

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПРОПОЛИСА В СОСТАВЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА «АПИБАКТ»

А. М. Филенко<sup>1</sup>

В. С. Омелянюк<sup>2</sup>

Д. С. Янковский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-производственная компания «О. Д. Пролисок», Киев

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

*E-mail: anfil@voliacable.com*

В процессе хранения препарата «Апибакт» (на протяжении 2 мес при +5° С) введенный в него прополис полностью сохраняется и не расходуется в метаболических процессах микроорганизмов. Спектр поглощения раствора прополиса, вводимого в препарат, и расчетный спектр поглощения прополиса, извлеченного из препарата «Апибакт» по истечении 2 мес хранения, совпадают в пределах всего интервала длин волн поглощения (240–450 нм). Это означает, что в процессе хранения препарата сохраняются все компоненты прополиса, и количественное соотношение между ними остается неизменным. Это справедливо для основных компонентов прополиса, ответственных за формирование его спектра поглощения, таких как галангин, кверцетин, кемпферол, хризин, нарингенин, пиноцембрин и различные эфиры кофейной, коричной и других фенольных кислот. Тот факт, что около 5% всего количества прополиса, вводимого в препарат, не переходит в супернатант при первом центрифугировании, а остается в осадке, указывает на то, что часть прополиса, суспендированного в препарате, может связываться на гидрофобных участках клеточных стенок микроорганизмов.

**Ключевые слова:** прополис, микроорганизм, микрофлора, бактериальный препарат, «Апибакт», пробиотик, мультипробиотик.

Разработанный научно-производственной компанией «О. Д. Пролисок» комбинированный бактериальный препарат «Апибакт» [1, 2] содержит, кроме пробиотической физиологической микрофлоры, восстанавливающей нормомикробиоценозу организма человека, также прополис — природный продукт, который с древних времен используется в лечебных целях и оказывает ингибирующее воздействие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы.

Пчелы получают прополис, собирая вещества, выделяемые растениями, и его химический состав зависит от особенностей местной флоры. Однако проведенные за последние десятилетия исследования показывают, что в умеренных климатических зонах главным его источником служат смолистые выделения почек тополей, в основном черного тополя *Populus nigra* [9; 10]. По этой причине европейский прополис (в том числе собранный на территории Украины) содержит типичные фенольные смолы тополиных почек: флавоноиды, фенольные кислоты и их эфиры [11].

За последние два десятилетия прополис стал объектом интенсивных химических

и фармакологических исследований [12–35]. Установлено, что в его состав входит более 150 фармакологически активных веществ. Это главным образом флавоноиды, фенольные кислоты и их эфиры. Благодаря наличию бензольного кольца в структуре молекул этих веществ, все они оптически активны. Их растворы в спирте (или других органических растворителях) поглощают в ультрафиолетовой и видимой области (240–450 нм). Спектры поглощения отдельных веществ, различающиеся в большей или меньшей степени [24; 36], в совокупности образуют спектр поглощения прополиса, который является своего рода паспортом этого продукта [37]. Спектры поглощения и растворимость отдельных компонентов прополиса зависят от растворителя (различные концентрации этилового спирта или другие органические растворители), поэтому спектры экстрактов прополиса в различных растворителях различаются. В фирме «О. Д. Пролисок» для максимального извлечения из прополиса всех фенольных производных использовали 96% -й спирт. Спектры поглощения таких экстрактов в 96% -м спирте для образцов прополиса, полученных в разные

годы из разных областей Украины, имели характерный максимум при 292 нм и практически не различались между собой. Это свидетельствует о достаточно стабильном соотношении основных фенольных компонентов в прополисе «тополиного типа» [33–35].

