

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ СВОЙСТВ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА ОТ СОДЕРЖАНИЯ ТОКОФЕРОЛОВ ПРИ ХРАНЕНИИ

О. В. Тринеева, Е. Ф. Сафонова, А. В. Бузлама, А. И. Сливкин

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 03.10.2011 г.

Аннотация. Методом ИКС, установлено, что витамин Е в масле претерпевает окислительные изменения в процессе хранения, что может сопровождаться потерей фармакологической активности. На лабораторных животных доказано наличие взаимосвязи между присутствием витамина Е в масле и его клинической эффективностью при различных сроках хранения.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, витамин Е, ожоги, токоферолы.

Abstract. Method IRS, it has been established that vitamin E in oil undergoes oxidizing changes in storage process that can be accompanied by loss of pharmacological activity. As a whole, at carrying out of experimental researches on laboratory animals interrelation presence between presence of vitamin E at oil and its clinical efficiency on various periods of storage is proved.

Keywords: IR-spectroscopy, vitamin E, burns, tocopherols

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения ожогов продолжает оставаться актуальной задачей. Несмотря на значительные успехи в области химии синтетических лекарственных препаратов, вещества природного происхождения зачастую, более полно отвечают требованиям современной медицины. К числу таких природных соединений относится фармакопейное растительное облепиховое масло (ОМ). Основным показанием для наружного применения ОМ являются ожоги, трофические язвы, лучевые поражения кожи и слизистых оболочек [1]. Терапевтический эффект при этом обусловлен проявлением противовоспалительного и ранозаживляющего действия, что позволяет применять его для лечения патологических изменений при ожогах различной степени. Восстановление поврежденной ткани обеспечивают биологически активные вещества ОМ, которые нивелируют недостаток пролиферации и эпителизации [2]. Однако, зависимость противоожоговой эффективности ОМ от срока его хранения недостаточно изучена.

Метод ИК-спектроскопии (ИКС) можно успешно использовать при изучении химической структуры биологически активных веществ (БАВ) и их стабильности при хранении. Колебательные спектры стали богатым источником информации о структуре молекул органических соединений [3—6].

Целью работы являлось изучение стабильности ОМ по содержанию в нем основного БАВ — витамина Е методом ИКС, а также влияние срока хранения исследуемого масла на его регенерирующую и противовоспалительную активность в эксперименте на лабораторных животных.

В качестве объекта исследования было выбрано официальное ОМ отечественного производителя. Анализируемое масло хранили в режиме реального времени в условиях, указанных производителем на упаковке. Эксперимент проводился с ОМ после 3 мес. хранения и 9 мес. хранения.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Стабильность витамина Е в растительных маслах (РМ) при хранении и идентификацию продукта его окислительного превращения изучали, методом ИКС. Были исследованы структурные изменения молекулы токоферола, выделенного из образца ОМ через 9 мес. хранения (рис. 1). Для получения токоферилхинона, фракцию α -токоферола окисляли при нагревании на водяной бане при 80° С конц. азотной кислотой как описано в литературе [7]. Полученный раствор, имеющий характерное красно-оранжевое окрашивание, очищали от посторонних примесей методом ТСХ [8]. Выделение токоферилхинона из ОМ после 9 мес. его хранения на первом этапе осуществляли аналогично токоферолам методом реперколяции, по известной методике [9]. Полученную спиртовую вытяжку упаривали на водяной бане до 0.5—1.0 мл.

© Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Бузлама А. В., Сливкин А. И., 2012

Полученный раствор очищали от посторонних примесей методом ТСХ [8]. ИК-спектры экспериментально полученного токоферилхинона из стандартного образца α -токоферола и токоферилхинона, выделенного из масла после 9 мес. его хранения снимали, используя методику получения тонких пленок на монокристаллических кремниевых пластинках из легколетучих растворителей (хлороформ). Для компенсации поглощения в канал сравнения помещали такую же пластину без пробы. ИК-спектр стандартного образца α -токоферола (ICN «Biomedical», США, степень чистоты более 97 %) снимали, используя методику «раздавленной капли» образца между двумя монокристаллическими кремниевыми пластинами. Для компенсации поглощения в канал сравнения помещали две такие же пластины без пробы. Регистрировали ИК-спектры в диапазоне средних частот $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием «Vertex 70» с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32.

