НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА імені П.І. ПРОКОПОВИЧА»

Дінець А.В., Захарія А.В., Давидова Г.І., Гоцька С.М.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

ІЗ ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ СУБСТАНЦІЙ МАТОЧНИХ ЛИЧИНОК БДЖІЛ І РОСЛИННИХ ЖИРІВ (МАСЛО КАКАО, ОЛІЯ ЧОРНОГО КМИНУ (*NIGELLA SATIVA* L.)) ДЛЯ СТВОРЕННЯ АПІФІТОКОМПЛЕКСУ

Київ – 2023

Дінець А.В., Захарія А.В., Давидова Г.І., Гоцька С.М. Методичні рекомендації із використання різних субстанцій маточних личинок бджіл і рослинних жирів (масло какао, олія чорного кмину (*Nigella sativa L.*)) для створення апіфітокомплексу / Науково-методичні рекомендації. – Київ : ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича». – 2023. – 20 с.

Дані методичні рекомендації розповсюджується на виготовлення апіфітокомплексів – свічок – засобів призначених для гігієни, профілактики та оздоровлення організму людини, до складу яких входять як основа масло какао, різні субстанції маточних личинок бджіл, маточне молочко, густа витяжка прополісу, ефірна олія та олія холодного віджиму із насіння чорного кмину (*Nigella sativa L.*)).

Рецензенти: д.с.-г.н., професор, член-кореспондент НААН Постоєнко В.О.,
к.б.н. Акименко Л.І.

Схвалено Вченою радою ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича», протокол № 7 від 24 жовтня 2023 р.

Перелік скорочень, умовних позначень, одиниць і термінів

АМОЗ – 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідінон, метаболіт нітрофурану

АМП – антимікробні пептиди

АОЗ – 3-аміно-2-оксазолідінон, метаболіт нітрофурану

БАР – біологічно активні речовини

БАРпб – біологічно активні речовини продуктів бджільництва

БАС – біологічно активні сполуки

БГКП – бактерії групи кишкових паличок

ГМФ – гідроксиметил-фурфулол

ДДТ – дихлордифеніл трихлорметилметан, інсектицид

ДФУ – державна фармакопея України

КУО – колонієутворюючі одиниці

ЛРС – лікарська рослинна сировина

МАФАнМ – мезофільні аеробні і факультативно-анаеробні мікроорганізми

МКТП – міжнародний класифікатор товарів і послуг

См/м – одиниця електропровідності в системі SI — сименс на метр

ABTS – 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) (2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate])

CAA – антиоксидантна активність клітин (antioxidant activity of cells)

DHA – докозагексаєнова кислота (docosahexaenoic acid)

DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy)

EPA – ейкозапентаєнова кислота (eicosapentaenoic acid)

FRAP – спрощений аналіз та оцінка ризиків (Facilitated Risk Analysis Process)

GAE – еквівалент вмісту галової кислоти (gallic acid equivalent)

MJRP – основні білки маточного молочка (major jelly royal protein)

ORAC – здатність поглинання радикалів кисню (oxygen radicals absorbance capacity)

RE – еквівалент вмісту рутину (routine equivalent)

TQ – тімоквінон, тімохінон (thymoquinone)

В С Т У П

Альтернативні антибактеріальні засоби широкого спектру дії – апіфітокомплекси (супозиторії, свічки), розроблені на основі природної сировини – продуктів бджільництва в поєднанні з лікарською рослинною сировиною можуть дати додаткові переваги в комплексному лікуванні за рахунок синергізму антибактеріального ефекту та зменшення частоти формування резистентності бактерій. На сьогодні експоненціальне зростання мультирезистентних патогенів – це ключовий виклик сучасності. Ефективність препаратів у формі супозиторіїв за ефектом засвоюваності значно перевищує таблетовані лікарські форми й прирівнюється до ін'єкційних. Це одна із найбільш раціональних форм введення речовин в організм, коли цілющі комплекси природних біологічно активних сполук всмоктуються безпосередньо в кровоносне русло, здійснюючи максимальний терапевтичний ефект. Перевагами апіфітокомплексів є: біодоступність, м'яка дія на організм, можливість одночасного введення з фармакологічними засобами, відсутність побічних ефектів при тривалому застосуванні. Медико-біологічна цінність апіфітокомплексів забезпечується різноманітним вмістом біологічно активних речовин в продуктах бджільництва та рослинній сировині; при комплексному застосуванні проявляється синергізм їх лікувального ефекту.

