

Статья публикуется по материалам доклада на Научно-практической конференции “Новые химико-фармацевтические технологии”, состоявшейся 28 мая 2014 г. в РХТУ им. Д.И. Менделеева. Публикация доступна для обсуждения в рамках функционирования постоянно действующей интернет-конференции “Бутлеровские чтения”. <http://butlerov.com/readings/>  
Поступила в редакцию 18 июля 2014 г. УДК 541.18:544.7.

## Микрокапсулирование гормонов стероидного ряда в желатиновую оболочку

© Городнюк\*<sup>+</sup> Ян Андреевич, Пенкина\* Юлия Александровна,  
Кузнецов Владимир Владимирович, Мацко Артем Олегович  
и Авраменко\* Григорий Владимирович

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Ул. Героев Панфиловцев, 20.  
г. Москва, 125480. Россия. Тел: (916) 607-71-31. E-mail: [gorodnyuk.yan@mail.ru](mailto:gorodnyuk.yan@mail.ru)

\*Ведущий направление; <sup>+</sup>Поддерживающий переписку

**Ключевые слова:** брассиностероиды, микрокапсулирование, холестерин, Solvent Blue 104.

### Аннотация

Статья посвящена микрокапсулированию брассиностероидов в желатиновую оболочку. На основе метода Златкиса-Зака разработана методика, позволяющая контролировать степень вовлечения активного вещества – холестерина в микрокапсулы. Наибольшая степень микрокапсулирования достигается при использовании 3% раствора желатина. Исследована кинетика высвобождения модельных веществ – холестерина и красителя Solvent Blue 104 из микрокапсул. Было выяснено, что микрокапсулирование позволяет добиться постепенного высвобождения активного вещества на всём промежутке времени замачивания семян.

### Введение

Повышение урожайности и защиты растений от неблагоприятных условий среды является основной задачей растениеводства в настоящее время. В качестве принципиально нового средства для решения данных проблем являются гормоны брассиностероиды. Их крайне высокая активность привлекает внимание многих учёных из разных областей химии, биологии и сельского хозяйства [1-4].

В растениеводстве используется препарат *эпибрассинолида* «Эпин-Экстра» [5] – раствор эпибрассинолида в спирте 0.025 г/л в ампулах. Несколько капель препарата разводится в 1 л воды и в этом растворе производится замачивание семян. Препарат должен быть израсходован сразу. Микрокапсулированный эпибрассинолид позволит увеличить срок хранения препарата, его устойчивость к неблагоприятным факторам среды, а так же обеспечить устойчивое высвобождение и поддержание оптимальной концентрации гормона.

### Экспериментальная часть

В качестве материала оболочки использовали желатин, поскольку он инертен по отношению к гормону и способен к формированию прочной плёнки, в то же время обеспечивающей постепенное высвобождение активного вещества.

Для микрокапсулирования гормонов был выбран метод простой коацервации, поскольку при микрокапсулировании этим методом капсулируемое вещество не подвергается химическим превращениям и капсулирование проводится при умеренной температуре [6-9].

Для анализа полученных микрокапсул разработана аналитическая методика, позволяющая определить степень вовлечения гормона в оболочку, а также изучить кинетику его высвобождения.

В связи с тем, что брассиностероиды дорогостоящи, на начальном этапе данной работы в оболочку мы заключали не гормон, а его более дешёвый аналог, обладающий схожей структурой – *холестерин* (рис. 1).

Обработку аналитической методики количественного определения капсулируемого в оболочку вещества проводили на холестерине. Все существующие методики анализа по методу Златкиса-Зака применяются в основном для его определения в сыворотке крови [10], поэтому требуется адаптировать

г. Казань. Республика Татарстан. Россия. \_\_\_\_\_ © *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т.38. №4. \_\_\_\_\_ 27

методы к нашим условиям и на их основе разработать аналитическую методику, позволяющую анализировать полученные микрокапсулы.