Лабораторные исследования фармакологической активности образцов проведены на белых беспородных крысах самцах и самках общим количеством 28 голов массой тела $250\text{--}300\text{ г}$. Подопытные животные (n) были разделены на 4 группы: 1 опытная группа ($n=6$) — применяли масло со сроком хранения 9 мес., 2 опытная группа ($n=6$) — масло со сроком хранения 3 мес., 3 группа контроль, т.е. самостоятельное заживление ожога ($n=10$), 4 группа интакт, т.е. ожоги не наносили ($n=6$). Экспериментальные ожоги наносили при помощи специального приспособления, разработанного в Воронежском госуниверситете на кафедре физиологии человека и животных М. И. Рецким и др. [10]. Место нанесения ожога — заднебоковая поверхность тела, 2 симметричных ожога по обе стороны от позвоночника. Степень ожога — IIIa. Площадь каждого ожога — 300 мм^2 , общая площадь 5 % поверхности тела. У животных опытных групп один участок являлся контрольным, заживление ожоговой раны проходило самостоятельно, второй участок являлся опытным, на его поверхность наносили облепиховое масло. Нанесение экспериментальных ожогов проводили на фоне действия нейролептика фенотиазинового ряда ксилозина в дозе 10 мг/кг массы тела животного. Облепиховое масло наносили на поверхность ожога опытных участков ежедневно 1 раз в день в количестве 0.2 мл . Площадь ожога измеряли планиметрическим способом при помощи миллиметровой сетки,

распечатанной на прозрачной пленке для лазерных принтеров. Измерения производили на 1, 5, 9, 14, 21 и 28-ой день до полного заживления ожоговой раны. Длительность наблюдений составила 28 дней. Статистическую обработку всех полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы «Статистика 6».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вид полученных ИК-спектров стандартного образца α -токоферола, токоферилхинона, экспериментально полученного из стандартного образца α -токоферола и экспериментально выделенного токоферилхинона из масла представлены на рис. 1—3. Отнесение характеристических частот поглощения в ИК-спектрах исследуемых образцов считаем возможным не приводить в виду наличия таких сведений в литературе [11]. Остановимся только на основных отличительных особенностях, позволяющих дифференцировать витамин Е от продуктов его окислительных превращений по виду ИК-спектра. Основные различия между характеристическими частотами поглощения в ИК-спектрах приведены в табл. 1.

Симметрические деформационные колебания групп $\text{C}-\text{CH}_3$ и $\text{C}-\text{CH}_2$ в ИК-спектрограмме α -токоферола расположены в области частот $1380\text{--}1300\text{ см}^{-1}$. При этом интенсивность поглощения при 1379 см^{-1} зависит от полноты метилирования бензольного кольца. Симметрические и ассимметрические колебания валентных связей $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -группы представлены полосами поглощения в области частот $1280\text{--}1010\text{ см}^{-1}$. Полоса поглощения при 1169 см^{-1} характерна для деформационных колебаний свободной ОН-группы фенола. Валентные колебания свободного фенольного гидроксила, по литературным данным [5], находятся в диапазоне частот $3670\text{--}3640\text{ см}^{-1}$. По сведению авторов [3,5], полосы поглощения в интервале $3650\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ характеризуют наличие группы $-\text{OH}$ в межмолекулярных водородных связях. Это обусловлено тем, что при образовании водородной связи силовая постоянная связи $\text{O}-\text{H}$ уменьшается, а полоса может сдвигаться до $3500\text{--}2500\text{ см}^{-1}$. Чем прочнее возникающее взаимодействие, тем ниже частота колебаний. Полосы поглощения при 3634 , 3482 и 3439 см^{-1} на ИК-спектре α -токоферола (рис. 1) обусловлены валентными колебаниями фенольного гидроксила в межмолекулярных водородных связях [12, 13]. Кроме того, вид ИК-спектра α -токоферола свидетельствует о присутствии в его структуре тетрагидропиранового цикла, обуславливающего характерные