Одними із компонентів апіфітокомплексів, представленими в даних методичних рекомендаціях – різні субстанції маточних личинок бджіл та маточне молочко. На сьогодні, на відміну личинок трутнів (трутневий розплід), маточні личинки залишаються не дослідженими. Маточне молочко (це середовище в якому вони знаходяться) – є одним із найбільш дослідженим продуктів бджільництва, який набуває популярності завдяки своїм різноманітним фармакологічним властивостям, і використовуються як натуральний лікувальний засіб у медицині. Серед них антимікробна, антиоксидантна, протизапальна, протипухлинна, противірусна, імуномодулююча, нейропротекторна тощо. У дослідженнях останніх років вчені зупиняються на його потужних антимікробних властивостях. Оскільки стійкість бактерій до антибіотиків є глобальною проблемою, потреба в природних альтернативах спричинила прогрес у дослідженнях маточного молочка. Згідно з даними літератури, маточне молочко може боротися з широким спектром патогенних бактеріальних штамів. Ця речовина продемонструвала свою ефективність проти *P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, L. monocytogenes, P. Larvae* та ін. Маточне молочко – джерело біологічно активних сполук: білки, пептиди, гормони, ліпіди (жирні кислоти), фенольні сполуки та флавоноїди, мікроелементи, вітаміни.

Ключовими є білки, 80% серед яких це «основні білки маточного молочка» – major jelly royal protein (MJRP) – вони відповідають за розвиток бджолиної матки та личинок, забезпечуючи їм споживання незамінних амінокислот, включаючи аргінін, валін, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан і фенілаланін.

Протимікробний механізм дії маточного молочка забезпечують антимікробні пептиди (АМП). Залишки у їх складі аргініну, лізину і гістидину роблять їх катіонними сполуками, завдяки чому вони здатності взаємодіяти з аніонними фосфоліпідами мембран різних патогенних мікроорганізмів, що спричиняє руйнацію цілісності бактерій, і як наслідок – призводить до загибелі бактеріальних клітин.

В маточному молочку ідентифіковано сімейство коротких пептидів (від восьми до дев'яти амінокислот) – желеїнів (jelleines) та амфіпатичних пептидів – роялізинів (royalisins). Досліджено і підтверджено їх антимікробну дію проти бактерій і дріжджів *C. Albicans*.

Основною та унікальною жирною кислотою маточного молочка є 10-гідрокси-2-деценова кислота. Дослідженнями підтверджено, що вона чинить потужну дію бактерицидну дію проти чотирьох грампозитивних бактерій: *Staphylococcus aureus, S. intermedius B, S. xylosus і Streptococcus alactolyticus* і чотирьох грамнегативних бактерій: гемолітичної *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella cholearasuis і Vibrio parahaemolyticus*.

Добре відомі й активно використовуються бактеріостатичні, антивірусні, фунгіцидні, анестезуючі, імуномодулюючі, антиоксидантні, регенерувальні властивості прополісу. Визначенню кількісного і якісного складу біологічно активних речовин прополісу присвячено досить багато досліджень. Згідно із ДСТУ 4662:2006 кількість флавоноїдів визначають як критерій якості прополісу. Хімічний склад прополісу залежить від його географічного та рослинного походження. Сирий прополіс зазвичай містить близько 300 різних сполук, які в основному складаються з тритерпенів, фенольних сполук, воску, летких моно- і сесквітерпенів, які надають прополісу типовий смолистий запах та ін. Крім того, як хімічний склад, так і біологічні властивості екстрактів прополісу сильно залежать від типу розчинників, які використовуються для екстракції. Найбільш часто використовуваним розчинником для екстракції прополісу є водний етанол (зокрема в концентрації 70-75%), потім такі як етиловий ефір, вода, метанол, гексан і хлороформ. Загальний вміст поліфенолів і загальний вміст флавоноїдів різко змінюється і коливається від 6,68 до 164,20 мг галової кислоти (GAE)/г і від 4,07 до 282,83 мг еквівалентів рутину (RE)/г, відповідно, і найвища концентрація спостерігалася в розчинах 75% етанолу, трохи нижчий у 95% та 100% розчинах етанолу і найменший у водному розчині. 75% етанольний екстракт продемонстрував найвищу антиоксидантну здатність, виміряну методами з застосуванням 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy), 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти (ABTS, 2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), спрощеного аналізу та оцінки ризиків (FRAP, Facilitated Risk Analysis Process), здатністю поглинання радикалів кисню (ORAC, oxygen radicals absorbance capacity) і антиоксидантною активністю клітин (CAA, antioxidant activity of cells).

Рослинною складовою апіфітокомплексів є екстракти (олія) та ефірна олія із насіння чорного кмину (*Nigella sativa L.*).

Чорний кмин або чорнушка посівна є перспективним сировинним компонентом. Насіння чорного кмину містять білок (26%), вуглеводи (25%), клітковину (8,4%), алкалоїди (дамасцеін, дамасценін), сапоніни (а-гедерін), тімохінон (2-ізопропіл 5-метил 1,4 бензохинон), флавоноїди (кверцетин, кемпферол), пігменти, смоли, віск, дубильні речовини, кумарини, аскорбінову кислоту. Насіння багаті мінеральними компонентами (мг/кг): залізо (411,28 ± 41,13), марганець (41,80 ± 13,79), мідь (19,59 ± 1,96), магній (3720,50 ± 1004,50), цинк (51,60 ± 5,16). Олія чорного кмину – джерело поліненасичених жирних кислот. Вона містить вісім насичених жирних кислот (15,13%) і вісімнадцять ненасичених жирних кислот (79,87%). Лінолева кислота (42,76%), олеїнова кислота (16,59%), пальмітинова кислота (8,51%), ейкогексаєнова кислота – омега 3 (4,71%), ейкозапентаєнова кислота EPA (5,98%) і докозагексаєнова кислота DHA (2,97%) – є основними компонентами. Олія чорного кмину містить олеїнову та лінолеву кислоти (18,9-25,0 і 47,5-60,8%, відповідно), що знаходиться в оптимальному співвідношенні (16,59 і 42,76%, відповідно). Окрім жирнокислотного профілю, олія містить значну кількість вітаміну Е (токоферолу α, β та γ), ретинолу (вітаміну А), каротиноїдів (β-каротин). Жиророзчинні вітаміни складають понад 0,2% від загального вмісту олії.

Ефірна олія кмину чорного складає від 0,4 до 0,45% маси насіння, містить такі компоненти: тімохінон – 27,8-57,0%, р-цимен – 7,1-15,5%; карвакрол – 5,8-11,6%, карвон – 0,13-4%; 4-терпинеол – 2-6,6%, лімонен – 0,29-4,3%.

Багато досліджень показали, що олія чорного кмину і, зокрема, ефірна олія, завдяки головному компоненту – тімохінону має потужну антиоксидантну активність і підвищує активність відповідних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза. Крім того, тімохінон (або тімоквінон, TQ) вже отримав високі рейтинги в фармакологічній медицині завдяки своїм протизапальним, знеболюючим, протипухлинним властивостям. Відзначено згубну дію чорного кмину на грам-позитивні і негативні мікроорганізми, виражену протигрибкову властивість, противірусні властивості, зокрема, проти цитомегаловірусів людини.

Основою апіфітокомплексу буде какао-масло – жир, який вилучають із зерен плодів шоколадного дерева *Theobroma cacao* (*Theobroma L.*) родини мальвові (*Malvaceae*). Хімічний склад – дво- та трикислотні тригліцерини. Серед яких переважають три: олеїнова кислота (С18:1) – 34,5 %, стеаринова кислота (С18:0) – 34,5%, пальмітинова кислота (С16:0) – 26,0% та більше 10 мінорних – лінолева кислота (С18:2) – 3,2%, арахінова кислота (С20:0) – 1,0 %, лауринова кислота (С12:2) – 0,3 %, пальмітолеїнова кислота (С16:1) – 0,3%, інші жирні кислоти – 0,5 %. Кислотне число – 2,25 КОН/г, йодне число – 32–38, температура плавлення – 30–34°С. У разі нагрівання вище 35°С утворюються поліморфні модифікації (a, b, b_1). Найбільш стабільною є b модифікація.

Сполукам із продуктів бджільництва й рослин притаманна унікальна біологічна активність. Лікувальні й профілактичні властивості їх емпірично

апробовані не одним поколінням, коло їх практичного застосування постійно розширюється. За результатами чисельних фізико-хімічних досліджень продуктів бджільництва можна стверджувати, що вони містять повний набір компонентів, які забезпечують повноцінне функціонування бджолиної сім`ї на всіх стадіях життєдіяльності й розвитку. Це обумовлює їх високу ефективність і комплексність позитивної профілактичної й терапевтичної дії. Також до переваг застосування біологічно активних сполук із продуктів пасічництва і рослинної сировини ще відносять нетоксичність, екологічну безпечність і відсутність небажаних побічних ефектів на організм людини.

Відомо, що стресорні фактори довкілля хімічної, фізичної і біологічної природи є універсальними елементами розвитку патогенезу багатьох клітинних пошкоджень і впливу на стан багаторівневої системи антиоксидантного захисту. Вивчення оксидативного стресу за останні роки стало одним із пріоритетних напрямків біології та теоретичною основою для розробки біотехнології нових препаратів. Фізико-хімічний аналіз продуктів бджільництва і рослин свідчить, що до їх складу входить значна кількість біологічно активних сполук з антиоксидантними властивостями. Найпоширенішими серед них є біологічно активні фракції каротиноїдів, токоферолів і фенольних сполук. Шляхом активації ферментів лізосом у фагоцитах, каротиноїди набувають антибактеріальних та антивірусних властивостей. З антиоксидантноактивних фенольних сполук із продуктів бджільництва і рослин пов’язують такі позитивні ефекти при патологіях органів і систем як: протизапальні, протимікробні, спазмолітичні, мембраностабілізуючі, протипухлинні, антитоксичні, імунорегулюючі, капіляpозміцнюючі, захисні від впливу негативних чинників довкілля, сприяючі покращенню мікроциркуляції крові та стану слизових оболонок.

Нашим пріоритетом є створення принципово нових технологічних схем, глибокого комплексного перероблення апісировини у продукти високої якості, які сприяють усуненню оксидативного стресу, мають оздоровчий вплив на організм людини, забезпечують профілактику аліментарно-залежних станів, сприяють усуненню дефіциту вітамінів, мікро- і макроелементів, є джерелом потужних антиоксидантів. Цим вимогам відповідають інноваційні продукти із заданими властивостями – апіфітокомплекси.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ

Апіфітокомплекси – свічки – засоби призначені для гігієни, профілактики та оздоровлення людини до складу яких входять як основа масло какао, різні субстанції маточних личинок бджіл, маточне молочко, густа витяжка прополісу, ефірна олія та олія холодного віджиму із насіння чорного кмину (*Nigella sativa L.*)). Апіфітокомплекс – свічка (супозиторій) має форму циліндра із загостреним кінцем довжиною 2,5 см, діаметром – 1,0 см, масою – 2,0 г. В розрізі засіб має відповідати наступним критеріям якості – однорідність вмісту, однорідність маси.

Апіфітокомплекс може бути від світло- до темно-жовтого кольору, з ароматом прополісу і кмину. Представлено три рецептури апіфітокомплексів до складу яких входять як основа масло какао; ефірна олія та олія холодного віджиму із насіння чорного кмину; субстанції маточних личинок бджіл, маточне молочко, та густа витяжка прополісу (таблиця 1).

Таблиця 1. Рецептура апіфітокомплексів

Складові	Апіфітокомлекс 1		Апіфітокомлекс 2		Апіфітокомлекс 3	
	Розрахунок на 1 свічку, г	Розрахунок на 100 г, г	Розрахунок на 1 свічку, г	Розрахунок на 100 г, г	Розрахунок на 1 свічку, г	Розрахунок на 100 г, г
Масло какао	1,6	80	1,6	80	1,6	80
Субстанція маточних личинок бджіл	0,1	5,0	0,1	5,0	-	-
Маточне молочко	0,1	5,0	-	-	0,1	5,0
Ефірна олія із насіння чорного кмину	-	-	0,05	2,5	0,05	2,5
Олія із насіння чорного кмину	0,1	5,0	0,15	7,5	0,15	7,5
Густа витяжка прополісу	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1	5,0

2. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ І МАТЕРІАЛІВ

Для апіфітокомплексу використовується наступна сировина: какао-масло – жир, який вилучають із зерен плодів шоколадного дерева *Theobroma cacao* (*Theobroma L.*) родини мальвові (*Malvaceae*); субстанція маточних личинок бджіл; маточне молочко (ДСТУ 4666:2006); ефірна олія та олія холодного віджиму із насіння чорного кмину (*Nigella sativa L.*)); прополіс (ДСТУ 4662:2006).

Трьохдобові личинки бджолиної матки, вагою 180-250 мг відбирають із маточників як побічний продукт, коли збирають маточне молочко бджолине натуральне.

Згідно із ДСТУ 4666:2006 за мікробіологічними показниками маточне молочко натуральне, повинно відповідати нормам, зазначеним у таблиці 2. Мікробіологічні показники гомогенату маточних личинок мають відповідати нормам для маточного молочка.

Таблиця 2. Мікробіологічні показники маточного молочка натурального згідно із ДСТУ 4666:2006

Назва показника	**Норма**
Загальна кількість МАФАнМ, КУО в 1 г, не більше ніж	$2{,}5 \times 10^4$
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше ніж	100
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше ніж	50
Патогенні мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Salmonella*, в 50 г	не допустимі
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи) в 0,1 г	не допустимі

Визначено мікробіологічні показники субстанції маточних личинок бджіл (гомогенат) та маточного молочка як нативного, що зберігався від 1 дня до 1 місяця при температурі -15^0С, так і через три місяці зберігання при температурі -15^0С. Результати визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАнМ), бактерій групи кишкових паличок (БГКП), плісеневих грибів, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* та *Salmonella* представлено в таблиці 3. Проби готували згідно ДСТУ.

Таблиця 3. Мікробіологічні показники субстанції маточних личинок бджіл (гомогенат) та маточного молочка

Зразки	Маточні личинки бджіл (гомогенат)	Маточні личинки бджіл (гомогенат) після 3-х міс. замороження	Маточне молочко (зберігання до 1 міс.)	Маточне молочко після 3-х міс. замороження
Мезофільні аеробні і факультативно-анаеробні мікроорганізми	$5x10^2$	$4x10^2$	$1x10^2$	$2x10^2$
Бактерії групи кишкових паличок	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Плісеневі гриби	не виявлено	$1x10^1$	не виявлено	не виявлено
Staphylo-coccus aureus	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Listeria monocytogenes, у 25,0 г проби	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Salmonella, у 25,0 г проби	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено

Дослідженнями підтверджено потужну дію бактерицидну дію маточного молочка проти грампозитивних та грамнегативних бактерій: *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Paenibacillus Larvae* та ін.

Нами досліджено антимікробну активність гомогенату бджолиних личинок і маточного молочка проти чотирьох фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae 8511, Pectobacterium carotovorum 8982, Clavibacter michiganensis 10 і Xanthomonas campestris 8003* (таблиця 4).

Таблиця 4. Антибактеріальна активність гомогенату маточних личинок бджоли та маточного молочка

Зразок	*Clavibacter michiganensis 10*	*Pectobacterium carotovorum 8982*	*Xanthomonas campestris 8003*	*Pseudomonas syringae 8511*
Гомогенат маточних личинок бджоли	0,0	0,0	18,0	0,0
Маточне молочко	24,0	45,0	18,0	18,0

Для виготовлення апіфітокомплексу рекомендується використовувати прополіс за органолептичними показниками та фізико-хімічними показниками згідно із ДСТУ 4662:2006 (таблиці 5, 6).