Рис. 1. Структурные формулы эпибрасинолида (I) и холестерина (II)

Учитывая, что проведение количественного анализа холестерина требует дополнительных химических реактивов и времени для подготовки пробы, для проведения кинетики высвобождения активного вещества на ряду с холестерином мы использовали краситель – Solvent Blue 104 (1,4-бис(2,4,6-триметиланилино)антрахинон).

Для удобства применения микрокапсулы было решено закрепить на подложке из фильтровальной бумаги.

Целью нашей работы является создание микрокапсулированного препарата брасиностероидов с последующим закреплением микрокапсул на подложке.

### 1. Метод микрокапсулирования

Для микрокапсулирования была использована технология простой коацервации с последующим нанесением системы на бумажную подложку [11]. Этот метод исключает необходимость подготовки поверхности бумаги и покрытия связующим веществом. Раствор желатина, содержащий холестерин в масляной фазе и ПЭГ-20 сорбитан монолаурат (Твин 20) в качестве эмульгатора, был коацервирован 20%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Подложка, пропитанная раствором коацервата, была погружена в 20%-ный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на 10 мин, после чего высыхала при комнатной температуре 24 ч.

Брасиностероиды и холестерин хорошо растворимы в неполярных растворителях. Поскольку растительные масла содержат соединения различного класса витаминов и фитостеролов, что затрудняет проведение количественного анализа холестерина в них, в качестве растворителя для холестерина было выбрано полусинтетическое масло каприлик/каприк триглицерид (Рофетан).

### 2. Выбор оптимальной концентрации желатина в водной фазе

Для наиболее полного заключения в микрокапсулы капсулируемого вещества необходимо подобрать концентрацию желатина в водном растворе. Для этого нами были приготовлены пять систем с концентрациями желатина 1%, 2%, 3%, 4% и 5%.

Определение эффективности микрокапсулирования осуществлялось косвенным методом. Спектрофотометрически по методу Златкиса-Зака определялось количество свободного холестерина в маточном растворе после его экстракции из системы при помощи хлороформа.

Результаты опыта показали, что использование раствора желатина с концентрациями 4% и 5% хоть и даёт 100% степень микрокапсулирования, но микрокапсулы оказываются заключены в оболочку, состоящую из не вовлеченного желатина, что приводило к проблеме с микроскопированием и дальнейшим использованием. Результаты приведены в таблице.

Таблица. Исследуемые микрокапсулированные системы

| № п/п | Масло, содержащее холестерин с твин 20, мл | Содержание холестерина, мг | Конц. исходного раствора желатина, % масс./об. | Эффективность микрокапсулирования, % |
|-------|--|----------------------------|--|--------------------------------------|
| 1     | 2.75                                       | 300                        | 1  | 53.6                                 |
| 2     | 2.75                                       | 300                        | 2  | 75.6                                 |
| 3     | 2.75                                       | 300                        | 3  | 95.5                                 |

### 3. Кинетика высвобождения

Важным показателем является количество выделившегося вещества из микрокапсул с течением времени. Ввиду того, что количественный анализ определения холестерина по методу Златкиса-Зака

*МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ ГОРМОНОВ СТЕРОИДНОГО РЯДА В ЖЕЛАТИНОВУЮ ОБОЛОЧКУ* \_\_\_\_ 27-32 является продолжительным, то на начальном этапе для определения кинетики высвобождения использовали краситель Solvent Blue 104. Затем эксперимент по кинетике высвобождения был проведён для холестерина.

