

УДК: 615.324.091.072;543.865/867.42



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЧЕЛИНОГО ЯДА И ПРОДУКТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

Л.И. Бутенко¹, С.А. Кулешова¹, Ж.В. Подгорная², Л.П. Мыкоц¹,
А.Б. Дмитриев¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России,
357500, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

² Представительство BRACCO Group в России, Региональный директор,
г. Москва, ул. Краснобогатырская, д. 89

В настоящее время является актуальной разработка метода количественного определения мелиттина не только в образцах пчелиного яда, но и в продуктах его переработки. **Целью** нашего исследования является изучение физико-химических характеристик основного компонента пчелиного яда – мелиттина. А также разработка методики количественного определения мелиттина в образцах пчелиного яда и в фармацевтических продуктах, полученных на основе пчелиного яда: крем «Софья с пчелиным ядом» и препарат «Апизартрон». **Материалы и методы.** Объектами исследований являлись пчелиный яд и мелиттин, а также образцы мази «Апизартрон» и крема «Софья с пчелиным ядом®», соответствующие требованиям нормативной документации, серийно выпускаемые отечественными и зарубежными производителями. УФ-спектр мелиттина и пчелиного яда регистрировали на спектрофотометре СФ 103 в кварцевых кюветах толщиной 1 см. ИК-спектры исследовали на приборе ИК-Фурье – спектрофотометр ФСМ-1201 ООО «Инфраспек». Определение чистоты мелиттина проводили методом хроматографии. **Результаты и обсуждение.** Для мелиттина, как референтного образца и основного компонента пчелиного яда, были установлены основные физико-химические характеристики. Установлена $T_{пл} = 190^{\circ}\text{C}$. В УФ-спектре наблюдаются максимумы поглощения, соответствующие 2 пикам: $\lambda_{max} = 225 \pm 2$ нм и 285 ± 2 нм. В качестве аналитической длины волны необходимо выбрать пик $\lambda = 285$ нм, так как пик с $\lambda = 225$ нм связан с поглощением света внутренним (экранированным) бензольным кольцом молекулы триптофана. Характер кривой и положение максимумов спектров мелиттина и раствора яда совпадают, что позволяет использовать мелиттин в качестве стандарта для спектрометрического количественного определения действующих веществ в пчелином яде и препаратах на основе пчелиного яда. **Заключение.** Разработанная спектрофотометрическая методика количественного определения мелиттина в пчелином яде валидирована по показателям специфичность, правильность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность.

Ключевые слова: пчелиный яд, мелиттин, стандартизация, спектрофотометрическое определение, УФ- и ИК-спектры мелиттина, лекарственные препараты на основе пчелиного яда

PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF APITOXIN AND PRODUCTS ON ITS BASIS

L.I. Butenko¹, S.A. Kuleshova¹, J.V. Podgornaya², L.P. Myikots¹, A.B. Dmitriev¹

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State
Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

² Representative establishment of BRACCO Group in Russia, Regional Director,
89, Krasnobogatyrskaya Str., 107076

Introduction. Nowadays, it is vitally important to develop a method for quantifying melittin not only in apitoxin samples, but also in the products of its processing. **The aim of our study** is to investigate physical and chemical

Для цитирования:

Бутенко Л.И., Кулешова С.А., Подгорная Ж.В.,
Мыкоц Л.П., Дмитриев А.Б.
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПЧЕЛИНОГО ЯДА И ПРОДУКТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ.
Фармация и фармакология. 2018;6(4):351-366.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-351-366
© Бутенко Л.И., Кулешова С.А., Подгорная Ж.В.,
Мыкоц Л.П., Дмитриев А.Б., 2018

For citation:

Butenko L.I., Kuleshova S.A., Podgornaya J.V.,
Myikots L.P., Dmitriev A.B.
PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF
APITOXIN AND PRODUCTS ON ITS BASIS
Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(4):351-366. (In Russ.)
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-351-366

characteristics of melittin, the main component of apitoxin, as well as the development of methods for the quantitative determination of melittin in the samples of apitoxin and in the pharmaceutical products derived from apitoxin: "Sophia with apitoxin" cream and "Apizartron" ointment. **Materials and methods.** The objects of the research were apitoxin and melittin, as well as the samples of "Sophia with apitoxin" cream and "Apizartron" ointment satisfying the requirements of regulatory documentation, produced in lots by domestic and foreign manufacturers. The UV spectra of melittin and apitoxin were registered on SF 103 spectrophotometer in quartz cuvettes with 1 cm thickness. The IR spectra were investigated on the IR-instrument of Fourier – FSM-1201 spectrophotometer, LLC "Infraspek". The determination of melittin purity was carried out by chromatography. **Results and discussion.** The basic physical and chemical characteristics were established for melittin as a reference sample and the main component of apitoxin. The melting temperature was: $(T_{\text{melt}}) = 190^\circ\text{C}$. In the UV-spectrum there could be watched the absorption maxima corresponding to 2 peaks: $\lambda_{\text{max}} = 225 \pm 2 \text{ nm}$ and $285 \pm 2 \text{ nm}$ were observed. As an analytical wavelength, it is necessary to choose the peak $\lambda = 285 \text{ nm}$, since the peak with $\lambda = 225 \text{ nm}$ is associated with the absorption of light by the internal (shielded) benzene ring of the tryptophan molecule. The nature of the curve and the position of the maxima of the spectra of melittin and the apitoxin solution coincide, which makes it possible to use melittin as a standard for spectrometric quantitative determination of the active substances in apitoxin and preparations based on apitoxin. **Conclusion.** The worked out spectrophotometric methods for the quantitative determination of melittin in apitoxin has been validated by the indices of specificity, accuracy, detection limit, quantitative determination limit, linearity.

Keywords: apitoxin, melittin, standardization, spectrophotometric determination, UV and IR spectra of melittin, drugs based on apitoxin

ВВЕДЕНИЕ. В последнее десятилетие наблюдается некоторое повышение интереса к продуктам пчеловодства [1–7]. Именно в наши дни апитерапия переживает свое второе рождение. История пчел и их продуктов не только не закончена, напротив, с научной точки зрения, она только начинается [8–14]. Люди поняли, что никакая химия не заменит им натуральный природный материал, и стали возвращаться к препаратам, изготовленным на естественной основе. В нас снова оживает опыт прошедших веков поколений, использовавших пчелиные продукты в лечебных целях. Поэтому на современном этапе являются достаточно актуальными исследования как состава пчелиного яда, так и его основных компонентов [15–29]. Кроме того, необходимо разработать современный, доступный и простой метод анализа пчелиного яда и фармацевтических продуктов на его основе.

ЦЕЛЬЮ нашего исследования является изучение физико-химических характеристик мелиттина – основного компонента пчелиного яда. Также разработка методики спектрофотометрического количественного определения мелиттина в образцах пчелиного яда и в фармацевтических продуктах, полученных на основе пчелиного яда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Пчелиный яд. Все образцы пчелиного яда для исследования были предоставлены Сердиным Юрием Павловичем – индивидуальным предпринимателем Краснодарского края города Майкопа. Представленные образцы – это светло-желтые порошки с резким характерным запахом и горькие на вкус, растворимые в воде, растворах кислот и спиртовых растворах различной концентрации. Яд имеет кислую реакцию (рН 4,5–5,5).

Мелиттин. Референтный образец был предоставлен Аналитическим центром химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Мазь «Апизартрон»® – Мазь для наружного применения на основе пчелиного яда. Произведено:

Эспарма Гмбх, Германия, серия: 040033, дата изготовления 07/03.

Крем «Софья. Пчелиный яд Бальзам для тела». Произведено: Россия, ООО КоролевФарм. По заказу ООО НПО «Фара Фарм» соответствие ТР. ТС 0092011, серия: 011821333.

Изучение физико-химических характеристик

УФ-спектр регистрировали на спектрофотометре СФ 103 в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Растворитель и раствор сравнения – вода очищенная.

ИК-спектры исследовали на приборе ИК-Фурье – спектрофотометр ФСМ-1201 ООО «Инфраспек».

Определение мелиттина методом хроматографии

Исследования проводили на жидкостной хроматографической системе «Миллихром» с использованием хроматографической колонки Рер RPC HR 5/5. Методика была разработана Академией аграрных наук Украины, Институтом пчеловодства им. П.И. Прокоповича и принята Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 11 МГС от 23 апреля 1997 г.) [31].

Методика спектрофотометрического определения мелиттина в образцах пчелиного яда. Точную навеску (1,0 г) пчелиного яда растворяли в 30 мл дистиллированной воды при небольшом нагревании и отфильтровывали в горячем виде. Фильтр с нерастворившейся частью вновь заливали дистиллированной водой при небольшом нагревании и отфильтровывали в горячем виде (данную операцию проводили дважды). Фильтраты объединяли и после охлаждения доводили извлечение до метки (100,0 мл). Если при охлаждении выпадал осадок, то перед взятием аликвоты колбу нагревали. Затем брали мерную колбу вместимостью 100 мл, в нее помещали 1,0 мл полученного водного извлечения, доводили до метки и спектрофотометрировали при длине волны 285 нм.

В качестве раствора сравнения использовали воду. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора референтного образца мелиттина.

Приготовление раствора референтного образца мелиттина для построения градуировочного графика. Около 0,125 г (точная навеска) мелиттина количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли и доводили до метки водой очищенной. 1 мл полученного раствора содержит 0,00125 г мелиттина (раствор А). Далее готовили разведение: в шесть мерных колб на 10 мл помещали в каждую колбу по 1 мл, 2 мл, 4 мл, 6 мл, 8 мл и 10 мл раствора А и доводили до метки водой. Определяли оптическое светопоглощение полученных растворов на спектрофотометре (СФ-103) при длине волны 285 нм.