Фенольные компоненты прополиса обладают антибактериальной, противовоспалительной, онкостатической, антиоксидантной, гепатозащитной и иммуностимулирующей активностью [38–40]. Флавоноиды и другие фенольные производные представляют собой растительные пигменты, которые синтезируются растениями и часто накапливаются ими в больших количествах (в зависимости от вида растения и условий его произрастания). Практически все лекарственные препараты растительного происхождения содержат фенольные производные [2–5]. Флавоноиды всегда поступали в организм человека с растительной пищей и при сбалансированном питании их потребление с овощами и фруктами достигает 1–2 г в день [18]. Вследствие этого нормальная физиологическая микрофлора человека прошла длительный отбор на устойчивость к этим веществам, поэтому и прополис практически не оказывает на нее (в отличие от патогенных или условно-патогенных микроорганизмов) отрицательного воздействия. Пробиотическая микрофлора, входящая в состав препарата «Апибакт» (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*), очень близка по своим свойствам к нормальной физиологической микрофлоре. Следовательно, она также достаточно устойчива к воздействию прополиса, что было показано в ряде экспериментов с посевом микроорганизмов на питательные среды, в которые добавляли различные концентрации прополиса (данные здесь не приводятся). Кроме того, была еще дополнительно проведена селекция наиболее устойчивых штаммов, которые и были введены в состав мультипробиотика «Апибакт» [2]. Исходный концентрированный спиртовой экстракт прополиса вводили в препарат «Апибакт» в небольшом количестве (не более 2% экстракта). Введенный прополис находится в препарате в виде суспензии, поскольку его спиртовая фракция в водной среде практически нерастворима [8–11].

В связи с повышенной устойчивостью бактериальных штаммов мультипробиотика «Апибакт» к фенольным компонентам прополиса, а также их высокой концентрацией в этом препарате возникло предположение, что такая устойчивость может быть связана

(по крайней мере, частично) с утилизацией компонентов прополиса в метаболизме бактерий. Поскольку эти процессы могли бы приводить к существенному уменьшению содержания прополиса в препарате «Апибакт» в процессе его хранения, для проверки этого предположения было проведено сравнение содержания прополиса в препарате в конце его срока годности (2 мес при +5°С) с количеством прополиса, вводимого в препарат. Количество прополиса в бакпрепарате определяли с помощью метода спектрофотометрии. Предварительные исследования (данные не приведены) показали, что прополис, растворенный в исходном насыщенном 96%-м спиртовом экстракте, после доведения в нем этанола до 75% и дополнительном разведении в 1,5–2 раза 75%-м спиртом полностью переходит в растворенное состояние, причем спектр поглощения 75%-го раствора прополиса совпадает с таковым исходного экстракта. Поэтому при подготовке препарата «Апибакт» для спектрофотометрического анализа содержание спирта в нем доводили до 75% (для полного растворения суспендированного в препарате прополиса) и центрифугировали при 6 000 g до просветления надосадочной жидкости (в которую должен перейти суспендированный в препарате прополис). Затем измеряли спектр поглощения надосадочной жидкости на спектрофотометре Carry-50 и сравнивали со спектром поглощения исходного раствора прополиса, разбавленного 75%-м спиртом в требуемой пропорции (с учетом всех разбавлений образца препарата).

## Материалы и методы

### Материалы и приборы

Для исследования использовали прополис, собранный на территории Полтавской области в 2006 г. Экстракты прополиса готовили на 96%-м пищевом спирте высшей степени очистки (Трилисский спиртовой завод, с. Трилисы, Фастовский р-н, Киевская обл.). Для приготовления препарата «Апибакт» использовали специально селекционированные для этого штаммы микроорганизмов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* [2].

Центрифугирование и осветление образцов производили при 6 000 об/мин (g = 6 000) на центрифуге РС-6 (завод биофизических приборов, Львов). Для измерения оптического поглощения применяли спектрофотометр Carry-50 фирмы Varian, Inc. (США).

*Получение спиртового экстракта прополиса*

Экстракт прополиса получали как описано в работе [8]. 400 г измельченного (после замораживания до  $-20^{\circ}\text{C}$ ) прополиса заливали 1 л 96%-го спирта и в плотно закрытой стеклянной банке помещали на шейкерную мешалку. Экстракцию производили при комнатной температуре на протяжении недели при непрерывном перемешивании в течение рабочего дня. Полученный экстракт декантировали и фильтровали. Объем экстракта после удаления нерастворенного остатка составлял 1,15 л, следовательно, концентрация спирта в нем составляла  $96\% \times (1/1,15) = 83\%$ .

