

УДК 577.1

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БИОМАССЫ СПИРУЛИНЫ ПЛАТЕНСИС И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ЕЕ ОСНОВЕ

© 2007 П.П. Пурыгин<sup>1</sup>, Н.Н. Желонкин<sup>2</sup>, О.Н. Павлова<sup>3</sup>, С.В. Первушкин<sup>4</sup>,  
В.А. Куркин<sup>5</sup>, Ю.Л. Герасимов<sup>6</sup>, Т.Ю. Боронец<sup>7</sup>

Работа посвящена изучению биомассы Спирулины платенсис, при этом особое внимание уделяется ее токсичности и антиоксидантной активности. Исследование токсичности проводилось на образце дафнии. Антиоксидантная активность выявлена при задержке окисления адреналина антиоксидантами в Спирулине платенсис. Результат нашей работы вполне согласован с общепринятой теорией.

### 1. Актуальность исследования

Сине-зеленая нитчатая микроводоросль Спирулина платенсис (*Spirulina platensis*, семейство Осцилляториевые — *Oscillatoriaceae*) широко культивируется во многих странах. Химический состав биомассы включает в себя множество различных групп соединений: белки (50.8%); витамины С, Е и группы В; свободные аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты; эссенциальные фосфолипиды; полисахариды (15.7%); пигменты: фикоцианин С (9–15%), каротиноиды (30–180 мг %), хлорофилл а [1].

Большая часть макро- и микроэлементов, содержащихся в биомассе *Spirulina platensis*, находится в форме органических соединений. В частности, микроэлементы — катионы d-элементов образуют хелатные комплексы с аминокислотами и полипептидами.

<sup>1</sup>Пурыгин Петр Петрович, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

<sup>2</sup>Желонкин Николай Николаевич, кафедра фармацевтической технологии Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

<sup>3</sup>Павлова Ольга Николаевна, кафедра технологии и организации питания Московского государственного университета сервиса (Самарский филиал), 443099, Россия, г. Самара, ул. Куйбышева, 103.

<sup>4</sup>Первушкин Сергей Васильевич, кафедра фармацевтической технологии Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

<sup>5</sup>Куркин Владимир Александрович, кафедра фармакогнозии с ботаникой и оснований фитотерапии Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

<sup>6</sup>Герасимов Юрий Леонидович, кафедра зоологии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

<sup>7</sup>Боронец Татьяна Юрьевна, кафедра фармацевтической технологии Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Белки являются значимой группой биологически активных соединений биомассы *Spirulina platensis* благодаря высокому содержанию и сбалансированному аминокислотному составу. По данным различных литературных источников, содержание белка в биомассе *Spirulina platensis* составляет 40–70% [2]. Подобный разброс данных связан с использованием неодинаковых методов количественного анализа, разных штаммов и различиями в условиях культивирования. Исследования показали, что с возрастом культуры относительное содержание белка в ней уменьшается, хотя определенные колебания наблюдаются в течение всего периода культивирования [3].

Исследования электрофоретическим методом фракционного состава белков позволили установить наличие большого количества белковых фракций и определенной их изменчивости [4]. Присутствуют как стабильные белковые фракции, обнаруживаемые в течение всего роста культуры, так и переменные белковые фракции, появляющиеся лишь в определенные периоды роста культуры. Углеводы *Spirulina platensis* представлены главным образом сложными полимерами. Полисахариды входят в состав клеток, клеточных стенок и слизистых чехлов [5].

У *Spirulina platensis*, как и других сине-зеленых водорослей, над всеми фракциями углеводов преобладают полисахариды типа гемицеллюлоз и пектиновых веществ (10–16%).

Сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis*, в отличие от других растений и бактерий, содержит водорастворимые фикобилиновые пигменты — С-фикоцианин и аллофикоцианин [6].

Фикоцианин-билипротеид, имеющий молекулярную массу 275000 дальтон и содержащий в качестве простетической группы фикобилины — тетрапиррольные соединения с открытой цепью в количестве 20–30 на молекулу пигмента. Белковая часть фикоцианина состоит из 17 аминокислот с преобладанием кислых аминокислот; N- и C-концевыми аминокислотами являются соответственно треонин и серин. Низкие значения отмечены по содержанию лизина, характерны аминокислоты, имеющие гидрофобные радикалы. Изоэлектрическая точка — при рН 4,3; температура денатурации 48–51°C [7]. В состав фикоцианина входит углеводный компонент (4,5%), образованный уроновыми кислотами, в котором обнаружены также ксилоза. А при соблюдении мягких условий экстракции возможно получение кристаллических препаратов данного пигмента [8, 9].

