

УДК 615.07

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТРЕБОВАНИЙ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ «ПРОПОЛИС»****Шелестова В.В., Ковалева Е.Л., Бунятян Н.Д., Николаева О.Б.***ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»**Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,**e-mail: ShelestovaW@expmed.ru, Bunyatyan@expmed.ru*

Проведен сравнительный анализ требований к качеству фармацевтической субстанции «Прополис» разных производителей. Сравнительный анализ показал, что при отсутствии фармакопейной статьи на субстанцию значительно различаются подходы к оценке ее качества. Показано, что методики подтверждения подлинности и количественного определения мало информативны и неспецифичны. Обоснована необходимость введения хроматографических методов анализа и показателя «Окисляемость», унификации требований по показателям «Воск», «Механические включения».

Ключевые слова: прополис; показатели качества; методы количественного определения флавоноидов

**COMPARATIVE EVALUATION OF THE QUALITY ASSURANCE REQUIREMENTS
FOR PHARMACEUTICAL SUBSTANCE «PROPOLIS»****Shelestova V.V., Kovaleva E.L., Bunyatyan N.D., Nikolaeva O.B.***Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation
of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,**e-mail: ShelestovaW@expmed.ru, Bunyatyan@expmed.ru*

The comparative analysis of the quality assurance requirements for pharmaceutical substance «Propolis» by different manufacturers has been performed. The comparative analysis showed that if there is no pharmacopeial monograph for a substance, then the approaches to the assessment of its quality significantly differ. It was shown that the identification and assay methods were non-specific and not very informative. The need for introducing new chromatographic methods of analysis and new quality parameter «Oxidizability», as well as for unification of the requirements for «Wax» and «Particulate matter» characteristics was justified.

Keywords: propolis; quality parameters; flavonoid assay methods

Прополис, продукт жизнедеятельности пчел, издавна применялся в народной медицине в качестве противовоспалительного дезинфицирующего и болеутоляющего средства. В семьдесятые годы прошлого столетия были созданы лекарственные препараты, полученные из прополиса и разрешенные к медицинскому применению – «Пропосол», аэрозоль и «Пропоцеум», линимент. «Пропосол» до сих пор применяется в местной терапии при воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта. Позднее разработана лекарственная форма «Прополиса настойка», применяемая в качестве ранозаживляющего и противовоспалительного средства. Разрабатываются новые формы лекарственных препаратов на основе прополиса [1, 2, 3].

Компонентами прополиса являются вещества, вырабатываемые и выделяемые растениями. В настоящее время большое внимание уделяется изучению химического состава прополиса, который чрезвычайно сложен и окончательно не изучен. В состав прополиса входят вещества флавоноидной природы: флавоны (кризин, тектохризин,

лютеолин, апигенин и другие), флавонолы (кверцетин, кемпферол, галангин, изиальпинин, рамоцитрин), флавононы (пиноцембирин, пиностробин и другие), феноловые кислоты (кофейная, п-кумаровая, феруловая, коричная, ванилиновая и другие). Фенольные соединения (в том числе и вещества флавоноидной природы), входящие в состав прополиса, относятся к биологически активным веществам и обладают не только антибактериальными свойствами, но и оказывают желчегонное, мочегонное, капилляроукрепляющее и противовоспалительное действие, содержащиеся феноловые кислоты оказывают вяжущее действие, способствуют заживлению ран и язв [4, 5, 6, 7, 8]. В прополисе установлено наличие веществ терпеноидной группы: а-ацетоксибегулиленола, бисаболола и ароматического альдегида изованилина. Обнаружены вещества, обладающие выраженной способностью задерживать рост и развитие микроорганизмов: бензойная кислота, сложные эфиры органических кислот, кониферилловый, коричный и другие спирты. Известно, что ненасыщенные

жирные кислоты прополиса, поступающие с секретом верхнечелюстных желез рабочих пчел, обладают противooksидлительными свойствами. Доказано наличие большого содержания эфирных масел, железа, кальция, алюминия, магния, кремния, меди, марганца, цинка и кобальта. Обнаружены азотистые соединения – белки, амиды, амины, а также такие аминокислоты, как фенилаланин, гистидин, аспарагиновая, глутаминовая, триптофан, лейцин, цистин, валин, серин, аргинин, пролин, лизин. В следовых количествах обнаружены витамины (В₁, В₂, В₆, А, Е, никотиновая кислота) [9, 10, 11, 12].

