УДК 665.52.54+544.773.3+542.943+665.256.15

ИНГИБИРОВАНИЕ ОКИСЛЕНИЯ ЭМУЛЬСИЙ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЭФИРНЫМИ МАСЛАМИ МОНАРДЫ ДУДЧАТОЙ И ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

Т.Г. Шутова, А.Г. Шутова*, Л.Р. Варданян, С.А. Айрапетян**, Р.Л. Варданян**, В.Е. Агабеков**

ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
**ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*
***Горисский государственный университет, Горис, Республика Армения*
e-mail: tshutova@yahoo.com

Введение

Поиск новых эффективных экологически безопасных фитопрепаратов с антиоксидантными свойствами и использование для этих целей местных или интродуцированных видов растений весьма актуальны, в том числе, с точки зрения замещения дорогостоящей импортной продукции. Антиоксидантное действие индивидуальных веществ фенольной природы, присутствующих в растениях, рассмотрено в ряде статей [1, 2–5]. Несмотря на то, что свойства экстрактов из различных растительных источников к настоящему времени хорошо изучены [6–8], литературные данные об антиоксидантной активности эфирных масел (ЭМ) растений немногочисленны, а сведения об особенностях проявления антиоксидантных свойств ЭМ в эмульсиях полностью отсутствуют. Высокая способность улавливать радикалы дифенилпикрилгидразида показана для отдельных компонентов ЭМ, таких как γ–терпинен, терпинолен, цитраль, гераниол, которые по проявляемым антиоксидантным свойствам превосходят тролокс [9].

Известно, что липофильные антиоксиданты оказывают большее влияние на окисление пищевых продуктов с высоким содержанием воды, в то время как полярные антиоксиданты более эффективны в жирах (так называемый «полярный парадокс») [5]. При исследовании антиоксидантной активности экстрактов и ЭМ растений необходимо учитывать не только реакционную способность входящих в их состав индивидуальных соединений, но и физическую локализацию этих соединений в окисляющихся системах.

Эфирные масла монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.) и тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) различаются по компонентному составу с преобладанием пула фенольных соединений в ЭМ монарды [10] и практически полным их отсутствием в ЭМ тысячелистника [11].

Целью данной работы являлась оценка распределения компонентов и изучение антиоксидантных свойств эфирных масел монарды дудчатой и тысячелистника обыкновенного в эмульсиях ненасыщенных жирных кислот в воде.

Методы исследования

Эфирные масла монарды дудчатой и тысячелистника обыкновенного получали методом перегонки с водяным паром из свежесобранного растительного сырья [12, с. 234]. Для получения эфирных масел использовали надземную массу растений, собранных в период цветения (опытный участок отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»).

В работе использовали: горчичное масло, содержащее до 95 мас.% ненасыщенных жирных кислот, в том числе 45 мас.% олеиновой кислоты, 32 мас.% омега-6 и 14 мас.% омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ГОСТ 8807-94), лецитин из желтков куриных яиц (Sigma), Tween 80 (Sigma), 2, 6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол (ионол, Sigma), краситель Нильский красный (НК, Molecular Probes), тиобарбитуровая кислота (TBA, AppliChem), трихлоруксусная кислота (Sigma).

Исследуемое ЭМ растворяли в горчичном масле в концентрации 0,01–10,0 об%. Для получения эмульсий «масло в воде», 0,1 мл этого раствора добавляли к 10 мл свежеприготовленной эмульсии, содержащей 8 мг/мл лецитина и 2 мг/мл Tween 80, и диспергировали 10 мин. Концентрация ЭМ в полученной эмульсии варьировалась от $1x10^{-3}$ до 1,0 μл/мл. В качестве стандарта с высокой ингибирующей активностью использовали ионол, который растворяли в горчичном масле перед получением эмульсии. Концентрация ионола в эмульсиях составляла 0,001–1,0 мг/мл, что соответствует диапазону концентраций ЭМ в пересчете на массовый процент.