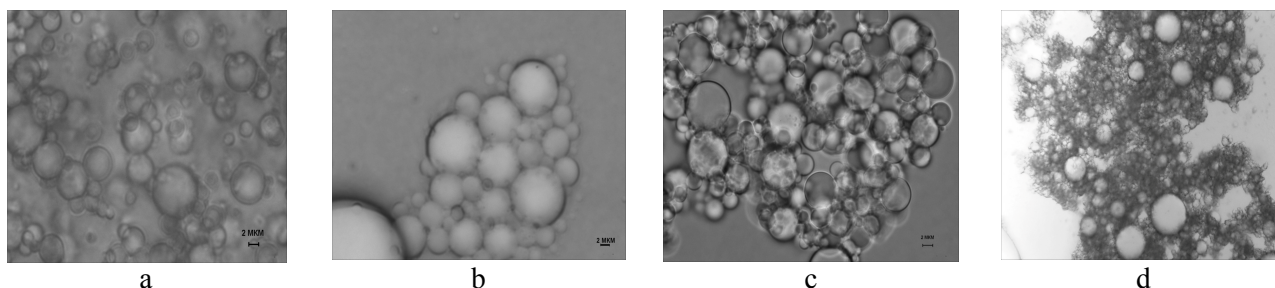
Поскольку семена растений замачивают в воде (отфильтрованная с помощью угольных фильтров или кипячёная), в которую добавляют раствор гормона (брасиностероида), то исследование кинетики высвобождения также проводилось в водную среду.

Исследование кинетики включало в себя следующие этапы:

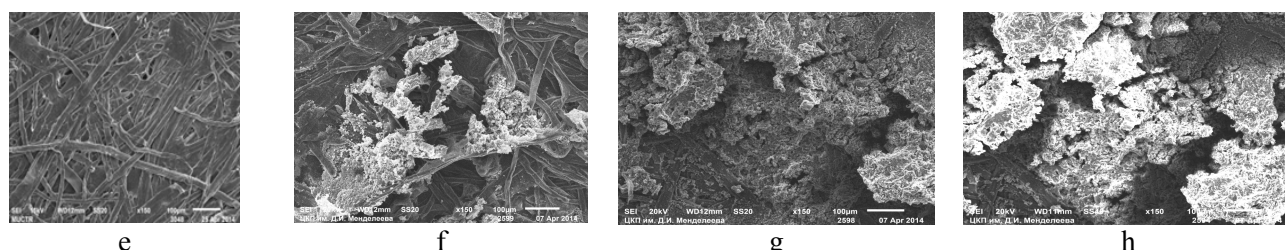
- Помещали высушенную подложку, на которой находятся микрокапсулы, в 100 мл воды. Подложку с микрокапсулами помещали в воду на 12 часов, поскольку это время является оптимальным для замачивания семян в уже существующем товарном продукте гормона брасиностероида – «Эпин-экстра» [5].
- Каждый час из исследуемой системы отбирали 1 мл пробы, которая состояла из воды и выделившегося активного вещества (красителя, либо холестерина).
- Отобранную пробу помещали в делительную воронку и проводили экстракцию хлороформом (3 мл).
- Нижний слой (хлороформенный) сливали в пробирку, переносили в кювету с длиной оптической 0.5 см (для красителя), 1.0 см (для холестерина) и фотометрировали при длине волны 590 нм (для красителя), 560 нм (для холестерина по методу Златкиса-Зака). Концентрацию высвободившегося вещества определяли по значению оптической плотности.

### Результаты и их обсуждение

Как видно из данных таблицы, максимальная степень микрокапсулирования достигается при использовании 3% раствора желатина. Дальнейшее увеличение массовой доли желатина приводит к тому, что микрокапсулы будут окружены слоем желатина, и система после микрокапсулирования становится студнеобразной, что затрудняет выделение капсул и их анализ. Результаты оптической микроскопии при 100х увеличении приведены на рис. 2. На них можно наблюдать отчетливые гроздья желатиновых микрокапсул холестерина. Результаты SEM подложек с микрокапсулами приведены на рис. 3. На этих рисунках можно видеть нанесенные на волокна целлюлозы гроздья желатиновых микрокапсул холестерина. Следовательно, для дальнейшей работы и при нанесении микрокапсул на подложку была выбрана 3% концентрация раствора желатина.



**Рис. 2.** Оптическая микроскопия систем, с концентрацией желатина 1% (a), 2% (b), 3% (c) и 4% (d)



**Рис. 3.** Снимки SEM для контрольного образца (без микрокапсул) (e), 1% (f), 2% (g) и 3% (h) концентрации желатина

При исследовании кинетики высвобождения с помощью модельного вещества – красителя Solvent Blue 104 необходимо, чтобы при капсулировании была сопоставимая с холестерином степень вовлечения активного вещества в микрокапсулы.

