

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУППОЗИТОРИЕВ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ СПИРУЛИНЫ

И.И. Маркова, С.В. Первушкин, докт. фарм. наук, профессор,
В.А. Куркин*, докт. фарм. наук, профессор
Самарский государственный медицинский университет;
443099, Самара, ул. Чапаевская, д.89

*E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Для анализа суппозиторий на основе биомассы спирулины пищевой разработаны методики установления подлинности и спектрофотометрического количественного определения β -каротина и пигмента фикоцианина. Содержание β -каротина и фикоцианина в суппозиториях колеблется от 0,80 до 1,35 мг% и от 0,20 до 0,33% соответственно.

Ключевые слова: спирулина пищевая, *Spirulina platensis*, биомасса, β -каротин, фикоцианин, суппозитории, стандартизация, спектрофотометрия.

Номенклатура лекарственных средств (ЛС) для лечения проктологических и гинекологических заболеваний весьма ограничена, а применение сильнодействующих лекарственных препаратов (ЛП) нередко вызывает побочные реакции, которые могут иметь серьезные последствия [5]. Геморрой и воспалительные заболевания мочеполовой системы у женщин протекают продолжительное время, часто сопровождаются осложнениями. [7, 9]. При лечении хронических заболеваний часто применение лекарственных растений более целесообразно, чем использование химиотерапии. По фармакологической активности препараты растительного происхождения, как правило, не уступают синтетическим препаратам, а благодаря сбалансированному комплексу биологически активных веществ они воздействуют на организм человека, проявляя при этом минимум возможных побочных эффектов.

Геморрой – одно из самых распространенных колоректологических заболеваний, которым страдают в среднем 120 человек из 1000, а его доля в общей структуре патологии прямой кишки составляет почти 40% [7]. В лечении больных с данными патологиями ведущее место принадлежит ЛП, проявляющим местноанестезирующее и противовоспалительное действие, а также антибактериальной терапии. Медикаментозное лечение связано с выбором наиболее рациональной лекарственной формы, в которой действующее вещество или комплекс веществ обладает максимальным лечебным или профилактическим эффектом [5–7].

От пути введения ЛП в организм зависят: скорость и полнота поступления лекарственных веществ, время сохранения активной концентрации в плазме крови, возможность поступления лекарства к месту действия и, следовательно, наличие или отсутствие лечебного эффекта [1, 3]. Наиболее часто при лечении геморроя и воспалительных заболеваний в гинекологии применяется такая лекарственная форма, как суппозитории [2, 7, 9], так как они позволяют снизить уровень аллергических реакций, пролонгировать лечебный эффект, особенно – в очаге воспаления, увеличить скорость всасывания лекарственного вещества, а в некоторых случаях – снизить дозу.

Одним из перспективных растительных источников получения препаратов, обладающих регенерирующей и противовоспалительной активностью, является биомасса спирулины пищевой (*Spirulina platensis*, семейство осцилляторiales – *Oscillatoriales*; отдел сине-зеленые водоросли – *Cyanophyta*) [4, 6]. 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, В₁₂, К, В₁, В₂, В₃, В₆, β -каротин), аминокислоты, в том числе незаменимые [6, 10]. Биологически активные соединения спирулины обладают широким спектром фармакологической активности, включая противовоспалительные, регенерирующие, иммуномодулирующие, гепатопротекторные и противораковые свойства [4, 6].

Цель настоящего исследования – разработка методов стандартизации суппозиторий, содержащих биомассу спирулины.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были выбраны: биомасса *Spirulina platensis* (Nords.) Gelit.-835, произведенная в закрытых условиях, а также основы ПЭГ 1500, ПЭГ 400, витепсол Н-15, витепсол W-35, твердый жир, масло какао. Суппозитории готови-

ли методом выливания массой 3,0 г. Биомассу спирулины вводили в основы по типу суспензии. В результате сравнительного анализа по внешнему виду и основным технологическим показателям (время полной деформации, температура плавления, температура затвердевания) для дальнейшей работы были отобраны 4 состава суппозиторных основ (табл. 1).

Для дальнейшей работы с разрабатываемым ЛС необходимо было решить вопросы установления подлинности и определения содержания основных действующих веществ. При разработке подходов к стандартизации суппозитория мы придерживались принципа унификации методов анализа в ряду сырье – субстанция – лекарственная форма [8].

Для определения подлинности суппозитория предложена идентификация пигмента фикоцианина, содержащегося в биомассе спирулины и проявляющего противовоспалительное действие, визуальным методом – окрашивание в синий цвет водного раствора после извлечения ацетоном каротиноидов и хлорофилла.

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА СУППОЗИТОРНЫХ ОСНОВ

Тип основы (характер)	Номер состава	Состав
Дифильный	1	Масло какао – сплав ПЭГ 1500 : ПЭГ 400 (1,5:1) (1:1)
	2	Витепсол Н-15 и твердый жир (1:1) – сплав ПЭГ 1500 : ПЭГ 400 (1,5:1) (1:1)
Гидрофильный	3	Сплав ПЭГ 1500 и ПЭГ 400 (9:1)
Липофильный	4	Витепсол Н-15, витепсол W-35 (1:1)

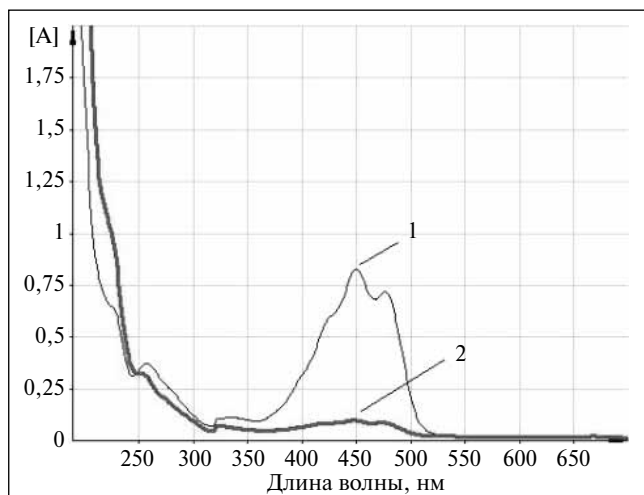


Рис. 1. Электронные спектры гексановых растворов биомассы спирулины (1) и суппозитория спирулины, очищенных на оксиде алюминия (2).

В ходе исследования были изучены УФ-спектры гексановых и водных растворов суппозитория. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40». Показано, что для определения подлинности препарата целесообразно также использовать метод спектрофотометрии по характерным максимумам поглощения в электронных спектрах гексанового раствора, очищенного на колонке оксида алюминия, имеющего максимум поглощения (450 нм), характерный для β-каротина (рис. 1), и водного раствора, имеющего в длинноволновой области максимум поглощения (620 нм), характерный для фикоцианина (рис. 2).

Для количественного анализа предложено определение содержания β-каротина методом хромато-спектрофотометрии при аналитической длине волны 450 нм, а также фикоцианина методом спектрофотометрии при длине волны 620 нм. Попытка применить спектрофотометрию неочищенного гексанового раствора суппозитория показала, что в оптическую плотность анализируемого раствора вносят свой вклад хлорофилл и сопутствующие каротиноиды (рис. 3).

Методика количественного определения содержания β-каротина. Около 6 г препарата (2 суппозитория) помещают в колбу вместимостью 50 мл, расплавляют суппозитории на водяной бане при температуре 40°С, прибавляют 10 мл ацетона, тщательно перемешивают и центрифугируют при скорости 8000 об/мин (операцию повторяют дважды). Ацетоновые экстракты объединяют, фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР-16. Фильтр промывают ацетоном, объединенный экстракт количественно переносят в делительную воронку, в которую добавляют 30 мл воды очищенной. Каротиноиды из водно-ацетонового раствора извлекают последовательно 10, 5 и 5 мл гексана, каждый раз после встряхивания оставляя смесь до полного разделения слоев. После расслаивания нижний водно-ацетоновый слой сливают и отбрасывают. Все порции гексанового извлечения сливают в другую делительную воронку и отмывают его от ацетона 10 мл воды очищенной. Отделенный гексановый раствор 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 каротиноидов 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 препарате X вычисляют в мг% по формуле:

