УДК 615.32: 547.9

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В-КАРОТИНА И ФИКОЦИАНИНА В БИОМАССЕ СПИРУЛИНЫ ПИЩЕВОЙ (SPIRULINA PLATENSIS)

Первушкин С.В., Маркова И.И., Куркин В.А., Желонкин Н.Н.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

В настоящей работе обсуждаются результаты исследований в области стандартизации биомассы спирулины пищевой (*Spirulina platensis*), культивируемой в Самарской области. Разработаны методики количественного определения содержания важнейших биологически активных соединений спирулины пищевой – β-каротина и фикоцианина. Разработана методика количественного определения содержания β-каротина с использованием хроматоспектрофотометрии при аналитической длине волны 450 нм. Определено, что содержание β-каротина в биомассе спирулины варьируется от 20,90 до 40,85 мг%. Ошибка единичного определения содержания β-каротина в биомассе спирулины с доверительной вероятностью 95% составляет +4,45%. Разработана методика количественного определения фикоцианина с использованием спектрофотометрии при аналитической длине волны 620 нм. Определено, что содержание фикоцианина в биомассе спирулины варьируется от 5,57 до 10,05%. Ошибка единичного определения содержания фикоцианина в биомассе спирулины с доверительной вероятностью 95% составляет +4,07%.

Ключевые слова: спирулина пищевая, Spirulina platensis, биомасса, β-каротин, фикоцианин, стандартизация, колоночная хроматография, спектрофотометрия, хроматоспектрофотометрия

THE DEVELOPMENT OF THE METHODICS OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CONTENT OF β-CAROTENE AND PHYCOCYANIN IN THE BIOMASS OF SPIRULINA PLATENSIS

Pervushkin S.V., Markova I.I., Kurkin V.A., Zhelonkin N.N.

Samara State Medical University, Samara, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

In the present paper are discussed the results of the investigations in the field of standardization of biomass of Spirulina platensis, cultivated in the Samara region. The methods of quantitative determination of the most important biologically active compounds of Spirulina platensis – β-carotene and phycocyanin was developed. There was developed the method of quantitative determination of β-carotene using chromatospectrophotometry with analytical wavelength at 450 nm. There was established that the content of β-carotene in the Spirulina platensis biomass varies from 20,90 to 40,85 mg%. The relative degree of the determination of the the content of β-carotene in developed method with confidence probability 0,95 is no more than +4,45%. There was developed the technique of quantitative definition of phycocyanin using spectrophotometry with the analytical wavelength 620 nm. There was established that the content of phycocyanin in the Spirulina platensis biomass varies from 5,57 to 10,05%. The relative degree of the determination of the content of phycocyanin in developed method with confidence probability 0,95 is no more than + 4,07%.

Keywords: Spirulina platensis, biomass, β-carotene, phycocyanin, standardization, column chromatography, spectrophotometry, chromatospectrophotometry

В соответствии со Стратегией развития фармацевтической отрасли Российской Федерации на период до 2020 г., одной из актуальных задач современной фармации является создание и внедрение импортозамещающих лекарственных средств, а также поиск рациональных путей использования лекарственных растений и лекарственного растительного сырья (ЛРС) в соответствии с принципами доказательной медицины [1–5]. Это связано с тем, что препараты растительного происхождения, как правило, не уступают препаратам, полученным синтетическим путем, а благодаря сбалансированному комплексу биологически активных веществ они воздействуют на организм человека, проявляя при этом минимум возможных побочных эффектов. Одним из перспективных растительных источников получения препаратов является биомасса спирулины пищевой (*Spirulina platensis,* сем. Осциллаториальные – *Oscillatoriaceae;* отдел Сине-зеленые водоросли – *Cyanophyta*) [3, 6], обладающая широким спектром фармакологической активности, включая противовоспалительные, регенерирующие, иммуномодулирующие, гепатопротекторные и противораковые свойства [3, 6, 7].

Накопленный багаж сведений позволяет говорить о том, что биомасса спирулины пищевой обладает уникальным биохимическим составом, содержит широкий набор биологически активных веществ: низкомолекулярные белки, функциональные пигменты (фикоцианин, каротиноиды, хлорофилл), углеводы, макро- и микроэлементы, витамины (А, Д, B_{12}, К, B_1,B_2, B_3, B_6, β-каротин), аминокислоты, в том числе незаменимые [5]. На наш взгляд, с точки зрения химической стандартизации наи-

больший интерес представляют β-каротин и фикоцианин.

Цель настоящего исследования – разработка методик количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*Spirulina platensis*).

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования была выбрана биомасса спирулины пищевой *Spirulina platensis* (Nords.) Gelit.-835, произведенная в закрытых условиях ООО «Неофит» (г. Самара).

В ходе разработки методики количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина изучены УФ-спектры гексановых и водных растворов извлечений из биомассы спирулины пищевой соответственно. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). В методике количественного определения содержания β-каротина использовали хроматографическую колонку (алюминия оксид «Chemapol»), которую элюировали гексаном.