Были изготовлены микрокапсулы с содержанием красителя в системе 100 мг с использованием 3% раствора желатина. Эффективность микрокапсулирования для данной системы составила 94,21%, © Бутлеровские сообщения. 2014. Т.38. №4. \_\_\_\_\_ E-mail: journal.bc@gmail.com \_\_\_\_\_ 29

что сопоставимо с системами, содержащими холестерин, и данные микрокапсулы использовали для дальнейшего исследования.

Для микрокапсул с холестерином и красителем *Solvent Blue 104* был проведен эксперимент кинетики высвобождения по методике описанной выше. График зависимости выделенного красителя от времени приведен на рис. 4.

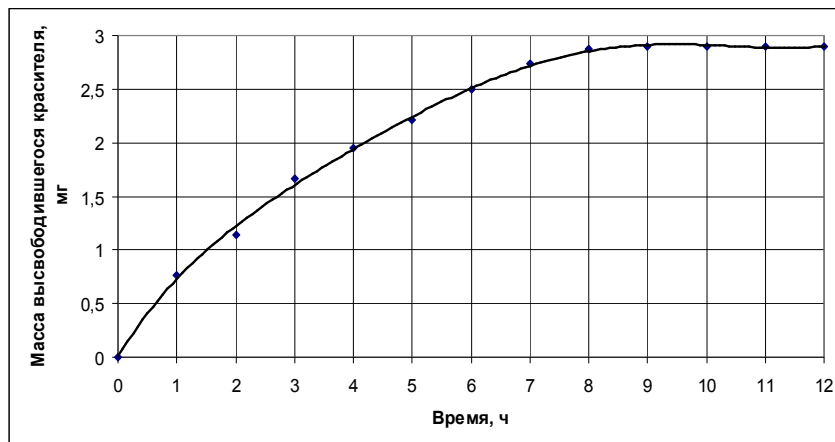


Рис. 4. Кривая высвобождения модельного вещества – красителя из желатиновых микрокапсул, осажденных на бумаге

Как видно из графика, высвобождается лишь малая часть того вещества, что микрокапсулировано в исходной системе (около 3 мг из инкапсулированных 94,2 мг). Это объясняется, прежде всего, тем, что на бумагу из системы осаждаются не все микрокапсулы.

Однако стоит отметить, что, несмотря на неполное высвобождение, полученные концентрации красителя всё равно несколько превышают нужные рабочие концентрации брассиностероидов, с которыми в будущем будет проводиться работа. Для анализа более низких концентраций гормона требуется использование хроматографических методов анализа, например капиллярной газожидкостной хроматографии [12].

Зависимость количества высвободившегося холестерина от времени представлена на рис. 5. Для микрокапсулирования готовилась система из 300 мг холестерина (степень вовлечения 95,5%) и 3% раствора желатина.