Диаметр капель дисперсной фазы эмульсий определяли по светорассеянию методом Геллера [13] через 24 ч после получения.

Окисление эмульсий проводили на воздухе при температуре 23±2°С. Пробы 0,3 мл отбирали из реакционной смеси и замораживали при -20°С.

Для определения концентрации продуктов окисления в эмульсии использовали тиобарбитуровую кислоту [14–15]. Сток-раствор тиобарбитуровой кислоты получали растворяя 0,375 г тиобарбитурой кислоты и 15,0 г трихлоруксусной кислоты в 0,25 н HCl. К нему добавляли 3 мл 2 мас.% раствора ионола в этиловом спирте. К 0,25 мл окисленной эмульсии, добавляли 0,75 мл воды и 2 мл сток-раствора, тщательно перемешивали и нагревали 30 мин в кипящей водяной бане. Полученную смесь охлаждали и центрифугировали для отделения нерастворимых в воде реагентов. Концентрацию продуктов окисления, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS, от англ. thiobarbituric acid reactive substances), в супернатанте определяли по поглощению при 538 нм, используя значение коэффициента экстинкции аддуктов тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом $1,56x10^5$ $M^{-1}см^{-1}$ [16].

Спектры флуоресценции красителя Нильского красного в эмульсиях записывали на спектрофлуориметре *CM2203* (*Solar*, Беларусь). 20–50 μл сток-раствора НК в ацетоне ($1\cdot10^{-3}$ М) добавляли в эмульсию, которую диспергировали ультразвуком в течение 5 мин, а затем оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Непосредственно перед регистрацией спектра эмульсию разбавляли водой в 100 раз.

Для оценки антимикробной активности эфирных масел использовали метод бумажных дисков, суть которого состоит в определении диаметра зоны задержки роста тест-культур на агаризованной среде (мясопептонный агар), которая формируется под воздействием диффундирующих в неё бактериостатических веществ. В качестве тест-культур использовали посевы бактерий *Sarcina lutea, Bacillus mycoides, Bacillus megaterium, Staphylococcus saprophyticus (*грам$^+$*)* и *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Erwinia herbicola (*грам$^-$*)*. Опыты осуществлялись в асептических условиях. Посев культур бактерий на поверхность находящегося в чашках Петри стерильного мясопептонного агара производили с помощью шпателя Дригальского (сплошной газон). На засеянную поверхность помещали стерильные бумажные диски диаметром 8 мм, с последующим нанесением на них 10 мкл эфирного масла тысячелистника. Чашки Петри помещали в термостат на 24 часа. Затем измеряли диаметр зон ингибирования роста тест-культур.

Результаты и обсуждение

Диаметр капель дисперсной фазы эмульсии без добавок эфирных масел достигает 220 нм. Ионол и эфирное масло монарды, содержащее высокие концентрации фенольных соединений [10], способствуют уменьшению диаметра капель гидрофобной фазы эмульсии (таблица 1). Концентрации эфирного масла монарды 0,001 μл/мл или ионола 0,001 мг/мл достаточно для того, чтобы уменьшить диаметр капель до 140–160 нм, однако, дальнейшее увеличение концентрации фенолов практически не влияет на размеры дисперсной фазы. В то же время, ЭМ тысячелистника во всех исследованных концентрациях увеличивает диаметр капель масла. Различное влияние ЭМ монарды и тысячелистника на размеры капель

дисперсной фазы можно связать с составом этих эфирных масел, в которых преобладают различные по структуре и свойствам соединения.

Таблица 1 – Диаметр капель дисперсной фазы и устойчивость эмульсии в зависимости от концентрации ЭМ

С эм, мкл/мл	Диаметр**, нм			Устойчивость, дней		
	ионол*	тысячелистник	монарда	ионол*	тысячелистник	монарда
0	220			10–12		
0,001	144	256	156	13	13	12
0,01	224	248	190	19	10	13
0,1	130	230	160	25	13	19
1,0	140	220	160	25	13	25

Примечание: * – концентрация ионола приведена в мг/мл; ** – погрешность 10%.