Результаты исследования их обсуждение

Для количественного анализа биомассы спирулины предложено определение содержания важнейших биологически активных соединений данного сырья – β-каротина и фикоцианина.

Попытка применить спектрофотометрию неочищенного гексанового раствора извлечения из биомассы спирулины показала, что в оптическую плотность анализируемого раствора вносит хлорофилл, а также сопутствующие каротиноиды (рис. 1). С целью отделения β-каротина от сопутствующих каротиноидов нами использована колоночная хроматография на оксиде алюминия. В этих условиях электронный спектр гексанового раствора, очищенного на колонке оксида алюминия, имеет максимум поглощения при длине волны 450 нм, характерный для β-каротина (рис. 2).

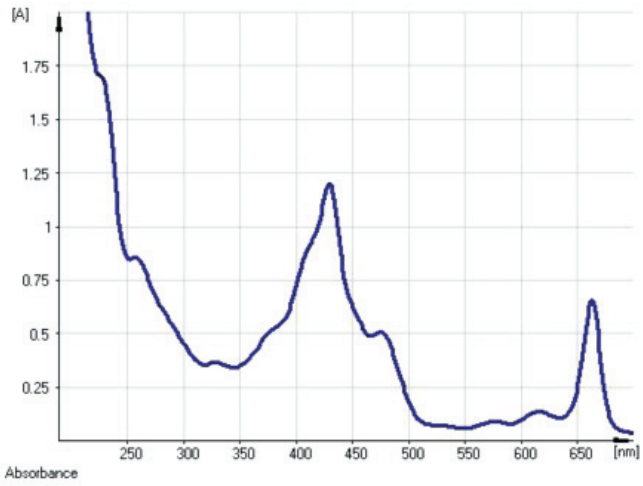

Рис. 1. Электронный спектр гексанового раствора извлечения из биомассы спирулины

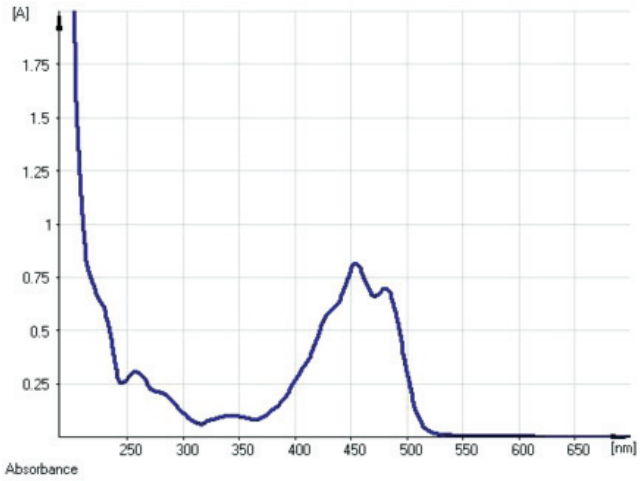

Рис. 2. Электронный спектр гексанового раствора извлечения из биомассы спирулины, очищенного на Al_2O_3

Таким образом, для количественного определения содержания β-каротина в биомассе спирулины целесообразно использовать метод хроматоспектрофотометрии при аналитической длине волны 450 нм.

Учитывая полярный характер фикоцианина, нами для целей экстракции предложено использовать воду очищенную. Определено, что электронный спектр водного извлечения наряду с коротковолновым максимумом имеет в длинноволновой области максимум поглощения (620 нм), характерный для фикоцианина (рис. 3). Следовательно, для количественного определения фикоцианина может быть использован метод спектрофотометрии в качестве аналитической длины волны 620 нм.