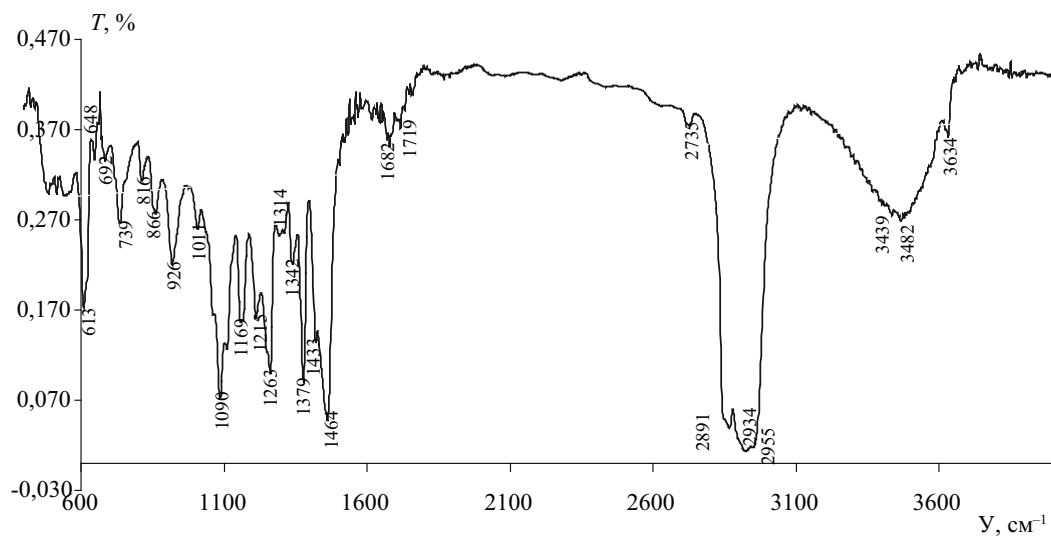


Рис. 1. ИК-спектр стандартного образца α -токоферола

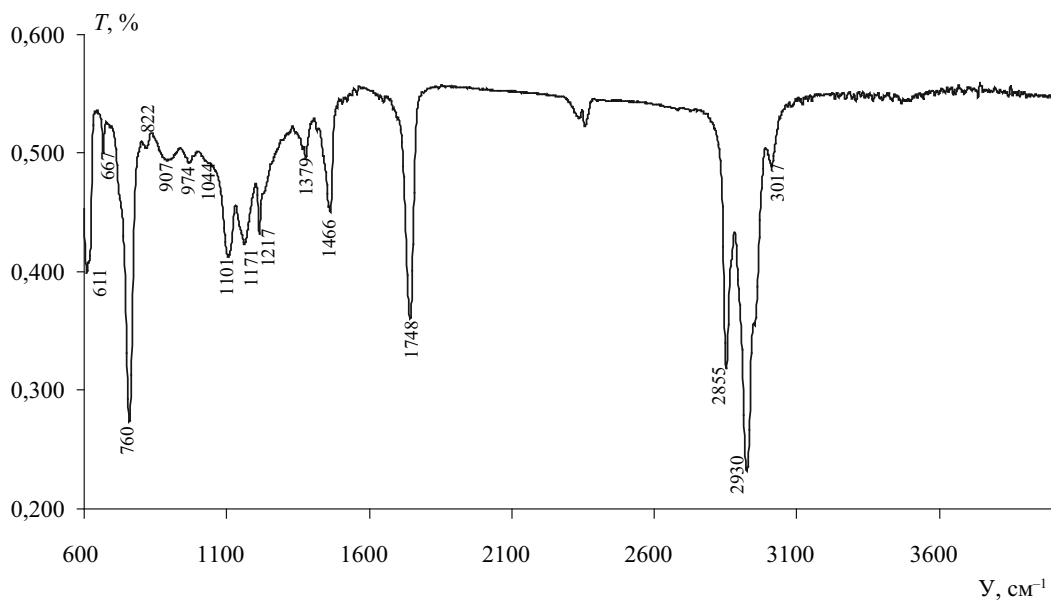


Рис. 2. ИК-спектр токоферилхинона, выделенного из масла после 9 мес. хранения

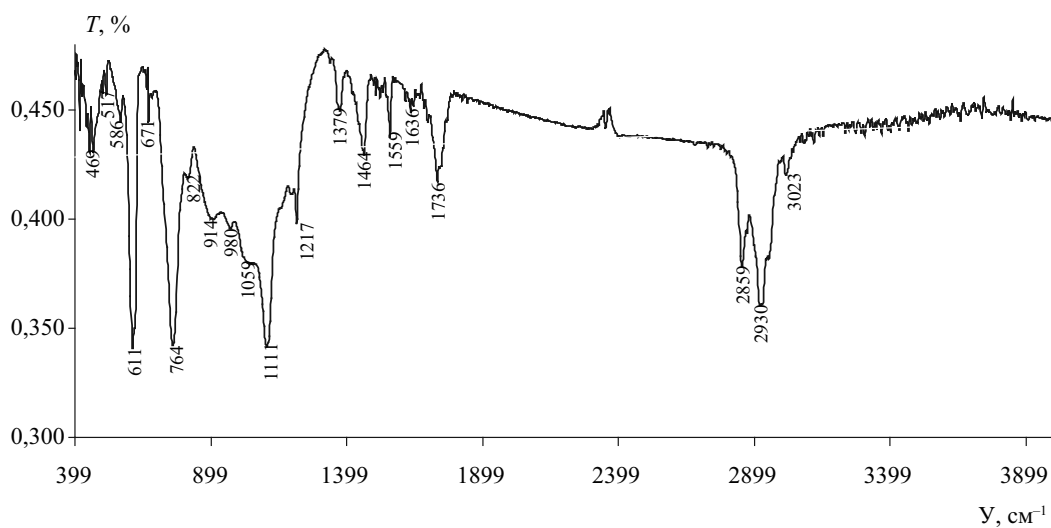


Рис. 3. ИК-спектр токоферилхинона, экспериментально полученного из стандартного образца α -токоферола

Основные различия между характеристическими частотами поглощения в ИК-спектрах

Тип колебаний	Функциональная группа	Связь	Частота, см ⁻¹ на спектре		
			1*	2*	3*
Валентные колебания фенольного гидроксила в межмолекулярных водородных связях	–ОН	О–Н	—	—	3634
			—	—	3482
			—	—	3439
Валентные колебания связей С–СН ₃ и С–СН ₂	С–СН ₃ С–СН ₂	С–С С–Н	2930	2930	2949
			2859	2855	2891
Симметрические и деформационные колебания групп	С–СН ₃ С–СН ₂	С–С С–Н	1379	1379	1342
			—	—	1314
Валентные колебания связей	С–О–С С–ОН	С–О	1217	1217	1263
			—	—	1169
Валентные колебания ароматического кольца	—	С=C	—	—	Группа полос при 1600—1500
Структура пирана	Пирановый цикл	—	—	—	1090
			—	—	813
Структура токола	Токол	—	—	—	1169
Валентные колебания связи С=О токоферилхинонов	—	С=О	1748	1736	—

1* — ИК-спектр о-токоферилхинона, полученного из стандартного образца α-токоферола; 2* — ИК-спектр токоферилхинона, выделенного из масла после 9 мес. хранения; 3* — ИК-спектр стандартного образца α-токоферола.

полосы поглощения при 1097 и 813 см⁻¹, и фрагмента токола, обуславливающего полосу поглощения при 1169 см⁻¹. Данные структурные фрагменты молекулы α-токоферола отвечают за проявление специфической Е-витаминной фармакологической активности. Выявленные в спектре специфические частоты можно считать характеристическими для α-токоферола, и поэтому использовать их в качестве маркеров присутствия токоферолов в различных сложных биологических объектах, таких как РМ, при исследовании их методом ИКС.