Первоначально интерес к спирулине платенсис определялся только как к источнику белков, витаминов и минеральных веществ. Сравнительно недавно появились исследования, посвященные изучению фармакологических эффектов применения спирулины и биологически активных соединений, извлеченных из нее [10, 11].

Среди большого числа биологически активных соединений практический интерес представляют водорастворимые белки и пигменты (фикоцианин, каротиноиды, хлорофиллы), имеющие огромное значение и практический интерес как для фармации и медицины, так и пищевой промышленности и косметологии.

В настоящий момент одним из самых перспективных направлений в области исследования спирулины платенсис является создание препаратов растительного происхождения (спрея и геля), удачно сочетающих высокую активность и мягкое действие на организм человека с минимальными побочными эффектами [12].

Спреи — лекарственная форма, общая фармакопейная статья (ФС) на которую отсутствует в Государственной фармакопее XI издания. В настоящее время представляет собой часто употребляемую форму выпуска фармацевтического продукта.

Данная лекарственная форма представляет собой растворы, эмульсии или суспензии и предназначена для обеспечения местного или системного эффекта. Допускается расслаивание эмульсий и суспензий в процессе хранения, однако они должны легко реэмульгироваться и ресуспендироваться при встряхивании для обеспечения однородности дозирования лекарственного средства [13]. Спреи представляют собой многодозовые дозируемые и недозируемые лекарственные формы.

Таким образом, спрей — жидкая многодозовая лекарственная форма, предназначенная для обеспечения местного или системного эффекта путем высвобождения лекарственного средства (раствора, эмульсии, суспензии) из специального вида упаковки в виде капель, размер которых соответствует отверстию распыляющего устройства (пульверизатора).

Общими показателями качества являются однородность массы и масса 1 дозы.

Спрей, обладая преимуществами аэрозольной упаковки (удобство применения, быстрота эффекта), лишен недостатков, связанных с применением флаконов под повышенным давлением и использованием пропеллентов в качестве газа носителя: высокая стоимость, сложность изготовления, опасность, возможность взрыва и др.

Гель обладает ранозаживляющим, противовоспалительным и антимикробным действием. В качестве антимикробного ингредиента в состав разработанного водорастворимого геля входит настойка чистотела большого, экстрактивные вещества которого оказывают противовоспалительное и антимикробное действия и, в тоже время, выполняют роль стабилизатора, защищая лекарственную форму от микробной кантаминации. В качестве стимулятора репаративных процессов входит микроводоросль спирулина платенсис, способствующая ускорению регенерации и эпителизации тканей. В исследуемом препарате в качестве основы был использован водорастворимый аэросилсодержащий гель.

## 2. Цель исследования

Провести анализ токсичности и антиоксидантной активности биомассы спирулины платенсис и лекарственных препаратов (спрея и геля) на ее основе с целью обоснования их фармакотерапевтических эффектов.

## 3. Экспериментальная часть

Объектами исследования служили биомасса спирулины платенсис, выращенной биотехнологическим методом на базе НПП "Поиск" (г. Самара), спрей и гель с концентрацией спирулины 1%. Измерение оптической плотности производили при длине волны 347 нм с помощью спектрофотометра Specord 40 (Spectrolab, Германия) при использовании кювет с длиной оптического пути 10 мм.

*Определение токсичности спрея и геля.* По стандартной методике Н.С. Строганова [14] проводилось исследование влияния на дафний геля и спрея, изготовленных на основе спирулины. Исследование самой биомассы спирулины по данной методике не представлялось возможным, так как происходило закупоривание дыхательных путей у дафний.

Среду для экспериментов готовили на основе отстоянной не менее трех суток водопроводной воде, в которую добавляли до необходимых концентраций (от 0,01 до 5 мг/л) исследуемые вещества и корм — 1% суспензию пекарских дрожжей.

В каждый сосуд (объемом 0,75 л) сажали по 10 рачков в возрасте до 24 часов из одного поколения.

Использовали дафний из имеющейся на кафедре зоологии лабораторной культуры, содержащейся по общепринятой методике [15].

В качестве контроля использовали отстоянную водопроводную воду.

Эксперименты проводились на протяжении 21 суток каждый в термостате со стеклянной дверкой при температуре 21–22°C и естественном освещении. Дафний кормили суспензией пекарских дрожжей через 1 сутки. Через каждые 4 дня проводили замену среды на вновь приготовленную.