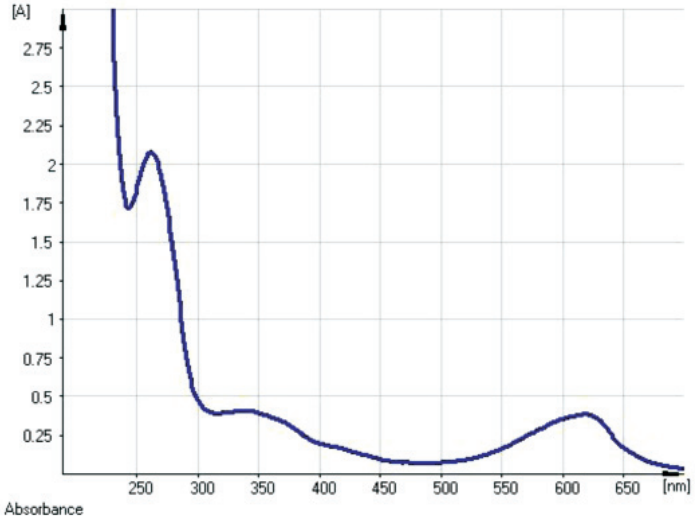

Рис. 3. Электронный спектр водного извлечения из биомассы спирулины

Методика количественного определения содержания β-каротина в биомассе спирулины. Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл гексана, колбу закрывают пробкой и осуществляют экстракцию при периодическом перемешивании в течение 2 часов. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная полоса»). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 2 мл гексанового извлечения количественно переносят в хроматографическую колонку с оксидом алюминия (высота слоя – 1 см, диаметр – 2 см). Каротиноиды элюируют гексаном до полного отделения β-каротина от других пигментов и его десорбирования (конец хроматографирования определяют по исчезновению желтой окраски вытекающего из колонки элюата). Гексановый раствор β-каротина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем гексаном до метки и перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание β-каротина в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1000}{2773 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья,%; 2773 – удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1\,см}$ β-каротина при длине волны 450 нм.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствует о том, что ошибка единичного определения содержания β-каротина в биомассе спирулины доверительной вероятностью 95% составляет +4,45% (табл. 1). Определено, что содержание β-каротина в биомассе спирулины варьируется от 20,90 до 40,85 мг%.

Методика количественного определения содержания фикоцианина в биомассе спирулины. Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл воды, колбу закрывают пробкой и осуществляют экстракцию при периодическом перемешивании в течение 2 часов. Гомогенат центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 мин,

5 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем до метки водой очищенной, перемешивают и измеряют оптическую плотность полученного испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную.

Таблица 1

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания β-каротина в биомассе спирулины

f	$\overline{X}$	S	P, %	$t(P,f)$	ΔX	E, %
10	40,08	0,7998	95	2,23	±1,78	±4,45

Содержание фикоцианина в пересчете на абсолютно сухое сырье в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 20 \cdot 25 \cdot 100}{8{,}97 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 8,97 – удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1\text{ см}}$ фикоцианина при длине волны 620 нм

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствует о том, что ошибка единичного определения содержания фикоцианина в биомассе спирулины доверительной вероятностью 95 % составляет +4,07 % (табл. 2). Определено, что содержание фикоцианина в биомассе спирулины варьируется от 5,57 до 10,05 %.

Таблица 2

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания фикоцианина в биомассе спирулины

f	$\overline{X}$	S	P, %	$t(P,f)$	ΔX	E, %
10	8,10	0,1478	95	2,23	±0,33	±4,07

Выводы

Разработаны методики количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой с использованием соответственно хроматоспектрофотометрии (аналитическая длина волны 450 нм) и спектрофотометрии (аналитическая длина волны 620 нм). Определено, что содержание β-каротина в биомассе спирулины варьируется от 20,90 до 40,85 мг %, содержание фикоцианина в биомассе спирулины варьируется от 5,57 до 10,05 %.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.

2. Котельников Г.П., Шпигель А.С. Доказательная медицина. Научно обоснованная медицинская практика: монография. – 2-е, изд. перераб. и доп. – М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2012. – 242 с.

3. Куркин В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд. – М.: РИА «Новая волна», 2008. – 1206 с.

5. Новый терапевтический справочник / под ред. И.Н. Денисова, Н.А. Мухиной, А.Г. Чучалина. Серия «Клинические рекомендации».– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 608 с.

6. Первушкин С.В., Воронин А.В., Сохина А.А. Биомасса спирулины: исследования и перспективы использования: монография. – Самара: СамГМУ, 2004. – 100 с.

7. Boussiba S., Richmond A. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. – 1979. – Vol. 120. – P. 155–159.

References

1. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: Vyp. 2. Obshhie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e / MZ SSSR. 11-e izd., dop. M.: Medicina, 1990. 400 p.

2. Kotel'nikov G.P., Shpigel' A.S. Dokazatel'naya medicina. Nauchno obosnovannaya medicinskaya praktika: monografiya. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: Izdatel'skaya gruppa «GE'OTAR-Media», 2012. 242 p.

3. Kurkin V.A. Osnovy fitoterapii: Uchebnoe posobie dlya studentov farmacevticheskix vuzov. Samara: OOO «Ofort»; GOU VPO «SamGMU Roszdrava», 2009. 963 p.

4. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva. 15-e izd. M.: RIA «Novaya volna», 2008. 1206 p.

5. Novyj terapevticheskij spravochnik / Pod red. I.N. Denisova, N.A. Muxinoj, A.G. Chuchalina. Seriya «Klinicheskie rekomendacii». M.: GE'OTAR-Media, 2005. 608 p.

6. Pervushkin S.V., Voronin A.V., Soxina A.A. Biomassa spiruliny: issledovaniya i perspektivy ispol'zovaniya: Monografiya. Samara: SamGMU, 2004. 100 p.

7. Boussiba S., Richmond A. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga Spirulina platensis // Arch. Microbiol. 1979. Vol. 120. pp. 155–159.

Рецензенты:

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Дубищев А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии им. заслуженного деятеля науки РФ, профессора А.А. Лебедева, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 09.07.2013.