

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ НАНОЭМУЛЬСИЙ С ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНОМ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

**И.В. Калинина**

*Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Россия*

Целью данного исследования являлось установление возможности использования ультразвукового воздействия для получения стабильных наноэмульсий типа «масло-вода» для инкапсуляции биологически активного вещества дигидрокверцетина с целью повышения и сохранения его биоактивных свойств. Были получены эмульсии на основе кукурузного масла, дистиллированной воды и гелановой камеди. Акцент в работе был сделан на исследовании стабильности полученной эмульсии в сравнении с контрольным образцом. Морфологический состав эмульсий был исследован с помощью конфокальной микроскопии. В исследовании представлены также данные по оценке стойкости эмульсий (% выделившей фракции масла). Проведена оценка перекисного числа эмульсий свежеприготовленных, через 7 и через 14 дней хранения в агрессивных условиях (при комнатной температуре, с доступом кислорода и ультрафиолета). Результаты, полученные в рамках данного исследования, позволили установить целесообразность и эффективность применения ультразвукового воздействия для получения наноэмульсий, морфология которых была более однородной и мелкодисперсной, в отличие от контрольного образца, агломерации частиц не наблюдалось. Стойкость эмульсии, полученной с применением ультразвукового воздействия, в 7 раз превышала значения для контрольного образца. Результаты оценки перекисного числа эмульсий доказали эффективность применения данного подхода инкапсуляции дигидрокверцетина для проявления им свойств антиоксиданта. Полученные результаты показали, что использование ультразвукового воздействия при получении эмульсий позволяет в значительной степени добиться увеличения стойкости эмульсий при сохранении биоактивных свойств дигидрокверцетина. Значения перекисного числа эмульсии, полученной с применением ультразвука, позволили в 1,7 раза замедлить окислительные процессы.

**Ключевые слова:** наноэмульсии, дигидрокверцетин, ультразвуковое воздействие, стойкость.

### Введение

Многочисленные исследования, представленные в литературе, свидетельствуют о целесообразности использования наноэмульсий в качестве метода инкапсуляции, для защиты и эффективной доставки биологически активных веществ в организм человека.

Известно, что эмульсии, в том числе и наноэмульсии, являются дисперсными системами, которые образуются при взаимодействии двух несмешивающихся жидкостей (обычно масла и воды) и различаются в зависимости от размеров капель (рис. 1).

Особое внимание в рамках данной работы отводится наноэмульсиям, так как они могут эффективно использоваться в качестве наноразмерных «контейнеров» для включения в них биологически активных веществ (БАВ). Под наноэмульсиями понимают тонкодиспер-

гированные системы, состоящие из чрезвычайно мелких частиц размером в интервале от 20 до 200 нм (по некоторым данным менее 100 нм), для формирования которых обычно используют масло, воду и поверхностно-активные вещества (ПАВ). Микро- и наноэмульсии в последнее время являются одной из наиболее часто исследуемых форм пероральной системы доставки для гидрофобных биологически активных веществ [6, 8–12, 20, 21, 23–25].

Описаны данные использования эмульсий для инкапсуляции многих БАВ, включая  $\omega$ -3 жирные кислоты, каротиноиды, куркумин, ресвератрол, коэнзим Q10. Ряд этих исследований показал, что инкапсуляция гидрофобных БАВ в эмульсии или наноэмульсии увеличивает их биодоступность и/или биологическую активность. Например, *in vivo* иссле-

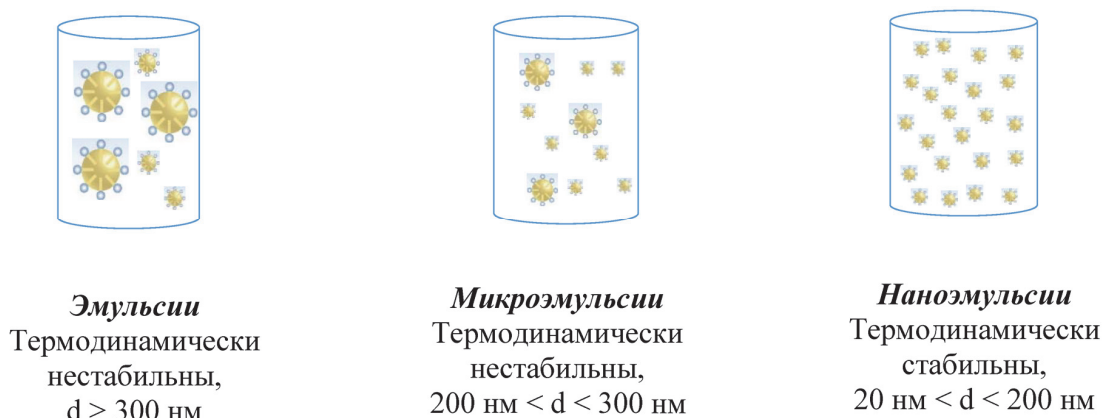


Рис. 1. Схематическое изображение различных видов эмульсий в зависимости от размера частиц

дования показали, что инкапсуляция куркумина в наноэмульсии увеличивала его биодоступность по сравнению со свободным куркумином. Аналогичным образом, исследования *in vivo* показали, что пероральная биодоступность  $\beta$ -каротина примерно в 11,5 раз выше при доставке в виде наноэмульсии, а не при простом диспергировании в масле [4, 7, 13, 14, 15–19, 20–22].

Вместе с тем, необходимо учитывать, что эффективность эмульсии зависит от ее состава и структуры. Как правило, способность эмульсии повышать биодоступность инкапсулированных БАВ возрастает по мере того, как уменьшается размер липидных капель, поскольку это приводит к увеличению границы раздела масло-вода и, следовательно, к более быстрому перевариванию липидов и солюбилизации БАВ. Более того, для некоторых БАВ характер масляной фазы, используемой для их солюбилизации, также играет важную роль в формировании их биодоступности [1–5, 21].

В рамках настоящего исследования рассматривается возможность использования наноэмульсии типа «масло-вода» в качестве системы инкапсуляции флавононола дигидрокверцетина (ДГК) и исследование стабильности эмульсии.

#### Материалы и методы

В качестве объекта исследования выступал сухой экстракт ДГК, представленный ООО «БиоТех» (с содержанием ДГК 98,9 %) [2], в качестве жировой фракции эмульсии использовалось кукурузное масло. В качестве водной фазы использовалась дистиллированная вода. В качестве ПАВ использовали гелановую камедь.

Для получения наноэмульсии применялся аппарат ультразвуковой технологический погружной «Волна-Л» модель УЗТА-0,63/22-ОЛ с рабочим инструментом грибового типа. Ультразвуковая колебательная система построена на пьезоэлектрических кольцевых элементах и изготовлена из титанового сплава ВТ5. Принцип действия основан на использовании свойств ультразвуковых колебаний высокой интенсивности в жидких и жидкодисперсных средах. Используемые инженерные решения защищены патентом РФ № 2141386.

Концентрация масла в эмульсии составляла 5 %, ДГК вносили в количестве 0,1 % к общему объему эмульсии. Гелановую камедь вносили в количестве 0,2 % на каждый процент жировой фракции.

Готовился образец контрольный и модельный.

*Контрольный образец.* Контроль 1 (К). Эмульсию готовили путем механического перемешивания (10000 об/мин) всех ингредиентов одноэтапно при температуре 40 °С в течение 30 мин.

*Модельный образец.* Готовили путем одноэтапного смешивания всех ингредиентов с использованием УЗВ. Режимы УЗВ: мощность воздействия 320 Вт, продолжительность 15 мин (циклами 5 мин работы прибора, 5 мин отдыха). Объем смеси составлял 200 мл. УЗ обработка велась в условиях принудительного охлаждения обрабатываемой смеси при контроле температуры не выше 40 °С.

Полученные образцы эмульсий оценивались по следующей номенклатуре показателей.

- *Морфология.* Использовался конфо-

## Биохимический и пищевой инжиниринг

кальный микроскоп Leica TCS SP5. Объектив HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV. Возбуждение Di-4 ANNEPS производилось аргоновым лазером, полосой 488 нм.

- *Стойкость эмульсий* (% выделившейся фракции масла) по ГОСТ Р 53595-2009.

- *Перекисное число эмульсий* определяли согласно ГОСТ Р 51487-99 (свежеприготовленных эмульсий, через 7 дней, через 14 дней хранения в агрессивных условиях).

### Результаты и их обсуждение

Полученные свежеприготовленные контрольный и модельный образцы эмульсий имели однородную систему без расслоения. Так как эмульсии были нагружены ДГК, то были заложены на хранение в агрессивных условиях для оценки активности пищевого ингредиента как антиоксиданта. Полученные результаты позволили установить выраженное влияние УЗВ на все показатели качества свежеприготовленных эмульсий.

Совокупный анализ морфологии полученных образцов эмульсий показывает, что более однородные эмульсии с меньшими размерами жировых капель формируются при использовании УЗВ (рис. 2).

Известно, что различия между эмульсиями и наноэмульсиями становятся более выраженными, когда диаметр капли падает ниже 200 нм. Электрические характеристики эмульсионных капель в значительной степени определяются природой любых поверхностно-активных веществ, адсорбированных на их поверхности. Электрический потенциал может изменяться от сильно положительного, нейтрального до сильно отрицательного в зависимости от типа эмульгатора и состава эмульсии.

Представленные микрофотографии, характеризующие морфологию исследуемых образцов эмульсий, позволяют судить, что в контрольном образце эмульсии наблюдалась активная агломерация частиц, очевидно вызванная протеканием процессов флокуляции и коалесценции. Наноэмульсия, полученная с применением УЗВ, характеризовалась более стабильным состоянием.

Электрические свойства капель масла в наноэмульсии играют важную роль в определении его физической и химической стабильности. Укрупнение капель дисперсной фазы со временем может быть обусловлено оствальдо-

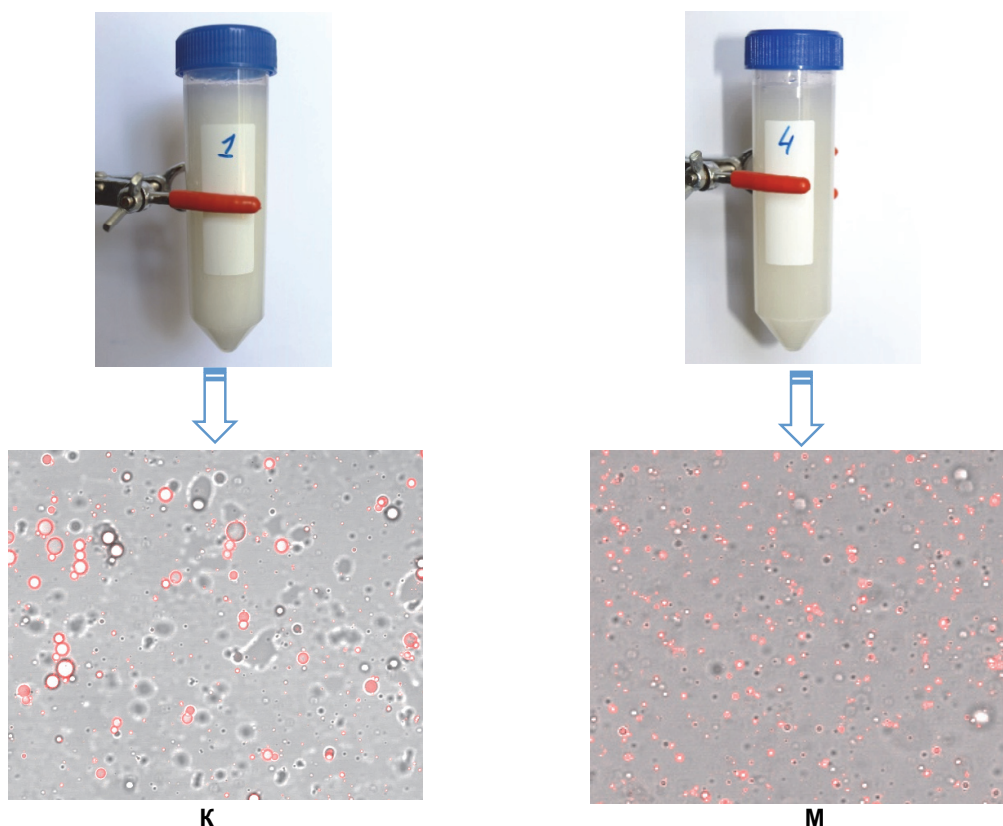


Рис. 2. Морфологическая структура образцов эмульсий с ДГК

вым созреванием, коагуляцией и последующей коалесценцией. Большинство исследователей считает, что основным процессом, приводящим к расслаиванию наноэмульсий, является остальдово созревание [10, 20–23].