Цель работы – сравнительная оценка требований к фармацевтической субстанции «Прополис» разных производителей.

Фармакопейная статья на субстанцию «Прополис» включена в фармакопею Китая. В отечественной и ведущих зарубежных фармакопеях субстанция не описана.

Ранее отечественные производители лекарственных препаратов на основе прополиса использовали субстанции, качество которых регламентировалось по ГОСТ 28886-90 «Прополис. Технические условия» или ВФС 42-1084-81 «Прополис». ГОСТ 28886-90 распространяется на прополис, заготавливаемый для промышленной переработки. В настоящее время в Государственный реестр лекарственных средств включены фармацевтические субстанции «Прополис» шести производителей. При создании проектов нормативной документации фирмы-производители руководствовались требованиями ВФС 42-1084-81, ГОСТ 28886-90 и ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».

В ГОСТ 2886-90 отсутствуют показатели качества «Подлинность», «Растворимость», «Антимикробная активность», «Микробиологическая чистота», в ВФС 42-1084-81 не включены показатели «Окисляемость», «Окисляемые вещества», «Йодное число», «Микробиологическая чистота» (таблица), различаются нормы по показателям «Описание», «Растворимость», «Механические включения», «Воск».

Поскольку существенную часть соединений, образующих прополис, составляют соединения флавоноидной природы, в ВФС 42-1084-81 «Прополис» подлинность флавоноидов подтверждается двумя качественными реакциями: с порошком магния в кислой среде и с раствором свинца (II) уксуснокислого. Реакция восстановления магнием в присутствии хлористоводородной кислоты (проба Chinoda) является общей реакцией на флавонолы, флаваноны и флавоны, в результате которой наблюда-

ется постепенное окрашивание раствора в красный цвет. Реакция определения подлинности с раствором свинца (II) уксуснокислого основного относится к реакциям комплексообразования, в которую вступает группа флавоноидов: флавоны, халконы, аураны, содержащие свободные орто-гидроксильные группы в кольце В. При добавлении к спиртовому раствору прополиса раствора свинца (II) уксуснокислого основного образуется осадок, окрашенный в желтый цвет. В нормативную документацию на субстанцию для характеристики подлинности производители включают обе вышеуказанные качественные реакции. Но в последние годы все большее распространение получают физико-химические методы анализа, с помощью которых предоставляется возможность выделения и определения отдельных веществ (флавоноидов) из лекарственного сырья, обладающих фармакологическим действием, и качественные реакции в данном случае малоинформативны, так как позволяют идентифицировать вещества флавоноидной природы, а не отдельные их группы [18]. В Китайской фармакопее для идентичности прополиса включен метод ТСХ с использованием стандартных образцов кризина и галангина, относящихся соответственно к группе флавонов и флавонолов.

На способности флавоноидов растворяться в спирте и поглощать в области УФ-спектра основана методика количественного определения в прополисе. В ВФС 42-1084-81 и в ГОСТ 28886-90 включено количественное определение фенольных веществ (флавоноидов и других фенольных соединений) методом спектрофотометрии. Так как УФ-спектр спиртового раствора прополиса имеет максимум поглощения при длине волны 290 нм, определение проводится напрямую, без использования приемов для удаления соединений других классов, которые могут оказывать влияние на результаты анализа (хлорофиллы, жирные масла, эфирные масла и др.). При расчете используется величина удельного поглощения, т.е. коэффициент пропорциональности оптической плотности и концентрации суммы фенольных соединений прополиса.

В ГОСТ 55312-2012 «Прополис. Метод определения флавоноидных соединений» включена спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидных соединений. Методика основана на спектрофотометрическом определении оптической плотности комплексов, образующихся при взаимодействии флавоноидов, имеющих гидроксильную группу в молекуле, с раствором алюминия хлорида. Определение проводят в максимуме

поглощения в интервале длин волн от 390 до 420 нм. В качестве СО используется рутин, на который осуществляется пересчет суммы флавоноидов. В ГОСТ 55488-2013 «Прополис. Метод определения полифенолов» включена спектрофотометрическая методика определения суммарного содержания полифенольных соединений водно-спиртового экстракта прополиса модифицированным методом Фолина-Чокальтеу в пересчете на галловую кислоту. Определение проводят в максимуме поглощения при длине волны 765 нм. В качестве СО используется галловая кислота. Указанные методики более специфичны, чем методика, включенная в ВФС 42-1084-81 и в ГОСТ 28886-90, однако в реакции с алюминия хлоридом и реактивом Фолина-Чокальтеу вступают и другие соединения. Поэтому недостатком указанных спектрофотометрических методик является недостаточная селективность. Совершенствование стандартизации лекарственного сырья природного происхождения требует оценки отдельных компонентов биологически активных соединений, определяющих терапевтическое действие лекарственного препарата, получаемых из лекарственного сырья. В этой связи наиболее перспективно использование метода ВЭЖХ. Так, в монографию на прополис Китайской фармакопеи включена методика ВЭЖХ количественного определения кризина и галангина (с нормами «не менее 2%» и «не менее 1%», соответственно) и с использованием стандартных образцов кризина и галангина.

На химический состав, цвет, аромат и внешний вид прополиса оказывают влияние природно-климатические факторы территории сбора и своеобразие флоры в месте сбора. Например, прополис, собранный в районе с преобладанием хвойных деревьев, имеет светлые оттенки зеленого и коричневого цвета, а собранный с тополей будет коричнево-красного цвета. Иногда, если пасека находится вдоль дорог, пчелы собирают битум. Тогда прополис приобретает черные оттенки цветов с черными прожилками [6, 11, 12, 21]. Из литературных источников известно, что на 36–80% прополис состоит из растительных смол, на 2–15% из пчелиного воска [21]. Растительные смолы и воск не обладают биологической активностью, поэтому их содержание должно контролироваться. В ВФС 42-1084-81 и ГОСТ 28886-90 включены показатели «Воск» и «Механические примеси». В нормативной документации четырех производителей по показателям качества «Механические примеси» и «Воск» приведены нормы в соответствии с ГОСТ 28886-90:

«не более 20%» и «не более 25%» соответственно. Для субстанций других производителей по указанным показателям были утверждены нормы, соответствующие требованиям ВФС 42-1084-81: «не более 15%» и «не более 20%» соответственно. Анализ технологических схем показал, что получение субстанции фармакопейного качества направлено в основном на очистку с использованием различных способов и приемов, снижающих содержание механических включений и воска. Основным лекарственным препаратом, для производства которого используется субстанция, является Прополиса настойка, на изготовление которой берется 100 г субстанции прополиса (суммарно эти 100 г включают механические примеси, воск и сам прополис) и добавляется спирт этиловый до 1000 мл. Завышенное содержание механических включений и воска в субстанции может привести к снижению содержания действующих веществ, обладающих фармакологической активностью, и, как следствие, к снижению эффективности лекарственного препарата. Завышенное содержание воска может стать одной из причин появления осадка. Производителям предложено руководствоваться нормами, приведенными в ВФС 42-1084-81 «Прополис», так как субстанции с высокими нормами содержания механических включений и воска «не более 20%» и «не более 25%», соответственно, являются недоочищенными.

Известно, что прополис и лекарственные формы, созданные на его основе, обладают антимикробной активностью [3, 23]. Активность прополиса связана не только с антимикробным действием, но и с изменением иммунологической реактивности микроорганизмов [3]. В ВФС 42-1084-81 включен показатель «Антимикробная активность», определение проводится методом последовательных разведений в мясопептидном агаре. Субстанция «Прополис» подавляет рост тест-микроорганизма в концентрации «не более 0,08%». Указанный показатель включен в фармакопейные статьи предприятий.

Наличие в составе субстанции ненасыщенных жирных кислот, азотистых соединений, витаминов, аминокислот [12, 21] влияет на окислительную способность прополиса при действии кислорода воздуха и света, что приводит к изменению цвета, запаха субстанции и других физико-химических характеристик. В этой связи в ГОСТ 28886-90 включен показатель «Окисляемость», а в монографию Китайской фармакопеи – показатель «Время окисления». В ВФС 42-1084-81 «Прополис» указанный

показатель отсутствует. Анализ нормативной документации предприятий и проектов нормативной документации позволил выяснить, что только двумя производителями в перечень показателей включен показатель «Окисляемость».

Таким образом, проведенный сравнительный анализ показателей качества, включенных в отечественные стандарты на фармацевтическую субстанцию Прополис (ВФС 42-1084-81, ГОСТ 28886-90, фармакопейные статьи предприятий и проекты фармакопейных статей предприятий), показал отсутствие единого подхода в разработке проектов нормативной документации в связи с отсутствием единого государственного стандарта качества на фармацевтическую субстанцию «Прополис». У большинства производителей отсутствует показатель «Окисляемость», различаются нормы по показателям «Описание», «Растворимость», «Механические включения», «Воск». Методики подтверждения подлинности (качественные реакции на флавоноиды) и количественного определения (УФ-спектрофотометрия) мало-

информативны и неспецифичны, отражают суммарную оценку всей группы фенольных соединений, входящих в состав фармацевтической субстанции, в то время как совершенствование стандартизации лекарственного сырья природного происхождения требует оценки отдельных компонентов биологически активных соединений, определяющих терапевтическое действие лекарственного препарата.

С целью усовершенствования подходов к стандартизации субстанций, с учетом достижений в области физико-химических методов анализа лекарственных средств для медицинского применения, необходима разработка фармакопейной статьи на фармацевтическую субстанцию «Прополис» с включением современных и специфичных хроматографических методов анализа для идентификации и количественного определения, установления единых норм по показателям «Воск» и «Механические включения» с пределами «не более 15%» и «не более 20%», соответственно и включения показателя «Окисляемость».

Сравнительная таблица по показателям качества на субстанцию прополис

Показатели	ВФС 42-1084-81	ГОСТ 28886-90	Китайская фармакопея
1	2	3	4
Описание	Темно-серая с зеленоватым или коричневым оттенком масса, неоднородная в изломе, горьковатого вкуса, с характерным смолистым ароматным запахом	Комки, крошки или брикеты темно-зеленого, бурого или серого с зеленоватым, желтым или коричневым оттенком. Запах характерный – смолистый (смесь запахов меда, душистых трав, хвой, тополя); вкус горький, слегка жгучий. Структура плотная, в изломе неоднородная	Неоднородные гранулы или фрагменты, в основном коричневатого-желтого, темно-коричневого или серо-коричневого цвета, блестящие. Обладает неплотной (рыхлой) консистенцией (текстурой) при 20°C, постепенно размягчается при температуре 30°C. Характерен специфический ароматный запах, горький и жгучий (острый) вкус
Подлинность	1. Качественная реакция с свинца ацетата основного раствором 2. Качественная реакция с магния порошком в присутствии кислоты хлористоводородной концентрированной	–	ТСХ Система: хлороформ, метанол, бутанон (9,4:0,3:0,3) СО кризина и СО галангина
Растворимость	Практически нерастворим в воде, эфире, хлороформе, спирте и ацетоне	–	–
Механические примеси	Не более 15%	Не более 20,0%	–
Воск	Не более 20%	Не более 25,0%	–
Окисляемость (Время окисления)	–	Не более 22,0 с	Не более 22 с
Окисляемые вещества	–	Не менее 0,6	–
Йодное число	–	Не менее 35,0	–

Окончание таблицы

1	2	3	4
Потеря в массе при высушивании	–	–	Не более 2,0%
Зола общая	–	–	Не более 8,0%
Зола, нерастворимая в кислоте	–	–	Не более 6,0%
Экстрактивных веществ	–	–	Не менее 50,0%
Антимикробная активность	Должен подавлять рост тест-микроорганизма в концентрации не более 0,08%	–	–
Микробиологическая чистота	–	–	–
Количественное определение содержания – кризина – галангина	– –	– –	Не менее 2,0% Не менее 1,0%
суммы фенольных соединений	Не менее 25%	–	–
суммы флавоноидных соединений и других фенольных соединений	–	Не менее 25	–
Срок годности	3 года	10 лет	–
Хранение	При температуре не выше 20°C	В сухом и темном месте при температуре не выше 25°C и относительной влажности не менее 65%	–

Список литературы

1. Симонян Е.В., Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Ушакова В.А., Ножкина Н.Н., Климантова М.С., Юмагузина А.Т. Обоснование состава и биофармацевтические исследования суппозиторий, содержащих кислоту глутаминовую и экстракт прополиса // Научные ведомости БелГУ. – 2014. – № 11(182). – С. 255–7.
2. Симонян Е.В., Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Григорьева Г.П., Ермолаев А.Д., Чернов А.В., Епифанов А.В., Юмагузина А.Т. Исследование фармакологических свойств разработанных суппозиторий с кислотой янтарной и экстрактом прополиса // Вестник ЮУрГУ. – 2014. – № 14(3). – С. 61–64.
3. Барсков А.А. Разработка стандартных лекарственных форм прополиса, оценка их антимикробного и иммуномодулирующего действия при лечении сельскохозяйственных животных: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – Казань, 1988.
4. Симонян Е.В., Юркова Е.А., Карагезова С.Т., и др. Определение флавоноидов в продуктах пчеловодства // Научная дискуссия: вопросы медицины: материалы I Международной заочной научно-практической конференции. – М.: Международный заочный центр науки и образования, 2012.
5. Браславский В.Б., Куркин В.А. Исследование электронных спектров флавоноидов тополя и прополиса // Медицинский альманах. – 2011. – № 15(2). – С. 140–4.
6. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. Исследование экстрактов прополиса и почек тополя бальзамического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (материалы VI Всероссийского симпозиума молекулярной жидкостной хроматографии) // Журнал физической химии. – 1994. – № 68(10). – С. 1816–18.
7. Соколов И.В., Торгов И.В. Флавоноидные агликоны в прополисе и его источниках // Химия природных соединений. – 1990. – № 4. – С. 550–1.
8. Поправко С.А., Гуревич А.И., Колосов М.Н. Флавоноидные компоненты прополиса // Химия природных соединений. – 1969. – № 6. – С. 476–82.
9. Симонян Е.В., Евсельева Е.А., Юмагузина А.Т., и др. Определение дубильных веществ в продуктах пчеловодства // Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации: материалы II Международного конгресса. Традиционная медицина. – 2012. – № 5. – С. 301–3.
10. Fabris S., Bertelle M., Astafyeva O., Gregoris E., Zangrando R., Gambaro A., Pace Pereira Lima G., Stevanato R. Antioxidant Properties and Chemical Composition Relationship of Europeans and Brasilians Propolis // Pharmacology & Pharmacy. – 2013. – № 4. – С. 46–51.
11. Silva B.B., Rosalen P.L., Cury J.A., Ikegaki M., Souza V.C., Esteves A., Alencar S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. – eCam 2007: 1–4.
12. Брыкалов А.В., Токарева Н.А., Белик Е.В. Исследование количества микроэлементов, содержащихся в прополисе // Фундаментальные исследования. Материалы конференций. – 2004. – № 4. – С. 46.
13. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 1; 2010.
14. Прополис. Технические условия. ГОСТ 28886-90.
15. Прополис. ВФС 42-1084-81.
16. Об обращении лекарственных средств. Федеральный закон Российской Федерации № 61-ФЗ.
17. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.05.001-00.
18. Миронов А.Н., Сакаева И.В., Саканян Е.И., Корсун Л.В., Мочкина О.А. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 2. – С. 52–56.
19. Прополис. Метод определения флавоноидных соединений. ГОСТ Р 55312-2012.
20. Прополис. Метод определения полифенолов. ГОСТ Р 55488-2013.
21. Кайгородов Р.В., Суворова С.А. Биохимические особенности растительных источников прополиса умеренной природной зоны // Вестник Пермского университета. – 2013. – № 3. – С. 65–68.
22. Шишкова Ю.С., Симонян Е.В., Абрамовских О.С., Шикова Ю.В., Хасанова Д.М., Липская А.Д., Ушакова В.А. Изучение антимикробной активности некоторых двухосновных карбоновых кислот в сочетании с прополисом // Медицинский альманах. – 2014. – № 1(31). – С. 99–101.