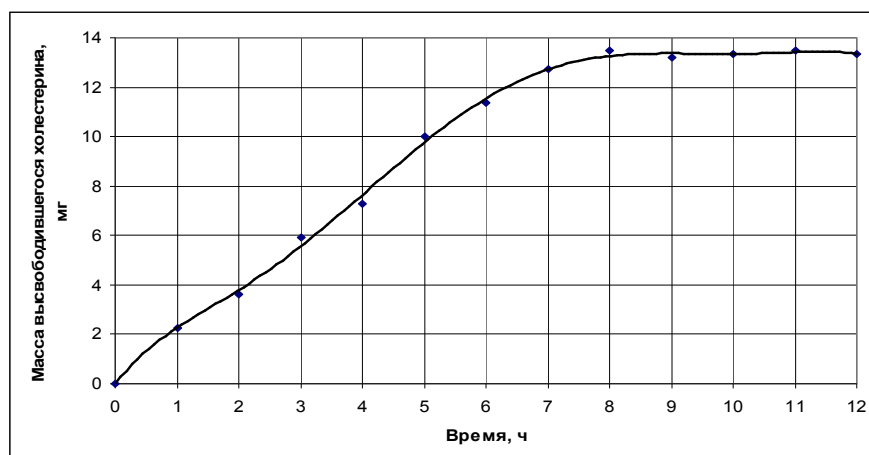
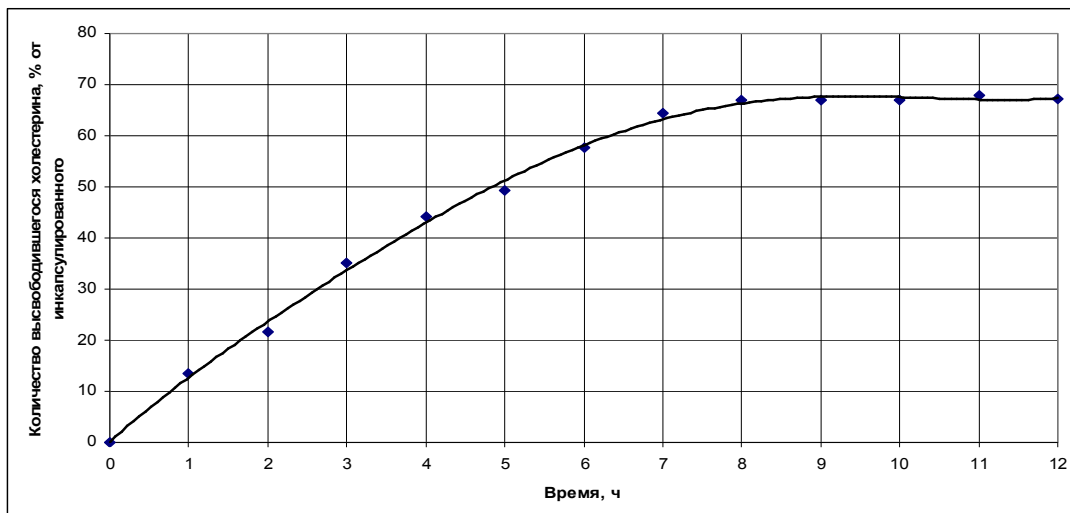


Рис. 5. Кривая высвобождения холестерина из желатиновых микрокапсул, осажденных на бумаге

Аналогично причинам, указанным выше, высвобождается меньшее количество холестерина, чем микрокапсулировано в исходной системе, из которой происходит осаждение на бумагу (около 13 мг из инкапсулированных 286,5 мг). Следует также отметить, что полученные концентрации холестерина находятся рядом с границей нижнего предела обнаружения метода Златкиса-Зака. Поэтому анализ более низких концентраций затруднителен и требуется использование, например, капиллярной газожидкостной хроматографии.

Чтобы определить процент высвобождения холестерина из микрокапсул, была приготовлена система с 300 мг холестерина и 3% раствором желатина, (степень инкапсулирования 95.5%). Так как при фиксировании на бумаге нет возможности определить массу осаждённых микрокапсул, для данного эксперимента полученные микрокапсулы выделяли из системы центрифугированием и высушивали. Навеску микрокапсул помещали в 100 мл воды и исследовали кинетику высвобождения по методу Златкиса-Зака. Полученный график представлен на рис. 6.



**Рис. 6.** Кривая высвобождения холестерина из желатиновых микрокапсул, не зафиксированных на подложке

Как видно из графика, максимально высвобождается около 67% от вовлечённого в микрокапсулы холестерина. То есть часть холестерина (~33%) не диффундирует сквозь оболочку. Как и в случае осаждения микрокапсул на бумаге, после 8 часов кривая высвобождения выходит на плато. На основе полученных данных о степени высвобождения, а также данных предыдущего эксперимента с бумагой, было рассчитано, что на бумагу в процессе нанесения осаждается ~75 мг микрокапсул, то есть около 10% от суммарного их количества.