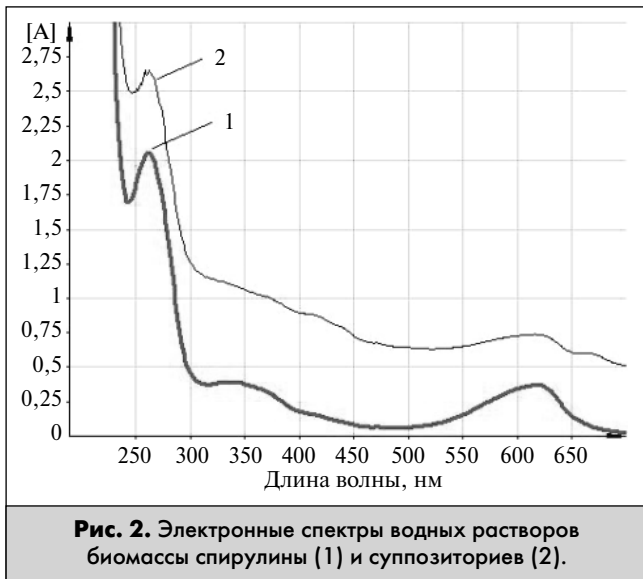


Рис. 2. Электронные спектры водных растворов биомассы спирулины (1) и суппозиторияев (2).

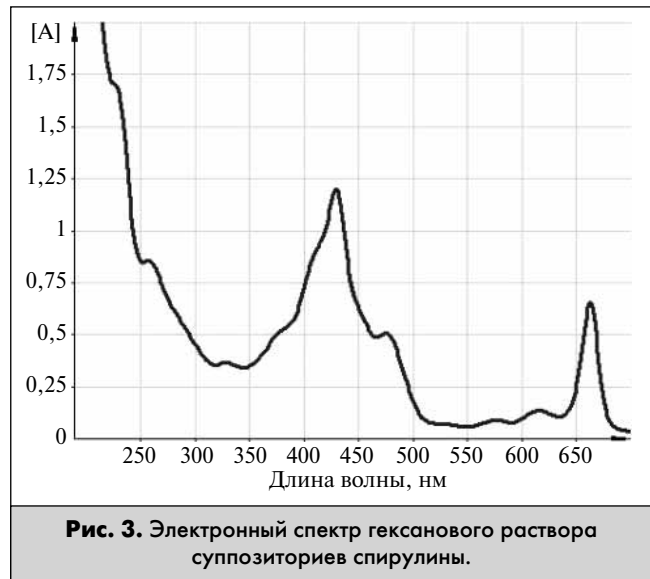


Рис. 3. Электронный спектр гексанового раствора суппозиторияев спирулины.

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 1000}{2773 \cdot m},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска препарата, г; 2773 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

Ошибка единичного определения содержания β -каротина в суппозиториях с биомассой спирулины при доверительной вероятности 95% составляет $\pm 4,97\%$ (табл. 2). Содержание β -каротина в суппозиториях с биомассой спирулины колеблется от 0,80 до 1,35 мг%.

Методика количественного определения содержания фикоцианина. Около 6 г препарата (2 суппозитория) помещают в колбу вместимостью 50 мл, расплавляют суппозитории на водяной бане при температуре 40°C, прибавляют 10 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Гомогенат центрифугируют при скорости 8000 об/мин в течение 15 мин и измеряют оптическую плотность полученного фильтрата. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную.

Содержание фикоцианина в препарате X вычисляют в % по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 10}{8,97 \cdot m},$$

Таблица 2

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ β -КАРОТИНА В СУППОЗИТОРИЯХ С БИОМАССОЙ СПИРУЛИНЫ

f	\bar{X}	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
10	1,05	0,0234	95	2,23	$\pm 0,052$	$\pm 4,97$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска препарата, г; 8,97 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ фикоцианина при длине волны 620 нм.

Ошибка единичного определения содержания фикоцианина в суппозиториях с биомассой спирулины при доверительной вероятности 95% составляет $\pm 3,87\%$ (табл. 3). Содержание фикоцианина в суппозиториях с биомассой спирулины колеблется от 0,20 до 0,33%.

Выводы

1. Для определения подлинности суппозиторияев с биомассой спирулины предложено проводить идентификацию пигмента фикоцианина и использовать спектральные характеристики β -каротина и фикоцианина.

2. Разработана методика хроматоспектрофотометрического количественного определения β -каротина в суппозиториях с биомассой спирулины (аналитическая длина волны – 450 нм). Содержание β -каротина в суппозиториях колеблется от 0,80 до 1,35 мг%.

3. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения фикоцианина в суппозиториях с биомассой спирулины (аналитическая длина волны – 620 нм). Содержание фикоцианина в суппозиториях колеблется 0,20 до 0,33% соответственно.