Таблиця 5. Органолептичні показники прополісу
згідно із ДСТУ 4662:2006

Назва показника	**Характеристика**
Зовнішній вигляд	Грудки, крихти або брикети
Колір	Темно-зелений, коричневий, зеленувато-коричневий, бурий, сірий з зеленуватим, жовтим або коричневим відтінком
Запах	Смолистий (суміш запахів меду, хвої, тополі)
Смак	Гіркий, трохи пекучий
Структура	Щільна, на зломі неоднорідна

Таблиця 6. Фізико-хімічні показники прополісу
згідно із ДСТУ 4662:2006

Назва показника	**Норма**
Щільність за температури 20 ^{o}C	1,120—1,187
Масова частка механічних домішок, %, не більше ніж	15,0
Масова частка воску, %, не більше ніж	15,0
Масова частка флавоноїдних та інших фенольних сполук, %, не менше ніж	25,0
Об’єм окислених речовин на 1 мг прополісу, см^3, не менше ніж	0,6
Йодне число, %, не менше ніж	35,0

За мікробіологічними показниками прополіс повинен відповідати вимогам ДСТУ 4662:2006 (таблиця 7).

Таблиця 7. Мікробіологічні показники прополісу згідно із ДСТУ 4662:2006

Назва показника	**Норма**
Загальна кількість МАФАнМ, КУО в 1 г, не більше ніж	$2{,}5 \times 10^4$
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше ніж	100
Дріжджі, КУО в 1 г, не більше ніж	50
Патогенні мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Salmonella*, в 50 г	не допустимі
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи) в 0,1 г	не допустимі

Допускається використання аналогічної сировини згідно з чинною нормативною документацією.

3. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ І ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА

3.1. Опис технологічного процесу одержання екстрактів.

3.1.1. Опис технологічного процесу одержання олії із насіння чорного кмину

Для одержання якісної олії чорного кмину, яка містить у своєму складі максимальну кількість вітамінів, мінералів та біологічно активних речовин, її виробляють шляхом холодного пресування (віджиму) насіння чорного кмину, тоді вона буди містить у своєму складі до 36% цього цінного рослинного жиру.

Ефірну олію кмину чорного способом екстрагування. Встановлено оптимальне співвідношення сировина: екстрагент – 1:10. В якості екстрагента використали 70%-й етиловий спирт та петролейний ефір, що обумовлено тим, що більша частина біологічно активних сполук сировини є малополярними та неполярними.

Подрібнене насіння заливали екстрагентом, перед початком нагрівання настоювали впродовж двох годин для початку вилучення біологічно активних сполук. Екстрагування проводилось протягом 120 хв, з метою максимального вилучення екстрактивних речовини. Екстрагування проводили у температурному інтервалі 65-75°С.

Після виготовлення олія відстоюється за кімнатної у скляній тарі в темному місці впродовж 12 годин. Цим самим вдається досягти максимального сповільнення окислювальних процесів. Під час відстоювання мікрочастинки насіння осідають без стороннього втручання, олія стає прозорою.

Вміст основного компонента тімохінону становить – 45-55%.

Фізико-хімічні характеристики екстрактів:

кислотне число – 6,68,
ефірне число – 1,40,
перекисне число – 110.
Отримані екстракти мали наступні органолептичні показники:
зовнішній вигляд – рідина;
колір – жовтувато-коричневий;
запах – спиртово-кминовий;
смак – пекучий, терпкуватий.

3.1.2. Опис технологічного процесу одержання екстракту прополісу.

Прополіс заморожують впродовж 16 годин при температурі -18°С. Подрібнений прополіс екстрагують 70° етиловим спиртом у співвідношенні прополіс – етиловий спирт 2:8 при температурі +37°С в темному місці (термостаті) впродовж 10-х діб при щоденному кількаразовому струшуванні, потім фільтрують. Можна використовувати аптечну форму: «Прополісу настойка» (*tincture propolisi*) (1:10) (екстрагент – етанол 80 %).

3.2. Опис технологічного процесу на виготовлення апіфітокомлексів рис.1.

Для виготовлення супозиторіїв використано метод виливання (лиття). Вага однієї свічки складає 2,0 г. З фізико-хімічної точки зору – апіфітокомплекси – дисперсні системи, які мають основу (дисперсійне середовище) та біологічно активні речовини-складові (дисперсна фаза). Це складні багатокомпонентні гетерогенні системи, оскільки містять одразу декілька діючих речовин, розчинених у різних складних основах і можуть розчинятися або диспергувати у воді. Для дотримання вимог до відповідних засобів – критеріїв якості – однорідність вмісту, однорідність маси, температура плавлення, час повної деформації, час розчинення, мікробіологічна чистота тощо, максимально можлива маса внесених компонентів до основи не може перевищувати 0,4 г.

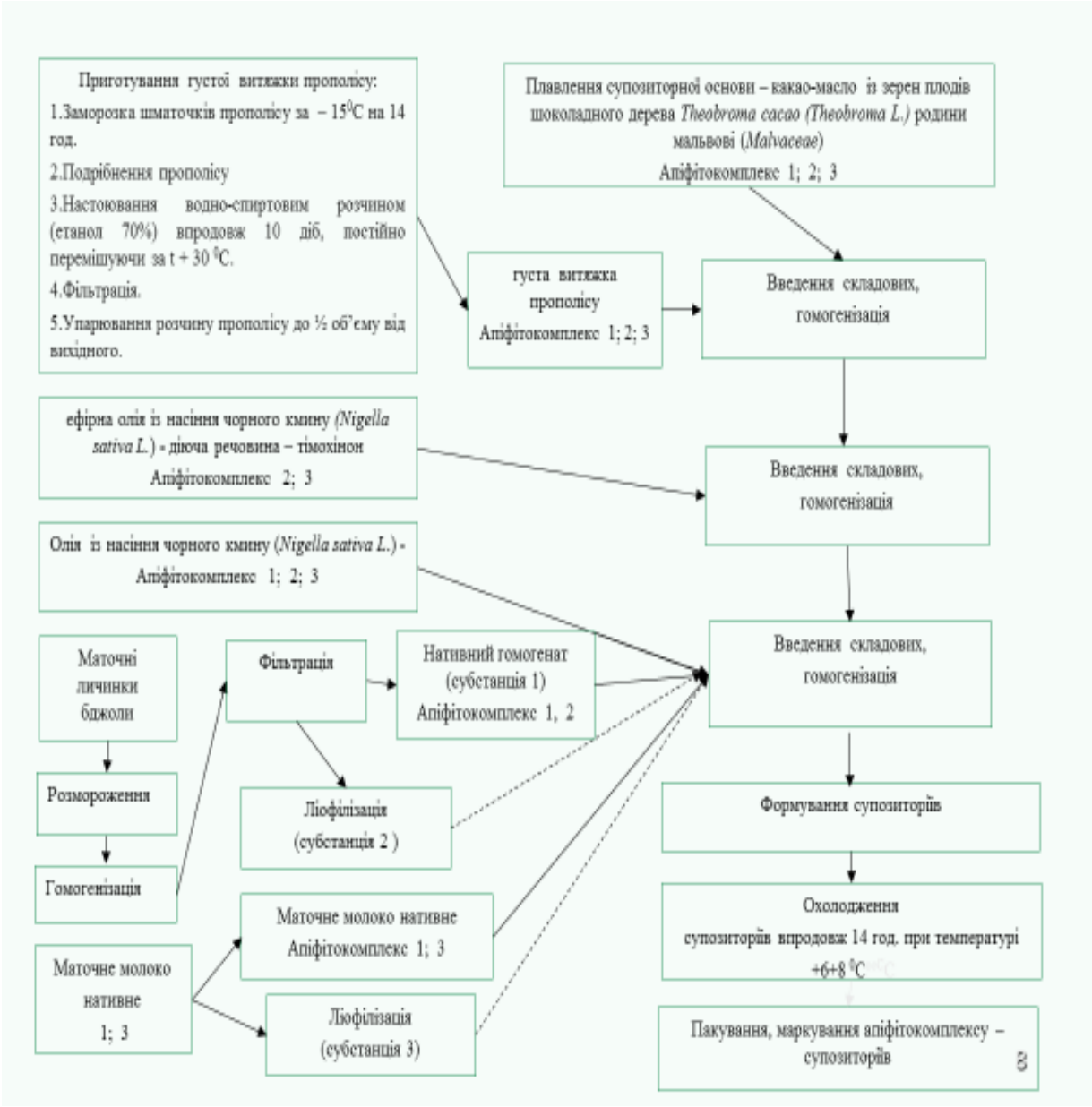

Рис.1. Технологічна схема виготовлення апіфітокомплексів

Готовий продукт має відповідати всім нормам мікробіологічної безпеки. В таблиці 10 представлено результати досліджень трьох апіфітокомплексів на момент їх виготовлення та за три місяці їх зберігання за температури +6+8 °С (зберігання у побутовому холодильнику).

Таблиця 10. Дослідження на мікробіологічну чистоту апіфітокомплексів, в тому числі за три місяці зберігання, (КУО/г)

Апіфіто-комлекс	Мезофільні аеробні і факульта-тивно-анаеробні мікро-організми	Бактерії групи кишкових паличок	Грам-позитивна паличкоподібна бета-гемолітична бактерія, факультативний анаероб (*B. cereus*)	Плісеневі гриби	*Staphylococcus aureus; Listeria monocytogenes; Salmonella* у 25,0 г проби
1	$2,1x10^1$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
2	$2,5x10^2$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
3	$2,3x10^1$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
1 - через 3 міс зберігання	$2,5x10^2$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
2 - через 3 міс зберігання	$3,5x10^2$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
3 - через 3 міс зберігання	$2,5x10^2$	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено

Реологічні (структурно-механічні властивості) апіфітокомлексів та їх основ оцінювали за допомогою ротаційного віскозиметру «Реотест-2» (Германія) при температурах 20^0С і 34^0С. Формула:

$$\tau = \tau^o + K \bullet Дr \bullet n,$$

де τ – напруга зсуву, *Па*;

Дr – швидкість зсуву, c^{-1};

τ^o, *K, n* – константи апроксимації.

