

УДК 615.32: 547.9+543.544

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ ПРОПОЛИСА

© 2013 Н.В. Браславский, И.Ф. Шаталаев

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 21.05.2013

Проведено сравнительное исследование компонентного состава флавоноидов и фенилпропаноидов прополиса и тополя почек. На основе систематизации данных литературы и собственных результатов исследований показана близость компонентного состава прополиса и почек тополя с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии, электрофореза и ВЭЖХ. Обоснованы методологические подходы к стандартизации сырья и препаратов прополиса. На основе данных подходов разработаны унифицированные методики качественного и количественного анализа сырья и препаратов прополиса методами ТСХ, УФ-спектроскопии с использованием государственного стандартного образца пиностробина. Разработана нормативная документация на исследуемое сырье и препараты. Показаны пути рационального использования продукта пчеловодства прополиса.

Ключевые слова: прополис, почки, тополь, *Populus L.*, флавоноиды, фенилпропаноиды, стандартизация, ТСХ, УФ-спектроскопия, ВЭЖХ, электрофорез, пиностробин, рациональное использование

Перспективным источником противовоспалительных, антимикробных и регенерирующих лекарственных средств является продукт совместной жизнедеятельности пчел и растений (тополь, ива и др.) – прополис (Р. № 95/335/910, ВФС 42-1084-81) [1-5, 7-9]. Продукт пчеловодства животного происхождения прополис и его источники – растения семейства Ивовых (*Salicaceae*), в частности, виды рода тополь (*Populus L.*), широко используются в народном хозяйстве как источники ценной древесины для строительства, производства столярных изделий, и др. В настоящее время в России находятся большие сырьевые запасы видов рода *Populus L.*, но так как непрерывно растёт спрос на древесину, они быстро сокращаются. Создание быстрорастущих плантаций кроме экономического эффекта – важный социальный аспект [10]. При рубке леса побеги и почки деревьев являются отходами производства и практически не используются [10].

В медицинской практике широко используется лекарственное средство «Прополиса настойка» (Р. № 90/111/3, ФС 42-3736-99) [1, 2, 4, 6, 8, 9]. Использование в физиотерапии электрофореза с прополисом оказывает обезболивающий и противовоспалительный эффекты при лечении стоматологических заболеваний пародонтопатий, при острых и обостренных хронических периодонтитах, в гинекологии, а также для фонофореза; в отоларингологии при лечении нейросенсорной тугоухости – наружно для проведения фонофореза прополиса на растительном масле [1, 2, 4, 6, 8, 9].

Актуально совершенствование определения подлинности и доброкачественности препаратов прополиса на основе современных данных о компонентном составе биологически активных соединений (БАС). В препаратах прополиса, как и в почках тополя, антимикробную активность обуславливают флавоноиды и фенилпропаноиды [1-2, 4, 7-9]. Ранее было установлено, что стандартизацию сырья «Тополя почки «ангро»» (ФСП 42-03291682-01), препаратов тополя «Тополя настойка» (ФСП 42-03291747-01) и прополиса целесообразно проводить по содержанию суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в пересчете на государственный стандартный образец (ГСО) пиностробина (Р. № 001373/01, ФС 42-0073-01). Показана перспективность использования метода ВЭЖХ для стандартизации почек тополя, прополиса и их препаратов [1, 5, 8]. Однако в сырье прополиса и настойке (ВФС 42-1936-89) ранее определяли не флавоноиды, а простые фенолы неспецифической реакцией с солями железа [1]. Качественный анализ настойки прополиса (ФС 42-3736-99) в настоящее время представлен более специфичной цианидиновой реакцией на флавоноиды. Ранее была показана целесообразность использования тонкослойной хроматографии (ТСХ) и УФ-спектрофотометрии с использованием ГСО пиностробина (Рег. № 001373/01-2002, ФС 42-0073-01) для стандартизации сырья прополиса и почек тополя [1]. Актуальным является рациональное использование в медицинской практике прополиса и препаратов на его основе, что позволяет снизить сырьевую нагрузку на его растительные источники (тополя, ивы, березы и др.).

Цель исследований: проведение сравнительных фитохимических и аналитических исследований для стандартизации и обоснования целесообразности использования в медицинской

Браславский Никита Валерьевич, аспирант. E-mail: nk@bmail.ru

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета

практике препаратов на основе прополиса и его растительных источников.