В ходе экспериментов учитывали следующие показатели: количество погибших и оставшихся в живых рачков, время появления яиц в выводковых камерах, время выхода молоди из выводковых камер и ее количество. Для изучения воспроизводства использовали показатель плодовитости (среднее количество потомства на одну самку на каждый вымет молоди). Все эксперименты проводились в трех повторностях. Достоверность различий оценивали по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни [16].

В растворах геля и спрея гибель рачков начиналась с концентрации 2,5 мг/л (рис. 2), смертность к 21 суткам здесь достигла 37 и 13% соответственно. При 5,0 мг/л в растворе спрея дафнии погибали на 16-е сутки, в растворе геля — на 21-е сутки. Следует отметить, что в растворе геля гибель шла довольно равномерно по ходу эксперимента, а в растворе спрея до 10–16-х суток все дафнии оставались живыми, далее начиналось быстрое вымирание рачков.

В растворах геля размножение дафний происходило во всех концентрациях (табл. 1). Задержка выхода молоди по сравнению с контролем составляла 1–2 суток, начиная с концентрации 5 мг/л. Плодовитость оказалась достоверно меньше контроля в растворах 1,25–5,0 мг/л.

В растворе 0,25 мг/л молоди появилось меньше, чем в контроле, но недостоверно. В растворах 0,1–0,01 мг/л размножение не отличалось от контроля.

В растворах спрея размножение дафний также происходило во всех концентрациях с задержкой выхода молоди относительно контроля на 1–2 суток начиная с концентрации 5 мг/л (табл. 1). При этом в растворе спрея 5,0 мг/л появилось всего 2 рачка. Плодовитость здесь также оказалась достоверно меньше, чем в контроле в растворах 1,25–5,0 мг/л.

В растворах спрея 0,25–2,5 мг/л плодовитость оказалась меньше, чем в соответствующих растворах геля, но недостоверно. В концентрациях 0,1 и 0,01 мг/л негативного влияния геля и спрея на размножение дафний не выявлено.

Раствор спрея оказался токсичнее для дафний, чем раствор геля по показателям выживаемости и размножения (табл. 2 и рис. 1). Недействующие концентрации для обоих — 0,1 мг/л и ниже.

Исходя из результатов проведенных экспериментов исследовавшиеся препараты геля и спрея, изготовленных на основе пресноводной сине-зеленой нитчатой водоросли спирулины, можно считать веществами средней степени токсичности для дафний.

*Определение антиоксидантной активности биомассы спирулины и спрея.* Обнаружено, что в процессе аутоокисления низких концентраций адреналина (230 мкМ) в щелочной среде (рН = 10,65) при комнатной температуре в отсутствие дополнительных источников окисления интенсивно нарастает поглощение с максимумом при 347 нм. Установлено, что появление этого продукта окисления адреналина, не описанного ранее в литературе, значительно опережает по времени

Таблица 1

**Плодовитость (яиц/самку) дафний в ходе эксперимента**

Концентрация	Сутки							
	10	11	12	13	14	16	18	20
Контроль	3,3		4,9		7,3	5,1	3,2	6,8
Гель 1,25 мг/л	0,8				0,9	1,5	2,3	2,4
Гель 2,5 мг/л		0,7		1,5		1,6		2,5
Гель 5,0 мг/л			0,4		0,9	1,5		1,3
Спрей 1,25 мг/л	0,6				0,8	1,2	1,7	1,9
Спрей 2,5 мг/л	0,7				0,8	1,4	2,1	2,5
Спрей 5,0 мг/л			0,3					

Таблица 2

**Выживаемость дафний (%) в растворах геля и спрея**

Концентрация	Сутки									
	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
Контроль	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Гель 5,00 мг/л	100	80	70	70	70	70	60	40	2	1
Гель 2,5 мг/л	100	100	100	93	80	77	63	53	43	37
Спрей 5,00 мг/л	100	100	100	100	80	2	1	0		
спрей 2,5 мг/л	100	100	100	100	100	100	90	70	3	1

образование адренохрома и ингибируется некоторыми исследованными антиоксидантами (аскорбат, цистеин, кверцетин) [17]. На этих данных основано измерение антиоксидантной активности биомассы спирулины и спрея. Процедура проведения реакции аутоокисления адреналина: к 2 мл 0,2 М бикарбонатного буфера (рН = 10,65) добавляют 100 мкл 0,1% раствора адреналина, тщательно перешивают, измеряют величину оптической плотности при длине волны 347 нм через 40 секунд в течение 2 минут. Для измерения в кюветы к 2 мл бикарбонатного буфера добавляют поочередно 3, 4, 5, 7, 10, 14 мг исследуемых объектов и затем 100 мкл 0,1% раствора адреналина, перемешивают и измеряют нарастание оптической плотности как описано выше. В контрольную пробу, против которой проводится измерение, вносят 2 мл буфера и исследуемый объект, но не добавляют адреналин. Для исключения влияния плотности исследуемых объектов производился пересчет на массу.