ИК-спектр токоферилхинона значительно отличается от спектра стандартного образца α-токоферола (рис. 2, 3). Симметрические и асимметрические колебания валентных связей С–О–С-группы для молекулы токоферилхинона проявляются в интервале 1200—1000 см⁻¹. Полоса поглощения при 1169 см⁻¹, характерная для деформационных колебаний свободной ОН-группы в структуре токола, в ИК-спектре о-токоферилхинона не выявлена (табл. 1). Следует отметить, что для структуры

токоферилхинона симметрические и деформационные колебания групп С–СН₃ и С–СН₂ смещены и проявляется при 1380 см⁻¹. Это можно наблюдать на ИК-спектре токоферилхинона (рис. 2 и 3). Кроме того, вид ИК-спектра токоферилхинона свидетельствует об отсутствии в его структуре тетрагидропиранового цикла и фрагмента токола, обуславливающих максимумы поглощения при 1097 и 813 см⁻¹ и 1169 см⁻¹ соответственно.

Токоферилхиноны в виду своей структуры не способны образовывать водородные связи. На ИК-спектре токоферилхинона, полученного экспериментально из стандартного образца α-токоферола (рис. 3), полос поглощения, характерных для Н-связей, не обнаружено. Следовательно, при окислении α-токоферола (при неправильном хранении, истечении срока годности и т. д.) в ИК-спектре РМ будут отсутствовать полосы поглощения при 1169, 1097 и 813 см⁻¹, что можно использовать для оценки доброкачественности РМ, содержащих витамин Е.

На следующем этапе работы проводили сравнение полученного спектра токоферилхинона, выделенного из масла, и о-токоферилхинона, полученного из стандарта α -токоферола. При сравнении ИК-спектров двух токоферилхинонов, наблюдается хорошее совпадение характеристических частот поглощения экспериментально полученного токоферилхинона из стандарта α -токоферола (1) и токоферилхинона, выделенного из масла (2) (рис. 2, 3; табл. 1). Валентные колебания связи $C=C$ ароматического ядра в диапазоне $1610\text{—}1580\text{ см}^{-1}$, характерные для всех гомологов витамина Е, отсутствуют в ИК-спектре токоферилхинона, выделенного из масла после 9 мес. его хранения (рис. 2). Небольшие различия в ИК-спектрах при 1171 и 1059 см^{-1} можно объяснить тем, что в ОМ, как и в других РМ, присутствует сумма гомологов витамина Е (α -, β -, γ -, δ -токоферолы и токотриенолы) [14], которые окисляются с разрывом тетрагидропиранового цикла и без, в результате чего образуются соответствующие о- и п-токоферилхиноны [11]. Токоферилхинон, полученный из стандартного образца α -токоферола, относится к о-изомеру (продукт окисления α -токоферола конц. азотной кислотой) [11].

Таким образом, методом ИКС, подтверждено присутствие в ОМ после 9 мес. хранения токоферилхинонов — антагонистов природного витамина Е.

В результате проведенных исследований, считаем возможным, оценивать качество масел по наличию в ИК-спектре таких полос поглощения, как $1171\text{—}1165$; $3505\text{—}3476\text{ см}^{-1}$, характерных для деформационных колебаний свободной ОН-

группы фенола и валентных колебаний OH групп в межмолекулярных водородных связях соответственно, что обусловлено присутствием токоферолов в маслах. При окислении витамина Е, происходит разрушение ассоциатов БАВ в маслах, так как токоферилхиноны в силу своей структуры не способны образовывать водородные связи.

Таким образом, было установлено, что витамин Е в масле претерпевает окислительные изменения в процессе хранения, что может сопровождаться потерей их фармакологической активности. В связи с этим параллельно были проведены лабораторные исследования регенераторной эффективности изучаемого облепихового масла на различных этапах его хранения.

ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА СО СРОКОМ ХРАНЕНИЯ 3 МЕСЯЦА

Установлено, что при измерении исходных показателей площадь экспериментальных ожогов не имела достоверных различий между контрольными и опытными участками. Через две недели (14-й день наблюдений) выявлена положительная динамика заживления ожоговой раны на фоне применения облепихового масла (срок хранения 3 мес.) — площадь контрольных участков сократилась на 45.8 %, тогда как опытных на 54.7 % по отношению к исходным значениям, что на 9 % лучше по сравнению с контролем. Результаты представлены на рис. 4.

ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА СО СРОКОМ ХРАНЕНИЯ 9 МЕСЯЦЕВ

Установлено, что на 1-й день после нанесения ожога площадь контрольных и опытных участков не имела достоверных различий. Начиная с 5-го по 10 день наблюдений у 50.0 % животных в зоне ожогового некроза опытных участков были выявлены признаки воспаления — краевая гиперемия, отечность подлежащих тканей, глубокие трещины, гнойный экссудат. В области контрольных участков за данный период не было выявлено указанных патологических изменений. В связи с отсутствием положительной динамики воспалительного процесса на опытных участках эксперимент был прекращен на 14 день. Результаты представлены на рис. 5.

Таким образом, местное нанесение облепихового масла со сроком хранения 9 мес. приводит к ухудшению течения процессов регенерации в первые 10 дней, что сопровождается прогрессированием воспалительного процесса. Незначительная тенденция к ускорению процессов регенерации

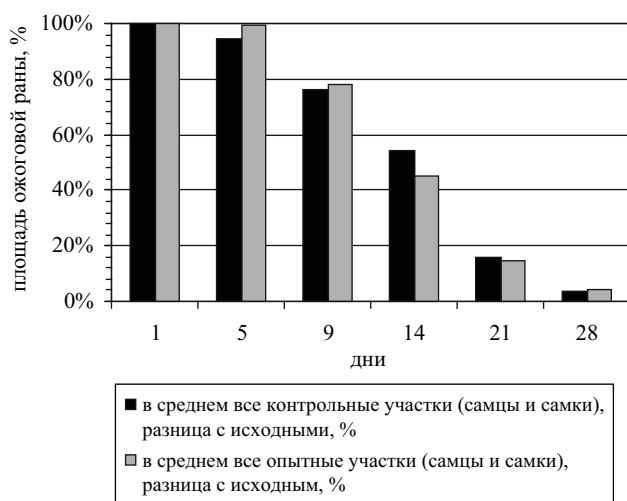


Рис. 4. Изменение площади ожоговой раны при лечении облепиховым маслом, (разница с исходным, %) со сроком хранения 3 мес.

выявлена только через 2 недели после ежедневного применения.

С целью облегчения сравнения эффективности облепихового масла с различным сроком хранения полученные данные представлены в виде сводной табл. 2 и графика (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов свидетельствует, что применение облепихового масла со сроком хранения 9 мес. приводит к ухудшению заживления ожоговой раны на 22.0% (5—7 день) и 21.6% (9—12 день) в сравнении с маслом срок хранения которого не превышает 3-х мес. Данный факт можно объяснить отсутствием токоферолов, биологически активных форм фосфолипидов [15], сквалена [16], наличием большого количества продуктов перекисного окисления липидов [17]. В

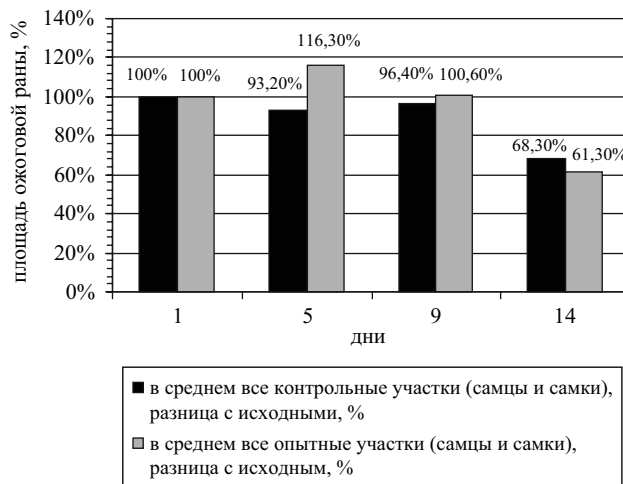


Рис. 5. Изменение площади ожоговой раны при лечении облепиховым маслом, (разница с исходным, %) со сроком хранения 9 мес.