Результаты оценки стойкости полученных эмульсий указывают на то, что наиболее стабильной была модельная эмульсия, полученная с применением УЗВ: Процент выделенной фракции масла –  $(4,0 \pm 0,4)$  %, тогда как для контрольного образца это значение составило  $(28,0 \pm 0,5)$  %. Согласно данным McClements меньший размер частиц эмульсии обеспечивает значительные размеры межфазного слоя, что в целом препятствует протеканию остальдового созревания, процессов флокуляции и коалесценции [11, 18, 22, 21, 23–25].

На следующем этапе была проведена оценка динамики изменения перекисного числа исследуемых образцов эмульсий при хранении их в агрессивных условиях в течение 14 дней (рис. 3). Основными факторами провокации окислительных процессов являлись комнатная температура, свет и доступ кислорода.

Известно, что ДГК способен проявлять антиоксидантные свойства в различных системах, в том числе и жировых. Первичный

механизм действия ДГК как антиоксиданта заключается во взаимодействии с продуктами или катализаторами свободнорадикального окисления: с активными радикалами, гидроперекисями, а также в хелатировании катализаторов свободнорадикального окисления, прежде всего ионов металлов переменной валентности.

Представленные данные свидетельствуют о том, что в эмульсии, полученной с применением УЗВ, процессы окисления протекают с меньшей интенсивностью, чем в контрольном образце эмульсии. На конечный период исследования значения перекисного числа для модельной эмульсий были  $(28 \pm 0,03)$  ммоль  $(^{1/2}\text{O})/\text{кг}$ , в то время как контрольного образца  $(36 \pm 0,03)$  ммоль  $(^{1/2}\text{O})/\text{кг}$ .

Полученные данные также дают ясное представление о роли ДГК в замедлении процессов окисления липидов. В образцах эмульсий без ДГК окислительные процессы протекали более активно и через 14 дней значения перекисного числа составило  $(48 \pm 0,03)$  ммоль  $(^{1/2}\text{O})/\text{кг}$ , что значительно превосходило значения ПЧ эмульсии с ДГК (в 1,3–1,7 раза).

#### Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали возможность применения УЗВ для получения устойчивых, стабильных нано-

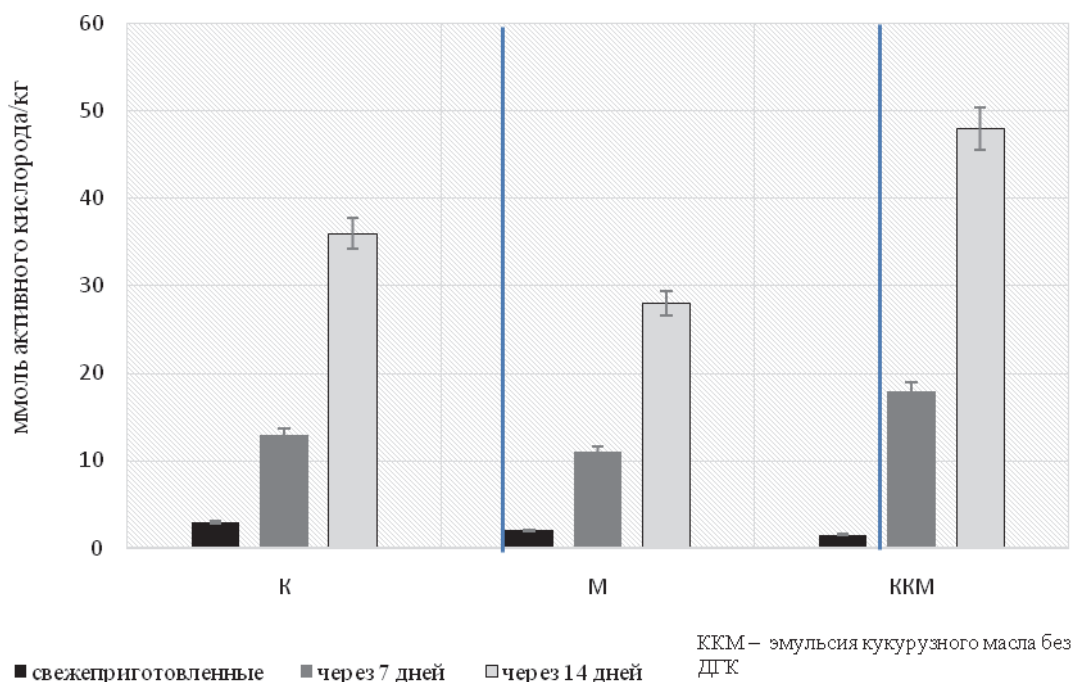


Рис. 3. Результаты определения перекисного числа исследуемых эмульсий в процессе хранения (ммоль  $(^{1/2}\text{O})/\text{кг}$ )

эмульсий типа масло-вода, нагруженных БАВ.