О величине антиоксидантной активности экстрактов судили о степени ингибирования ими скорости аутоокисления адреналина. Расчет процента ингибирования скорости реакции аутоокисления вычисляли по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \left[ 1 - \frac{\Delta D_{\text{опыт}}}{\Delta D_{\text{контроль}}} \right] \cdot 100\%$$

где  $\Delta D_{\text{опыт}}$  и  $\Delta D_{\text{контроль}}$  — скорости реакции аутоокисления адреналина в присутствии и отсутствии экстракта.

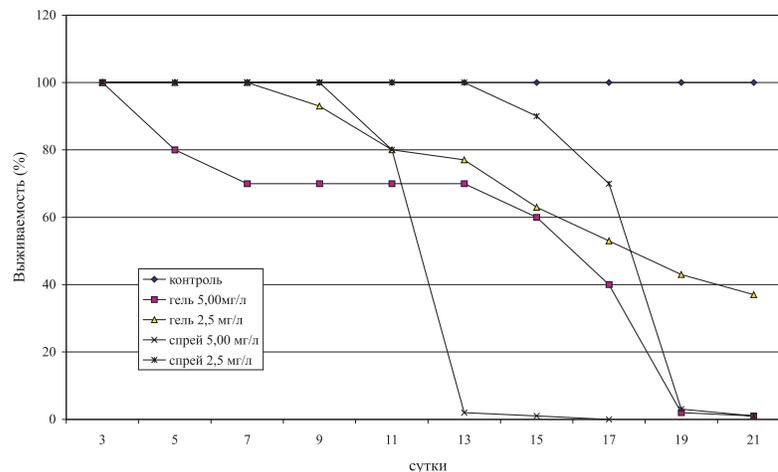


Рис. 1. Выживаемость (%) дафний в растворах геля и спрея

О скорости окисления адреналина судили по изменению оптической плотности измеренной при 347 нм за 2 минуты [17].

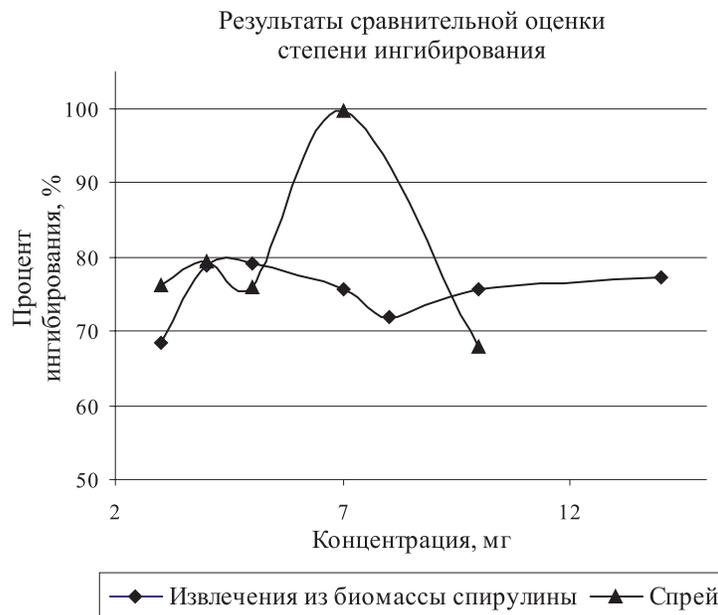


Рис. 2. Результаты сравнительной оценки степени ингибирования

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что спрей и извлечение из биомассы спирулины платенсис обладают ярко выраженной антиоксидантной активностью.

Следовательно, данные препараты можно рекомендовать для безопасного применения в качестве антиоксидантов в медицинской и фармацевтической практике.