Таблица 2
Сравнительная оценка регенераторных свойств облепихового масла в зависимости от срока его хранения

Показатель, группа	Площадь ожога, %, через n дней после нанесения					
	1-ый день	5-ый день	9-ый день	14-ый день	21-ый день	28-ый день
Контрольная группа, степень заживления, разница с исходным, %	—	+5.3	-24.3	-52.4	-83.0	-97.8
Облепиховое масло (3 мес. хранения)						
Контрольные участки, степень заживления, разница с исходным, %	—	-5.4	-23.7	-45.8	-84.3	-96.6
Опытные участки, степень заживления, разница с исходным, %	—	-0.9	-21.7	-54.7	-85.4	-95.9
Разница площади опытные/контрольные участки, %	+1.8	+2.9	+0.8	-14.9	-5.2	+22.9
Повышение (+) или снижение (-) степени заживления, разница опытные/контрольные по отношению к исходному, %						
Опытные участки	—	-4.5	-2.0	+8.9	+0.7	-0.7
Облепиховое масло (9 мес. хранения)						
Контрольные участки, степень заживления, разница с исходным, %	—	-17.5	-18.9	-28.0	—	—
Опытные участки, степень заживления, разница с исходным, %	—	+9.0	+4.7	-38.5	—	—
Разница площади опытные/контрольные участки, %	-8.0	+21.5	+18.8	-21.5	—	—
Повышение (+) или снижение (-) степени заживления, разница опытные/контрольные по отношению к исходному, %						
Опытные участки	—	-26.5	-23.6	+10.5	—	—
Ухудшение процессов регенерации, разница по степени заживления с маслом 3 мес. хранения	—	22.0	21.6	—	—	—

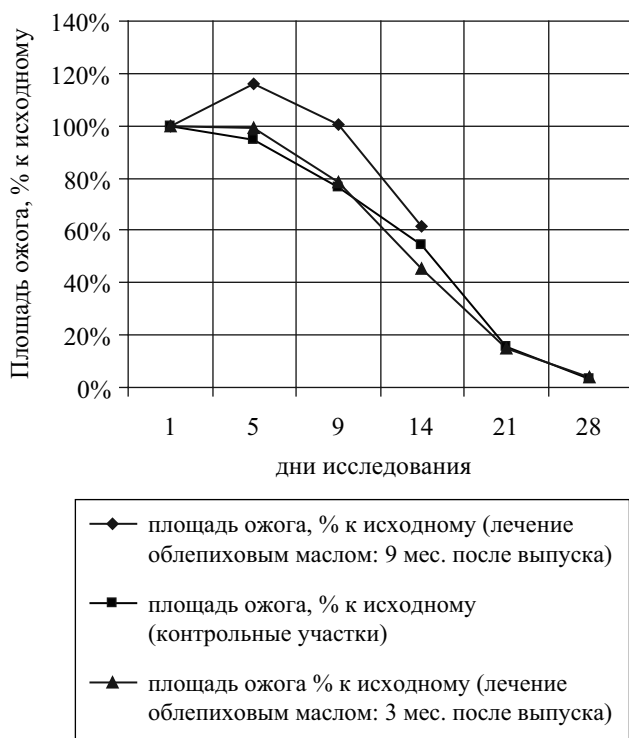


Рис. 6. Динамика процесса регенерации экспериментальной ожоговой раны при лечении облепиховым маслом на разных сроках его хранения

целом, при проведении экспериментальных исследований на лабораторных животных доказано наличие взаимосвязи между присутствием витамина Е в масле и его клинической эффективностью на различных сроках хранения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Monafo W. W.* Initial Management of Burns / *W. W. Monafo* // *N. Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 335. — №21. — P. 1581—1586.
2. *Зацепина Е. Е.* Исследование гастропротекторной активности многокомпонентной лекарственной формы на основе концентрата облепихового масла / *Е. Е. Зацепина* // Матер. науч.-практ. конф. «Достижения клинической фармакологии в России». — Москва, 2009. — С. 275—276.
3. *Казицына Л. А.* Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии / *Л. А. Казицына, Н. Б. Куплетская* // М.: Изд-во «Высшая школа», 1971. — 264 с.
4. *Литтл Л.* Инфракрасные спектры адсорбированных молекул / *Л. Литтл* / Под ред. Лыгина В. И. // М.: Мир, 1969. — 514 с.