Для оценки возможного распределения основных компонентов эфирных масел в эмульсии в качестве модельного соединения использовали сольватохромный флуоресцентный краситель Нильский красный. Положение максимумов возбуждения и испускания флуоресценции НК зависят от полярности среды, в которой находятся молекулы красителя [17–19].

Спектр испускания НК в эмульсии без добавок ингибиторов состоит из двух перекрывающихся полос с максимумами 582 и 620 нм (рисунок 1а, спектр 1). Максимум в области 660 нм, характерный для испускания молекул НК в воде (спектр 2), в спектре окрашенной эмульсии отсутствует, что указывает на то, что все молекулы НК находятся в гидрофобной фазе. Максимум испускания в области 580 нм, по-видимому, соответствует излучению молекул красителя, находящихся во внутреннем объеме гидрофобных капель. Полярность среды в них сравнима со свойствами чистого горчичного масла, в котором максимальная флуоресценция НК наблюдается при 579 нм (спектр 3). Полосу испускания 620 нм можно отнести к молекулам красителя, находящимся на поверхности диспергированных капель в слое эмульгаторов. Так максимум флуоресценции НК в эмульсиях лецитина и Tween 80, не содержащих горчичное масло, находится при 634 и 636 нм, соответственно (спектры 4, 5).

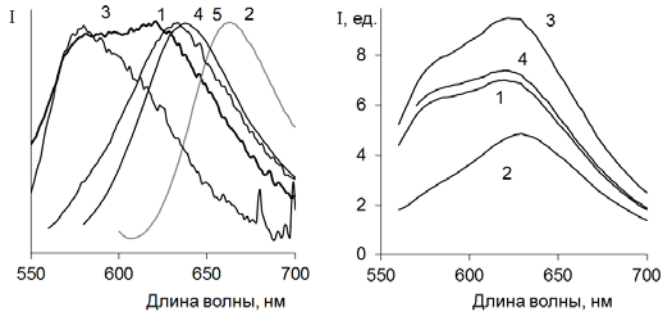
Таким образом, компоненты эфирных масел, подобно НК, распределены между внутренным объемом капли и слоем эмульгаторов на ее поверхности. ЭМ растений являются многокомпонентными системами, распределение каждого компонента в эмульсии индивидуально. Анализ влияния ЭМ на флуоресцентные свойства НК в эмульсиях позволяет оценить распределение некоторых компонентов ЭМ в каплях дисперсной фазы эмульсии.

В отдельной серии экспериментов было показано, что эфирное масло тысячелистника, содержащее высокие концентрации терпеновых соединений [11], является эффективным тушителем флуоресценции НК в этиловом спирте. Тушение флуоресценции НК может быть вызвано взаимодействием флуоресцентного красителя с хамазуленом [20], который придает ЭМ тысячелистника синий цвет. Эфирное масло монарды, содержащее карвакрол и тимол [10], и ионол практически не влияют на флуоресценцию НК в этиловом спирте.

Эфирное масло тысячелистника уменьшает интенсивность флуоресценции НК в эмульсии (спектр 2), при этом полоса испускания 582 нм, отнесенная ранее к молекулам НК в объеме дисперсной фазы, полностью отсутствует. Предположительно, хамазулен, входящий в состав ЭМ тысячелистника, находится преимущественно в объеме эмульгированных капель.

