

УДК 615.324:547.9

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОПОЛИСА НАСТОЙКИ**Браславский Н.В., Шаталаев И.Ф.***ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, e-mail: nk1@bmail.ru*

Обсуждаются результаты исследования стандартизации серийных образцов лекарственного средства «Прополиса настойка» российских производителей методом спектрофотометрии и разработка на этой основе методик определения подлинности с использованием прямой и дифференциальной спектроскопии после добавления 3% спиртового раствора $AlCl_3$ и количественного определения биологически активных соединений в препарате. Разработаны методики определения подлинности и количественного определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате «Прополиса настойка» методом спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца (ГСО) пиностробина. При помощи разработанной методики определено количественное содержание суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в заводских серийных образцах «Прополиса настойка». Содержание суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате в пересчете на пиностробин колебалось от 1,4 до 2,1% и во всех образцах составляет более 1,0%. Приведены метрологические характеристики разработанной методики. Разработанные методики включены в проект фармакопейной статьи «Прополиса настойка».

Ключевые слова: стандартизация, прополиса настойка, спектрофотометрия, подлинность, количественное определение, флавоноиды и фенилпропаноиды, пиностробин, государственный стандартный образец (ГСО)

STANDARDIZATION OF THE TINCTURE OF PROPOLIS**Braslavskiy N.V., Shatalaev I.F.***Samara State Medical University, Samara, e-mail: nk1@bmail.ru*

We discussed the results of the study of standardization of samples of the drug «Propolis tincture» (tincture of Bee glue) which are manufactured in Russia, by using of spectrophotometry. On this basis there were developed methodics for determining the authenticity with methods spectroscopy and differential spectroscopy after the addition of 3% alcohol solution of $AlCl_3$ and the quantitative determination of biologically active compounds with by using of spectrophotometry in the tincture of propolis. The spectrophotometric methodics of the determining the identity in the tincture of propolis and of the quantitative estimation of the total flavonoids and phenylpropanoids in the tincture of propolis with using of state standard sample pinostrobin there were developed. The content of the total flavonoids and phenylpropanoids are ranged from 1,4 to 2,1% (calculated on pinostrobin) and always more than 1,0% in the tincture of propolis. We calculated the metrological characteristics of the developed technique. The developed techniques incorporated into the design of article pharmacopoeia «Propolis tincture».

Keywords: tincture of propolis (tincture of bee glue), standardization, spectrophotometry, authenticity, quantitative estimation, flavonoids, phenylpropanoids, pinostrobin, state standard sample

В современной стандартизации лекарственного сырья и препаратов, в фармацевтическом анализе актуальными являются подбор, совершенствование и разработка современных и специфичных методик определения подлинности и качества, отвечающих требованиям валидации и соблюдению системного подхода в ряду «сырьё – препарат» [7].

Для продукта пчеловодства – сырья прополиса, имеющего широкий ареал сырьевой базы [1–4, 6], включенного в государственный реестр лекарственных средств РФ [5] и являющегося источником эффективных и безопасных антибактериальных и регенерирующих лекарственных средств [1, 3, 4, 6, 8, 9], ранее были разработаны современные и специфичные подходы к стандартизации [1–4, 6].

Фармакологическая активность препаратов прополиса обусловлена компонентным составом биологически активных соединений (БАС), который как по литературным данным, так и по результатам наших исследований близок к составу тополя почек, но вариабелен и определяется хи-

мическим составом преобладающих растительных источников (тополь и др.) [1–4, 6, 8–10]. Популярным лекарственным средством является «Прополиса настойка» (рег. № 90/111/3, Фармакопейная статья (ФС) 42-3736-99) [5, 6].

Актуальна проблема совершенствования фармакопейного анализа для лекарственных средств на основе прополиса, в случае которых стандартизация недостаточно специфична и современна – осуществляется без использования стандартного образца, а методики не в полной мере отвечают параметрам валидации и системного подхода в ряду «сырьё – лекарственное средство» [1–4, 6, 7, 9].

Цель исследования – разработка методик определения подлинности и количественного определения биологически активных соединений прополиса настойки.

Материал и методы исследования

Были исследованы серийные образцы лекарственного средства «Прополиса настойка» российских производителей, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Содержание суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в образцах препарата «Прополиса настойка» российских производителей

Номер образца	Наименование производителя (серия)	Содержание флавоноидов и фенилпропаноидов, (%)
1	ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань (240709)	1,98 ± 0,087
2	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», г. Тула (20211)	1,66 ± 0,073
3	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», г. Тула (91012)	1,91 ± 0,084
4	ООО «БЭГРИФ», г. Бердск Новосибирской области (030411)	1,95 ± 0,086
5	ООО «БЭГРИФ», г. Бердск Новосибирской области (090912)	1,37 ± 0,060
6	ООО «Гиппократ», г. Самара (04112010)	1,49 ± 0,066
7	ООО «Гиппократ», г. Самара (03072012)	1,67 ± 0,074
8	ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика», г. Москва (210810)	2,02 ± 0,089
9	ООО «ВАТХЭМ – ФАРМАЦИЯ», г. Рязань (011110)	1,55 ± 0,068
10	ЗАО «ВИФИТЕХ», Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск (040111)	2,06 ± 0,091
11	ЗАО «ВИФИТЕХ», Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск (081012)	1,58 ± 0,070
12	ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика», г. Тверь (130809)	1,90 ± 0,084
13	ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика», г. Тверь (290910)	1,64 ± 0,073

Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Germany) в диапазоне длин волн 190–500 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование электронных спектров поглощения света образцов прополиса настойки исходной и после добавления к 1 мл настойки 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида (AlCl₃) с последующим разведением 1:2500 (рис. 1–3), а также дифференциальных (рис. 1.1–3.1) показало, что аналогично сырью прополиса и тополя почек характер суммарных кривых поглощения электронных спектров определяется в основном веществами флавоноидной при-

роды. Общим для электронных спектров всех исследованных образцов является выраженное поглощение света в УФ-области (в интервале от 260 до 330 нм) – основной максимум поглощения спектра находится около 290 ± 2 нм, а после добавления к 1 мл настойки 1 мл 3% раствора AlCl₃ – дает bathochромный сдвиг в УФ-область 307 ± 3 нм (флаваноны пиностробин и др.), а в видимой области спектра – 407 ± 10 нм (рис. 1–3 и 1.1–3.1). Большинство спектров образцов прополиса настойки ближе к «тополиному» типу прополиса (образцы № 1–7, 9–11, 13), некоторые – к «смешанному» типу (образцы № 8 и 12). Исходные кривые образцов «смешанного» типа отличаются от других более высоким поглощением в области 320 ± 5 нм.

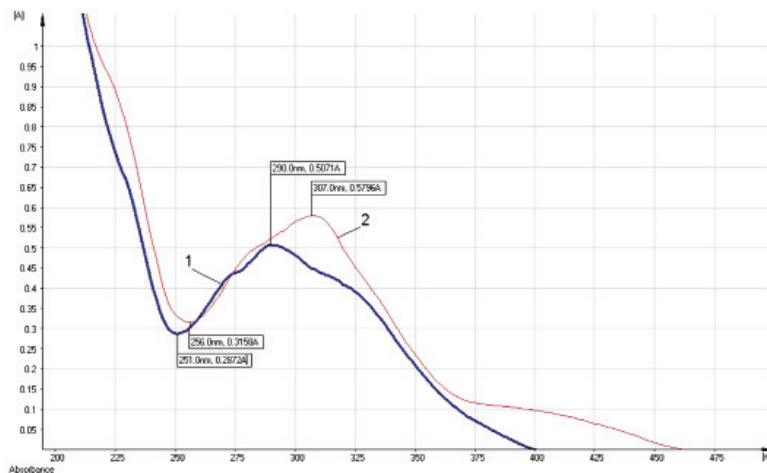


Рис. 1. Спектр раствора образца прополиса настойки № 3. Обозначения: 1 – раствор настойки исходный (разведение 1:2500), 2 – с добавлением к 1 мл настойки 1 мл 3% спиртового раствора AlCl₃ (разведение 1:2500)

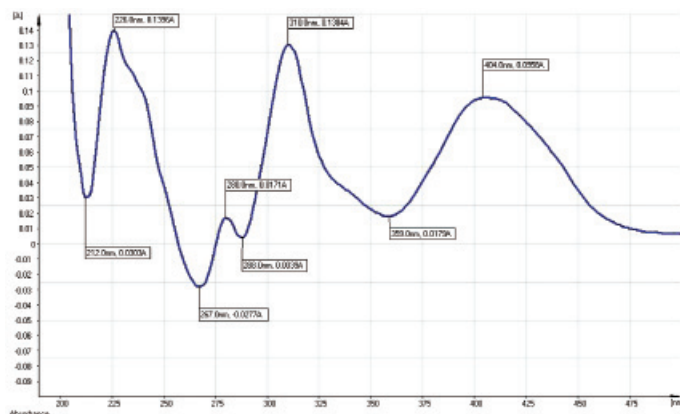


Рис. 1.1. Дифференциальный спектр раствора прополиса настойки № 3 с добавлением к 1 мл настойки 1 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ относительно исходного (разведение 1:2500)

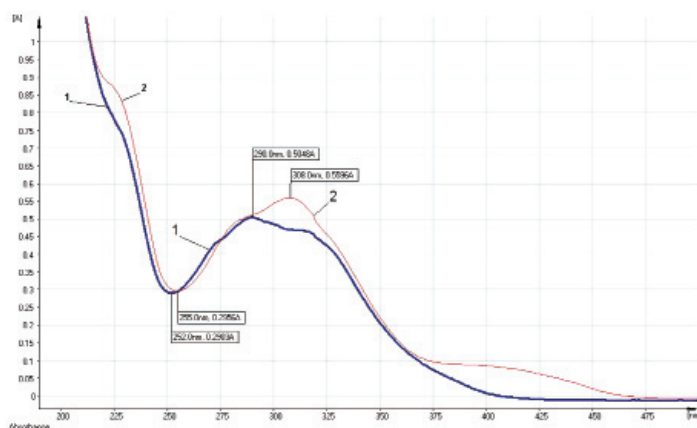


Рис. 2. Спектр раствора образца прополиса настойки № 12. Обозначения те же

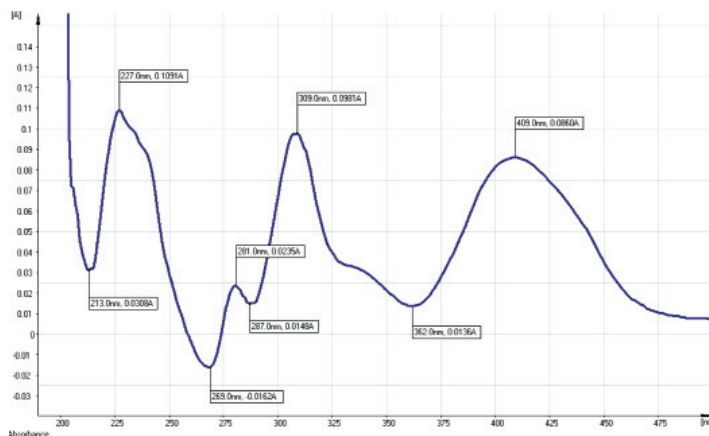


Рис. 2.1. Дифференциальный спектр раствора прополиса настойки № 12

В дифференциальных спектрах (рис. 1.1–3.1) всех исследованных образцов препарата прополиса (после добавки $AlCl_3$ по сравнению с исходным) наблюдаются отчетливо выраженные максимумы поглощения при 225 ± 2 , 281 ± 1 , 312 ± 3 , 407 ± 4 нм. Кроме того, для всех дифференциальных спектров образцов препарата

прополиса характерны выраженные минимумы поглощения при 213 ± 1 , 266 ± 3 , 289 ± 3 , 356 ± 3 нм.

В спектре спиртового раствора ГСО пиностробина (рис. 3) присутствуют максимумы поглощения при 213, 289 нм и плечо при 320 нм, минимумы – при 204, 247 нм. После добавления $AlCl_3$ (рис. 3) в спектре

наблюдается батохромный сдвиг соответствующих максимумов (222, 308 и 376 нм) и минимумов (212, 255 и 333 нм) поглощения

света. Дифференциальная кривая ГСО в целом согласуется с таковыми препаратов прополиса (рис. 3.1).

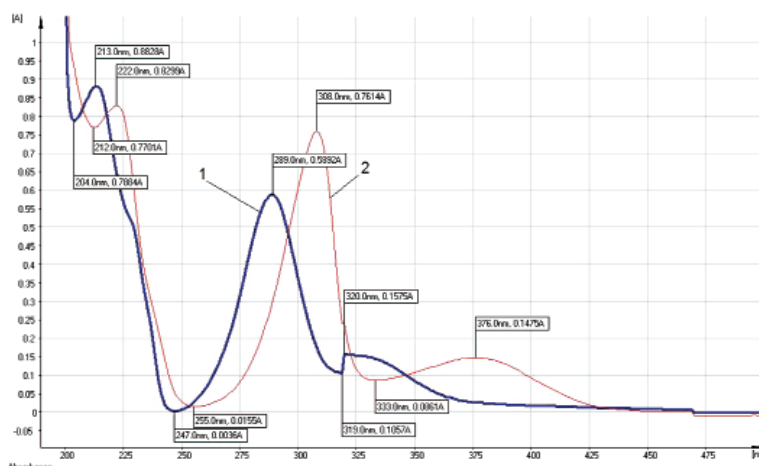


Рис. 3. Спектр спиртового раствора образца пиностробина (разведение 1:125000). Обозначения: 1 – раствор исходный, 2 – с добавлением к 1 мл исходного 1 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$

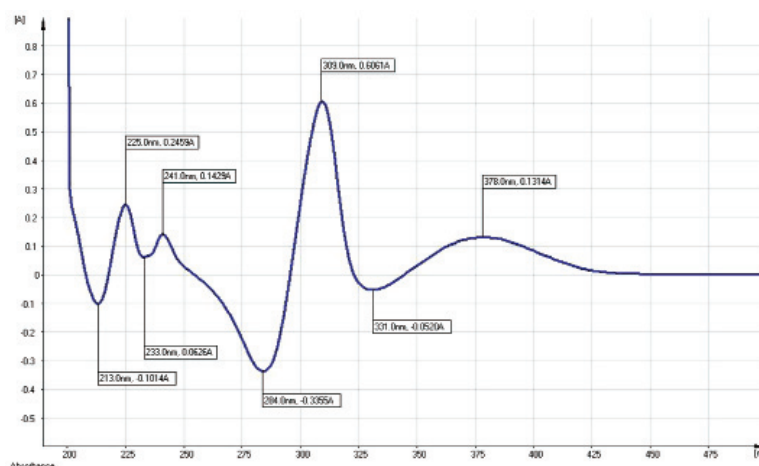


Рис. 3.1. Дифференциальный спектр спиртового раствора пиностробина с добавлением к 1 мл раствора А 1 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ относительно исходного (разведение 1:125000)

Предлагаем для усиления подлинности препарата «Прополиса настойка» ввести в нормативную документацию (НД) на сырье и препараты прополиса характеристику электронного спектра как прямого (исходного), так и дифференциального. Электронный спектр сырья прополиса и лекарственного средства «Прополиса настойка» должен иметь выраженный максимум поглощения в области 290 ± 2 нм и выраженный минимум при 252 ± 3 нм. Характерный дифференциальный спектр сырья прополиса и препарата «Прополиса настойка» после добавления раствора $AlCl_3$ должен иметь выраженные максимумы поглощения света: при 225 ± 2 , 280 ± 2 нм, при 312 ± 3 , 406 ± 3 нм и выраженные минимумы: при 213 ± 1 , 267 ± 3 , 289 ± 3 , 356 ± 3 нм.

В методике количественного определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препаратах прополиса методом прямой спектрофотометрии с использованием ГСО пиностробина, также как и для сырья прополиса и почек тополя в качестве аналитической была выбрана длина волны 289 нм, соответствующая максимуму поглощения ГСО пиностробина [1–4, 6]. Методика количественного определения суммы БАС в лекарственном средстве «Прополиса настойка» унифицирована с сырьем прополиса [1–4, 6] и выглядит следующим образом: 1,00 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки 96% спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью

50 мл, доводят объем раствора до метки 96% спиртом и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора Б ГСО пиностробина. В качестве раствора сравнения используют 96% этиловый спирт. Содержания суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате в процентах (X) в пересчете на пиностробин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot V \cdot 100 \cdot 25} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot V},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора (раствор Б); D_0 – оптическая плотность раствора Б ГСО пиностробина; m_0 –

масса ГСО пиностробина, г; V – объем испытуемого препарата, мл.

Приготовление раствора ГСО пиностробина. Около 0,02 г (точная навеска) ГСО пиностробина (ФС 42-0073-00) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл 96% спирта при нагревании (70–75°C). Содержимое колбы охлаждают и доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А). 1 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 96% спиртом этиловым (раствор Б).

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что относительная ошибка отдельного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 4,44% (табл. 2).

Таблица 2

Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате «Прополиса настойка»

f	$x, \%$	s	$P, \%$	$t(P, f)$	Δx	$\varepsilon, \%$
10	1,655	0,033	95	2,23	$\pm 0,074$	$\pm 4,44$

f – число степеней свободы;
 x – среднее выборки;
 s – стандартное отклонение;
 P – доверительная вероятность;
 $t(P, f)$ – значение критерия Стьюдента;
 Δx – полуширина доверительного интервала;
 ε – относительная ошибка отдельного определения.

Опыты с добавками ГСО пиностробина к препарату показали, что ошибка опыта находится в пределах ошибки единичного

определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (табл. 3).

Таблица 3

Результаты опытов с добавками ГСО пиностробина

№ п/п	Содержание действующих веществ в 1 мл препарата (мг)	Добавлено ГСО пиностробина (мг)	Найдено (мг)	Ошибка	
				Абсолютная (мг)	Относительная (%)
1	16,4 ± 0,7	11,1	27,1 ± 1,2	-0,4	-1,46
2	16,4 ± 0,7	22,2	37,1 ± 1,7	-1,5	-3,89
3	16,7 ± 0,7	11,1	28,7 ± 1,3	+0,9	+3,24
4	16,7 ± 0,7	22,2	40,2 ± 1,8	+1,3	+3,34

Разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате включена в проект ФС «Прополиса настойка».

Проведено количественное определение содержания суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в препарате «Прополиса настойка» в пересчете на ГСО пиностробина,

оно составило от 1,4 до 2,1% (табл. 1). Данный показатель рекомендован для включения в проект ФС на лекарственное средство «Прополиса настойка» – не менее 1,0%.

Выводы

1. Разработаны унифицированные с сырьем новые методики определения подлин-

ности прополиса настойки, заключающиеся в использовании прямой и дифференциальной спектроскопии после добавки треххлорного алюминия.

2. Разработана унифицированная методика количественного спектрофотометрического определения содержания суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в прополисе настойке с использованием ГСО пиностробина, которая рекомендована для включения в проект ФС «Прополиса настойка» взамен ФС 42-3736-99. Результаты статистической обработки проведенных определений свидетельствуют о том, что относительная ошибка отдельного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 4,44%.

3. При помощи разработанной методики определено количественное содержание суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в заводских серийных образцах «Прополиса настойка», которое колебалось от 1,4 до 2,1%. Для ФС рекомендуется нижний предел данного показателя – не менее 1,0%.

Список литературы

1. 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 // Экология и здоровье человека: тезисы докладов XI Всероссийский конгресс. – Самара, 2006. – С. 41–45.
2. Браславский В.Б. Стандартизация сырья и препаратов тополя и прополиса / В.Б. Браславский, В.А. Куркин // Фармация. – 2009. – Т. 57, № 4. – С. 53–56.
3. Растения семейства ивовых и прополис – перспективные источники фитопрепаратов / В.Б. Браславский, В.А. Куркин, Н.В. Браславский, И.Ф. Шаталаев // Традиционная медицина. – 2011. – № 5. – С. 159–163.
4. Комплексные фармакогностические исследования растений семейства ивовых и прополиса – источников лекарственных средств / В.Б. Браславский, В.А. Куркин, Н.В. Браславский, И.Ф. Шаталаев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13 (39), № 1 (8). – С. 1978–1981.
5. Государственный реестр лекарственных средств. – Т. 1. Официальное издание. – М.: Ремедиум, 2008. – 1398 с.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
7. 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, 1994. – С. 254.
8. Ценный продукт пчеловодства: прополис / под рук. В. Харнажа. – 4-е изд., перераб. и доп. – Бухарест: Изд-во Апимондии, 1981 – 248 с.

9. Bankova, V.S. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization / V. Bankova // Journal of Ethnopharmacology. – 2005. – № 100. – P. 114–117.

10. Wollenweber E. A Novel Caffeic Acid Derivative and Other Constituents of Populus Bud Excretion and Propolis (Bee Glue) / E. Wollenweber, Y. Asacawa, D. Schillo, U. Lehmann and H. Weigel // Z. Naturforsch. C: Biosci. – 1987. – Bd. 42C, № 9–10. – P. 1030–1034.

References

1. Braslavskiy V.B., Kurkin V.A., Braslavskiy N.V. *Sravnitel'nye issledovaniya vidov Salicaceae i propolisa – perspektivnykh istochnikov antimikrobnih i protivovospalitel'nykh lekarstvennykh sredstv, XI Vserossiyskiy kongress «Ekologiya i zdorov'e cheloveka»: Tezisy dokladov*, Samara, 2006, pp. 41–45.
2. Braslavskiy V.B., Kurkin V.A. *Standartizatsiya syr'ya i preparatov topolya i propolisa*, Farmatsiya, 2009, Vol. 57, no. 4, pp. 53–56.
3. Braslavskiy V.B., Kurkin V.A., Braslavskiy N.V., Shatalaev I.F. *Rasteniya semeystva ivovyh i propolisa – perspektivnye istochniki fitopreparatov, Traditsionnaya meditsina*, 2011, no. 5, pp. 159–163.
4. Braslavskiy V.B., Kurkin V.A., Braslavskiy N.V., Shatalaev I.F. *Kompleksnye farmakognosticheskie issledovaniya rasteniy semeystva ivovyh i propolisa – istochnikov lekarstvennykh sredstv, Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2011, Vol. 13 (39), no. 1 (8), pp. 1978–1981.
5. *Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv, T. 1, Ofitsial'noe izdanie* [State Register of medicinal remedies. Vol. 1. Official edition], Moscow, Remedium, 2008, 1398 p.
6. Kurkin V.A. *Pharmacognosiya: Uchebnik dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov (fakul'tetov)* [Pharmacognosy: textbook for students of pharmaceutical universities], 2 izd., pererab. i dop. Samara, ООО «Ofort», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007, 1239 p.
7. Samylina I.A. *Problemy standartizatsii lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i lekarstvennykh rastitel'nykh sredstv, Traditsionnaya meditsina i pitaniye: teoreticheskie i prakticheskie aspekty: Materialy I Mezhdunarodnogo nauchnogo kongressa*, M.: Institut traditsionnykh metodov lecheniya MZ RF, 1994, pp. 254.
8. *Cennyy produkt pchelovodstva: propolis, pod ruk. V. Harnazha*, Izdanie chetvertoe, pererabotannoe i dopolnennoe, Buharest: izdatel'stvo Apimondii, 1981, 248 p.
9. Bankova V.S. *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, Journal of Ethnopharmacology*, 2005, no. 100, pp. 114–117.
10. Wollenweber E., Asacawa Y., Schillo D., Lehmann U., Weigel H. *A Novel Caffeic Acid Derivative and Other Constituents of Populus Bud Excretion and Propolis (Bee Glue)*, Z. Naturforsch., C: Biosci, 1987, Bd. 42C, no. 9–10, pp. 1030–1034.

Рецензенты:

Куркин В.А., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, г. Самара;

Первушкин С.В., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.