## Литература

- [1] Первушкин, С.В. Методика идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе / С.В.Первушкин, В.А.Куркин, А.В.Воронин // Растительные ресурсы. – 2002. – Т. 38. – В. 1. – С. 112–119.
- [2] Альбицкая, О.А. Синтез витаминов культурой спирулины / О.А.Альбицкая, С.С.Воронкова, Т.И.Хвостенко // Мат. VII Всесоюз. Раб. Совец. по вопр. Круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. – Киев, 1972. – С. 148–149.
- [3] Судьина, Е.Г. Биохимия сине-зеленых водорослей / Е.Г.Судьина, Е.И.Шнюкова, И.В.Костлан; под ред. Е.Г. Судьиной. – Киев, 1978. – С. 24–56.
- [4] Пироженко, С.У. Біохімічна характеристика *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. 2. Вміст вуглеводів у процесі росту культури *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl / С.У.Пироженко // Укр. Ботан. Журн. – 1975. – Т. 32. – №2. – С. 229–332.
- [5] Анализ белков биомассы *Spirulina platensis* / С.В.Первушкин [и др.] // Химия природных соединений. – 2002. – Т. 41. – В. 3. – С. 101–112.
- [6] Бекасова, О.Д. Исследование фотохимических свойств фотосинтетических пигментов водорослей – фикоцианина и фикоэритрина: автореф. дис ... канд. биол. наук / О.Д.Бекасова. – М., 1971. – 20 с.
- [7] A.Mittal [et al.] // *Phytother. Res.* – 1999. – V. 13. – No. 2. – P. 111–114.
- [8] Wang, X.Q. A novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes / X.Q.Wang, L.N.Li, W.R.Chang // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2001. – V. 57. – No. 6. – P. 784–792.
- [9] White, J.C. Photostability studies of phycobiliprotein fluorescent labels / J.C.White, L.Stryer // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 161. – P. 442–452.
- [10] Блинкова Л.П. Биологическая активность спирулины / Л.П.Блинкова, О.Б.Горобец, А.П.Батура // Журн. микробиол. – 2001. – №2. – С. 114–118.
- [11] Первушкин, С.В. Биомасса спирулины: исследования и перспективы использования. Монография // С.В.Первушкин, А.В.Воронин, А.А.Сохина. – Самара. – 2004. – 100 с.
- [12] Разработка спрея для лор-практики на основе биомассы спирулины и очистителя большого / С.В.Первушкин [и др.] // Сб. науч. трудов XI Всероссийского Конгресса "Экология и здоровье человека". – Самара, 2006. – С. 200–201.
- [13] Спреи: определение понятия / О.И. Терешкина [и др.] // Фармация. – 2006. – №5. – С. 41–43.
- [14] Строганов, Н.С. Методика определения токсичности водной среды / Н.С.Строганов // Методики биологических исследований по водной токсикологии. – М.: Наука, 1971. – С. 14–60.
- [15] Строганов, Н.С. Ведение лабораторной культуры и определение плодовитости дафний в ряду поколений / Н.С.Строганов, Л.В.Колосова // Методики биологических исследований по водной токсикологии. – М.: Наука, 1971. – С. 210–216.
- [16] Гублер, Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В.Гублер. – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.

- [17] Сирота, Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45. – №3. – С. 109–116.

Поступила в редакцию 13/XII/2006;  
в окончательном варианте — 13/XII/2006.

## ANALYSIS OF TOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BIOMASS AND OFFICIAL CONFORMATION OF ALGA SPIRULINA PLATENSIS

© 2007 P.P. Purigin<sup>8</sup> N.N. Zhelonkin<sup>9</sup> O.N. Pavlova<sup>10</sup> S.V. Pervushkin,<sup>11</sup>  
V.A. Khurkin,<sup>12</sup> U.L. Gerasimov,<sup>13</sup> T.Y. Boronets<sup>14</sup>

To study properties biomass and spray of alga spirulina platensis we pay special attention to toxicity and antioxidant activity. Investigation of the toxicity conduct on the water flea Research of antioxidant activity found on inhibition oxidation of adrenalin with antioxidant contain in alga spirulina platensis. The result of our work agree with accepted theory.

Paper received 13/XII/2006.

Paper accepted 13/XII/2006.

---

<sup>8</sup>Purygin Pyotr Petrovich, Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

<sup>9</sup>Zhelonkin Nikolay Nikolaevich, Dept. of Pharmaceutical Technology, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.

<sup>10</sup>Pavlova Olga Nikolaevna, Dept. of Technology and Organization of Nutrition, Moscow State University of Services (Samara Branch) Samara, 443099, Russia.

<sup>11</sup>Pervushkin Sergey Vasiljevich, Dept. of Pharmaceutical Technology, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.

<sup>12</sup>Khurkin Vladimir Alexandrovich, Dept. of Pharmacognosy with Botany and Fundamental Physiotherapy, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.

<sup>13</sup>Gerasimov Yuriy Leonidovich, Dept. of Zoology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

<sup>14</sup>Boronets Tat'yana Yurievna, Dept. of Pharmaceutical Technology, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.