

УДК 615.32.451.16 + 638.178

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ПЧЕЛИНОГО ПОДМОРА

*Н. Ю. Ермакова*¹*А. Д. Рошаль*^{1,2}*О. П. Сынчикова*¹*Б. П. Сандомирский*¹¹Институт проблем криобиологии и криомедицины

НАН Украины, Харьков

²Институт химии при Харьковском национальном университете

им. В. Н. Каразина, Харьков

E-mail: bsan38@yahoo.com

Изучен химический состав экстракта из пчелиного подмора (апиэкстракта), проведена оптимизация процедуры экстракции, оценено влияние условий выделения экстракта на его химический состав и антиоксидантную активность.

Показано, что апиэкстракт является ценным источником биологически активных соединений — витаминов, аминокислот и антиоксидантов и по антиокислительной активности не уступает традиционным фармацевтическим препаратам. Установлено, что максимальное извлечение экстракта достигается после 25–30 циклов экстракции при использовании 150 мл этанола на 10 г исходного сырья, причем очистка исходного сырья и самого экстракта от примесей приводит к снижению его биологической активности и поэтому нежелательна.

Ключевые слова: экстракция, пчелиный подмор, апиэкстракт, антиоксидантная активность.

Продукты пчеловодства являются ценным источником углеводов, витаминов, антиоксидантов и биологически активных протеинов, поэтому на протяжении тысячелетий их широко используют как в качестве продуктов питания, так и в составе фармацевтических препаратов [1, 2]. Все используемые пчелопродукты можно разделить на две группы — имеющие растительное происхождение (перга, мед) и производимые организмом пчел (яд, маточное молочко, прополис). Генезис этих продуктов обуславливает их химический состав и, как следствие, разные способы применения и обработки. Продукты растительного происхождения содержат значительные количества моно- и олигосахаридов, фитоантиоксиданты, растительные протеины. Для продуктов метаболизма пчел характерно наличие липидов, специфических полиненасыщенных жирных кислот, животных протеинов, проявляющих высокую биологическую активность. Все перечисленные выше продукты пчеловодства содержат микро/макроэлементы и витамины, но состав этих компонентов у них существенно различается [3].

Общей особенностью использования продуктов пчеловодства является то, что независимо от генезиса все они, в смесях, растворах или в чистом виде, как правило, не разделяются на отдельные компоненты, т.е. используются в нативном состоянии без существенной коррекции их химического состава.

Совершенно особое место среди продуктов пчеловодства занимает широко используемый в народной медицине продукт, называемый пчелиным подмором. Пчелиный подмор — это тела пчел, погибших естественной смертью на протяжении зимнего периода жизни пчелиной семьи, которые вместе с частицами воска скапливаются на дне улья [1, 4, 5]. Поскольку на поверхности тел и в зобе пчел имеется цветочная пыльца, пчелиный подмор является комбинированным препаратом, включающим как животные, так и растительные компоненты. Кроме того, трупы пчел не используют в нативном состоянии — в процессе экстракции биологически активные компоненты отделяются от хитинового покрова пчел, высокомолекулярных протеинов и углеводов, частиц воска и клетчатки.

Целью работы были оптимизация экстракции биологически активных компонентов пчелиного подмора, анализ химического состава экстракта и его антиоксидантной активности.

Материалы и методы

Объект исследования

Объектом исследования был воздушно-сухой пчелиный подмор, собранный весной 2008 г. в экологически чистой зоне с. Стрельче Харьковской области.

Получение экстракта

Экстракт пчелиного подмора (далее апиэкстракт) получали циклической экстракцией молотого сырья в экстракторе Сокслета. В качестве экстрагента использовали этанол — растворитель, традиционно используемый для экстракции пчелиного подмора в народной медицине. С целью удобства отбора проб во время экстракции была использована двугорлая колба-приемник.

По окончании процедуры экстракции раствор апиэкстракта в этаноле упаривали на роторном вакуумном испарителе до половины объема и охлаждали до +5 °С в течение 12 ч. Образовавшийся на дне твердый слой пчелиного воска, а также слой липидов пастобразной консистенции отделяли фильтрованием. Полученный раствор в дальнейшем дважды подвергали последовательным процедурам упаривания (до 1/2 объема), охлаждения и фильтрования, а затем упаривали и дополнительно сушили под вакуумом в течение суток.