Кислотне число апіфітокомплексу (Х), в мг КОН / г розраховували за формулою:

$$X = \frac{K \cdot V}{m},$$

де К – коефіцієнт , який дорівнює значенню розрахованої маси лугу в 1 мл 0,1Н розчину, для КОН він дорівнює 5,611, а NaOH – 4,0;

V – об'єм 0,1Н розчину лугу, який витратили на титрування, мл;

m – наважка препарату, г.

Показник окислюваності є універсальною характеристикою і свідчить про наявність і кількість ненасичених сполук, які присутні в усіх фракціях біологічно активних сполук, що відібрані для конструювання препаратів. Крім того, дані сполуки є хімічно нестійкими і швидше за інші руйнуються при порушеннях технологічної обробки й в процесі зберігання. Суть методу полягає у водно-спиртовій екстракції комплексу з наступною обробкою ненасичених сполук перманганатом калію. Час (секунди) зникнення рожевого забарвлення відповідає показнику окислюваності.

Наважку апіфітокомплексу або сировини масою 0,5г поміщають у конічну колбу, додають 25мл водно-спиртового розчину 40^0, перемішують скляною паличкою і витримують протягом 60хв на водяній бані при 40^0С, в затемненому місці, періодично перемішують. Розчин фільтрують через паперовий фільтр у колбу об'ємом 50мл. Фільтр промивають розчином спирту 40о і об'єм доводять до мітки. В стакан місткістю 50 мл відбирають 2мл фільтрату, доливають 1мл розчину сірчаної кислоти. Перемішують плавними круговими рухами стакану протягом 1хв. До розчину додають 40мкл 0,1М $KMnO_4$ і одночасно вмикають секундомір. Час (секунди) зникнення рожевого забарвлення відповідає показнику окислюваності.

Суть методу визначення антиоксидантної активності полягає в тому, що при використанні моделі термічного автоокислення ліпідного субстрату в присутності водно-спиртового екстракту апіфітокомплексу або сировини, можна оцінити їх здатність гальмувати чи прискорювати процеси перекисного окислення ліпідів.

Для визначення антиоксидантної активності апіфітокомплексу або сировини готували інкубаційні суміші такого складу: 2мл фосфатного буферу, рН 7,4; 0,2мл 2% спиртового розчину олеїнової кислоти або лінетолу та 2мл етилового спирту 40^o (контроль 1). У дослідних зразках замість 1мл етилового спирту 40^o додають 1мл водно-спиртового екстракту апіфітокомплексу або сировини. Інкубаційні суміші добре перемішують. Пробірки з сумішами поміщають у термостат та витримують при t $+50^0$ С протягом 2год, періодично перемішуючи. По закінченні термостатування у перші дві пробірки кожної серії додають 3,2мл 20% розчину три хлороцтової кислоти (контроль 2), а в інші дві – 3,2мл 0,5% розчину тіобарбітурової кислоти в 20% розчині трихлороцтової кислоти (дослід). Після перемішування всі пробірки витримують у термостаті при 37^0С протягом 1год, після чого охолоджують до кімнатної температури. Проби центрифугують при 3000 об /хв протягом 20хв, та вимірюють оптичну щільність супернатантів на спектрофотометрі при λ=532нм. Контролем вимірювань для кожної серії слугували проби, які містили 20% розчин трихлороцтової кислоти (контроль 2).

Розрахунок результатів. Антиоксидантну активність апіфітокомплексу розраховують у відносних одиницях (в. о.) за формулою:

$$АОА = \frac{Д\ (олеїнової\ \ кислоти, контроль\ 1)}{Д\ (проби\ з\ екстрактом\ препарату\ чи\ сировини)},$$

де Д (олеїнової кислоти, контроль 1) – оптична щільність зразків без додавання екстракту комплексу;

Д (проби з екстрактом мазі) – оптична щільність зразків, що містять екстракт комплексу.

Вміст каротиноїдів в апіфітокоплексі або сировині розраховують за формулою:

$$A(мг\%) = \frac{avc \cdot 100}{вd},$$

де a – вміст каротиноїдів, знайдений і розрахований по градуйованій шкалі біхромату калію, мг/мл;
v – об'єм розчину, який аналізується на спектрофотометрі мл;
c – загальна кількість бензольного розчину, мл;
100 – перерахунок на 100г комплексу, г;
$в$ – об'єм бензольного розчину, який відібраний для аналізу, мл;
d – наважка комплексу для аналізу, г.

Метод кількісного визначення вмісту фенольних сполук.

