономодальное при хранении. Профиль распределения микрочастиц в системе с яблочным пектином несколько были широкими и со временем также концентрировались в области 1.8–2.0 микрометра.

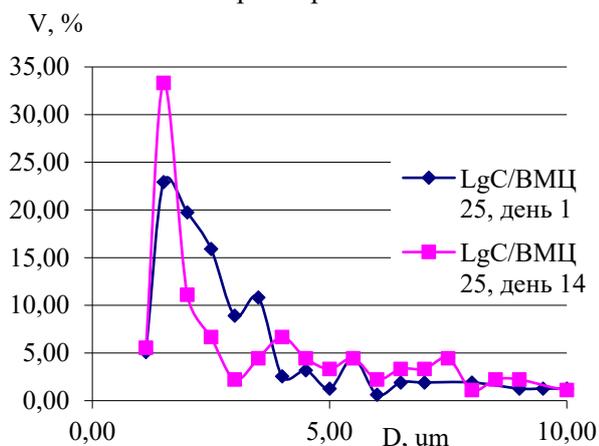


Рис. 1. Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин и цитрусовый пектин

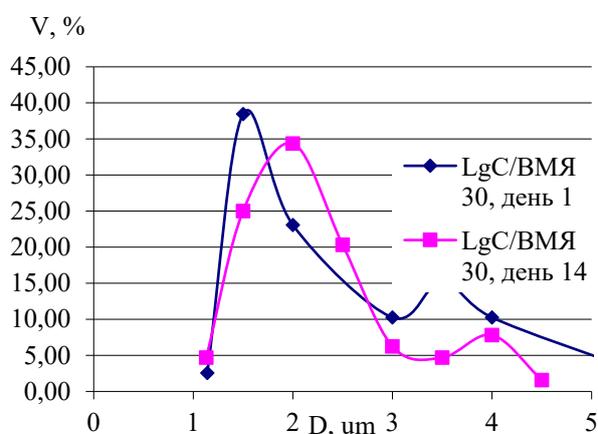


Рис. 2. Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин и яблочный пектин

Таким образом, разработан способ микрокапсулирования активного ингредиента масла Тимьяна, произрастающего в Республики Таджикистан в эмульсионных микрокапсулах стабилизированным белком молочной сыворотки и двух видов пектина. Дана характеристика полученных эмульсий при различных соотношениях белка и пектина. Показано, что максимальный объем эмульсии получается при мольных соотношениях белок / пектин 16–30 для цитрусового и 18–25 для яблочного пектина. Хотя другие изученные соотношения белок / пектин также показали высокую стабильность эмульсии. Полученные системы доставки эфирных масел в виде микрокапсул, стабилизированных биополимерами соответственно, требуют дальнейших исследований для выяснения механизма высвобождения активного ингредиента, лежащего в основе их биологической активности, с целью получения доступа к новым природным антисептикам для фармацевтической и пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Donsi, F., & Ferrari, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 2016 – 233, 106–120.
 2. Ryu, V., McClements, D.J., Corradini, M.G., & McLandsborough, L. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food Chemistry*, 2018, 245, 104–111.
 3. Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Hamed, B. Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains Iran. *J. Med. Plants Res.* 2012–6, 675–679.
 4. Dall'Acqua, S., Peron, G., Ferrari, S., Gandin, V., Bramucci, M., Quassinti, L., Mártonfi, P., Maggi, F. Phytochemical investigations and antiproliferative secondary metabolites from *Thymus alternans* growing in Slovakia. *Pharm. Biol.* 2017–55, 1162–1170.
 5. P. Matusinsky, Zouhar M., Pavela R., Novy P. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals/ *Industrial Crops and Products* 2015 – 67, 208–215.
 6. Borugă O, Jianu C, Mișcă C. et al. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity *Journal of Medicine and Life*. 2014 – Volume 7, Special Issue 3, pp. 56–60
 7. Marinelli O., Iannarelli R., Morelli M.B., et al. Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line *Chem. Biol. Interact.* 2016–256, pp. 125–133.
 8. Демченко, Д.В. Разработка технологии мягких агаровых капсул с масляными экстрактами: дис... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Демченко Д.В. – Санкт-Петербург, 2015. – 226 с.
 9. Мухидинов З.К., Бобокалонов Д.Т., Усманова С.Р. Пектин-основа для создания функциональной пищи. Душанбе. 2019.
 10. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidionv Z.K. Development of double layered emulsion droplets with pectin/ β -lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes. *Journal of Molecular Liquid*, 2017, 243, p. 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.036>.
 11. <https://www.medgadget.com/2020/06/nanotechnology-in-medical-applications-market-2020-analysis-to-2025-impact-of-covid-19-on-emerging-trends-and-leading-players.html>.
 12. Nikolova M., Slavchov R., Nikolova GNanotechnology in Medicine. In: Hock F., Gralinski M. (eds) *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*. Springer, Cham. 2020 https://doi.org/10.1007/978-3-319-68864-0_45.
 13. Mukherjee A., Bhattacharyya SNanotechnology in Medicine. In: Saxena A. (eds) *Biotechnology Business – Concept to Delivery. EcoProduction (Environmental Issues in Logistics and Manufacturing)*. Springer, Cham. 2020 – https://doi.org/10.1007/978-3-030-36130-3_3.
 14. Патент TJ 563. Флэш-способ получения пектина из растительного сырья. (29.12.2011). З.К. Мухидинов, Х.И. Тешаев, А.С. Джонмуродов, Л.С. Лиу.
 15. Golmakani, M.T.; Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.*, 2008, 109, 925–930.
 16. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidionv Z.K. Fabrication, characterization and stability of oil in water nano-emulsion produced by apricot gum-pectin complex. *Int. J. of Biol. Macromolecules* 2017 – 103, p. 1285–1293.
- Бобокалонов Д.Т., Усманова С.Р., Исмоилов И.Б., Шерова З.У., Мухидинов З.К. Изучение полифенольных соединений корнеклубней Эремуруса Гиссарского (*E Hissaricus*) методом капиллярного зонного электрофероза. *Актуальная биотехнология*. 2018 – № 3(26). стр. 275–279.