Таблица 3

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФИКОЦИАНИНА В СУППОЗИТОРИЯХ С БИОМАССОЙ СПИРУЛИНЫ

f	\bar{X}	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
10	0,31	0,0054	95	2,23	$\pm 0,012$	$\pm 3,87$

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузовский А.Н., Казарян И.А. Разработка составов и технологии суппозиторных основ дифильного типа. Фармация, 1988; 5: 21–23.
2. Государственная фармакопея СССР XI издания, вып.2. М.: Медицина, 1990; 400.
3. Драник Л.И. Мягкие лекарственные формы и вспомогательные вещества для их производства. Фармац. журн., 1990; 3: 45–47.
4. Куркин В.А. Основы фитотерапии. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрави», 2009: 963.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: «Новая волна», 2008; 1200.
6. Первушкин С.В., Воронин А.В., Сохина А.А. Биомасса спирулины: исследования и перспективы использования. Самара: СамГМУ, 2004; 100.

7. Ривкин В.Л., Дульцев Ю.В., Капулер Л.Л. Геморрой и другие заболевания заднепроходного канала. М.: Медицина, 1994; 240.
8. Самылина И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств. Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты. Материалы I Международного научного конгресса. М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ и др., 1994; 254.
9. Савельева Г.М., Антонова Л.В. Острые воспалительные заболевания внутренних половых органов женщин. М.: Медицина, 1987; 160.
10. Boussiba S., Richmond A. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., 1979; 120: 155–159.

Поступила 10 марта 2014 г.

STANDARDIZATION OF SPIRULINA (SPIRULINA PLATENSIS) MASS-BASED SUPPOSITORIES

I.O. Markova; Professor S.V. Pervushkin, PhD; Professor V.A. Kurkin, PhD*

Samara State Medical University; 89, Chapayevskaya St., Samara 443099

SUMMARY

Dietary spirulina (*Spirulina platensis*) biomass is one of the promising types of plant raw materials to design drugs having regenerating and anti-inflammatory activities. A dosage form, such as suppositories, is commonly used to treat hemorrhoid and gynecological inflammatory diseases. To analyze dietary spirulina biomass-based suppositories, their standardization procedure has been developed. To determine the identity of the suppositories, the authors propose to identify the pigment phycocyanin and to use the spectral characteristics of β -carotene and phycocyanin. Procedures have been devised for the spectrophotometric quantification of β -carotene and phycocyanin. The content of β -carotene and phycocyanin in the suppositories ranges from 0.80 mg to 1.35 mg% and from 0.20 to 0.33%, respectively.

Key words: dietary spirulina (*Spirulina platensis*), biomass, β -carotene, phycocyanin, suppositories, standardization, spectrophotometry.

REFERENCES

1. Buzovsky A.N., Kazarian I.A. Development of formulations and technology suppozitornyh of difil' nogo type. Farmatsiya, 1988; 5: 21–23 (in Russian).
2. The State pharmacopoeia of the USSR XI ed., Moscow: Medicine, 1990; 400 (in Russian).
3. Dranik L.I. Soft dosage forms and auxiliary materials for their production. Farmac. J., 1990; 3: 45–47 (in Russian).
4. Kurkin V.A. Basis of herbal medicine. Samara: «Ofort»; «SamGMU Roszdrava», 2009: 963 (in Russian).
5. Mashkovsky M.D. Medicines. 15-ed. Moscow: Novaya volna, 2008; 1200 (in Russian).
6. Pervushkin S.V., Voronin A.V., Sokhina A.A. Biomass Spirulina: research and perspectives. Samara: «SamGMU», 2004; 100 (in Russian).
7. Rivkin V.L., Dultsev Yu.V., Kapuler L.L. Hemorrhoids and other diseases of the anal canal. Moscow: Medicine, 1994; 240 (in Russian).
8. Samylyna I.A. Problems of standardization of medicinal vegetative raw material and medicinal vegetative means. Traditional medicine and food: theoretical and practical aspects. Materials of the I International Scientific Congress. Moscow: Institute of traditional medicine of RF, etc., 1994; 254 (in Russian).
9. Savelyeva G.M., Antonova L.V. Acute inflammatory diseases of the female internal genital organs. Moscow: Medicine, 1987; 160 (in Russian).
10. Boussiba S., Richmond A. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., 1979; 120: 155–159.