Методика количественного определения содержания мелиттина в мази «Апизартрон» и крема «Софья с пчелиным ядом». Высвобождение мелиттина из мазевых основ проводили по методу Кривчинского [27]. На целлофановую мембрану отвешивали навеску исследуемой мази массой 7,0 г и помещали в диализатор, наполненный 100 мл дистиллированной воды. Через 24 часа в диализате проводили количественное определение мелиттина методом спектрофотометрии. Аликвоту 25 мл диализата помещали в мерную колбу объемом 100 мл, затем объём доводили до метки водой. Через 5–10 мин определяли оптическое светопоглощение на СФ 103 при $\lambda=285$ нм. Массовую долю мелиттина вычисляли по формуле 1:

$$\omega\% = \frac{A \cdot V \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot V_a \cdot m}, \text{ где} \quad (1)$$

А – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель светопоглощения мелиттина, равный 127; m – навеска мази, взятая для анализа (г); V – объём мерной колбы; V_a – аликвота диализата.

Обработку результатов эксперимента проводили с помощью программного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Молекула мелиттина представляет собой гомомерный пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков [14, 24, 28, 29, 30]. $+H_3N - \text{Гли} - \text{Иле} - \text{Гли} - \text{Ала} - \text{Вал} - \text{Лей} - \text{Лиз} + - \text{Вал} - \text{Лей} - \text{Тре} - \text{Тре} - \text{Гли} - \text{Лей} - \text{Про} - \text{Ала} - \text{Лей} - \text{Иле} - \text{Сер} - \text{Трп} - \text{Иле} - \text{Лиз} + - \text{Арг} + - \text{Лиз} + -$

$\text{Арг} + - \text{Глн} - \text{Глн} - \text{CONH}_2$. Примечательно, что молекула мелиттина не содержит цистеина, в отличие от нейротоксинов змей, скорпионов, ядовитых пауков, которые являются гетеродетными пептидами и, как правило, содержат несколько дисульфидных мостиков. Молекулярная масса мелиттина равна 2840 Да. В молекуле мелиттина нет отрицательно заряженных групп, а положительно заряженные аминокислотные остатки преимущественно сосредоточены в С-концевом сегменте, который является гидрофильной частью молекулы мелиттина (остатки 21–26). Участок мелиттина 1–20 сформирован преимущественно гидрофобными аминокислотными остатками. Единственный хромофор мелиттина представлен остатком триптофана, который в полипептиде занимает положение 19, что можно удачно использовать для изучения мелиттина и продуктов его содержащих с помощью оптических методов. Полипептидная цепь молекулы мелиттина в растворе принимает конформацию правильной α -спирали (до 80%), нарушаемую остатком пролина в положении 14. При высокой ионной силе раствора или высокой концентрации мелиттин может ассоциироваться в тетрамер, образованный двумя симметрично расположенными парами антипараллельных протомеров [30].

Для стандартизации пчелиного яда, как исходного сырья для фармацевтических препаратов, нет современной нормативной документации. Для определения качества пчелиного яда используют следующие нормативные документы:

1). фармакопейная статья (ФС 42-26583-89 «Яд пчелиный») (утратила силу с 25 апреля 2001 года) [31], разработанная сотрудниками кафедры физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского совместно с сотрудниками Рижского медицинского института;

2). ГОСТ 30426-97 [26], разработанный Академией аграрных наук Украины, Институтом пчеловодства им. П. И. Прокоповича. Согласно требованиям ГОСТа, пчелиный яд-сырец должен соответствовать показателям, указанным в таблице 1.

Таблица 1 – Органолептические и физико-химические показатели пчелиного яда-сырца [26].

Наименование показателя	Значение показателей
Внешний вид	Порошок в виде мелких крупинок и чешуек
Цвет	Белый с кремоватым оттенком или с желтизной
Консистенция	Порошкообразная
Органолептические свойства	Вызывает раздражение слизистой оболочки, чихание
Массовая доля нерастворимых в воде примесей, %	не более 5
Массовая доля воды, %	не более 8
Массовая доля сырой золы, %	не более 2
Активность фосфолипазы А 2 в 1 мг яда в пересчете на сухой вес, МЕ	не менее 100
Активность глюкозамингликангидролазного комплекса (ГАГГ) в 1 мг, в пересчете на сухой вес, мМЕ	не менее 90
Определение времени гемолиза, с	не более 300
Массовая доля мелиттина, %	не менее 50
Массовая доля апамина, %	не менее 2

Как видно из таблицы, преобладающим веществом пчелиного яда, который можно использовать в фармации, должен быть мелиттин.

Определение мелиттина проводят методом колоночной хроматографии [8], который основан на разделении компонентов пчелиного яда-сырца после связывания их с твердой фазой хроматографической колонки. Эта методика требует предварительной подготовки и технология выполнения достаточно кропотлива. Поэтому в настоящее время является актуальной разработка современного более удобного метода количественного определения мелиттина не только в образцах пчелиного яда, но и в продуктах его переработки.

В качестве стандартного образца для разработки

количественного определения был выбран референтный образец мелиттина, предоставленный нам любезно Аналитическим центром химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова. Чистота представленного образца была доказана методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием и тандемной масс-спектрометрией в лаборатории МГУ. Результаты исследования приведены на рисунках 1, 2.

Как видно на рисунке 1, на хроматограмме имеется только один пик, что говорит о чистоте полученного референтного образца мелиттина. На хроматограммах пчелиного яда и чистого выделенного мелиттина (рис. 1, 2) хорошо видно, что пик, соответствующий мелиттину, имеет время выхода 12 минут.

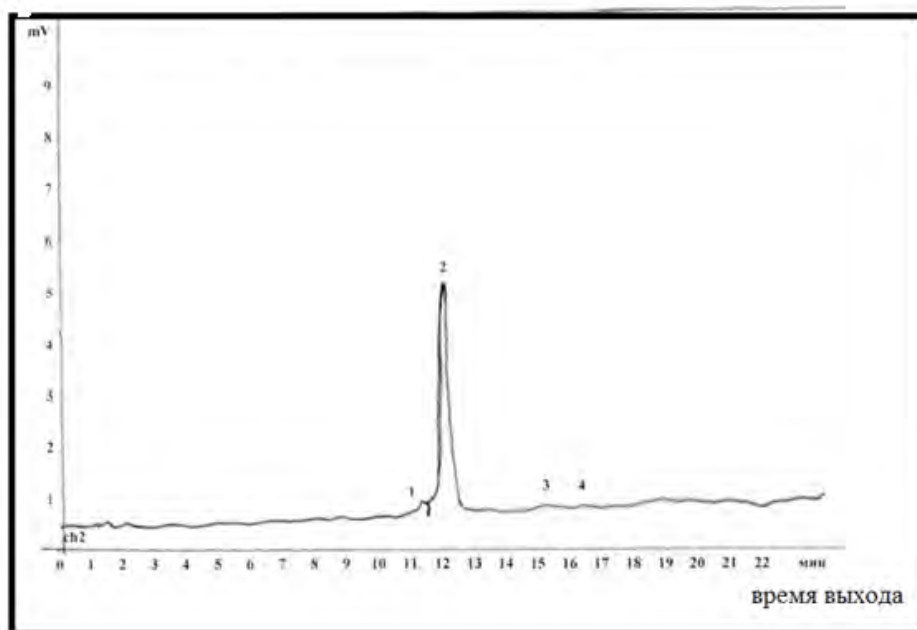


Рисунок 1 – Хроматограмма чистого образца мелиттина

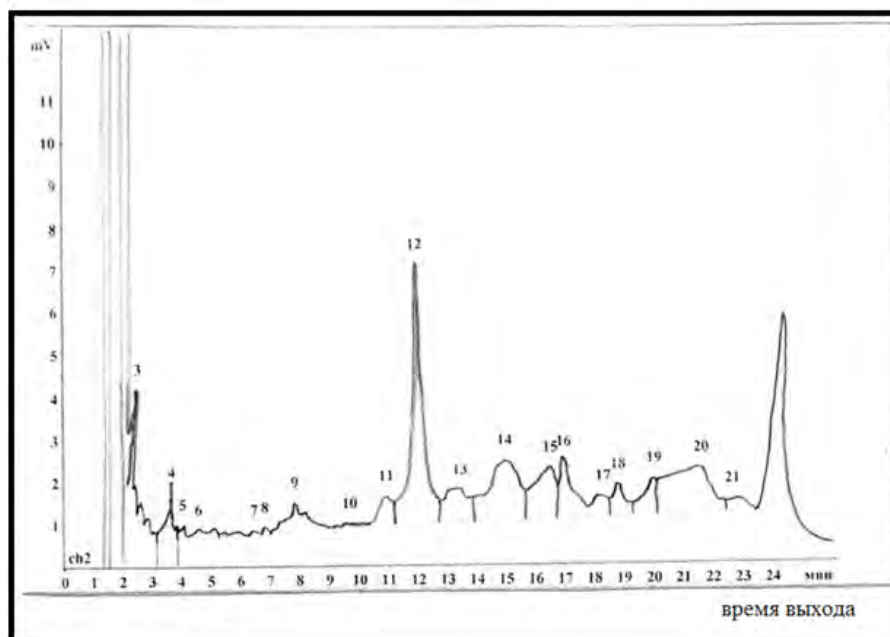


Рисунок 2 – Хроматограмма образца пчелиного яда

Как видно на рисунке 2, основным преобладающим компонентом пчелиного яда является мелиттин (пик номер 12, соответствующий времени выхода 12 минут).