Для понижения денатурирующего воздействия на микроорганизмы концентрированного спирта полученный экстракт прополиса перед добавлением его к бактериальному концентрату разводили 32%-м спиртом в соотношении 1:1, что приводило к уменьшению концентрации спирта в экстракте до 58%.

*Получение образцов для анализа*

В четырех флаконах, используемых для расфасовки препарата, готовили четыре образца:

♦ Образец № 1. К 10 мл бактериального концентрата, заготовленного для производства партии препарата «Апибакт», добавляли, тщательно перемешивая, 0,25 мл разбавленного (1:1) экстракта прополиса.

♦ Образец № 2. К 10 мл того же бакконцентрата добавляли, тщательно перемешивая, 0,25 мл 58%-го спирта.

♦ Образец № 3. К 10 мл дистиллированной воды добавляли 0,25 мл разбавленного (1:1) экстракта прополиса.

♦ Образец № 4. К 10 мл дистиллированной воды добавляли 0,25 мл 58%-го спирта.

Все четыре флакона закрывали резиновыми пробками с алюминиевой окантовкой (в соответствии с технологией расфасовки отдельных порций препарата «Апибакт») и помещали в холодильник, где они хранились при температуре  $+5^{\circ}\text{C}$  в течение 2 месяцев.

Образец №1 — это стандартная доза препарата «Апибакт». Образец № 2 отличается от него отсутствием прополиса и предназначен для использования в качестве образца сравнения при измерении оптического поглощения образца № 1 (после соответствующих разведений и перевода прополиса в растворенное состояние). Образец № 3 содержит такое же количество прополиса в виде водной суспензии, как и препарат «Апи-

бакт» (образец №1) и предназначен для измерения методом оптического поглощения количества введенного в препарат прополиса. Образец №4 (дистиллят с добавкой спирта) отличается от образца №3 отсутствием прополиса и предназначен для использования в качестве образца сравнения при измерении оптического поглощения образца № 3 (после соответствующих разведений).

*Подготовка образцов для спектрофотометрических измерений*

По истечении двух месяцев хранения образцов их извлекали из холодильника и готовили для спектрофотометрических измерений.

Прополис в препарате «Апибакт» (образец № 1) находится в суспендированном виде. Чтобы измерить поглощение прополиса на спектрофотометре, следует его перевести в растворенное состояние, для чего достаточно довести концентрацию спирта в препарате до 75% и избавиться от бактериальной фракции путем центрифугирования. Для этого отбирали 2 мл препарата из флакона с образцом № 1 и тщательно перемешивали с 7 мл 96%-го спирта. Точно так же довели содержание спирта до 75% в образце № 2 (контроль). После разведения полученные объемы образцов (9 мл) центрифугировали на центрифуге РС-6 при 6 000 об/мин на протяжении 30 мин до просветления надосадочной жидкости (супернатанта). Объем супернатанта  $V_c$  для каждого образца (№ 1 и 2) после центрифугирования составлял 7,75 мл, а объем осадка  $V_o$  — 1,25 мл, соответственно.

*Расчеты содержания прополиса в спиртовых растворах и в препарате «Апибакт»*

Записывали спектр поглощения спиртового (96%) экстракта прополиса и определяли поглощение при 290 нм, которое использовали для количественного определения фенольных соединений прополиса в растворе [7].

Оптическое поглощение раствора  $D$  связано с концентрацией растворенного вещества  $C$  линейной зависимостью  $D = E \cdot l \cdot C$ , где  $l$  — длина оптического пути (толщина кюветы  $l = 1$  см), а  $E$  — коэффициент поглощения (экстинкции). Линейная зависимость  $D$  от концентрации для спектрофотометра Саггу-50 соблюдается для  $D \leq 2,5$ . Коэффициент экстинкции для спиртового (96%) раствора прополиса при длине волны 290 нм составляет  $E = 510 [\text{см} \cdot \%]^{-1}$  [7, 8]. Для измерения поглощения при 290 нм в линейной области исходный спиртовой раствор пропо-

лиса разбавляли 96% -м спиртом в 2 000 раз и концентрацию разбавленного раствора  $C_p$  (%) определяли из соотношения  $C_p = D / E \cdot l$ . Для раствора прополиса, который использовали в опыте, при его разбавлении в 2 000 раз  $D_{290} = 1,53$ . Таким образом  $C_p = 1,53 / 510 = 0,003\%$ , а концентрация прополиса в исходном растворе  $C = 0,003\% \times 2\,000 = 6\%$  или 60 мг/мл.

На этапе центрифугирования прополис в образце № 1 трижды разбавляли. 1. В  $n = 2$  раза при разбавлении (1:1) исходного раствора 32% -м спиртом (концентрация разбавленного прополиса — 3% или 30 мг/мл). 2. При добавлении 0,25 мл разбавленного (1:1) раствора прополиса к 10 мл бакпрепарата в  $n = 10,25/0,25 = 41$  раз. Следовательно концентрация прополиса, введенного в бакпрепарат «Апибакт», составляет  $3\% / 41 = 0,073\%$  (0,73 мг/мл). 3. При смешивании 2 мл Апибакта с 7 мл 96% -го спирта достигали разбавления прополиса в  $n = 9/2 = 4,5$  раза. Следовательно, на этом этапе общее разбавление  $n = 2 \times 41 \times 4,5 = 369$  раз и концентрация прополиса в смеси составляет  $0,073\% / 4,5 = 0,016\%$  (0,16 мг/мл). При измерении на спектрофотометре образцы дополнительно разбавляли 75% -м спиртом в  $n = 5$  раз. Таким образом, концентрация прополиса в образцах на этапе оптических измерений составляла  $0,016\% / 5 = 0,0032\%$  (0,032 мг/мл или 32 мкг/мл).

#### Программная обработка данных спектроскопических измерений

Для коррекции спектральных данных, полученных с помощью спектрофотометра, расчета спектральных распределений, соответствующих концентрации прополиса в бакпрепарате «Апибакт», и построения кривых спектрального распределения использовали программное обеспечение Origin 11.

#### Результаты и обсуждение

Для корректного измерения оптического поглощения в пределах спектра поглощения прополиса (от 240 до 450 нм), т. е. для измерения в линейной области зависимости поглощения от концентрации поглощаемого вещества ( $D \leq 2,5$  для Cary-50), полученный после центрифугирования супернатант разбавляли еще в 5 раз 75% -м спиртом, доводя таким образом общее разбавление до  $n_{об} = 369 \cdot 5 = 1\,845$  раз. Точно так же разбавляли супернатант образца № 2 (образец сравнения, не содержащий прополиса) и записывали спектр поглощения образца 1 против

образца 2 в интервале длин волн 240–450 нм (рис. 1, кривая 2). По такой же схеме, как и для образцов № 1 и 2, но без центрифугирования, производили все разбавления тестовых образцов № 3 и 4 (с дополнительным разбавлением в 5 раз на последнем этапе). Находили оптическое поглощение образца № 3 (раствор прополиса в 75% -м спирте) против № 4 (растворитель — 75% -й спирт) (рис. 1, кривая 1).

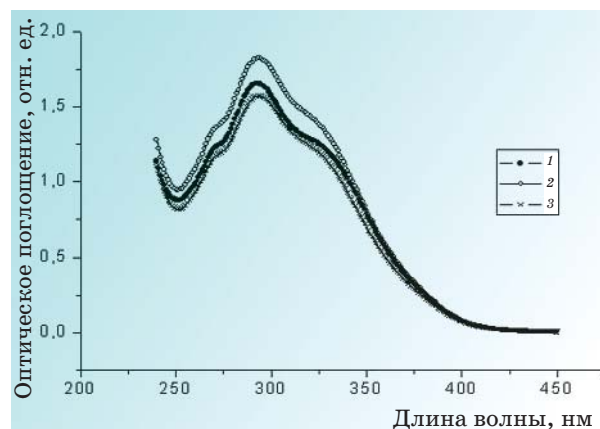


Рис. 1. Спектры поглощения растворов прополиса: 1 — спектр раствора прополиса в 75% -м спирте; 2 — спектр поглощения супернатанта полученного центрифугированием смеси из 2 мл препарата «Апибакт» и 7 мл 96% -го спирта после его разбавленного в 5 раз 75% -м спиртом; 3 — кривая 2, скорректированная на концентрирование прополиса в супернатанте

Как следует из рис. 1, спектр прополиса, извлеченного из препарата «Апибакт» после двух месяцев хранения при температуре  $+5^\circ\text{C}$  (кривая 2, поглощение в максимуме  $D_{292} = 1,82$ ), расположен выше спектра раствора прополиса, соответствующего количеству прополиса, введенного в препарат (кривая 1,  $D_{292} = 1,66$ ). Это кажущееся различие связано с разделением фаз при центрифугировании и переходом основной массы прополиса в супернатант. Как отмечалось выше, из 9 мл смеси препарата со спиртом после центрифугирования получен объем надосадочной жидкости  $V_c = 7,75$  мл (при объеме осадка  $V_o = 1,25$  мл, соответственно). Если допустить, что весь прополис при центрифугировании препарата перейдет в надосадочную спиртовую фракцию, то концентрация его в этой фракции возрастет в  $V/V_c = 9/7,75 = 1,16$  раза. Поскольку поглощение вещества прямо пропорционально его концентрации, для получения спектра поглощения, отнесенного к исходному объему (объем смеси до центрифугирования), необходимо кривую 2 разделить на коэффициент

концентрирования  $k_k = 1,16$ . Такой приведенный спектр поглощения представлен на рис. 1 (кривая 3). Поглощение в максимуме для приведенного спектра составляет  $D_{290} = 1,57$ , что отличается от поглощения в максимуме для образца прополиса № 3 (кривая 1) на  $[(1,66-1,57)/1,66] \times 100 = 5,4\%$ . Таким образом, около 95% массы прополиса в препарате «Апибакт» при центрифугировании переходит в надосадочную жидкость. Однако небольшая часть его (около 5%), возможно, остается в осадке или теряется (утилизируется микроорганизмами) при хранении препарата. Для выяснения этого вопроса мы дополнительно суспендировали полученные для образцов № 1 и 2 осадки ( $V_o = 1,25$  мл) в 75%-м спирту из расчета 10-кратного разведения (1,25 мл осадка плюс 11,25 мл спирта — суммарный объем смеси 12,5 мл) и еще раз центрифугировали полученную смесь.

Спектр поглощения полученного (вторичного) супернатанта (образец № 1 против образца № 2) приведен на рис. 2 (кривая 3; представлены также кривые 1 и 2, взятые из рис. 1). Это характерный спектр спиртового раствора прополиса. Мы взяли 10-кратное разведение, поэтому можно полагать, что практически весь прополис, оставшийся в осадке после первого центрифугирования, перешел после второго центрифугирования в надосадочную жидкость. Полученный спектр (кривая 3) необходимо откорректировать с поправкой на концентрирование (привести к исходному объему смеси 12,5 мл), умножив его на коэффициент  $11,25/12,5 = 0,9$ . Кроме того, его еще следует умножить на 2, чтобы привести к 5-кратному разведению, которое использовалось при разбавлении 1-го супернатанта.

Таким образом, на рис. 2 представлен спектр поглощения прополиса, перешедшего в супернатант при первом центрифугировании после 5-кратного разбавления (кривая 2) и спектр поглощения прополиса, распределенного в остатке после перевода его при повторном центрифугировании в 5-кратный (по сравнению с объемом остатка) объем спирта (кривая 3a). В процессе центрифугирования концентрация прополиса  $C$  в смеси ( $V = 9$  мл), полученной при смешивании 2 мл препарата «Апибакт» с 7 мл 96%-го спирта, перераспределяется по двум фракциям — супернатант объемом  $V_c = 7,75$  мл с концентрацией  $C_c$  и осадок объемом  $V_o = 1,25$  мл с концентрацией  $C_o$ . Очевидно, связь между этими концентрациями следующая:

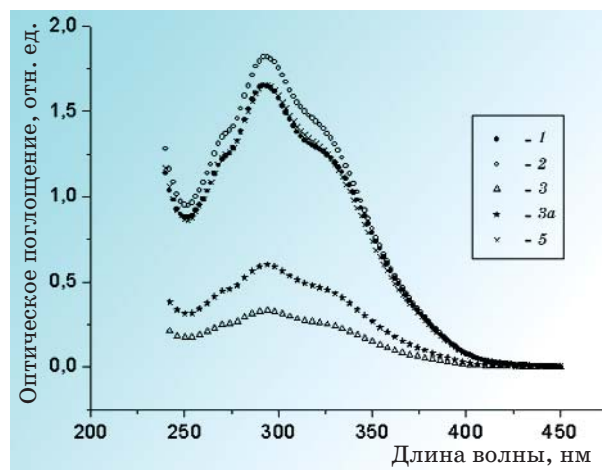


Рис. 2. Корректировка с поправкой на разбавление и концентрирование спектров поглощения прополиса, извлеченного из препарата «Апибакт», и расчет спектра поглощения, соответствующего концентрации прополиса, содержащегося в препарате:

кривые 1 и 2 — то же, что и на рис. 1; 3 — спектр поглощения супернатанта полученного при 10-кратном разбавлении 75%-м спиртом осадка после первого центрифугирования; 3a — кривая 3, откорректированная с поправкой на концентрирование и приведенная к 5-кратному разбавлению; 4 — расчетное спектральное распределение для прополиса, содержащегося в смеси 2 мл препарата «Апибакт» и 7 мл 96%-го спирта при дополнительном 5-кратном разведении 75%-м спиртом

$$C = (V_c/V)C_c + (V_o/V)C_o = 0,86 C_c + 0,139 C_o. \quad (1)$$

Поскольку спектральное поглощение прямо пропорционально концентрации растворенного вещества, такое же соотношение будет и для спектральных распределений по отдельным фракциям:

$$D = 0,86 D_c + 0,139 D_o, \quad (2)$$

где  $D_c$  — поглощение супернатанта,  $D_o$  — поглощение прополиса, распределенного в осадке при условии перевода его в объем растворителя (75% -й спирт), равный объему осадка. Разбавление отдельных фракций в 5 раз не изменяет отношения между поглощениями этих фракций. Таким образом, чтобы получить спектр поглощения  $D$ , соответствующий разбавленной в 5 раз концентрации прополиса, содержащегося в 9 мл смеси до центрифугирования, необходимо произвести перерасчет по соотношению (2), используя вместо  $D_c$  кривую 2 (рис. 2), соответствующую разбавленному в 5 раз супернатанту, и вместо  $D_o$  — кривую 3a (рис. 2), соответствующую разбавленной в 5 раз концентрации прополиса, содержащегося в осадке. Для расчета массива спектральных данных по соотношению (2) была ис-

пользована программа Origin 11. Полученное таким образом расчетное спектральное распределение приведено на рис. 2 (кривая 4). Из него следует, что кривая 4 совпадает со спектром поглощения раствора прополиса (кривая 1), полученным при адекватном разбавлении, что свидетельствует о полной сохранности прополиса в препарате «Апибакт» в процессе его хранения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 55913А Україна, С 12 N 1/20, А 61 К 35/74, № 2002076088. Спосіб одержання пробіотика «Апібакт» / Янковський Д. С., Димент Г. С., Філенко А. М., Потребчук О. П., Товкачевська Л. Д., Дубонос В. М., Передрій В. А., Муквіч О. Д. — Заявл. 22.07.2002; Опубл. 15.04.2003. — Бюл. №4.
2. Янковский Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. — К.: Эксперт ЛТД, 2005. — 362 с.
3. Максютина Н. П., Комиссаренко Н. Ф., Прокопенко А. П. и др. Растительные лекарственные средства. — К.: Здоров'я, 1985. — 280 с.
4. Петрова В. П. Биохимия дикорастущих плодово-ягодных растений. — К.: Вища школа, 1986. — 287 с.
5. Георгиевский В. П., Комиссаренко Н. Ф., Дмитрук Е. С. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. — 333 с.
6. Казимиров В. К., Коваленко В. Н., Мальцев В. И. Фитобиотики в клинической практике. — К., 2006. — 248 с.
7. Прополис. Технические условия. ГОСТ 28886-90. — Изд-во стандартов, 1991. — 13 с.
8. Тихонов А. И., Ярных Т. Г., Черных В. П. и др. Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса. — Х.: Основа, 1998. — 384 с.
9. Bankov V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization // J. Ethnopharmacol. — 2005. — V. 100, N 1-2. — P. 114-117.
10. Bankova V., Recent trends and important developments in propolis research // Evid. Based. Compl. Alternat. Med. — 2005. — V. 2, N 1. — P. 29-32.
11. Bankova V., Popova M., Bogdanov S. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results // Z. Naturforsch. [C.]. — 2002. — V. 57, N 5-6. — P. 530-533.
12. Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines // Biol. Pharm. Bull. — 2003. — V. 26, N 7. — P.1057-1059.
13. Boyanova L., Kolarov R., Gergova G. et al. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria // Anaerobe. — 2006. — V. 12, N 4. — P. 173-177.
14. Christov R., Trusheva B., Popova M. et al. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin // Nat. Prod. Res. — 2006. — V. 20, N 6. — P. 531-536.
15. Cos P., Rajan P., Vedernikova I. et al. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives // Free Radic. Res. — 2002. — V. 36, N 6. — P. 711-716.
16. Gekker G., Hu S., Spivak M. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures // J. Ethnopharmacol. — 2005. — V. 102, N 2. — P. 158-163.
17. Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Moreno-Torres et al. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry // J. Sep. Sci. — 2007. — V. 30, N 4. — P. 595-603.
18. Havsteen B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacol. Ther. — 2002. — V. 96, N 2-3. — P. 67-202.
19. Imhof M., Lipovac M., Kurz C. et al. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis // Int. J. Gynaecol. Obstet. — 2005. — V. 89, N 2. — P.127-132.
20. Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin // J. Ethnopharmacol. — 1999. — V. 64, N 3. — P. 235-240.
21. Machado G. M., Leon L. L., De Castro S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. — 2007. — V. 102, N 1. — P. 73-77.
22. Orsolich N., Saranovic A. B., Basic I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour

- activity of propolis and its polyphenolic compounds // *Planta Med.* — 2006. — V. 72, N 1. — P. 20–27.
23. *Pepeljnjak S., Jalsenjak I., Maysinger D.* Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis* // *Pharmazie.* — 1985. — V. 40, N 2. — P. 122–123.
  24. *Pietta P. G., Gardana C., Pietta A. M.* Analytical methods for quality control of propolis // *Fitoterapia.* — 2002. — V. 73, Suppl 1. — P. 7–20.
  25. *Popova M., Bankova V., Butovska D. et al.* Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis // *Phytochem. Anal.* — 2004. — V. 15, N 4. — P. 235–240.
  26. *Repolles C., Herrero-Martinez J. M., Rafols C.* Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column // *J. Chromatogr. A.* — 2006. — V. 1131, N 1–2. — P. 51–57.
  27. *Russo A., Longo R., Vanella A.* Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin // *Fitoterapia.* — 2002. — V. 73, Suppl 1. — P. 21–29.
  28. *Scazzocchio F., D'Auria F. D., Alessandrini D. et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis // *Microbiol. Res.* — 2006. — V. 161, N 4. — P. 327–333.
  29. *Seo K. W., Park M., Song Y. J. et al.* The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism // *Phytother. Res.* — 2003. — V. 17, N 3. — P. 250–253.
  30. *Sforcin J. M., Orsi R. O., Bankova V.* Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production // *J. Ethnopharmacol.* — 2005. — V. 98, N 3. — P. 301–305.
  31. *Sobocanec S., Sverko V., Balog T. et al.* Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis // *J. Agric. Food Chem.* — 2006. — V. 54, N 21. — P. 8018–8026.
  32. *Tan-No K., Nakajima T., Shoji T. et al.* Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema // *Biol. Pharm. Bull.* — 2006. — V. 29, N 1. — P. 96–99.
  33. *Velikova M., Bankova V., Sorkun K. et al.* Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity // *Z. Naturforsch. [C.]* — 2000. — V. 55, N 9–10. — P. 790–793.
  34. *Volpi N., Bergonzini G.* Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2006. — V. 42, N 3. — P. 354–361.
  35. *Volpi N.* Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis // *Electrophoresis.* — 2004. — V. 25, N 12. — P. 1872–1878.
  36. *Gomez-Caravaca A. M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D. et al.* Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2006. — V. 41, N 4. — P. 1220–1234.
  37. *Miyataka H., Nishiki M., Matsumoto H. et al.* Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods // *Biol. Pharm. Bull.* — 1997. — V. 20, N 5. — P. 496–501.
  38. *Banskota A. H., Tezuka Y., Kadota S.* Recent progress in pharmacological research of propolis // *Phytother. Res.* 2001. — V. 15, N 7. — P. 561–571.
  39. *Burdock G. A.* «Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis) // *Food Chem. Toxicol.* — 1998. — V. 36, N 4. — P. 347–363.
  40. *Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K. et al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis // *Experientia.* — 1988. — V. 44, N 3. — P. 230–232.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ  
ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПРОПОЛІСУ  
В СКЛАДІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА  
«АПІБАКТ»