Полученный конечный продукт — апиэкстракт имел темно-коричневую окраску вязкой смолоподобной консистенции с приятным запахом.

Элементный анализ пчелиного подмора

Элементный анализ исходного пчелиного подмора (металлы второй группы, d-металлы второго периода, свинец, неметаллы — бром и селен) проводили методом рентгенофлуоресцентного анализа [6, 7] с использованием радионуклидного (Am^{241}) рентгенофлуоресцентного спектрометра с многоканальным анализатором AFORA LP4900B. Пробоподготовку и измерения осуществляли согласно методике, описанной в [8].

Анализ флавоноидов и каротиноидов в экстрактах

Точную навеску 25–50 мг сухого апиэкстракта растворяли в 10 мл 96%-го этанола. Аликвоту полученного раствора разбавляли в 10 раз этанолом. 2 мл полученного раствора помещали в кварцевую кювету с шириной оптического слоя 1 см. Спектр поглощения полученного раствора измеряли при помощи спектрофотометра Hitachi U3210 (Япония) в интервале длин волн от 300 до 550 нм.

Выделение полос поглощения исследуемых соединений из общего спектра поглощения экстракта проводили методом деконволюции с использованием нормированных по интенсивности спектров поглощения стандартных веществ. В качестве стандарта для определения суммы флавоноидов был ис-

пользован 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавоон (кверцетин) (Aldrich, Швейцария). Для определения количества суммы каротиноидов применялся стандарт — β -каротин (Aldrich, Швейцария). Процедуру деконволюции спектров выполняли при помощи программного пакета Spectra DataLab [9]. Полученные оптические плотности в максимумах поглощения кверцетина и β -каротина пересчитывали по уравнению Ламберта–Бугера–Бэра в концентрации сумм анализируемых соединений.

Трехмерная флуоресцентная спектроскопия апиэкстракта

Измерение трехмерных спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Hitachi F4010 (Япония) в интервале длин волн 220–700 нм. Для измерений были использованы те же рабочие растворы, что и при анализе флавоноидов и каротиноидов. Измеряли спектры и обрабатывали результаты по методике, описанной в работах [10, 11].

Анализ аминокислот

Анализ свободных и связанных аминокислот проводили по стандартной процедуре [12] до и после полного гидролиза протеиновых молекул. Разделение апиэкстракта и его гидролизата на аминокислоты и анализ последних выполняли на аминокислотном анализаторе ААА339 (Чехия). Количество связанных аминокислот определяли по разности суммарной концентрации аминокислот (после гидролиза) и концентрации свободных аминокислот (до гидролиза).

Анализ антиоксидантной активности экстрактов

Антиоксидантную активность экстрактов определяли хемилюминесцентным методом с использованием системы: фениловый эфир N-метилакридинийкарбоновой кислоты (люминоген) — пероксид водорода в среде карбонатного буферного раствора (рН 9,93) [13]. Растворы апиэкстракта готовили как для анализа флавоноидов и каротиноидов.

Измерения скорости гашения хемилюминесценции проводили на спектрофлуориметре Hitachi F4010 (Япония), работающем в режиме хемилюминесценции. Кривую гашения люминесценции логарифмировали, тангенс угла наклона полученной прямой делили на массу исходного апиэкстракта. Результирующее значение парциальной константы скорости гашения хемилюминесценции (K_{CL}) — показателя антиоксидантной активности экстракта — определяли

как среднее значений констант, полученных для нескольких (3–5) образцов экстракта.

Антиокислительную активность апиэкстрактов оценивали, сравнивая с показателями K_{CL} для известных антиоксидантов — 10%-го раствора аскорбиновой кислоты (ГНЦЛС, Харьков), кристаллического кверцетина (Aldrich, Швейцария) и фармацевтического препарата «Аскорутин» (Киевский витаминный завод).

Результаты и обсуждение

Химический состав апиэкстрактов

Качественный анализ апиэкстрактов проводили методом трехмерной (3D) флуоресцентной спектроскопии. На рис. 1 показаны объемный (вверху) и проекционный (внизу) 3D-спектры флуоресценции спиртового раствора апиэкстракта. Слабоинтенсивный пик 1 можно отнести к флуоресценции некоторых фосфолипидов, имеющих животное происхождение. Пик 2 обусловлен флуоресценцией аминокислотных остатков, в основном триптофана. Пики 3 и 4 могут быть обусловлены флуоресценцией флавонов и флавонолов в агликонной и гликозидной формах, а пики 5 и 6 — флуоресценцией других природных красителей, близких к флавонолам, например ауруонами.

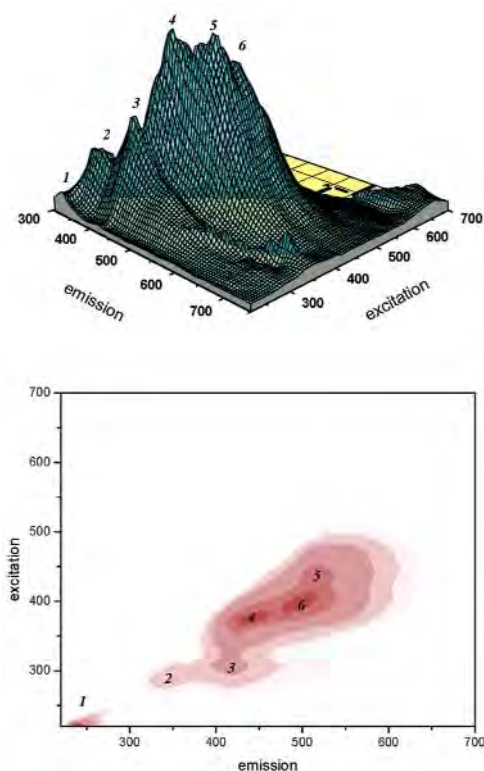


Рис. 1. 3D-спектры флуоресценции апиэкстракта: вверху — трехмерная проекция спектра; внизу — проекция на плоскость длин волн возбуждения и испускания

В спектре поглощения апиэкстрактов (рис. 2) выделяется серия полос в интервале 260–360 нм, типичных для флавонов и флавонолов. Полосы в области 400–425 нм характерны для каротиноидов. И, наконец, в области 430–500 нм видны слабые полосы не идентифицированных пигментов, соответствующих пикам 5 и 6 в 3D-спектрах флуоресценции.



Рис. 2. Спектр поглощения апиэкстракта в этаноле

Результаты аминокислотного анализа (табл. 1) свидетельствуют, что при экстракции этанолом в растворитель переходят преимущественно свободные аминокислоты и низкомолекулярные олигопептиды, чем объясняется относительно высокая концентрация свободных аминокислот. Из приведенных данных следует, что глутаминовая кислота, пролин и лизин находятся преимущественно в свободном состоянии, в то время как гистидин, метионин, лейцин, изолейцин обнаруживаются примерно поровну как в свободном, так и в связанном виде. Следует отметить, что в апиэкстракте обнаружены все незаменимые и условно незаменимые аминокислоты.

В табл. 2 представлены данные о содержании в апиэкстракте флавоноидов и каротиноидов. Оба этих антиоксиданта, придающие антиокислительную активность апиэкстракту, имеют растительное происхождение.

Оптимизация пробоподготовки и извлечения апиэкстракта

Оптимизацию процесса выделения апиэкстракта проводили по трем направлениям — подбор режима первичной очистки исходного сырья, определение оптимальных условий экстракции, дополнительная очистка конечного продукта.

Результаты анализа элементного состава пчелиного подмора, использованного для получения апиэкстракта, приведены в таблице 3. Как следует из них, концентрации

Таблица 1. Содержание свободных и связанных аминокислот в апиэкстракте*

	Свободные аминокислоты, мкг/100 мг	Связанные аминокислоты, мкг/100 мг
Аланин	305	95
Аспарагиновая кислота	475	150
Аргинин	380	165
Валин	240	95
Гистидин	95	135
Глицин	310	107
Глутаминовая кислота	1620	320
Изолейцин	265	210
Лейцин	275	220
Лизин	290	45
Метионин	330	390
Пролин	290	58
Серин	240	95
Тирозин	230	95
Треонин	210	77
Фенилаланин	100	35
Цистеин	17	14

* Данные для триптофана, цистеина и глутамина не приведены.

Таблица 2. Содержание антиоксидантов и антиоксидантная активность апиэкстракта при различных режимах его получения *

	Без промывки	С промывкой 1 сут	С промывкой 3 сут	Без промывки с обезжириванием
Флавоноиды, мг/г	50,84	6,11	3,61	46,17
Каротиноиды, мг/г	3,22	2,09	1,78	—
Антиоксидантная активность, 1/с/г	2,96	1,69	1,51	

* Доверительный интервал для всех приведенных значений не превышает $\pm 3\%$.

тяжелых металлов в пчелином подморе значительно ниже нормативных параметров [14], что позволяет считать его экологически чистым сырьем. Кроме того, в нем обнаружены значительные концентрации макроэлементов — калия, кальция и железа, что типично для других продуктов пчеловодства [3, 15], а также микроэлементы — медь, ванадий и бром.

Таблица 3. Результаты элементного анализа пчелиного подмора (содержание, мг/кг)

Металлы 1-й и 2-й групп	
K	23 500
Ca	2 750
Sr	10
Ba	20
Zn	150
Cd	0,1
Hg	не обнаружен
d-Металлы и свинец	
V	1,3
Cr	не обнаружен
Mn	не обнаружен
Fe	7 600
Co	не обнаружен
Cu	1,8
Pb	0,02
Неметаллы	
Br	11
Se	не обнаружен

С целью очистки пчелиного подмора от пыли, мелких фрагментов тел пчел и чешуек воска нами была предпринята попытка предварительной очистки исходного сырья. Мертвые сухие пчелы в марлевых мешочках промывали в медленном токе деионизированной воды на протяжении длительного времени, затем их сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали и далее подвергали процедуре экстракции.

Чтобы оценить влияние промывки на химический состав апиэкстракта нами были проанализированы его образцы, полученные без процедуры промывки, а также с промывкой, проводившейся в течение 1 и 3 сут. Результаты химического анализа (табл. 2) показывают, что промывка способствует значительному изменению химического состава апиэкстрактов, причем продолжительность ее не оказывает большого влияния на состав конечного продукта. Так, концентрация суммы флавоноидов после промывки уменьшается более чем в 14 раз, а суммы каротиноидов — в 1,8 раза. По нашему мнению, столь разное падение концентрации биологически активных компонентов обусловлено удалением при промывке не только мелкого мусора, но и основного источника флавоноидов — пыльцевых зерен,

находящихся в зобе и на теле пчелы. Каротиноиды, которые также имеют растительное происхождение, но усваиваются организмом пчел и накапливаются в их тканях, удаляются при промывке в значительно меньшей степени.

Приведенные данные позволяют сделать вывод о нежелательности предварительной очистки пчелиного подмора и использовании последнего в интактном виде, как это принято в народной медицине.

Поскольку экстракцию пчелиного подмора проводили в аппарате Сокслета, работающем в автоматическом режиме, количество параметров для оптимизации данного процесса было существенно ограничено. Так, в зависимости от объема экстракционной емкости аппарата можно варьировать массу сырья и количество экстрагента, однако соотношение этих параметров во всех аппаратах Сокслета примерно одинаково. Температура в зоне экстракции не поддается регулированию и самопроизвольно повышается в процессе извлечения; продолжительность извлечения сложным образом зависит от объема аппарата Сокслета и интенсивности нагрева колбы-приемника. На наш взгляд, основной количественной характеристикой процедуры экстракции могло бы быть количество экстракционных циклов.

Для определения оптимального количества экстракционных циклов при извлечении апиэкстракта после каждого цикла из колбы-приемника отбирали ~0,5 мл раствора. После охлаждения раствора, отбора аликвоты (0,1 мл) и разбавления последней в 50 раз проводили измерение оптической плотности полученного раствора на длине волны 410 нм (в области максимума поглощения каротиноидов). Масса сырья и объем растворителя составляли 10 г подмора на 150 мл этанола и определялись геометрическими параметрами экстрактора.

Оптическая плотность раствора существенно растет при 7–10 первых циклах экстракции, а далее наблюдается небольшой прирост вплоть до 25–35 циклов (рис. 3). Поскольку возрастание оптической плотности при длительной экстракции может быть обусловлено также частичной потерей растворителя и карамелизацией углеводов, оптимальным, на наш взгляд, является прекращение извлечения после 25–30 циклов.