Для мелиттина, как референтного образца, были установлены основные физико-химические характеристики, исследованы УФ- и ИК-спектры.

Мелиттин представляет собой белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде и спирте. $T_{пл.} = 190^{\circ}\text{C}$.

ИК-спектр, ν_{max} , см^{-1} : 1506 (C=C аром), 1720 (C=O), 4000–4200 (N–H). ИК-спектр мелиттина (рис. 3) мало информативен, так как в молекуле мелиттина преобладают в основном пептидные связи. Поэтому на рисунке, кроме валентных колебаний углеводородного скелета, четко видны выраженные валентные колебания карбонила – 1720 см^{-1} и валентные колебания N–H связи амида в области $4000\text{--}4400\text{ см}^{-1}$ (широкая полоса).

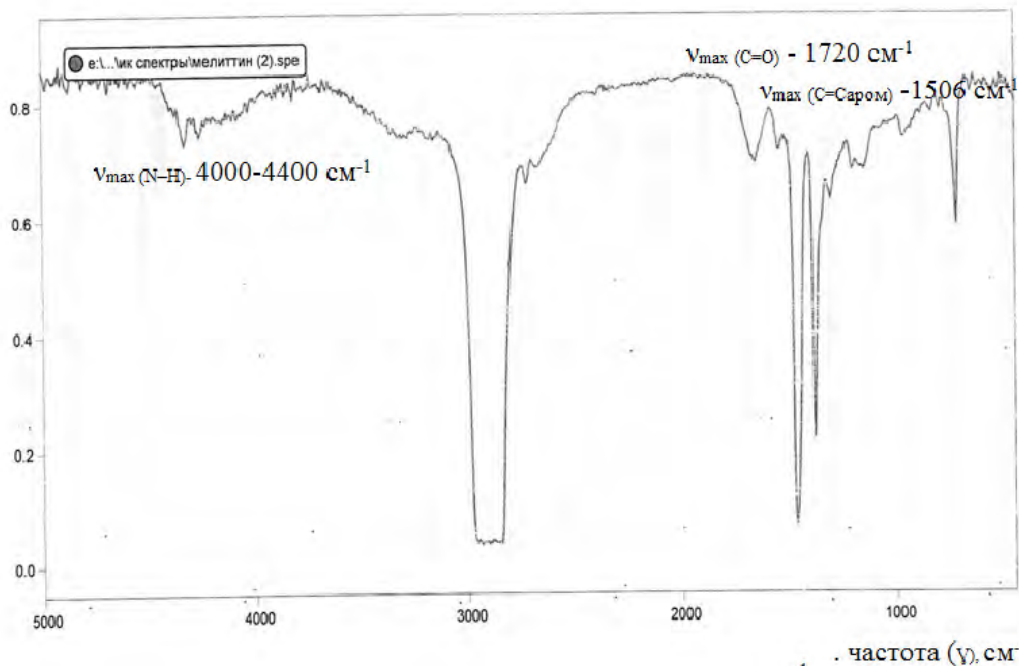


Рисунок 3 – ИК-спектр мелиттина

Единственный хромофор мелиттина представлен остатком триптофана, благодаря чему можно изучать мелиттин и продукты его содержащие, с помощью оптических методов исследования. УФ-спектр (H_2O), λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 217 (1,82), 285 (0,81). В УФ-спектре мелиттина (рис. 4) наблюдаются два

максимума поглощения при $\lambda=285\text{ нм}$ и $\lambda=225\text{ нм}$. В качестве аналитической длины волны необходимо выбрать пик с $\lambda=285\text{ нм}$, так как максимум при $\lambda=225\text{ нм}$ связан с поглощением света внутренним (экранированным) бензольным кольцом молекулы триптофана.

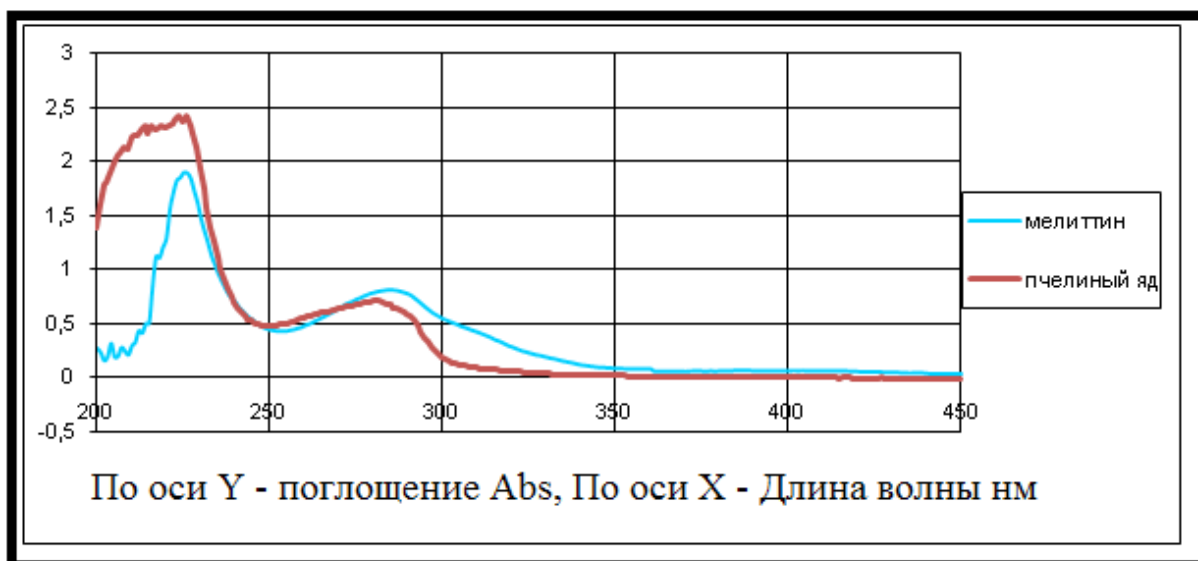


Рисунок 4 – УФ-спектры мелиттина и образцов пчелиного яда в воде

Были изучены УФ-спектры водных и спиртовых извлечений различных концентраций образцов пчелиного яда. Как видно из рисунка 4, характер кривой и положение максимумов спектра мелиттина и спектра водного извлечения пчелиного яда совпадают, что позволяет использовать мелиттин в качестве стандарта для спектрометрического количественного

определения действующих веществ в пчелином яде и препаратах на основе пчелиного яда.

Для определения мелиттина в образцах пчелиного яда был построен градуировочный график стандартного образца мелиттина в воде при длине волны 285 нм (рис. 5). Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Оптическое светопоглощение стандартных растворов мелиттина

Разведение	Массовая доля, %	Оптическое светопоглощение, А	Удельный показатель светопоглощения, А1%1см
10	0,0125	1,62	129,6
8:10	00,1	1,205	120,5
6:10	0,0075	0,947	126,3
4:10	0,005	0,675	135,0
2:10	0,0025	0,355	142,0
1:10	0,00125	0,165	132,0

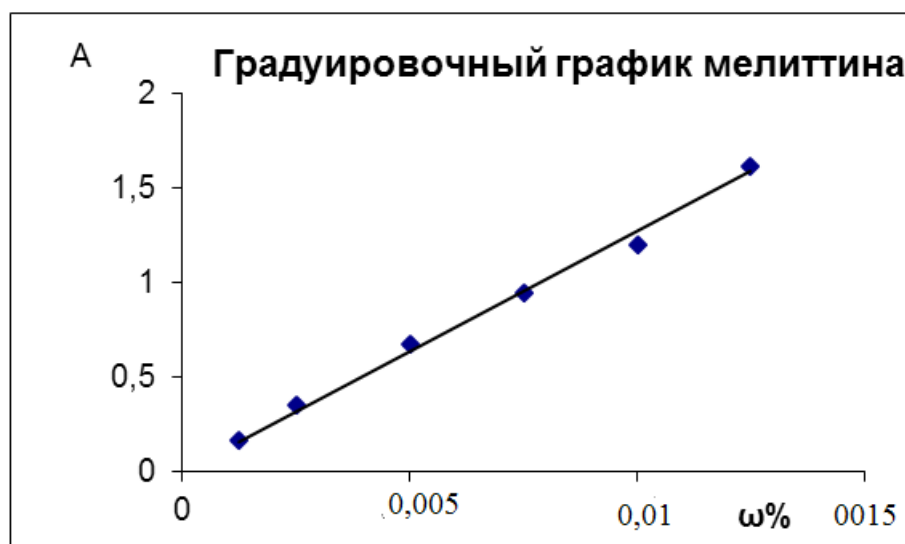


Рисунок 5 – Градуировочный график мелиттина

Как видно из градуировочного графика, подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера для раствора мелиттина лежит в пределах 0,01 до 0,125%, что составляет аналитическую область методики. Уравнение градуировочного графика $A = (12,7 \pm 0,6) \cdot \omega$, коэффициент корреляции $r = 0,999$. Среднее значение удельного показателя светопоглощения мелиттина равно $130,8 \pm 0,6$. Другие валидационные характеристики методики рассчитывали согласно фармакопейной статьи «Валидация аналитических методик» [32].

Расчет предела обнаружения (ПО) проводили по формуле: $ПО = 3,3 \times S/b$, где S равно стандартному отклонению свободного члена «а» градуировочного графика. Имеем $ПО = 3,3 \cdot 0,033/12,7 = 0,0086\%$. Пре-

дел количественного определения, рассчитанный по формуле: $ПКО = 10 \times S/b$, составляет $10 \cdot 0,033/12,7 = 0,026\%$.

Для определения правильности методики спектрофотометрического определения мелиттина был выбран образец, в котором Аналитическим центром химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова методом жидкостной хроматографии было установлено содержание мелиттина – $30 \pm 1,5\%$.

Далее мы определили содержание мелиттина спектрофотометрическим методом, в том же образце пчелиного яда. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения содержания мелиттина в образцах пчелиного яда

Пчелиный яд	Найдено, %	Метрологические характеристики
	30,8	
	30,2	
	30,1	
	30,3	
	30,6	

$f=4$ $p=0,95$ $t=2,78$
 $x_{cp} = 30,4$ $E_{отн}, \% = 1,2\%$
 $S = 0,29$ $x_{cp} \pm \Delta x = 30,4 \pm 0,4$
 $S_x = 0,13$
 $\Delta x = 0,4$

Как видно из таблицы 3, содержание мелиттина в одном из образцов пчелиного яда соответственно равно $30,4 \pm 0,4\%$.

Совпадение результатов спектрофотометрического определения мелиттина с результатами определения методом жидкостной хроматографии в пределах погрешности эксперимента позволяет сделать вывод, что предлагаемый метод свободен от систематической погрешности и отличается правильностью. Значение t-критерия, показывающего значимость различия средних, составляет 1,5, что меньше табличного, равного 2,306. Подтверждением правильности методики также может служить статистически незначимое отличие свободного члена «а» в уравнении градуировочного графика от нуля, поскольку $a = 0,027$, а доверительный интервал для «а» составляет 0,092. Это дает

возможность считать «а» равным нулю и от уравнения вида $y = bx+a$ перейти к уравнению вида $y = bx$.

Разработанная методика была применена к фармацевтическим продуктам, содержащим пчелиный яд. Так, спектрофотометрическим методом определили содержание мелиттина в фармацевтических продуктах на основе пчелиного яда: мази «Апизартрон» и креме «Софья с пчелиным ядом».

Высвобождение действующего вещества – мелиттина из выбранных объектов проводили методом диализа по Кривчинскому [27]. В качестве диализной мембраны использовали целлофановую пленку. Средой, в которую диализировалось лекарственное вещество, была вода очищенная. Результаты спектрофотометрического определения мелиттина в продуктах на основе пчелиного яда приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения содержания мелиттина в мази «Апизартрон» и креме «Софья с пчелиным ядом»

Мазь «Апизартрон»	Найдено, %	Метрологические характеристики
	0,0182	
	0,0193	
	0,0189	
	0,0187	
	0,0176	

$f=5$ $p=0,95$ $t=2,57$
 $x_{cp} = 0,0185$ $E_{отн}, \% = 3,1$
 $S = 0,00066$ $x_{cp} \pm \Delta x = 0,0185 \pm 0,0006$
 $S_x = 0,00029$
 $\Delta x = 0,00058$

Крем «Софья с пчелиным ядом»	Найдено, %	Метрологические характеристики
	0,0124	
	0,0121	
	0,0132	
	0,0127	
0,0133		

$f=5$ $p=0,95$ $t=2,57$
 $x_{cp} = 0,0127$ $E_{отн}, \% = 3,5$
 $S = 0,00051$ $x_{cp} \pm \Delta x = 0,0127 \pm 0,0005$
 $S_x = 0,00023$
 $\Delta x = 0,00045$

В результате приведенных исследований установлено, что содержание мелиттина в мази «Апизартрон» – $0,0185 \pm 0,0006\%$, а в креме «Софья» – $0,0127 \pm 0,0005\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Установлены физико-химические характеристики мелиттина как основного компонента пчелиного яда. В УФ-спектре 2 пика: $\lambda_{max} = 226 \pm 2$ нм и $285 \text{ нм} \pm 2$ нм, $T_{пл} = 190^\circ\text{C}$. Удельный показатель светопоглощения мелиттина равен 12,7. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения мелиттина в пчелином яде и продуктах его переработки. Методика валидирована по показа-

телям специфичность, правильность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность. Содержание мелиттина в одном из образцов пчелиного яда составляет $30,4 \pm 0,4\%$. В результате приведенных исследований установлено, что содержание мелиттина в мази «Апизартрон» – $0,0185 \pm 0,0006\%$, а в креме «Софья» – $0,0127 \pm 0,0005\%$.

РЕКОМЕНДАЦИИ. Предложенную методику количественного определения мелиттина в образцах пчелиного яда можно рекомендовать для стандартизации как пчелиного яда, так и лекарственных препаратов на основе пчелиного яда.

INTRODUCTION. In the last decade there has been a growing interest in bee products [1–7]. It is apitherapy that is experiencing its second birth. The story of bees and their products is not only uncompleted, on the contrary, from a scientific point of view, it is just beginning

[8–14]. People realized that no chemistry could replace any natural material, and began to return to drugs produced on a natural basis. The experience of the past centuries and generations using bee products for medicinal purposes, is coming to life again. Therefore, nowadays,

it is vitally important to study both – the composition of apitoxin and its main components [15–29]. Besides, it is necessary to develop a modern, affordable and simple method of the analysis of apitoxin and pharmaceutical products based on it.

THE AIM OF THE STUDY is to investigate physical and chemical characteristics of melittin, the main component of apitoxin, as well as the development of methods for the quantitative determination of melittin in the samples of apitoxin and in the pharmaceutical products made on the basis of apitoxin.

MATERIALS AND METHODS. *Apitoxin.* For our research, all samples of apitoxin were provided by Serbin Yury Pavlovich, a private entrepreneur of the city of Maikop (Krasnodar Region). The presented samples were light yellow powders with a sharp characteristic smell and a bitter taste, soluble in water, acid solutions and alcoholic solutions of different concentrations. Apitoxin has an acidic reaction (pH 4.5–5.5).

Melittin. The reference sample was provided by the Analytical center of the chemistry faculty of Moscow State University n. a. M. V. Lomonosov.

“Apizartron” ointment is the ointment for external use on the basis of apitoxin produced by Esparma GmbH, Germany, series 040033, the date of manufacture was 07/03.

“Sophia. Apitoxin body Balm” cream, produced by LLC Korolevfarm, Russia, by order of scientific production association “Phara Pharm” in compliance with TR. TC 0092011, series: 011821333.

Study of physical and chemical characteristics

The UV spectra of melittin and apitoxin were registered on SF 103 spectrophotometer in quartz cuvettes with 1 cm thickness. The solvent and the comparison solution were purified water.

The IR spectra were investigated on the IR-instrument of Fourier – FSM-1201 spectrophotometer, LLC “Infraspek”.

Determination of melitin by chromatography method

The study was performed on a liquid chromatographic system of “Milligram” using a chromatographic column Pep RPC HR 5/5. The method was developed by the Academy of agrarian Sciences of Ukraine, Institute of beekeeping n. a. P. I. Prokopovich and adopted by Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (Record of proceedings No. 11, ICSMC, dated 23 April 1997) [31].

Methods of spectrophotometric determination of melittin in apitoxin samples

An accurately weighed quantity (1g) of apitoxin was dissolved in 30 ml of distilled water with a little heating and filtered hot. The filter with the undissolved part was again filled with distilled water with a little heating and filtered hot again (this operation was performed twice). The filtrates were combined, and after cooling the extraction was brought to the mark of 100 ml.

If the precipitate fell out upon cooling, the flask was heated before taking an aliquot. Then a volumetric flask with a capacity of 100 ml was taken, 1.0 ml of the obtained aqueous extract was placed in it, brought to the

mark and subjected to the spectrophotometric analysis at the wavelength of 285 nm.

Water was used as a comparison solution. At the same time, the optical density of the reference sample solution of melittin was measured.

Preparation of a solution of a melittin reference sample of for constructing a calibration graph

About 0.125 g (an accurately weighed quantity) of melittin was quantitatively transferred to a volumetric flask with a capacity of 100 ml, dissolved and brought to the mark with purified water. 1 ml of the resulting solution contains 0.00125 g of melittin (solution A). The further dilutions were prepared so: 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml and 10 ml of solution A were placed in six volumetric flasks per 10 ml (each flask) and brought to the mark with water. The optical light absorption of the obtained solutions was determined on the spectrophotometer (SF-103) at the wavelength of 285 nm was.

Methods of quantitative determination of melittin content in “Apizartron” ointment and “Sophia with apitoxin” cream

The release of melittin from the ointment bases was carried out according to the method of Kruvchinsky [27]. The exact quantity of the investigated ointment weighing 7.0g was placed on a cellophane membrane and then in a dialyzer filled with 100 ml of distilled water. After 24 hours, a quantitative determination of melittin was carried out by spectrophotometry. An aliquot of 25 ml of dialysate was placed in a 100 ml volumetric flask, then the volume was brought to the mark with water. After 5–10 min., the optical absorption was determined on SF 103 spectrophotometer at $\lambda = 285$ nm. The weight fraction of melittin was calculated according to Formula 1:

$$\omega\% = \frac{A \cdot V \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot V_a \cdot m}, \text{ where} \quad (1)$$

A is the optical density of the test solution; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ is the specific indicator of the optic absorption of melittin, equal to 127; m is the weight of the ointment taken for the analysis (d); V is the volume of the volumetric flask; V_a is an aliquot of dialysate.

The results of the experiment were processed using the Microsoft Excel software package.

RESULTS AND DISCUSSION. The molecule of melitin is a monomer peptide consisting of 26 amino acid residues: $^+\text{H}_3\text{N} - \text{Gly} - \text{Ile} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Lys}^+ - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Thr} - \text{Thr} - \text{Gly} - \text{Leu} - \text{Pro} - \text{Ala} - \text{Leu} - \text{Ile} - \text{Ser} - \text{Trp} - \text{Ile} - \text{Lys}^+ - \text{Arg}^+ - \text{Lys}^+ - \text{Arg}^+ - \text{GLn} - \text{GLn} - \text{CONH}_2$ [14, 24, 28, 29, 30].

It is noteworthy that the melittin molecule does not contain cysteine, in contrast to the neurotoxins of snakes, scorpions, poisonous spiders that are heterodetect peptides and, as a rule, contain several disulfide bridges. The molecular weight of melittin is 2840 Da. There are no negatively charged groups in the melitin molecule, and the positively charged amino acid residues are mainly concentrated in the C – terminal segment, which is the hydrophilic part of the melittin molecule (residues 21–26).

The area of melittin 1–20 is formed mainly by hydrophobic amino acid residues. The only chromophore of melittin is represented by the residual tryptophan, which occupies Position 19 in polypeptide, and that can be successfully used to study melittin and the products containing it, by optical methods. The polypeptide chain of the melittin molecule in the solution assumes the conformation of the correct α -spiral (up to 80%), disturbed by the Proline residue at Position 14. At a high ionic strength of the solution or its high concentration, melittin can be associated with a tetramer formed by two symmetrically arranged pairs of antiparallel protomers [30].

To standardize apitoxin as a raw material for pharmaceuticals, there is no modern regulatory

documentation. To determine the quality of apitoxin, the following regulations are used:

1). Pharmacopoeial item (FS 42-26583-89 “apitoxin”) (expired on 25 April, 2001) [31], developed by the staff of the Department of human and animal physiology and biochemistry of Nizhny Novgorod State University n. a. N.I. Lobachevsky together with the staff of Riga Medical Institute;

2). All-Union State Standard 30426-97 [26], developed by the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Institute of Beekeeping n. a. P.I. Prokopovich. According to the requirements of the All-Union State Standard, raw apitoxin must meet the parameters specified in Table 1.

Table 1 – Organoleptic and physico-chemical parameters of raw apitoxin [26]

Indicator name	Meaning of indicators
Appearance	Powder in the form of small grains and flakes
Colour	White with a creamy shade or yellowish
Consistency	Powdery
Organoleptic properties	Causes irritation of the mucous membrane, sneezing
Mass fraction of insoluble impurities in water, %	Not more than 5%
Mass fraction of water, %	Not more than 8%
Mass fraction of crude ash, %	Not more than 2%
Activity of phospholipase A 2 in 1 mg of apitoxin in terms of dry weight, IU	Not less than 100 IU
Activity of glucosaminoglycan hydrolase complex (GAGH) in 1 mg, in terms of dry weight, mIU	Not less than 90 mIU
Determining the time of hemolysis, sec.	Not more than 300 sec
Mass fraction of melittin, %	Not less than 50%
Mass fraction of apamine, %	Not less than 2%

As the table shows, the predominant substance of apitoxin, which can be used in pharmacy, should be melittin.

Melittin is determined by the method of column chromatography [8], which is based on the separation of components of apitoxin after their binding to the solid phase of the chromatographic column. This method requires preliminary preparation and the execution technique is quite painstaking. Therefore, at present it is urgent to develop a modern, more convenient method for quantifying melittin not only in the samples of apitoxin, but also in the products of its processing.

As a standard for the development of a quantitative determination, a reference sample of melittin, kindly

provided to us by the Analytical Center of the Chemical Faculty of Moscow State University n. a. M.V. Lomonosov, was selected. The purity of the presented sample was proved by the method of HPLC with diode-matrix detection and tandem mass spectroscopy in the Moscow State University laboratory. The results of the study are shown in Figures 1, 2.

As Figure 1 shows, in the chromatogram there is only one peak, which indicates the purity of the obtained reference sample of melittin. In the chromatograms of apitoxin and pure isolated melittin (Fig. 1, 2) it is clearly seen that the peak corresponding to melittin has the retention time of 12 minutes.

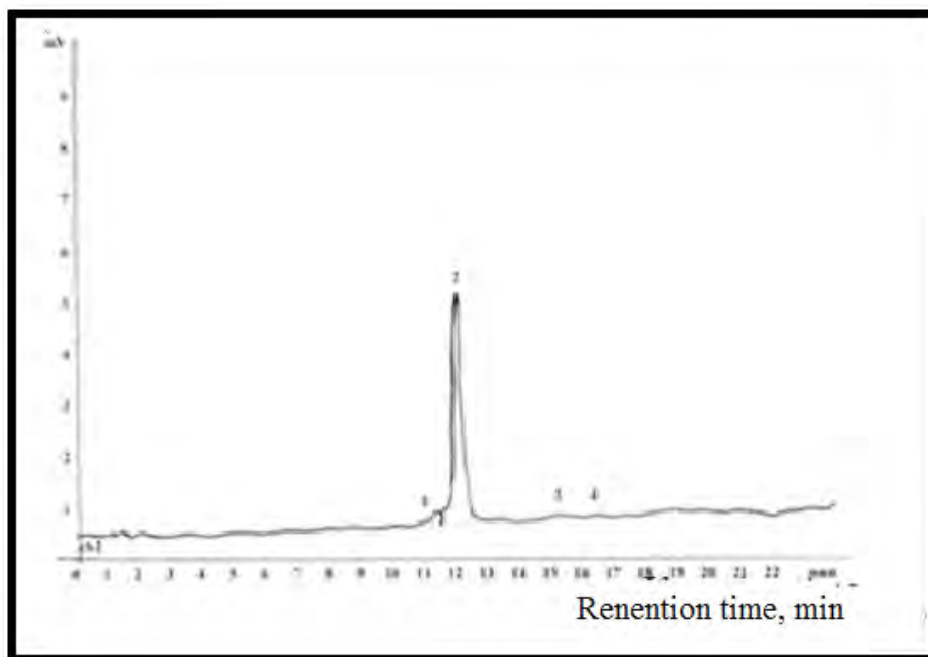


Figure 1 – Chromatogram of a pure melittin sample

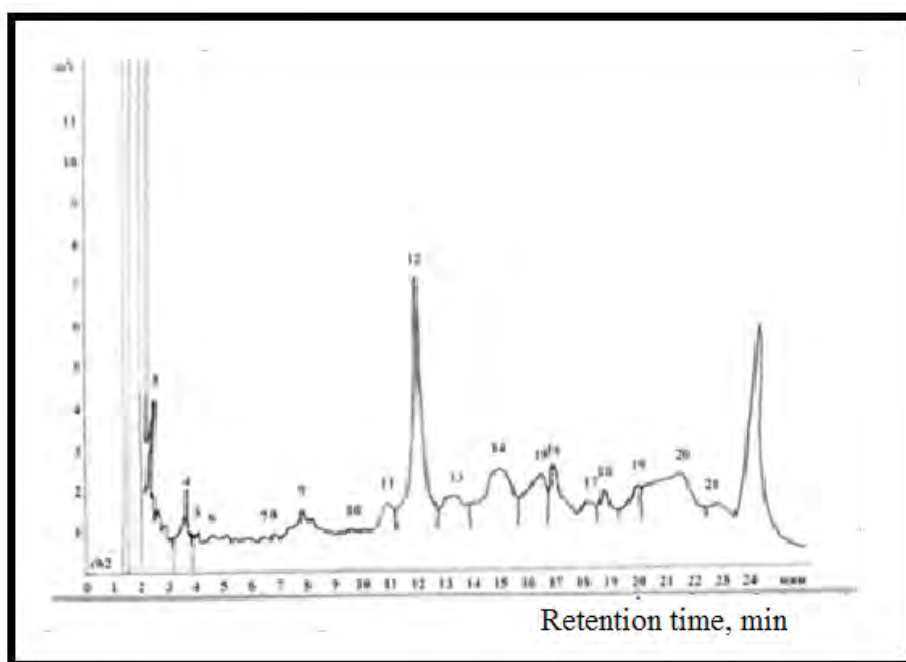


Figure 2 – Chromatogram of an apitoxin sample

As Figure 2 shows, the main predominant component of apitoxin is melittin (Peak 12, corresponding to the retention time of 12 minutes).

For melittin, as a reference sample, the basic physical and chemical characteristics have been established and UV and IR spectra have been studied.

Melittin is a white crystalline powder, highly soluble in water and alcohol. The melting temperature is 190°C.

The IR spectrum is ν_{\max} , cm^{-1} : 1506 (C=C ar), 1720 (C=O), 4000–4200 (N-H). The IR spectrum of melittin (Fig. 3) is less informative, as the melittin molecule is dominated by peptide bonds. Therefore, as the figure shows, in addition to the valence vibrations of the hydrocarbon skeleton, pronounced valence vibrations of carbonyl – 1720 cm^{-1} and valence vibrations of N-H bond of amide in the area of 4000–4400 cm^{-1} (a wide band) are clearly visible.

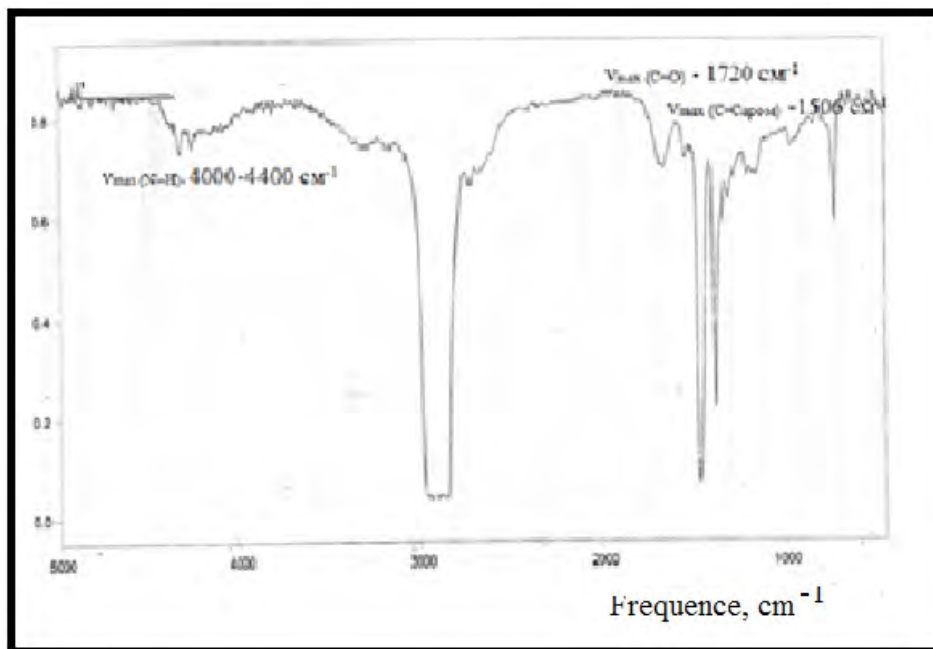


Figure 3 – The IR melittin spectrum

The only melittin chromophore is represented by tryptophan residue, which makes it possible to study melittin and products containing it, using optical research methods. UV-spectrum (H_2O) is λ_{max} , nm ($\lg \epsilon$): 217 (1.82), 285 (0.81). In the UV spectrum of melittin (Fig. 4), there

are two absorption maxima: at $\lambda = 285$ nm and $\lambda = 225$ nm. As an analytical wavelength, it is necessary to select a peak with $c\lambda = 285$ nm, since the maximum at $\lambda = 225$ nm is associated with the absorption of light by the internal (screened) benzene ring of the tryptophan molecule.

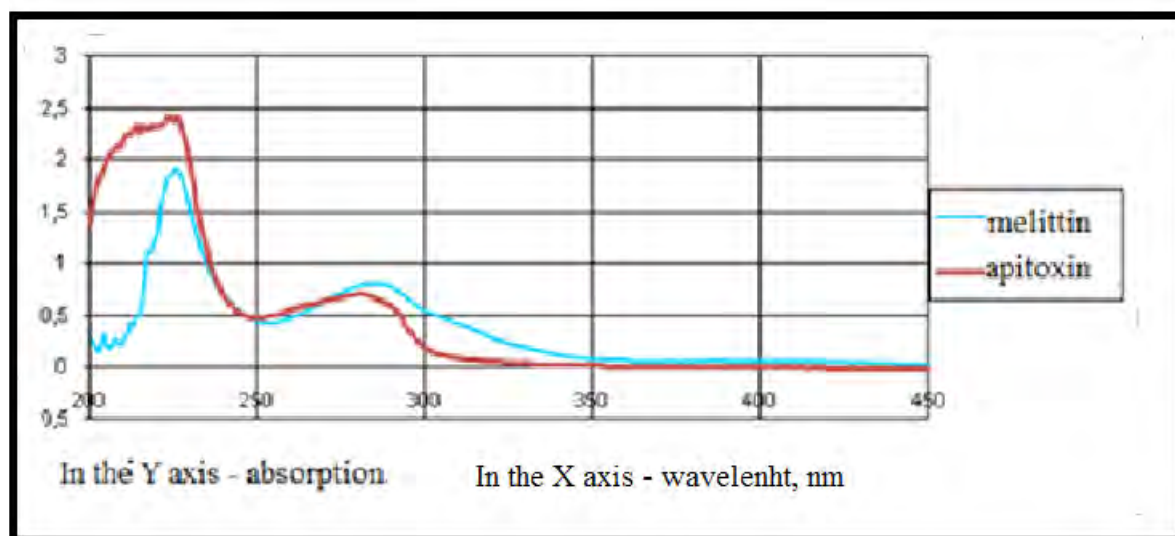


Figure 4 – UV spectra of melittin and apitoxin samples in water

UV spectra of aqueous and alcoholic extracts of various concentrations of apitoxin samples have been studied. As the Fig. 4 shows, the nature of the curve and the position of the maxima of the melittin spectrum and the spectrum of aqueous extraction of apitoxin coincide, making it possible to use melittin as a standard for the

spectrometric quantification of active substances in apitoxin and the preparations based on apitoxin.

To determine melittin in apitoxin samples, a calibration curve of a standard melittin sample in water at the wavelength of 285 nm was constructed (Fig. 5). The results of the studies are shown in Table 2.

Table 2 – Optical light absorption of standard melittin solutions

Dilutions	Weight percent, %	Optical light absorption, A	Specific optical absorbance $A_{1\%}^{1\text{cm}}$
10	0.0125	1.62	129.6
8:10	00.1	1.205	120.5
6:10	0.0075	0.947	126.3
4:10	0.005	0.675	135.0
2:10	0.0025	0.355	142.0
1:10	0.00125	0.165	132.0

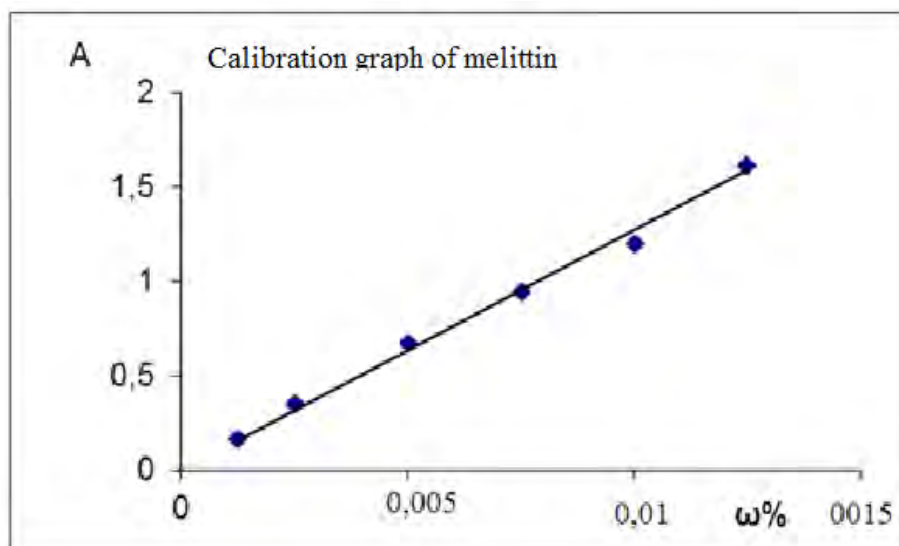


Figure 5 – Calibration graph of melittin

As the calibration graph shows, the subordination of Bouguer-Lambert-Beer law to the melittin solution lies in the range of 0.01 to 0.125%, which is the analytical area of the technique. The equation of the calibration graph is $A = (12.7 \pm 0.6) \omega$, the correlation coefficient is $r = 0.999$. The average value of the specific light absorption coefficient of melittin is 130.8 ± 0.6 . Other validation characteristics of the procedure were calculated according to the pharmacopoeial entry "Validation of analytical methods" [32].

The calculation of the detection limit (DL) was carried out according to the formula: $DL = 3,3 \times S / b$, where S is equal to the standard deviation of the free term "a" of the calibration graph. We have $DL = 3,3 \cdot 0,033 /$

$12,7 = 0,0086\%$. The Quantification Limit (QL) was calculated according to the formula: $QL = 10 \times S / b$, i. e. $10 \cdot 0,033 / 12,7 = 0,026\%$.

To confirm the correctness of the methods of spectrophotometric melittin determination, a reference sample of melittin, provided to us by the Analytical Center of the Chemical Faculty of Moscow State University n. a. M.V. Lomonosov, was selected. By method of liquid chromatography the content of melittin was established: $30 \pm 1.5\%$.

Further, we determined the content of melittin in the same sample of apitoxin by spectrophotometric method. The results of the studies are shown in Table 3.

Table 3 – Results of determining the content of melittin in apitoxin samples

Apitoxin	Found out, %	Metrological characteristics
	30.8	
	30.2	$x_{cp} = 30.4$ $E_{отн}, \% = 1.2\%$
	30.1	$S = 0.29$ $x_{cp} \pm \Delta x = 30.4 \pm 0.4$
	30.3	$S_x = 0.13$
	30.6	$\Delta x = 0.4$

As Table 3 shows, the content of melittin in one of the apitoxin samples corresponds to the meaning of $30.4 \pm 0.4\%$.

The coincidence of the results of the spectrophotometric determination of melittin with the results of determination by liquid chromatography within the ex-

perimental error allows us to conclude that the proposed method is free of a systematic error and correct. The value of the t-test, showing the significance of the difference in means, is 1.5, which is less than the tabulated one, equal to 2.306. The statistically insignificant difference between the free term "a" from zero in the equation of the

calibration graph can also serve as a confirmation of the correctness of the method, since $a = 0.027$, and the confidence interval for "a" is 0.092. This makes it possible to consider "a" equal to zero and pass on to the equation form "y = bx" from the equation form "y = ax + a".

The developed methods was applied to pharmaceutical products containing apitoxin. Thus, the content of melittin in pharmaceutical products based on apitoxin was determined spectrophotometrically:

"Apizarthron" ointment and "Sofia with apitoxin" cream.

The release of the active substance melittin from the selected objects was carried out by dialysis according to Kravchinsky [27]. As a dialysis membrane, a cellophane film was used. The medium in which the drug was dialyzed was purified water. The results of spectrophotometric determination of melittin in products based on apitoxin are given in Table 4.

Table 4 – Results of determining the content of melittin in "Apizarthron" ointment and "Sofia with apitoxin" cream

	Found out, %	Metrological characteristics
"Apizarthron" ointment	0.0182	$f=5$ $p=0.95$ $t=2.57$
	0.0193	$x_{cp} = 0.0185$ $E_{oth}, \% = 3.1$
	0.0189	$S = 0.00066$ $x_{cp} \pm \Delta x = 0.0185 \pm 0.0006$
	0.0187	$S_x = 0.00029$
	0.0176	$\Delta x = 0.00058$
"Sofia with apitoxin" cream	0.0124	$f=5$ $p=0,95$ $t=2,57$
	0.0121	$x_{cp} = 0.0127$ $E_{oth}, \% = 3.5$
	0.0132	$S = 0.00051$ $x_{cp} \pm \Delta x = 0.0127 \pm 0.0005$
	0.0127	$S_x = 0.00023$
	0.0133	$\Delta x = 0.00045$

As a result of the conducted studies, it has been established that the content of melittin in "Apizarthron" ointment is $0.0101 \pm 0.0006\%$ and in "Sophia" cream it is $0.0127 \pm 0.0005\%$.

CONCLUSION. Physical and chemical characteristics of melittin as the main component of apitoxin have been established. In the UV spectrum 2 peaks: $\lambda_{max} = 226 \pm 2$ nm and $285 \text{ nm} \pm 2$ nm, $T_{melt} = 190^\circ\text{C}$. The specific rate of melittin light absorption is 12.7. The spectrophotometric methods of quantitative determination of melittin in apitoxin and products of its processing has been developed. The technique is validated by the specificity, accuracy, detection limit,

limit of quantitative determination, linearity. The content of melittin in one of the samples of apitoxin is $30.4 \pm 0.4\%$. As a result of these studies, the "apophysics" $-0.0185 \pm 0.0006\%$, and in the cream "Sophia" $-0.0127 \pm 0.0005\%$.

As a result of the conducted studies, it has been established that the content of melittin in "Apizarthron" ointment is $0.0101 \pm 0.0006\%$ and in "Sophia" cream it is $0.0127 \pm 0.0005\%$.

RECOMMENDATIONS. The proposed methods for the quantitative determination of melittin in apitoxin samples can be recommended the standardization of both – apitoxin and the drugs based on apitoxin.

Библиографический список

- Bradshaw J.P., Dempsey C.E., Watts A. A combined X-ray and neutron diffraction study of selectively deuterated melittin in phospholipid bilayers: effect of pH // *Mol Membr Biol.* 1994. Vol. 11. Is. 2. P. 79–86.
- Walsh E.G., Maher S., Devocelle M., O'Brien P.J., Baird A.W., Brayden D.J. High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides.* 2011. Vol. 32. Is. 8. P. 1764–1773. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.006
- Zhou J., Zhao J., Zhang S., Shen J., Qi Y., Xue X., Li Y., Wu L., Zhang J., Chen F., Chen L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry // *Anal Biochem.* 2010. Vol. 404. Is. 2. P. 171–178. DOI: 10.1016/j.ab.2010.05.014
- Lee W.R., Kim K.H., An H.J., Kim J.Y., Han S.M., Lee K.G., Park K.K. Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell // *Eur J Pharmacol.* 2014. Vol. 740. P. 218–226. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.058
- Stankowski S., Pawlak M., Kaisheva E., Robert C.H., Schwarz G. A combined study of aggregation, membrane affinity and pore activity of natural and modified melittin. *Biochim Biophys Acta.* 1991. Vol. 1069. P. 77–86.
- Choe J.Y., Kim S.K. Melittin inhibits osteoclast formation through the downregulation of the RANKL-RANK signaling pathway and the inhibition of interleukin-1 β in murine macrophages // *Int J Mol Med.* 2017 Feb 3. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2876
- Gajski G., Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties // *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013. Vol. 36. Vol. 2. P. 697–705. DOI: 10.1016/j.etap.2013.06.009

8. Nordvall S.L., Uhlin T., Einarsson R., Johansson S.G., Ohman S. Bee keepers' IgG and IgE antibody responses to bee venom studied by means of crossed radioimmuno-electrophoresis // *Clin Allergy*. 1984. Vol. 14. Is. 4. P. 341–350.
9. Kulkarni H.M., Nagaraj R., Jagannadham M.V. Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics // *Microbiol Res*. 2015. Vol. 181. P. 1–7. DOI:10.1016/j.micres.2015.07.008
10. Gajski G., Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties // *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013. Vol. 36. Is. 2. P. 697–705. DOI: 10.1016/j.etap.2013.06.009
11. Dempsey C.E. The actions of melittin on membranes // *Biochim Biophys Acta*. 1990. Vol. 1031. Is. 2. P. 143–161.
12. Choi J.H., Jang A.Y., Lin S., Lim S., Kim D., Park K., Han S.M., Yeo J.H., Seo H.S. Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Mol Med Rep*. 2015. Vol. 12. Is. 5. P. 6483–6490. DOI: 10.3892/mmr.2015.4275
13. Demchenko A.P., Kostrzhevskaja E.G. Melittin: structure, properties, interaction with a membrane // *Ukr Biokhim Zh* (1978). 1986. Vol. 58. Is. 5. P. 92–103.
14. Ridgway Z., Picciano A.L., Gosavi P.M., Moroz Y.S., Angevine C.E., Chavis A.E., Reiner J.E., Korendovych I.V., Caputo G.A. Functional characterization of a melittin analog containing a non-natural tryptophan analog // *Biopolymers*. 2015. Vol. 104. Is. 4. P. 384–394. DOI: 10.1002/bip.22624
15. Casado M.P., Macken A., Byrne H.J. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multistep test battery // *Environ Int*. 2013. Vol. 51. P. 97–105. DOI: 10.1016/j.envint.2012.11.001
16. Tusiimire J., Wallace J., Dufton M., Parkinson J., Clements C.J., Young L., Park J.K., Jeon J.W., Watson D.G. An LCMS method for the assay of melittin in cosmetic formulations containing bee venom // *Anal Bioanal Chem*. 2015. Vol. 407. Is. 13. P. 3627–3635. DOI: 10.1007/s00216-015-8578-5
17. Kokot Z.J., Matysiak J., Urbaniak B., Dereziński P. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product // *Anal Bioanal Chem*. 2011. Vol. 399. Is. 7. P. 2487–2494. DOI: 10.1007/s00216-010-4627-2
18. Tusiimire J., Wallace J., Dufton M., Parkinson J., Clements C.J., Young L., Park J.K., Jeon J.W., Watson D.G. An LCMS method for the assay of melittin in cosmetic formulations containing bee venom // *Anal Bioanal Chem*. 2015. Vol. 407. Is. 13. P. 3627–3635. DOI: 10.1007/s00216-015-8578-5
19. Zenon J.K., Jan M. Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD // *Chromatographia*. 2009. Vol. 69. P. 1401–1405.
20. Szokan G., Horvath J., Almas M. Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from honey bee venoms // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol*. 1994. Vol. 17. P. 3333–3349.
21. Zhao J. Determination of melittin in bee venom by HPLC // *Chin. Mod. Instrum*. 1998. Vol. 6. P. 44–45.
22. Ziyavitdinov Z.F., Inogamov U.K., Sagdiev N.Z., Salikhov S.I. Development of a method for the complex isolation of physiologically active components from bee venom // *Chem. Nat. Compounds*. 1995. Vol. 31. P. 726–730.
23. Zhou J., Zhao J., Zhang S. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography – diode array detector – tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem*. 2010. Vol. 404. P. 171–178.
24. Demchenko A.P., Kostrzhevskaja E.G. Melittin: structure, properties, interaction with a membrane // *Ukr Biokhim Zh* (1978). 1986. Vol. 58. Is. 5. P. 92–103.
25. Омаров Ш.М., Атаев М.Г., Магомедова З.Ш., Омарова З.М. «Роль пчелиного яда и прополиса» // *Вестник международной академии наук (русская секция)*. 2006. Т. 1. С. 36–42.
26. ГОСТ 30426-97. Яд-сырец пчелиный. Технические условия. Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2000.
27. Быков В.А., Демина Н.Б., Кеменова В.А. Изучение влияния различных факторов на высвобождение лекарственных веществ из матричных таблеток // *Хим.-фарм. журнал*. 2005. №5. С. 40–45.
28. Хомутов А.Е., Гинойн Р.В., Лушникова О.В., Пурсанов К.А. Апитерапия. Монография. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ. 2014. 442 с.
29. Ахмерова Д.И., Ставрианиди А.Н., Родин И.А., Шпигун О.А. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии для обнаружения характеристичного пептида пчелиного яда – мелиттина. «Заводская лаборатория. Диагностика материалов» № 12. 2014. Том 80. С. 9–15.
30. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.Я. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. М.: Мир, 1985. 456 с.
31. Фармакопейная статья «Яд пчелиный» ФС-42-2683-89 (утратила силу с 25 апреля 2001 года). URL: <http://docs.cntd.ru/document/902314733> (дата обращения: 14.02.2017)
32. Государственная Фармакопея, XIII издание. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. URL: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> (дата обращения: 14.02.2017)

References

1. Bradshaw JP, Dempsey CE, Watts A. A combined X-ray and neutron diffraction study of selectively deuterated melittin in phospholipid bilayers: effect of pH. *Mol Membr Biol*. 1994 Apr- Jun;11(2):79–86.
2. Walsh EG, Maher S, Devocelle M, O'Brien PJ, Baird AW, Brayden DJ. High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides*. 2011 Aug;32(8):1764–73. doi:10.1016/j.peptides.2011.06.006
3. Zhou J, Zhao J, Zhang S, Shen J, Qi Y, Xue X, Li Y, Wu L, Zhang J, Chen F, Chen L. Quantification of melittin and apamin in apitoxin lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2010 Sep 15;404(2):171–8. DOI: 10.1016/j.ab.2010.05.014

4. Lee WR, Kim KH, An HJ, Kim JY, Han SM, Lee KG, Park KK. Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:218–26. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.058
5. Stankowski S, Pawlak M, Kaisheva E, Robert CH, Schwarz G. A combined study of aggregation, membrane affinity and pore activity of natural and modified melittin. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Oct 14; 1069(1):77–86.
6. Choe JY, Kim SK. Melittin inhibits osteoclast formation through the downregulation of the RANKL-RANK signaling pathway and the inhibition of interleukin-1 β in murine macrophages. *Int J Mol Med.* 2017 Feb 3. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2876
7. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013 Sep;36(2):697–705. DOI: 10.1016/j.etap.2013.06.009
8. Nordvall SL, Uhlin T, Einarsson R, Johansson SG, Ohman S. Bee keepers' IgG and IgE antibody responses to apitoxin studied by means of crossed radioimmuno-electrophoresis. *Clin Allergy.* 1984 Jul;14(4):341–50.
9. Kulkarni HM, Nagaraj R, Jagannadham MV. Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiol Res.* 2015 Dec;181:1–7. DOI:10.1016/j.micres.2015.07.008
10. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013 Sep;36(2):697–705. DOI: 10.1016/j.etap.2013.06.009
11. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1990 May 7;1031(2):143–61.
12. Choi JH, Jang AY, Lin S, Lim S, Kim D, Park K, Han SM, Yeo JH, Seo HS. Melittin, a honeyapitoxin derived antimicrobial peptide, may target methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Med Rep.* 2015 Nov;12(5):6483–90. DOI: 10.3892/mmr.2015.4275
13. Demchenko AP, Kostrzhevskaja EG. Melittin: structure, properties, interaction with a membrane. *Ukr Biokhim Zh (1978).* 1986 Sep-Oct;58(5):92–103. Russian.
14. Ridgway Z, Picciano AL, Gosavi PM, Moroz YS, Angevine CE, Chavis AE, Reiner JE, Korendovych IV, Caputo GA. Functional characterization of a melittin analog containing a non-natural tryptophan analog. *Biopolymers.* 2015 Jul;104(4):384–394. DOI: 10.1002/bip.22624
15. Casado MP, Macken A, Byrne HJ. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environ Int.* 2013 Jan;51:97–105. DOI: 10.1016/j.envint.2012.11.001
16. Tusiimire J, Wallace J, Dufton M, Parkinson J, Clements CJ, Young L, Park JK, Jeon JW, Watson DG. An LCMS method for the assay of melittin in cosmetic formulations containing apitoxin. *Anal Bioanal Chem.* 2015 May;407(13):3627–35. DOI: 10.1007/s00216-015-8578-5
17. Kokot ZJ, Matysiak J, Urbaniak B, Dereziński P. New CZE-DAD method for honeyapitoxin analysis and standardization of the product. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Mar;399(7):2487–94. DOI: 10.1007/s00216-010-4627-2
18. Tusiimire J, Wallace J, Dufton M, Parkinson J, Clements CJ, Young L, Park JK, Jeon JW, Watson DG. An LCMS method for the assay of melittin in cosmetic formulations containing apitoxin. *Anal Bioanal Chem.* 2015 May;407(13):3627–35. DOI: 10.1007/s00216-015-8578-5
19. Zenon JK, Jan M. Simultaneous determination of major constituents of honeyapitoxin by LC-DAD. *Chromatographia.* 2009;69:1401–5.
20. Szokan G, Horvath J, Almas M. Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from honey apitoxins. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 1994;17:3333–49.
21. Zhao J. Determination of melittin in apitoxin by HPLC. *Chin. Mod. Instrum.* 1998;6:44–5.
22. Ziyavitdinov ZF, Inogamov UK, Sagdiev NZ, Salikhov SI. Development of a method for the complex isolation of physiologically active components from apitoxin. *Chem. Nat. Compounds.* 1995;31:726–30.
23. Zhou J, Zhao J, Zhang S. Quantification of melittin and apamin in apitoxin lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography – diode array detector – tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2010;404:171–8.
24. Demchenko AP, Kostrzhevskaja EG. Melittin: structure, properties, interaction with a membrane. *Ukr Biokhim Zh (1978).* 1986 Sep-Oct;58(5):92–103. Review. Russian.
25. Omarov ShM, Ataev MG, Magomedova ZSh, Omarova ZM. «Rol pchelinoogo yada i propolisa» [“The role of bee venom and propolis”]. *Vestnik mejdunarodnoy akademii nauk (russkaya sektsiya).* 2006;1:36–42. Russian.
26. GOST 30426-97. YAd-syirets pchelinyiy. Tehnicheskie usloviya [Bee raw bee poison. Technical conditions.]. Minsk: Mejdunarodnyy sovet po standartizatsii, metrologii i sertifikatsii; 2000. Russian.
27. Byikov VA, Demina NB, Kemenova VA. Izuchenie vliyaniya razlichnykh faktorov na vyisvobozhdenie lekarstvennykh veschestv iz matrichnykh tabletok [The study of the influence of various factors on the release of drugs from matrix tablets]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2005;5:40–5. Russian.
28. Homutov AE, Ginoyan RV, Lushnikova OV, Pursanov KA. Apiterapiya [Apitherapy]. Monografiya. Nijniy Novgorod: Izd-vo NNGU; 2014. 442 p. Russian.
29. Ahmerova DI, Stavrianidi AN, Rodin IA, Shpigun OA. Primenenie metoda vyisokoeffektivnoy jidkostnoy hromatografii-tandemnoy mass-spektrometrii dlya obnaruzeniya harakteristichnogo peptida pchelinoogo yada – melittina [The use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of characteristic peptides of bee venom-melittin]. «Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov» N 12. 2014;80:9–15. Russian.
30. Yakubke HD, Eshkayt XYa. Aminokisloty, peptidy, belki [Amino acids, peptides, proteins]. Per. s nem. Moskva: Mir; 1985. 456 p. Russian.
31. Farmakopeynaya statya «YAd pchelinyiy» FS-42-2683-89 (utratila silu s 25 aprelya 2001 goda). [Internet]. [cited 2017 Feb 14]. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/902314733> Russian.
32. Gosudarstvennaya Farmacopeia [State Pharmacopoeia]. XIII edition. OFS.1.1.0012.15 Validatsiya analiticheskikh metodik. [Internet]. [cited 2017 Feb 14]. Available from: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы

Бутенко Людмила Ивановна – кандидат химических наук, преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений, исследование физико-химических характеристик биологически активных соединений природного происхождения. E-mail: polechka2802@yandex.ru.

Кулешова Светлана Анатольевна – кандидат фармацевтических наук, доцент, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: исследование фармакологической активности биологически активных соединений природного происхождения.

Подгорная Жанна Валериевна – кандидат фармацевтических наук, Представительство BRACCO Group в России, Региональный директор. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: podgornaya_janna@mail.ru.

Мыкоц Лилия Петровна – кандидат фармацевтических наук, доцент, кафедра общей, неорганической и физической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: физико-химические исследования биологически активных веществ.

Дмитриев Александр Борисович – кандидат химических наук, доцент, кафедра аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: физико-химические исследования биологически активных веществ. E-mail: abdmtr2006@yandex.ru.

Authors:

Butenko Lyudmila Ivanovna – PhD (Chemistry), Lecturer of the Department of Organic Chemistry Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds, study of physical and chemical characteristics of biologically active compounds of natural origin. E-mail: polechka2802@yandex.ru

Kuleshova Svetlana Anatolevna – PhD (Pharmacy), docent of the Department of Pharmacology with the course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: study of pharmacological activity of biologically active compounds of natural origin.

Podgornaya Janna Valerievna – PhD (Pharmacy), Representative establishment of BRACCO Group in Russia. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: podgornaya_janna@mail.ru

Myikots Liliya Petrovna – PhD (Pharmacy), docent of the Department of general, inorganic and physical chemistry Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: study of physical and chemical characteristics of biologically active compounds.

Dmitriev Aleksandr Borisovich – PhD (Chemistry), docent of the Department of Analytical Chemistry Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: study of physical and chemical characteristics of biologically active compounds. E-mail: abdmtr2006@yandex.ru.

Поступила в редакцию: 19.04.2018
Отправлена на доработку: 11.07.2018
Принята к печати: 01.08.2018

Received: 19.04.2018
Sent back for revision: 11.07.2018
Accepted for publication: 01.08.2018