Объекты и методы. Сравнительному исследованию подвергались образцы сырья прополиса из различных регионов России и образцы почек тополя (*Populus L.*), семейства Ивовых (*Salicaceae*), заготовленные в 2005-2011 гг. Кроме того, объектами исследования служили отечественные заводские образцы лекарственного средства «Прополиса настойка» серийного производства 2010-2012 гг.

Проведено сравнительное исследование образцов прополиса и тополя почек методом электрофореза в полиакриламидном геле. Для электрофореза настаивание образцов сырья проводили 20% спиртом этиловым в соотношении «сырье: экстрагент» 1: 50 при комнатной температуре в течение 48 часов в защищенном от света месте. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр с красной полосой. Анализируемые образцы в объеме 0,5 мл в смеси с 40% раствором сахарозы наносили на линию старта. Электрофоретическое определение молекулярных форм проводили в 7,5% полиакриламидном геле, состоящем из 2 гелей: концентрирующего (верхний слой) и разделяющего (нижний слой) – в трис-ЭДТА-боратном буфере при pH=9,0. При данной величине водородного показателя раствора в системе нами было отмечено эффективное разделение исследуемых белков на молекулярные фракции. Электрофорез вели при постоянном токе в два этапа: первый этап способствует образованию тонких пространственных слоев однородных по молекулярной массе молекул. Плотность тока $\Delta I=5$ мА/см, продолжительность 30 минут. Второй этап электрофореза является собственно разделяющим, позволяющий полученные области концентрирования разделить пространственно в структуре геля. Плотность тока 10 мА/см, продолжительность – до окончания электрофореза. В качестве индикатора окончания процесса разделения был выбран краситель бромфеноловый синий. При данном значении pH молекула индикатора приобретает эффективный отрицательный заряд, благодаря которому, а также размеру молекулы фронт данного вещества приходит на линию «финиша» первым. Полученные фракции белков окрашивали и фиксировали, для чего экспресс-окрашивание фракции белков и фиксацию электрофореграмм проводили следующим способом: по окончании электрофореза катодную камеру прибора заливали 1%-ным раствором амидо черного в 7% уксусной кислоте и продолжали процесс фореза в течение 10 мин. После окрашивания гелей раствор красителя заменяли 7%-ным раствором уксусной кислоты и продолжали электрофорез до полного удаления фонового окрашивания.

Для изучения прополиса использовали методы УФ-спектроскопии, ТСХ и ВЭЖХ. Регистрацию электронных спектров проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena). Изучение компонентного состава прополиса проводили при помощи ТСХ, обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Миликром-5».

Результаты и их обсуждение. В результате сравнительного исследования компонентного состава флавоноидов и фенилпропаноидов почек видов тополя и прополиса было установлено, что доминирующими компонентами почек видов тополя и прополиса являются флавоноиды и фенилпропаноиды. Оптимальной системой для хроматографирования подобрана малополярная система растворителей хлороформ-этиловый спирт в соотношении 9:1, так как ведущие БАС, получаемые на 80% этаноле прополиса настойки – флавоноиды являются малополярными агликонами. На хроматограмме исследованных образцов прополиса настойки обнаруживается диагностическое пятно фиолетовой флюоресценции в УФ-свете (254 нм), жёлто-оранжевого цвета после проявления щелочным раствором диазобензолсульфоуксусной кислоты на уровне пятна ГСО пиностробина (R_f около 0,8). Таким образом, получены данные сравнительного исследования серийных образцов лекарственного препарата «Прополиса настойка» методом ТСХ, разработаны новые подходы к объективному контролю подлинности препаратов прополиса методом ТСХ с использованием ГСО пиностробина.

Для почек тополя, прополиса и их препаратов разработана реакция подлинности методом ТСХ с использованием ГСО пиностробина. На электрофореграмме обнаружены фракции белка с молекулярной массой от 3 до 5 тыс. дальтон. Относительная электрофоретическая подвижность R_f образцов сравнима и находится в интервале от 0,2 до 0,4. Более легкие фракции белка проявились у образцов почек тополя душистого, черного, бальзамического и канадского, а также у большинства образцов прополиса. Более тяжелые фракции белка проявились у почек осины и образцов прополиса из Ульяновской области и горного Туапсинского района Краснодарского края. Полученные данные электрофореза позволяют предположить, что обнаруженные белки образцов прополиса являются маркерными белками различных типов прополиса. Электрофорез в полиакриламидном геле предлагается нами как новый перспективный метод стандартизации лекарственного сырья прополиса и почек тополя, а также препаратов на их основе.