5. *Сливкин А. И.* Функциональный анализ органических лекарственных веществ / *А. И. Сливкин, Н. П. Садчикова* // Воронеж: ВГУ, 2007. — 426 с.

6. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами / Под ред. Вайсбергера А. // М.: Химия, 1967. — 532 с.

7. *Рыбакова О. В.* Изучение стабильности токоферолов в растительных маслах и масляных экстрактах при хранении / *О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин* // Материалы VII Междунар. научно-практ. конф. «Здоровье и образование в XXI веке». — Москва, 2006. — С. 598—600.

8. *Рыбакова О. В.* Определение α -токоферола в жирных растительных маслах и масляных экстрактах методом хроматографии в тонком слое сорбента / *О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин* // Сборник материалов XIV национального конгресса «Человек и лекарство». — Москва, 2007. — С. 778.

9. *Рыбакова О. В.* Выделение токоферолов из растительных масел и масляных экстрактов / *О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин* // Тезисы доклада 3-ей Всероссийской научно-метод. конф. «Фармообразование — 2007». — Часть первая. — Воронеж, 2007. — С. 304—305.

10. *Степанюк Г. И.* Устройство для моделирования экспериментальных термических ожогов / *Г. И. Степанюк, В. П. Бобрук* // Патологическая данзиология и экспериментальная терапия, 1990. — №2. — С. 41—42.

11. *Надилов Н. К.* Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве / *Н. К. Надилов* // М.: Наука, 1991. — 336 с.

12. Водородная связь / Под ред. В. М. Чулановского // М.: Мир, 1964. — 462 с.

13. Водородная связь / Под ред. Н. Д. Соколова, В. М. Чулановского // М.: Наука, 1964. — 340 с.

14. *Луговой А. В.* Хранение растительных масел и жиров / *А. В. Луговой [и др.]* // М.: Агропромиздат, 1989. — С. 19—23.

15. *Сафонова Е. Ф.* Выделение и изучение фосфолипидов масла амаранта. Автореф. на соиск. уч. ст. канд. хим. наук / *Е. Ф. Сафонова* // Москва, 2004.

16. Хроматографическое определение сквалена в растительных маслах и масляных экстрактах / *Е. Ф. Сафонова [и др.]* // Тез. докл. 3-ей Всерос. научно-метод. конф. «Фармообразование — 2007». — Часть I. — Воронеж, 2007. — С. 326—327.

17. Изучение стабильности биологически активных веществ в растительных маслах и масляных экстрактах при хранении / *О. В. Чечета [и др.]* // Труды научно-практ. конф. «Фармация из века в век. Анализ и стандартизация лекарственных средств». — Часть III. — СПб, 2008. — С. 190—195.

Тринеева Ольга Валерьевна — к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: lelik83@list.ru

Trineeva Olga V. — PhD, the assistant to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VSU; e-mail: lelik83@list.ru

Сафонова Елена Федоровна — к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: safonova@pharm.vsu.ru

Бузлама Анна Витальевна — к.м.н., доцент кафедры экспериментальной фармакологии фармацевтического факультета ВГУ

Сливкин Алексей Иванович — д.ф.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Safonova Elena F. — PhD, the senior lecturer of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VSU; e-mail: safonova@pharmvsu.ru

Buzlama Anna V. — PhD, the senior lecturer of faculty of experimental pharmacology of pharmaceutical faculty VSU

Slivkin Alexey I. — PhD, the professor, the head of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VSU; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru