УДК 615.324:638.17

ФІЗИКО-ХІМІЧНЕ, МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВОДОРОЗЧИННОГО ПОЛІФЕНОЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ПРОПОЛІСУ

О. І. ТИХОНОВ, Д. П. САЛО, Д. П. КОЛОМІЄЦЬ, Н. Г. РИБАЛКО

Запорізький медичний інститут. Харківський фармацевтичний інститут

Дослідження біологічно активних, практично нешкідливих для організму, а, отже, і доступних ліків, є одним з першорядних завдань медичних працівників нашої країни. Певний інтерес щодо цього являють продукти бджільництва, зокрема прополіс. Проблемі наукового підходу до їх всебічного вивчення як доступного, економічно вигідного природного сировинного джерела одержання нових ефективних препаратів у нашій країні і за кордоном приділяється велика увага.

Прополіс (бджолиний клей, замазка, бджолина або воскова смола) являє собою клейку смолисту речовину темно-зеленого, коричневого або бурого кольору (11, 12, 14, 16), яка при температурі 15° стає твердою, крихкою, а при 36° і вище знову м'яка і пластична. Питома вага прополісу— 1,112—1,136. Температура топлення — 80—104°. Прополіс розчиняється в спирті, ефірі та деяких інших органічних розчинниках. У спирті розчиняються всі його основні компоненти. Спиртовий екстракт (настойка) прополісу — прозора рідина червоно-коричневого кольору.

Залежно від кількості прополісу, взятого для. приготування настой-

ки, і кількості в ньому воску* діапазон розчинності прополісу у спирті коливається у межах від 40 до 70%. У воді прополіс майже не розчиняється. Навіть при нагріванні на киплячому водяному огрівнику розчинність його у воді не перевищує 5%.

Прополіс — цінний лікарський засіб, що має протипухлинну, анестезуючу і стимулюючу дії (1, 6, 8, 13,' 15, 17, 20—22, 29). Широкий .спектр його терапевтичної активності (застосування в офтальмології, гінекології, дерматології, онкології, ЛОР-практиці, в лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту і т. д.) пояснюється наявністю в його складі цілого комплексу біологічно активних природних сполук (7,10,23,28).

Нині з лікувальною і профілактичною метою застосовують деякі препарати, що роблять з прополісу найрізноманітнішими методами (30-35).

Недоліком відомих способів його приготування є безпосереднє використання у виготовленні ліків прополісу-сирцю, що пов'язано з трудомісткими виробничими процесами, із застосуванням при цьому вогненебезпечних органічних розчинників, наявністю в усіх випадках виготовлення лікарських форм від 20 до 50% залишку (в залежності від способу виготовлення, що свідчить про неповноцінне використання прополісу, в якому до того ж міститься від 15 до 50% восків і до 13% механічних домішок. Все це, природно, утруднює розробку методів об'єктивного якісного і кількісного аналізу доброякісності приготування ліків вищезазначеними методами.

Нами був розроблений спосіб одержання біологічно активних поліфенолів з прополісу, що є його основними діючими речовинами (26). Вони являють собою препарат порошкоподібної консистенції, до кінця розчинний у спирті та інших органічних розчинниках. Беручи до уваги слабку розчинність одержаного препарату у воді і з метою більш ефективного використання прополісу-сирцю, ми розробили новий метод фракційно-диференціального екстрагування.

У цьому аспекті для визначення необхідності промислових заготівель прополісу незалежно від місця збирання і можливості його використання для одержання водорозчинного поліфенольного препарату з наступною розробкою на його основі технології більш ефективних лікарських форм було проведено і хемотаксономічне дослідження прополісу, зібраного в різних областях і районах нашої країни, зокрема, в Прибалтиці, Білорусії, на Україні, в Середній Азії, Сибіру, Далекому Сході та ін.

Застосовуючи запропонований метод, ми одержали з усіх зразків прополісу сипкі поліфенольні препарати жовтого кольору, добре розчинні у воді, спирті та інших органічних розчинниках, нерозчинні в петролейному ефірі.

Методом одно- і двовимірної хроматографії на папері в різних системах розчинників (проявники хлорокис цирконілу в поєднанні з парами аміаку, алюмінію хлорид, луг і т. д.) було встановлено, що якісний фенольний склад одержаних препаратів тотожний вихідній сировині. Це показано на прикладі зразка прополісу, зібраного на Україні (рис 1, 2).

Для більш об'єктивної оцінки якості, а також для підтвердження тотожності і незмінності структури хімічних компонентів речовин, одер-

*Кількість воску і механічних домішок у прополісі значною мірою залежить від особу його збирання. Якщо прополіс збирають влітку (перший взяток), він м'який, клейкий і вищезазначені речовини містяться в ньому в незначних кількостях. Коли ж прополіс зіскоблюють під час очищення вуликів (після другого взятку) _ у вигляді крихких, твердих частинок, в нього потрапляє вощина, стружка та інші домішки. В цьому випадку кількість воску у прополісі-сирцю значно збільшується, а воск деякої міри зменшує його бактерицидні та лікувальні властивості (25).

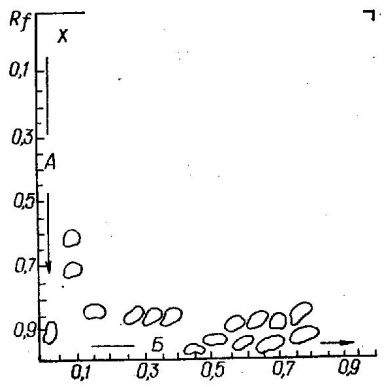

Рис. 1. Двовимірна хроматографія розчину прополісу-сирцю:

система розчинників: А — н.-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2), Б — 15% розчин оцтової кислоти. Проявник — 1% розчин хлорокису цирконілу з парами аміаку.

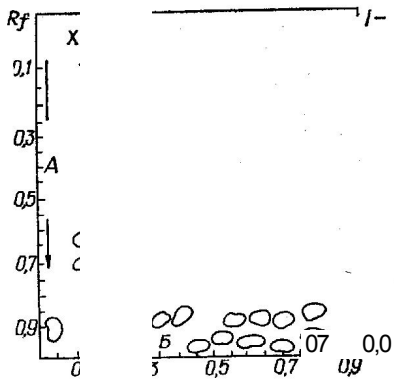

Рис. 2. Двовимірна хроматограма розчину поліфенольного препарату прополісу:

система розчинників: А — н.-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2), Б — 15% розчин оцтової кислоти. Проявник — 1% розчин хлорокису цирконілу з парами аміаку.

жаних з різних видів прополісу, ми розробили параметри їх аналізу,з використанням УФ спектроскопії, які потім було взято за основу при розробці спектрофотометричного методу кількісного визначення водорозчинного поліфенольного препарату прополісу, оскільки УФ спектри одержаних препаратів тотожні. Крім того, постійність хімічного складу водорозчинних поліфенольних препаратів доведено також синхронністю| та ефективністю їх анатомічної дії відносно грампозитивних бактерій. Встановивши якісний поліфенольний склад водорозчинних препаратів прополісу за допомогою хроматографічного, спектрального і мікробіо- логічного методів у поєднанні з класичними методами дослідження сировини природного походження (2, 9, 19), ми провели фізико-хімічне вивчення цих препаратів у порівнянні з вихідним прополісом-сирцем (на прикладі зразка, зібраного у Запорізькій області).

Таблиця 1

Порівняльний фізико-хімічний аналіз водорозчинного поліфенольного препарату прополісу і прополісу-сирцю

Фізико-хімічні показники	Досліджувані продукти	
	препарат прополісу	прополіс-сирець
Агрегатний стан	сипкий порошок	липка, пружно-глейка маса
Колір	жовтий	зеленувато-коричневий
Запах	польових квітів	польових квітів
Смак	гіркий	гірко-жалкий
Розчинність:		
у воді	+	—
у спирті	+	+
Якісні реакції:		
з лугом	+	+
з заліза III-хлоридом	+	+
ціанідинова проба	+	+
pH розчину	4,57—4,62	5,82%—6,12%
Неспалений залишок	—	3,45%—4,05%
Наявність восків	—	15,10%—45,21%
Механічні домішки	—	10,04%—12,53%

Умовні позначення: + — позитивний результат, — — негативний результат.

Таблиця 2

Порівняльний хімічний склад водорозчинного поліфенольного препарату прополісу і прополісу-сирцю

Назва компонентів	Наявність природних сполук	
	у препараті прополісу	у прополісі-сирцю
Віск	—	+
Смолисті речовини	—	+
Бальзамічні речовини	сліди	+
Флавоноїди	+	+
Кумарини	+	+
Лактони сесквітерпенові	+	+
Фенолкарбонові кислоти	+	+
Мікроелементи *	+	+
Полісахариди	+	+
Органічні кислоти	+	+
Амінокислоти	+	+

* *Методика визначення:* абсолютно сухий залишок прополісу і паралельно водорозчинного препарату прополісу подрібнювали до одержання найдрібнішого порошку, змішували з рівною кількістю спектрально чистого натрію хлориду при зволоженні спиртом, висушували і знову ретельно розтирали. Якісне і кількісне визначення проводили за методом 4-х еталонів. *Режим:* прилад — ІСП-28, дуга змінного струму — 12 *а*, ширина вхідної щілини спектрографа 0,010 *мм*; час експозиції 60 сек.; аналітичний проміжок — 2 *мм*.

Умовні позначення: + — наявність речовин, — відсутність речовин.

Таблиця 3

Результати вивчення можливості використання для виготовлення ліків водорозчинного поліфенольного препарату прополісу і прополісу-сирцю

Види лікарських форм	Можливість приготування ліків	
	з препаратом прополісу	з прополісом-сирцем
Порошки	+	—
Мікстури водні	+	—
Мазі і лініменти *	+	+
Супозиторії *	+	+
Розчини для ін'єкцій (водні)	+	—
Аерозолі (без застосування органічних розчинників), особливо для дитячої практики	+	—
Таблетки *	+	+
Спиртові настойки *	+	+
Очні краплі	+	—

* В усіх випадках приготування ліків втрата прополісу-сирцю, як вихідного продукту, становить 50—60% від ваги взятої наважки.

Умовні позначення: + — приготування можливе, — — приготування неможливе.

Як видно з даних, наведених у таблицях 1—3, відсутність у препараті восків, смол і вміст слідів бальзамічних речовин при збереженні основних біологічно активних компонентів дає можливість одержувати з прополісу водорозчинну суміш діючих поліфенолів, а це в свою чергу дозволяє розширити асортимент лікарських форм з даним препаратом порівняно з вихідною сировиною, спростити технологічні стадії їх виготовлення, виключає застосування органічних розчинів, що дуже важливо особливо при виробництві ліків, що застосовуються в дитячій практиці (аерозолі, примочки, мікстури, краплі і т. д.). Точність дозування поліфенольного препарату прополісу під час

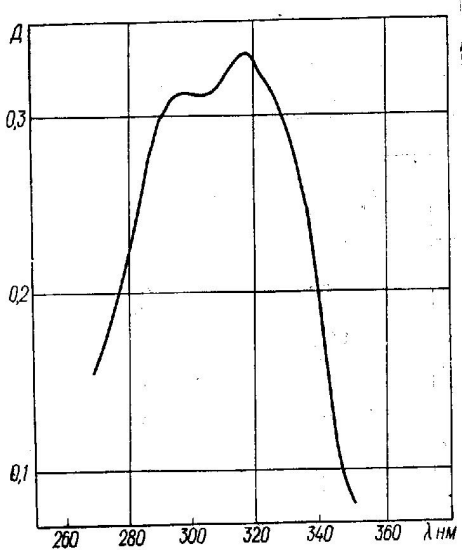

Рис. 3. УФ спектри вбирання водорозчинного поліфенольного препарату прополісу в диметилформаміді.

виготовлення зазначених лікарських форм досягається завдяки його повному розчиненню у водії без залишку. До того ж це створює передумови для розробки методу кількісного аналізу з метою контролю якості приготування цих лікарських форм.

В літературі для кількісного визначення поліфенолів наведено ряд колориметричних(18,36),об'ємних, комплексонометричних(4,5), фотоколориметричних методів (3,27).

Нами запропоновано спектрофотометричний метод кількісного визначення водорозчинного поліфенольного препарату прополісу, для розробки якого було знято спектр прополісу в диаметилформаміді (рис. 3) і встановлено, що максимум світловбирання знаходяться в УФ області спектра при 299 *нм* і 318 *нм.* При цьому було показано залежність між концентрацією водорозчинного препарату прополісу і величиною оптичної густини при максимумі вбирання і знайдено величину питомого показника вбирання досліджуваного препарату ($E^{1\%}_{1см}$), яку потім було використано для кількісного визначення.

Експериментально встановлено, що світловбирання розчинів водорозчинного поліфенольного препарату прополісу в диметилформаміді підпорядковується закону Бугера — Ламберта — Бера при *Хмакс* 299 *нм* (в межах концентрацій 0,2—2 *мг* у 100 *мл).* Результати визначень ведені в таблиці 4.

Для проведення кількісного визначення точну наважку (близько 0,024 *г)* водорозчинного поліфенольного препарату прополісу розчиняють в диметилформаміді у вимірювальній колбі на 100 *мл* і доводять до мітки (розчин *А); 1 мл* розчину А вміщують в мірну колбу на 100 *мл* і доводять диметилформамідом до мітки (розчин Б). Одержаний розчин спектрофотометрують і визначають величину його оптичної густини.

Результати кількісного визначення водорозчинного поліфенольного препарату прополісу наведені в таблиці 5.

Таблиця 4

Визначення питомого показника вбирання водорозчинного препарату прополісу

Концентрація у $t^{мл}$	Оптична густина	Питомий по-вбираний	Метрологічні характе-ристики
			X = 600.08 ±1.08
2	0.120	600.00	a = ±1.516
4	0,240	600,00	Cx = ±0,47
6	0.362	603.33	Io.93 = ±1.08
8	0,479	598,75	
10	0.600	600.00	A = ±0.18%
12	0.722	601.66	
14	0.840	600.00	
16	0.959	599.37	
18	1.076	597.77	
20	1,200	600,00	

Таблиця 5

Результати кількісного визначення водорозчинного препарату прополісу

Довжина хвилі X *нм*	Концентрація у *мгЛООмл*	Оптична густина	Результати у %	Метрологічні характеристики
299	0.24 0.36 0.42 0.58 0.68 0,72	0.145 0.224 0.250 0.346 0.410 0,430	100.66 103.66 99.57 99.41 100.47 99,29	X = 100,51 a = ±1.60 a x ±0.65 $I_{0.95}$ = ±1.89 A = ±1.88

Таблиця 6

Активність водорозчинного поліфенольного препарату прополісу відносно деяких мікробів

Тест-мікроби	Активність препарату у розведеннях	У t/*мл*
Стафілокок золотистий № 209 . . Кишкова паличка	1 : 64000 <1 : 2000 1 : 16000	=15 >500
Антракоїд (спороносна паличка) . Кислотостійкий сапрофіт В5 Candida albicans . . .		62 10 31

З даних, наведених в таблиці 5, видно, що відносна помилка спектрофотометричного визначення досліджуваного препарату, одержаного з прополісу, не перевищує ±1,88%.

Нами також було проведено мікробіологічні дослідження активності водорозчинного поліфенольного препарату прополісу. З цією метою використовували метод серійних розведень. Як поживне середовище (pH 7,3) застосували амінопептид, попередньо розведений дистильованою водою (1:2). Досліджувану культуру додавали в пробірки з рахунку 200 000 мікробних тіл на 1 *мл* середовища.

Результати дослідів вивчали через 18—20 годин після того, як зразки було вміщено в термостат при температурі +37°. Досліди з культурою кислотостійкого сапрофіту В5 витримувалися у термостаті менше трьох діб через порівняно повільний ріст досліджуваної кульги.

Результати дослідів наведені в таблиці 6.

Як видно з даних, наведених в таблиці 6, досліджуваний препарат прополісу найбільшу активність виявив відносно кислотостійкого сапрофіту В5 (1:100 000), трохи меншу — до грампозитивних бактерій (золотистий стафілокок № 209), дріжджових грибків (*Candida albicans*) і спороносних паличок (антракоїд). Препарат прополісу не діє бактеріостатично на грамнегативні бактерії (кишкова паличка).

ВИСНОВКИ

1. Проведений аналіз якісного складу порошкоподібного поліфенольного препарату прополісу показав, що у винайденому препараті містяться 16 речовин, тотожних вихідному прополісу-сирцю.

2. Встановлена наявність у досліджуваному препараті прополісу флавоноїдів, кумаринів, лактонів, фенолкарбонових кислот, мікроелементів, полісахаридів, органічних кислот, амінокислот.

3. Для одержаного водорозчинного поліфенольного препарату прополісу характерні дві смуги вбирання в УФ світлі — 299 *нм* і 318 *нм*

4. В межах концентрацій 0,2—2 *мг* у 100 *мл* у диметилформаміді розчини водорозчинного поліфенольного препарату підпорядковуються закону Бугера — Ламберта — Бера.

5. Розроблений спектрофотометричний метод кількісного визначення порошкоподібного водорозчинного поліфенольного препарату прополісу, помилка якого не перевищуе ±1,88%.

6. Встановлено, що найбшьшу бактеріостатичну активність одержаний препарат прополісу виявив відносно кислотостійкого сапрофіту B_5 (1 : 100000).

Л1ТЕРАТУРА

1. Арипов Х. А., Камилоо И. К., Алиев Х. У., Медицинский журнал Узбекистана, 1968, №5, 50.— 2. Бандюкова В. А., Растительные ресурсы, М.—Л., 1965, 1, вып. 4. — 3. Бандюкова В. А., Шинкаренко А. Л., ЖАХ, 1966, 21, выпД 232.— 4. Беликов В. В., Фармация, 1967, № 6, 36.— 5. Беликов В. *В.,* Шрайбер М. С, Фармацевтичний журнал, 1967, № 1, 30.— 6. Большакова В. Ф., В я. Фитонциды, К., «Наукова думка», 1967, 274.— 7. Вахонина Т. (В., Б .реева Л. Г Бодрова Р. Н. и др., В сб.: Труды научно-исследовательского института пчеловодства, М., 1972, вып. 7, 296.— 8. Гаптрахиманова К. Г., Автореферат кандидатской диссертации, Казань, 1964. — 9. Гейсман Т., Биохимические методы анализа растений, М., ИЛ., 1960.— Ю. Иванов Д. Ф., Тихонов А. И., Кривенчук П. Е. и др., Офтальмологический журнал, 1973, № 2, 104.— 11. Йориш Н. П., В кн, Пчелы — крылатые фармацевты, М., «Наука», 1966, 145.— 12. Каримова 3. Х., Пчеловодство, 1960, № 8, 58.— 13. Каримова 3. Х., Антибиотики, М., 1960, 5, *№.* 1, 122.— 14. Кивалкина В. П., Ветеринария, 1964, № 9, 78.— 15. Кивалкина В.П Автореферат докторской диссертации, Казань, 1964.— 16. Кравчук П. О., Рафальский К. П., Фармацевтичний журнал, 1969, № 5, 87.— 17. Кразчук П. А., Автореферат кандидатской диссертации, Киев, 1971.— 18. Нестюк М. Н., Вестник МГУ 1958, № 3, 53.— 19. Никонов Г. К., Аптечное дело, 1963, 12, № 4, 41.—20. Овчинни ков В. И., Вестник дерматологии и венерологии, М., 1965, № 9, 69.— 21. Оркин В. Ф., Автореферат кандидатской диссертации, Саратов, 1971.— 22. Покровский С. Г., Автореферат кандидатской диссертации, Казань, 1966.— 23. Поправко С.А., Гуревич А. И., Колосов М. Н., Химия природнх соединений, 1969, № 6, 476. 24. Темнов В. А., Пчеловодство, 1937, № 3, 34.—25. Тихонов А. И., Кривенчук П. Е., Литвинен коВ. И., Путятин И. В. В сб.: Современные проблемы фармацевтической науки и практики (тезисы докладов 2-го съезда фармацевтов Украинской ССР, Киев, 1972, 786.-26. Тихонов А. И., Кривенчук П. Е. Авторское свидетельство № 395 087 от 28 мая 1973, Бюлл. изобретений, 1973, № 35. — 27. Тюкавкина Н. А., Лаптева К. И., Ларина В. А., Девятко Н. Г., Химия природных соединений, 1967, № 5, 298.— 28. Ушкалова В. Н., Топалова О. В., Пчеловодство, 1973, № 6, 30.— 29. Шамраи Т. Е., Автореферат кандидатской диссертации, Киев, 1974.— 30. Филатов В. Ф., Шамрай Т. Е., Применение прополиса в оториноларингологии (методические рекомендации), Харьков, 1973.— 31. Инструкции по применению аэрозоля «Пропасол», В сб.: Методические рекомендации по использованию лекарственных препаратов, М., 1973, вып. 1, 26.—32. Baidan N., Oita N. Oftalmologia, 1971, 15, N 3, 201,— 33. Derevici A., Popescu A1., Popescu N Apiculture, 1964, N 7, 14.— 34. Derevici A., Ioanitiu R., Lescinski S Popescu A1., Farmacia (Бухарест), 1966, 14, N 5, 257.— 35. Tsakov Ts Farmacija (София), 1973, 23, N 2, 38.—36. Wilson C, Weatherby L., Bock W Ind. Engng. Chem. analyt. Ed, 1942, 14, 425.

Надійшла 12.VIII 1974

PHYSICO-CHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF WATERSOLUBLE POLYPHENOL PROPOLIS PREPARATION

A. I. TIKHONOV, D. P. SALO, D. P. KOLOMIYETS and N. G. RYBALKO
Zaporozhye Medical Institute, Kharkov Pharmaceutic Institute

SUMMARY

For the first time a watersoluble powder-like polyphenol preparation has been o tained from propolis. Its physico-chemical properties were determined and a spectroph tometric method of quantitative determination was developed, the error of which does not exceed ±1.88%.

The bacteriostatic activity of this preparation in relation to grampositive bacteria was determined.