Максимумы поглощения в УФ-спектрах водно-спиртовых извлечений прополиса, почек тополя (290 нм), спиртовых растворов пиностробина (289 нм) и батохромный сдвиг максимума поглощения комплекса с $AlCl_3$ в область 310 нм свидетельствуют, что характер кривой поглощения определяется флавононами. Исследованные образцы прополиса преимущественно «тополиного» или смешанного типа. В горном Туапсинском районе Краснодарского края образцы прополиса «осинового типа». УФ-спектр рекомендуется для определения подлинности сырья и препаратов прополиса. Количественное определение суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в прополисе проводили спектрофотометрическим методом с использованием ГСО пиностробина (в сырье должно быть

не менее 10%). В методе ВЭЖХ подобраны условия разделения компонентов прополиса.

Разрабатываемые методики анализа рекомендуются включить в НД на сырьё и препараты прополиса, что позволит создать основу для расширения ассортимента отечественных лекарственных средств и рационального использования природных ресурсов с целью сохранения экологического равновесия.

Выводы:

1. Результаты сравнительного изучения химического состава флавоноидов и фенилпропаноидов почек тополя и прополиса положены в основу качественного и количественного анализа препаратов прополиса.

2. Разработаны подходы к стандартизации на основе современных методик качественного и количественного анализа (ТСХ, УФ-спектрофотометрии, электрофорез) препаратов прополиса с использованием ГСО пиностробина.

3. Показаны пути рационального использования ресурсов сырья животного происхождения прополиса и его растительных источников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Браславский, В.Б.* Стандартизация сырья и препаратов тополя и прополиса / *В.Б. Браславский, В.А. Куркин // Фармация.* 2009. Т. 57, № 4. С. 53-56.
2. *Браславский, В.Б.* Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Populus L.* / *В.Б. Браславский, В.А. Куркин, И.П. Жданов // Раст. ресурсы.* 1991. Т.27, вып. 2. С. 77-81.
3. Государственный реестр лекарственных средств. Том 1. – М.: 2008. С. 408, 469.
4. *Кузьмина, К.А.* Продукты пчеловодства и здоровье. – Саратов: Издательство Саратовского университета, 1986. 152 с.
5. *Куркин, В.А.* Исследование экстрактов прополиса и почек тополя бальзамического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / *В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Г.Г. Запесочная // Журнал физической химии.* 1994. Т. 68, № 10. С. 1816-1818.
6. *Писарев, Ю.* Импульсофорез с прополисом в стоматологии // Ценный продукт пчеловодства: прополис. Издание четвертое, перераб. и дополн. – Бухарест: изд-во Апимондии, 1981. С. 180-181.
7. *Соколов, И.В.* Флавоноидные агликоны в прополисе и его источниках / *И.В. Соколов, И.В. Торгов // Химия природ. соединений.* 1990. № 4. С. 550-551.
8. *Браславский, В.Б.* Сравнительные исследования видов *Salicaceae* и прополиса – перспективных источников антимикробных и противовоспалительных лекарственных средств / *В.Б. Браславский, В.А. Куркин, Н.В. Браславский* и др. // XI Всероссийский конгресс «Экология и здоровье человека»: Тезисы докладов. – Самара, 2006. С. 41-45.
9. *Хисматуллина, Н.З.* Апитерапия. – Пермь: Мобиле, 2005. 296 с.
10. <http://www.lesprominform.ru/jarchive/articles/itemshow/1581> (10.05.2011) (*Н.М. Цивенкова, А. А. Самылин*).

STANDARDIZATION AND RATIONAL USE OF PROPOLIS RAW MATERIALS AND PREPARATIONS

© 2013 N.V. Braslavskiy, I.F. Shatalayev

Samara State Medical University

Comparative research of component structure of flavonoids and phenylpropanoids of propolis and poplar buds is conducted. On the basis of systematization the data of literature and own results of researches the proximity of component composition of propolis and poplar buds with using the methods of thin layer chromatography (TLC), UF-spectroscopy, electrophoresis and HELC is shown. Methodological approaches to standardization of propolis raw materials and preparations are proved. On the basis of these approaches the unified methods of qualitative and quantitative analysis of propolis raw materials and preparations by the TLC-methods, UF-spectroscopy with use of the state standard sample pinostrobin are developed. Standard documentation on studied raw materials and preparations is developed. Ways of rational use of a product of beekeeping – propolis are shown.

Key words: *propolis, buds, poplar, Populus L., flavonoids, phenylpropanoids, standardization, TLC, UF-spectroscopy, HELC, electrophoresis, pinostrobin, rational use*