В то же время, при концентрации ЭМ монарды в эмульсии 1 мкл/мл интенсивность испускания НК увеличивается (рисунок 1б, спектр 3) по сравнению с эмульсией без ЭМ (спектр 1). Соотношение интенсивностей испускания НК при 582 и 620 нм изменяется в сторону увеличения полосы эмиссии 620 нм, соответствующей испусканию молекул НК в поверхностном слое эмульгаторов. Поскольку эффекта тушения флуоресценции НК эфирным маслом монарды в растворе не было обнаружено, а интенсивность флуоресценции

НК увеличивается с уменьшением диэлектрической проницаемости среды [19], можно предположить, что компоненты ЭМ монарды уменьшают полярность масляной фазы эмульсии, причем в большей степени это влияние проявляется в слое эмульгаторов. Следует отметить, что ЭМ монарды уже в концентрации 0,001 μл/мл значительно уменьшает диаметр диспергированных капель (таблица 1), что также указывает на локализацию отдельных компонентов этого ЭМ на поверхности капель.



а б

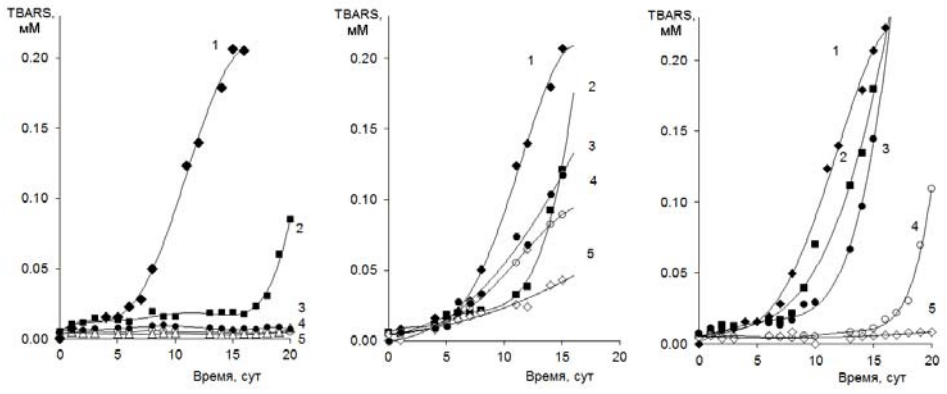
а) 1 – эмульсия без ЭМ, 2 – вода, 3 – горчичное масло, 4 – эмульсия лецитина, 5 – эмульсия Tween80; б) 1 – эмульсии без добавок , 2 – эмульсия, 1 μл/мл ЭМ тысячелистника, 3 – эмульсия, 1 μл/мл ЭМ монарды, 4 – эмульсия, 0,1 мг/мл ионола

Рисунок 1 – Спектры испускания флуоресценции (длина волны возбуждения 556 нм) красителя НК в различных средах ($C_{НК}$ = 0,5 μM)

Расслоение эмульсий без добавок происходит после 10–12 суток хранения при комнатной температуре. Добавление ионола или ЭМ монарды в эмульсию увеличивает этот период в зависимости от концентрации ингибирующей добавки (таблица 1). ЭМ тысячелистника оказалось неэффективно в качестве стабилизатора. Необратимое расслоение эмульсий, содержащих ЭМ тысячелистника, происходило практически в те же сроки, что и эмульсии, не содержащей добавок. Деградация эмульсий вызвана как процессами перекисного окисления, так и микробиологического разложения, происходящими по различным механизмам и приводящими к различному составу продуктов. В отдельной серии экспериментов было показано, что эфирное масло тысячелистника практически не проявляет антимикробной активности в отношении тест-культур за исключением *Bacillus megaterium (*зона ингибирования 17±0,5 мм). В то же время эфирное масло монарды дудчатой было весьма эффективным в отношении всех тест-культур, в том числе, *Sarcina lutea* (зона ингибирования 40±0,5мм), *Esherichia coli* (22±0,5 мм), *Staphylococcus saprophyticus* (25±0,5мм), *Bacillus megaterium* (29±0,5 мм).

Предполагается, что потеря устойчивости эмульсий с ЭМ тысячелистника происходит, главным образом, в результате микробиологического разложения.

Кривые накопления TBARS в присутствии различных концентраций сильного ингибитора, ионола, имеют выраженный период индукции (рисунок 2а).



а) ионол, $C_{ионол}$, мг/мл: 1 – 0, 2 – 0,001, 3 – 0,01, 4 – 0,1, 5 – 1,0;
б) монарда;
в) тысячелистник.
С эм, μл/мл: 1 – 0, 2 – 0,001, 3 – 0,01, 4 – 0,1, 5 – 1,0

а б в

Рисунок 2 – Кинетические кривые накопления продуктов окисления, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в эмульсии

Для эмульсии, не содержащей ингибирующих добавок, период индукции составляет около 6 дней, а в присутствии ионола в концентрации 0,001 мг/мл медленное увеличение концентрации продуктов окисления наблюдается в течение 17 дней. Затем скорость их накопления возрастает и достигает значения для неингибированного окисления. При более высоких концентрациях ионола, индукционный период превышал время наблюдений (20–25 суток).

Ингибирование окисления эмульсии зависит от концентрации ЭМ монарды в ней (рисунок 2б). При концентрации ЭМ монарды 0,001 μл/мл удается достичь периода индукции, равного 12 суткам, то есть ингибирующая активность этого эфирного масла сравнима с ионолом. При более высоких концентрациях ЭМ монарды в эмульсии наблюдается значительное снижение скорости накопления малонового диальдегида и других продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, по сравнению с эмульсией без ингибирующих добавок.

Однако, полного торможения накопления TBARS достичь не удалось даже при концентрации ЭМ монарды 1 μл/мл. Анализ кривых накопления продуктов окисления при разных концентрациях позволяет предположить, что компоненты ЭМ монарды вовлекаются в процесс окисления. При концентрации ЭМ монарды 0,001 μл/мл это приводит к окислению эмульсии после полного расхода ингибирующих соединений со скоростью, превышающей неингибированный процесс.

Добавление эфирного масла тысячелистника незначительно увеличивает период, в течение которого в эмульсии наблюдается медленное накопление TBARS (рисунок 2в). Для эмульсии без добавок индукционный период составляет около 6 дней, а в присутствии 0,001 и 0,01 μл/мл эфирного масла тысячелистник – 7 и 10 дней, соответственно. В концентрации 0,1 μл/мл эфирное масло этого растения увеличивает период медленного накопления TBARS до 17 дней. Однако, из-за микробиологического разложения эмульсии горчичного масла теряют коллоидную устойчивость на 10–12 сутки после получения, что существенно затрудняет анализ продуктов окисления в них. Следует отметить, что в эмульсиях с добавкой эфирного масла тысячелистника после окончания периода медленного накопления TBARS скорость окисления резко возрастает и превышает значение для неингибированного процесса. Такой вид кинетических кривых накопления продуктов окисления указывает на наличие в ЭМ тысячелистника соединений, эффективно ингибирующих перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. В то же время, аддукты соединений, входящих в состав ЭМ тысячелистника, и пероксидных радикалов, окисляются с высокой скоростью с образованием карбонилсодержащих продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Выводы

Таким образом, влияние эфирного масла растения на окисление эмульсий пищевых масел с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот зависит от компонентного состава ЭМ.

Высокое содержание фенольных соединений является критерием отбора эфирных масел с высокой антиоксидантной активностью в эмульсиях типа «масло-в-воде». Эфирное масло монарды в концентрации 0,001 μл/мл эффективно тормозит окисление эмульсий горчичного масла, незначительно уступая по антиоксидантным свойствам такому сильному ингибитору, как ионол. Однако, при концентрациях ЭМ монарды в эмульсии более 0,01 μл/мл компоненты эфирного масла медленно окисляются с образованием продуктов, содержащих карбонильные группы. ЭМ тысячелистника, в составе которого преобладают терпеновые соединения, менее эффективно в качестве ингибитора окисления эмульсий ненасыщенных жирных кислот, однако обеспечивает практически нулевую скорость окисления в течение короткого индукционного периода.

Работа выполнена в рамках совместных проектов Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Х11АРМ-001) и Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (№ 11РБ-019).

Список литературы

1.Flavonoids, Coumarins and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship / M. Foti [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1996. – Vol. 44, № 2. – P. 497–501.

2.Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products / Y.S. Velioglu [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1998. – Vol. 46, № 10. – P. 4113–4117.

3.Pedrielli, P. Antioxidant Mechanism of Flavonoids. Solvent Effect on Rate Constant for Chain-Breaking Reaction of Quercetin and Epicatechin in Autoxidation of Methyl Linoleate / P. Pedrielli, G.F. Pedulli, L.H. Skibsted // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, № 6. – P. 3034–3040.

4.Saucier, C.T. Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants / C.T. Saucier, A.L. Waterhouse // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 11. – P. 4490–4494.

5.Porter, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems / W.L. Porter // Toxicol. Ind. Health. – 1993. – Vol. 9. – P. 93–122.

6.Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant / K.I. Priydarsini [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, № 7. – P. 2200–2206.

7.Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives / O.I. Aruoma [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1993. –Vol. 41, № 11. – P. 1880–1885.

8.Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis vinifera sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity / R. Guendez [et al.] // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 89, № 1. – P. 1–9.

9.Radical–Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection using 1.1–Diphenyl–2–picrylhydrazyl / H-S.Choi [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 9. – P. 4156–4161.

10.Компонентный состав эфирного масла *Monarda fistulosa*, произрастающей в Республике Беларусь / Н.А. Коваленко [и др.] // Хроматография в химическом анализе и физико–химических исследованиях: сборник материалов Всероссийского симпозиума, Клязьма, 23 – 27 апреля 2007 г. / РАН; редкол.: Цивадзе А.Ю. – М., 2007. – С. 186.

11. Калинкина, Г.И. Химический состав эфирных масел некоторых видов тысячелистника флоры Сибири / Г.И. Калинкина, А.Д. Дембицкий, Т.П. Березовская // Химия растительного сырья. – 2000. – № 3. – С. 13–18.

12.Государственная Фармакопея РБ: Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертизы и испытаний в здравохранении; под общ. ред. Годовальникова Г.В. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии, 2006. – 650 с.

13.Кудряшов, С.Ю. Коллоидная химия: лабораторный практикум. / С.Ю. Кудряшов, Л.А Онучак // Самара: Изд-во «Универс-групп», 2006. – 48 с.

14.McDonald, R.E. Some characteristics of the enzymatic lipid peroxidation systems in the microsomal fraction of flounder muscle / R.E. McDonald, H.O. Hultin // J. Food Sci. – 1987. – Vol. 52, № 15–21. – P. 27.

15.Shaw, L.A. Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for ω-3 Fatty acids into Food Systems / L.A. Shaw, D.J. Mcclements, E.A. Decker // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 8. – P. 3112–3119.

16.Nair, V. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde / V. Nair, G.A Turner // Lipids. – 1984. – Vol. 19. – P. 804–805.

17.Greenspan, P. Spectrofluorometric studies of the lipid probe nile red / P. Greenspan, S.D. Fowler // J. Lipid Research. – 1985. – Vol. 26. – P. 781–789.

18.Neves Silva, J.P. Characterization of mixed DODAB/monoolein aggregates using Nile Red as a solvatochromic and anisotropy fluorescent probe / J.P. Neves Silva, M.E.C.D. Real Oliveira, P.J.G Coutinho // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 2009. – Vol. 203. – P. 32–39.

19.Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators / C. Reichardt // Chem. Rev. – 1994. – Vol. 94. – P. 2319–2358.

20. Photochemistry of Rhodamine 610 / P. Meallier [et al.] // Dyes and Pigments. – 1998. – Vol. 36, № 2. – P. 161–167.