А. М. Філенко<sup>1</sup>  
В. С. Омелянюк<sup>2</sup>  
Д. С. Янковський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Науково-виробнича компанія  
«О. Д. Пролісок», Київ

<sup>2</sup>Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка

*E-mail: anfil@voliacable.com*

У процесі зберігання препарату «Апібакт» (протягом 2 міс. при +5° С) уведений в нього прополіс повністю зберігається і не втрачається в метаболічних процесах мікроорганізмів. Спектр поглинання розчину прополісу, введеного в препарат, і розрахунковий спектр для прополісу, виділеного із препарату «Апібакт» після 2 міс його зберігання, збігаються в межах всього інтервалу довжин хвиль поглинання (240–450 нм). Це вказує на те, що в процесі зберігання препарату всі компоненти прополісу зберігаються, і кількісне співвідношення між ними залишається незмінним. Це справедливо для основних компонентів прополісу, що відповідають за формування його спектру поглинання, таких як галангін, кверцетин, кемпферол, хризин, нарінгенін, піноцембрин та різні ефіри кофейної, коричної та інших фенольних кислот. Той факт, що близько 5% всієї кількості прополісу, введеного в препарат, не переходить у супернатант під час першого центрифугування, а залишається в осаді, свідчить про те, що частина прополісу, суспендованого в препараті, може зв'язуватися на гідрофобних ділянках клітинних стінок мікроорганізмів препарату.

**Ключові слова:** прополіс, мікрофлора, бактеріальний препарат, «Апібакт», пробіотик, мультипробіотик.

SPECTROPHOTOMETRIC  
DETERMINATION OF PROPOLIS  
CONTENT IN FORMULATION  
OF MULTIPROBIOTIC «APIBACT»

A. M. Filenko<sup>1</sup>  
V. S. Omelianuk<sup>2</sup>  
D. S. Yankovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research-and-production company  
«O. D. Prolisok», Kiyv;

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kiyv National University

*E-mail: anfil@voliacable.com*

In the course of shelf-life of the preparation «Apibact» (2 months at +5° C), introduced into it propolis conserves completely and is not consumed in metabolic processes of the preparation microorganisms. Absorption spectrum of the propolis solution, introduced into the preparation, and calculated absorption spectrum of the propolis, extracted from the preparation «Apibact» after 2 months of its shelf-life, coincide within all interval of absorption wavelengths (240–450 nm). This means that during shelf-life of the preparation all propolis components are conserved and proportion between them remains changeless. That is right at least for main propolis components, responsible for formation of its absorption spectrum, such as galangin, quercetin, kaempferol, chrysin, naringenin, pinocembrin and different ethers of caffeic, cinnamic and other phenolic acids. The fact that about 5% of all propolis, introduced into the preparation, don't transfer into a supernatant at first centrifugation and remains in the precipitate shows that part of the propolis suspended in the preparation can be linked on hydrophobic sites of cell walls of the preparation microorganisms.

**Key words:** propolis, microflora, bacterial preparation, Apibact, probiotic, multiprobiotic.