Данный подход можно рассматривать эффективным дуально, т. е. и со стороны проявления антиокислительных свойств ДГК для замедления окислительных процессов жировой фракции в 1,7 раза.

Статья выполнена при поддержке Правительства РФ (Постановление № 211 от 16.03.2013 г.), соглашение № 02.А03.21.0011, при финансовой поддержке государственного задания № 40.8095.2017/БЧ (2017123-ГЗ) и гранта РФФИ 18-53-45015.

### Литература/References

1. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстикова Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск: Тео, 2007. 232 с. [Korul'kin D.Yu., Abilov Zh.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnye flavonoidy* [Prirodnye flavonoids]. Novosibirsk, 2007. 232 p.]

2. Potoroko I.U., Kalinina I.V., Naumenko N.V., Fatkullin R.I., Shaik S., Sonawane S.H., Ivanova D., Kiselova-Kaneva Y., Tolstykh O., Paymulina A.V. Possibilities of Regulating Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts. *Human. Sport. Medicine*, 2017, vol. 17, no. 4, pp. 77–90. DOI: 10.14529/hsm170409

3. Шатилов А.В., Богданова О.Г., Коробов А.В. Роль антиоксидантов в организме в норме и при патологии // Ветеринарная патология. 2007. № 2. С. 207–211. [Shatilov A.V., Bogdanova O.G., Korobov A.V. [The Role of Antioxidants in the Body under Normal and Pathological Conditions]. *Veterinarnaya patologiya*, 2007, no. 2, pp. 207–211. (in Russ.)]

4. Ahmed K., Li Y., McClements D.J., Xiao H. Nanoemulsion – and emulsion–based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. *Food Chem.*, 2012, vol. 132, pp. 799–807. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.039

5. Rogovskii V.S., Matiushin A.I., Shimanovskii N.L. et al. Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 2010, vol. 73, pp. 39–42.

6. Fatkullin R., Popova N., Kalinina I. et al. Application of ultrasonic waves for the improvement of particle dispersion in drinks. *Agronomy Research*, 2017, vol. 15, pp. 1295–1303.

7. Davidov-Pardo G., McClements D.J. Resveratrol encapsulation: designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci Technol*, 2014, vol. 38, pp. 88–103. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.05.003

8. Liang L., Gao C., Luo M. et al. Dihydroquercetin (DHQ) induced HO-1 and NQO1 expression against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, vol. 61, pp. 2755–2761. DOI: 10.1021/jf304768p

9. Teselkin Y.O., Babenkova I., Kolhir V. et al. Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. *Phytother. Res.*, 2000, vol. 14, pp. 160–162. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1573(200005)14:3<160::AID-PTR555>3.0.CO;2-Y

10. Zu Y., Wu W., Zhao X. et al. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, vol. 471, pp. 366–376. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.049

11. Ghosh V., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of foodgrade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason. Sonochem.*, 2013, vol. 20, pp. 338–344. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.08.010

12. Krasulya O., Shestakov S., Bogush V., Potoroko I. Applications of sonochemistry in Russian food processing industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, no. 21, pp. 2112–2116. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.03.015

13. Lane K.E., Li W., Smith C., Derbyshire E. The bioavailability of an omega-3-rich algal oil is improved by nanoemulsion technology using yogurt as a food vehicle. *International Journal of Food Science and Technology*, May 2014, vol. 49, iss. 5, pp. 1264–1271. DOI: 10.1111/ijfs.12455

14. Masaki H., Sakaki S., Atsumi T., Sakurai H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bul.*, 1995, vol. 18, pp. 162–166. DOI: 10.1248/bpb.18.162

15. McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 2012, vol. 40, pp. 1719–1729. DOI: 10.1039/C2SM06903B

16. Melidou M., Riganakos K., Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, vol. 39, pp. 1591–1600. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.009

17. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, vol. 7 (9), pp. 405–410. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
18. Naumenko N.V., Kalinina I.V. Sonochemistry effects influence on the adjustments of raw materials and finished goods properties in food production. *Materials Science Forum*, 2016, vol. 870, pp. 691–696. DOI: 10.4028/www.scientific.net/msf.870.691
19. Potoroko I.Yu., Kalinina I.V., Naumenko N.V., Fatkullin R.I., Nenasheva A.V., Uskova D.G., Sonawane S.H., Ivanova D.G., Velyamov M.T. Sonochemical Micronization of Taxifolin Aimed at Improving Its Bioavailability in Drinks for Athletes. *Human. Sport. Medicine*, 2018, vol. 18, no. 3, pp. 90–100. DOI: 10.14529/hsm180309
20. Qian C., Decker E.A., Xiao H., McClements D.J. Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, vol. 88(1), pp. 47–55. DOI: 10.1007/s11746-010-1658-y
21. Qian C., Decker E.A., Xiao H., McClements D.J. Physical and chemical stability of beta-carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, 2012, pp. 132(3), pp. 1221–1229. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.091
22. Rasenack N., Steckel H., Müller B.W. Preparation of microcrystals by in situ micronization. *Powder Technology*, 2004, vol. 143–144, pp. 291–296. DOI: 10.1016/j.powtec.2004.04.021
23. Salvia-Trujillo L., Qian C., Martín-Belloso O., McClements D.J. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141(2), pp. 1472–1480. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.050
24. Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü M.A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 2013, vol. 30(1), pp. 401–407. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.004
25. Zhang Z.R., Zaharna Al., Wong M., Chiu M.M., Cheung S.K. Taxifolin enhances andrographolide-induced mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells via spindle assembly checkpoint activation PLoS. *One*, 2013, vol. 8, p. e54577. DOI: 10.1371/journal.pone.0054577

Калинина Ирина Валерьевна, кандидат технических наук, доцент кафедры пищевых и биотехнологий, Южно-Уральский государственный университет (г. Челябинск), kalininaiv@susu.ru

Поступила в редакцию 17 мая 2019 г.

DOI: 10.14529/food190306

## THE STUDY OF DIHYDROQUERCETIN NANOEMULSIONS DERIVED BY MEANS OF ULTRASOUND

**I.V. Kalinina**

*South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

The purpose of the current investigation is to examine the possibility of using ultrasound treatment to obtain stable nanoemulsions of “oil-water” type to encapsulate biologically active substances of dihydroquercetin in order to increase and preserve its bioactive properties. Emulsions based on corn oil, distilled water and Gellan gum were obtained. The emphasis was placed on the study of the obtained emulsion stability in comparison with the reference sample stability. The morphological composition of the emulsions was investigated by confocal microscopy. The study also presents data on the assessment of the emulsions stability (% of the released oil fraction). The estimation of the peroxide number of freshly prepared emulsions and emulsions after 7 and 14 days of storage in aggressive conditions (at room temperature, with oxygen and ultraviolet supply). The results obtained in this study established the feasibility and effectiveness of the



ultrasonic effect in the production of nanoemulsions, the morphology of which was more homogeneous and finely dispersed, unlike the morphology of the reference sample, the agglomeration of particles was not observed. The stability of the emulsion obtained with the use of ultrasonic effect was 7 times higher than the values for the reference sample. The results of the evaluation of the peroxide number of emulsions proved the effectiveness of dihydroquercetin encapsulation approach to reveal the antioxidant properties. The results obtained The results showed that the use of ultrasonic effect in emulsions production can significantly increase the stability of emulsions while preserving the bioactive properties of dihydroquercetin. The values of the peroxide number of the emulsion obtained with the use of ultrasound slowed down the oxidizing processes by 1.7 times.

**Keywords:** nanoemulsions, dihydroquercetin, ultrasound effect, stability.

**Article is executed with support of the Government of the Russian Federation (the Resolution No. 211 of 16.03.2013), the agreement No. 02.A03.21.0011 and with the financial support of the state tasks No. 40.8095.2017/БЧ (2017123-ГЗ) and RFBR grant 18-53-45015.**

*Received May 17, 2019*

---

### ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Калинина, И.В. Исследование стабильности нано-эмульсий с дигидрокверцетином, полученных на основе ультразвукового воздействия / И.В. Калинина // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2019. – Т. 7, № 3. – С. 52–58. DOI: 10.14529/food190306

### FOR CITATION

Kalinina I.V. The Study of Dihydroquercetin Nanoemulsions Derived by Means of Ultrasound. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2019, vol. 7, no. 3, pp. 52–58. (in Russ.) DOI: 10.14529/food190306