Как было описано выше, после экстракции проводили ступенчатое упаривание экстракта, необходимое для возможно более полного отделения воска и липидов. Тем не менее некоторое количество балластных ве-

ществ все же остается в конечном продукте. С целью дополнительного обезжиривания уже готовый апиэкстракт кипятили в течение 1 ч в дихлорметане. Химический анализ показал, что после обработки апиэкстракт теряет 8–10% массы, при этом из него полностью удаляются каротиноиды, что снижает его биологическую активность. Количество флавоноидов при этом изменяется не столь значительно.

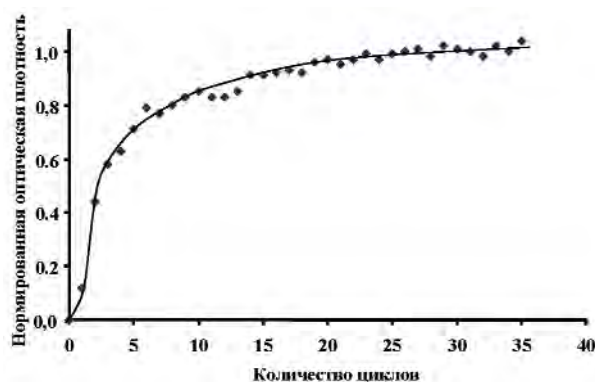


Рис. 3. Зависимость оптической плотности этанольного раствора апиэкстракта при 410 нм в зависимости от количества циклов экстракции (величины оптических плотностей нормированы на среднее значение, полученное при 30–35 циклах)

Антиоксидантная активность апиэкстракта

Выше было отмечено, что апиэкстракт содержит большое количество активных компонентов. Некоторые из них — флавоноиды, каротиноиды, восстанавливающие углеводы и аминокислоты — имеют антиоксидательные свойства, что объясняет наличие у апиэкстракта антиоксидантной активности.

Оценка антиоксидантной активности, проведенная методом [13], позволила сравнить активность апиэкстракта с активностью известных коммерческих антиоксидантов. Оценивали также влияние технологии приготовления экстракта на его антиоксидантные свойства.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают что максимальной активностью обладает апиэкстракт, полученный из пчелиного подмора, не подвергавшегося отмывке и обезжириванию. Промывание сырья в течение 3 сут приводит к двукратному снижению антиоксидантной активности.

Анализ коммерческих антиоксидантов — флавонола кверцетина, 10%-го раствора аскорбиновой кислоты и «Аскорутина»

(комбинированного препарата, состоящего из аскорбиновой кислоты и гликозида кверцетина — рутина) установил наличие у них следующих значений K_{CL} : 17,60; 0,54; 3,42 1/г/с, соответственно. Сравнение этих данных с величинами K_{CL} апиэкстракта (табл. 2) свидетельствует о том, что его антиоксидантная активность сопоставима с активностью препарата «Аскорутин».

Приведенные в работе характеристики экстракта пчелиного подмора показывают, что будучи комбинированным препаратом, полученным как из тканей пчелы, так и из

объектов растительного происхождения, например цветочной пыльцы, апиэкстракт является ценным источником биологически активных соединений — витаминов, аминокислот и антиоксидантов. В частности, по антиоксидантной активности апиэкстракт не уступает традиционным фармацевтическим препаратам, используемым для этой цели. Для получения апиэкстракта целесообразно придерживаться оптимального количества циклов экстракции, однако очистка исходного сырья и самого экстракта от примесей приводит к снижению его биологической ценности и поэтому нежелательна.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Стеблов И. И.* Медовые рецепты. Пчелиный подмор, эликсир молодости, медовый массаж, золотая глина. — СПб: Ареал-Принт, 2005. — 128 с.
2. *Синяков А. Ф.* Мед и медолечение. — М.: Вече, 2000. — 464 с.
3. *Омаров Ш. М.* Апитерапия: продукты пчеловодства в мире медицины. — Ростов н/Д: Феникс, 2009. — 351 с.
4. *Хисматуллина Н. З.* Апитерапия. — Пермь: Мобиле, 2005. — 296 с.
5. *Havsteen B. H.* The biochemistry and medical significance of the flavonoids // *Pharmacol. Therap.* — 2002. — V. 96, N 2–3. — P. 67–202.
6. *Тельдеши Ю.* Радиоаналитическая химия. — М.: Энергоатомиздат, 1987. — 184с.
7. *Боченин В. И.* Новый способ радиоизотопного рентгенфлуоресцентного экспресс-анализа // *Метрология.* — 1982. — № 9. — С. 59–63.
8. *Krasnoporova A. P., Lebedeva L. T., Yuhno G. D. et al.* Sorption-selective properties of natural and synthetic zeolite concerning of heavy metals in liquid medium // *Annales Chemia. Universitetas Marie Curie-Sklodowska. Section AA Chemia.* — 2007. — V. 62, N 7. — P. 68–73.
9. *Doroshenko A. O.* Program Packet Spectra DataLab 1.0.0 / Kharkov: KhNU, 2003.
10. *Параніч В. А., Рошаль О. Д., Дорошенко А. О. та ін.* Визначення видового походження рослинних олій // *Фарм. журн.* — 2000. — № 5. — С. 86–90.
11. *Кисличенко В. С., Рошаль О. Д., Болоховець Г. С.* Аналіз якісного складу олії насіння та ліпофільної фракції з трави розто-ропші плямистої // *Журн. орган. фарм. хімії.* — 2004. — Т. 2, № 3(7). — С. 58–61.
12. *Дэвени Т., Герсей Я.* Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Мир, 1976. — 368 с.
13. *Krzyminski K., Roshal A. D., Synchykova O. P., Sandomisky B. P.* Pat. P-381661 PL. Sposob oznaczania aktywnosci przeciwutleniajacej lub utleniajacej ekstraktow organicznych w oparciu o chemiluminescencje estrow akrydyniowych / *Prior. date.* 01.02.07.
14. *САН ПуН 42-123-4089-86.* Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов и мышьяка в продовольственном сырье и пищевых продуктах. — К., 1986.
15. *Соловьев Л. М.* Пчеловодство: Словарь-справочник. — Йошкар-Ола: Марийский ПИК, 2000. — 382 с.

**ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ
ЕКСТРАКТУ ІЗ БДЖОЛИНОГО ПІДМОРУ**

*Н. Ю. Єрмакова*¹
О. Д. Рошаль^{1,2}
*О. П. Синчикова*¹
*В. П. Сандомирський*¹

¹Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України, Харків

²Інститут хімії при Харківському національ-
ному університеті ім. В. Н. Каразіна, Харків

E-mail: bsan38@yahoo.com

Досліджено хімічний склад екстракту з бджолиного підмору (апіекстракту), проведено оптимізацію процедури екстракції, оцінено вплив умов виділення екстракту на його хімічний склад і антиоксидантну активність.

Показано, що апіекстракт є цінним джерелом біологічно активних сполук — вітамінів, амінокислот та антиоксидантів і за антиокиснювальною активністю не поступається традиційним фармацевтичним препаратам аналогічної дії. Встановлено, що максимальний вихід екстракту досягається після 25–30 циклів екстракції з використанням 150 мл метанолу на 10 г сировини, причому очищення сировини і кінцевого екстракту від домішок призводить до зниження його біологічної активності і тому не є бажаним.

Ключові слова: екстракція, бджолиний підмор, апіекстракт, антиоксидантна активність.

**TECHNOLOGY OF EXTRACT
OBTAINING FROM DEAD BEE BODIES**

*N. Yu. Yermakova*¹
O. D. Roshal^{1, 2}
*O. P. Synchykova*¹
*B. P. Sandomirsky*¹

¹Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

²Institute of Chemistry at V. N. Karazin
Kharkiv National University, Kharkiv

E-mail: bsan38@yahoo.com

Chemical composition of an extract derived from dead bee bodies (apiextract) was studied. The extraction procedure was optimized, chemical composition and antioxidant activity depending on the extraction conditions were estimated.

It has been shown that apiextract is a valuable source of biologically active compounds: vitamins, amino acids, and antioxidants. Antioxidant activity of the apiextract is highly competitive to ones of traditional pharmaceutical preparations. It was established that the maximum extract yield is achieved after 25–30 extraction cycles when using 150 ml ethanol per 10 g of raw material, moreover purification of both initial raw material and the extract itself from admixtures results in a reduction of its biological activity, therefore it is not desirable.

Key words: extraction, dead bee bodies, apiextract, antioxidant activity.