Данный профиль кривой показывает, что с помощью полученных микрокапсул можно добиться постепенного высвобождения холестерина (брасиностероида) в течение 8 часов, то есть данная форма выпуска гормона обладает пролонгированным действием, что повышает его эффективность по сравнению с уже известным продуктом – спиртовым раствором эпибрасинолида “Эпин экстра” [5].

## Выводы

1. На основе метода Златкиса-Зака разработана методика, позволяющая контролировать степень вовлечения активного вещества – холестерина в микрокапсулы. Наибольшая степень инкапсулирования достигается при использовании 3% раствора желатина, при данных условиях.
2. Исследована кинетика высвобождения модельного вещества – красителя Solvent Blue 104 из микрокапсул. Использование красителя позволяет ускорить проведение анализа, по сравнению с методом Златкиса-Зака для определения холестерина. Методика с использованием красителя обладает меньшим пределом обнаружения, большей чувствительностью, что позволяет снизить погрешность определения и работать с более низкими концентрациями модельных веществ.
3. Исследована кинетика высвобождения холестерина из микрокапсул с помощью метода Златкиса-Зака. Было выяснено, что микрокапсулирование позволяет добиться постепенного высвобождения активного вещества на всём промежутке времени замачивания семян.

## Литература

- [1] V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, de A. Groot. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. *Academic Press. San Diego*. **1999**. P.454.
- [2] Персикова Т.Ф., Ходянков А.А. Природный фитогормон гомобрассинолид – важный резерв повышения урожайности и качества льна-долгунца. *Агрехимический вестник*. **2008**. №1. С.19-21.
- [3] Андреев Н.Н., Каспировский А.В. Влияние регуляторов роста на формирование элементов структуры урожайности яровой пшеницы в условиях Ульяновской области. *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: мат. V междунар. научн.-практ. конф.* **2013**. Т.1. С.28-31.
- [4] Будькина Н.П., Шибаева Т.Г., Титов А.Ф. Влияние эпина экстра – синтетического аналога 24-эпибрассинолида на стрессоустойчивость и продуктивность растений огурца (*cucumis sativus L.*). *Труды Карельского научного центра РАН*. **2012**. №2. С.47-55.
- [5] Способ получения 24-эпибрассинолида: пат. 2272044 Рос. Федерация. № 2004127182/04; заявл. 13.09.2004; опубл. 20.03.2006. Бюл. № 8. 12с. Солодовник В.Д. Микрокапсулирование. *М.: Химия*. **1980**. 216с.
- [6] E.A. Berseneva, G.I. Dontsova, V.A. Chlenov. Study of the microencapsulation of oil solutions of vitamins. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **1976**. Vol.10. No.5. P.636-639.
- [7] Сардушкин М.В., Киенская К.И., Авраменко Г.В. Подбор стабилизатора и отработка основных стадий капсулирования рифампицина. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.32. №11. С.64-68.
- [8] K. Wu, X. Chai, Y. Chen. Microencapsulation of Fish Oil by Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Chinese Journal of Chemistry*. **2005**. No.23. P.1569-1572.
- [9] K. Shekhar, M. Naga Madhu, V. Pradeep, D. Banji. A Review on Microencapsulation. *Int. J. Pharm. Sci. Review and Research*. **2010**. Vol.5. Iss.2. P.58-62.
- [10] Гёрёг Ш. Количественный анализ стероидов: Пер. с англ. *М.: Мир*. **1985**. 504с.
- [11] I. Hideaki, K. Yoshitsugu. Direct Preparation of Gelatin Microcapsules on Paper Surface Using Simple Coacervation Technique. *Journal of applied polymer science* 2013 DOI: 10.1002/app.38941 P.2139-2144.
- [12] Тимофеева О.Н., Вашкевич Е.В., Буневич Н.В. Определение фитостероинов и холестерина в масложировой продукции методом капиллярной газожидкостной хроматографии. *Инновационные технологии в пищевой промышленности: мат. VIII междунар. научн.-практ. конф.* **2009**. С.683-690.