Суть методу кількісного визначення вмісту фенольних сполук полягає у спиртовій екстракції апіфітокомплексу чи сировини з наступним визначенням оптичної щільності розчину при λ= 290нм. Точну наважку сировини чи препарату масою 500мг поміщають в конічну колбу об'ємом 50мл, додають 25мл спирту етилового і перемішують на магнітній мішалці протягом 10хв. Суміш фільтрують через паперовий фільтр в мірну колбу на 50мл, фільтр промивають спиртом етиловим, ним же доводять об'єм розчину до мітки. 1мл отриманого розчину вносять у мірну колбу об'ємом 50мл, доводять об'єм розчину до мітки спиртом етиловим, перемішують. Вимірюють оптичну щільність отриманого розчину на спектрофотометрі при λ= 290нм, в кюветі 10мл проти 96^0 спирту етилового. Паралельно вимірюють оптичну щільність робочого стандартного розчину біхромату калію при λ=290нм проти води дистильованої, як видно з рисунку (рис. 2), де наведено калібрувальний графік по біхромату калію.

Вміст суми фенольних сполук розраховують за формулою:

$$\text{Р}(\%) = \frac{\text{D}_1 \cdot m_0 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 0{,}1715}{D_0 \cdot m_1},$$

де D_1 – оптична густина спиртового екстракту препарату чи сировини;
m_1- наважка, г;
$m_о$ – маса біхромату калію в 100 г стандартного розчину, г;
$D_о$ – оптична густина стандартного розчину біхромату калію;
V_1 – об'єм спиртового розчину, отриманого при екстракції вихідної сировини, мл;
V_2 – коефіцієнт розведення попереднього об'єму;
0,1715 – коефіцієнт перерахунку поглинання біхромату калію на суму фенольних сполук, який розрахований експериментально.

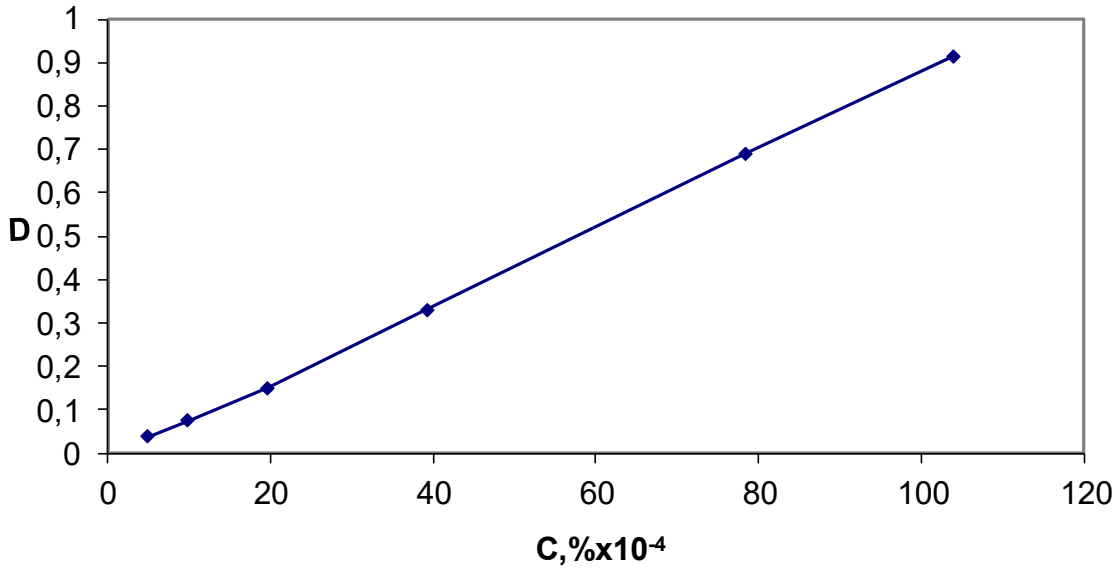

Рис. 2. Пряма залежності оптичної щільності від концентрації розчинів калію біхромату при λ=290нм.

4. ФАСУВАННЯ

Фасують вручну при кімнатній температурі. В одній упаковці 10 свічок. Їх розміщують у поліетиленовий пакет. І потім кладуть у картонну коробочку.

Допускається використання аналогічної тари та пакувальних засобів згідно з чинною в Україні нормативною документацією. Кожна одиниця упаковки повинна мати маркування згідно чинною нормативною документацією.

5. ЗБЕРІГАННЯ

Екстракти зберігають у темних приміщеннях, при температурі від +5°С до +8°С та відносній вологості повітря не більше 75%.

6. ВИМОГИ БЕЗПЕКИ І ОХОРОНИ НАВКОЛИШНЬОГО ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

При виробництві екстрактів необхідно дотримуватись правил безпеки та виробничої санітарії, затверджених у встановленому порядку.

ЛІТЕРАТУРА

Мікробіологія. Загальна настанова щодо підрахунку передбачуваної Escherichia coli. Метод найімовірнішого числа (ISO 7251:1993, IDT) : ДСТУ ISO 7251:2006

Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення Salmonella : ДСТУ EN12824:2004. [на заміну ДСТУ EN 12824:1997, IDT]. К. : Держспоживстандарт України, 2004. 24 с.

Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування Listeria monocytogenes. Частина 1. Метод виявлення : ДСТУ ISO 11290-1:2003. [на заміну ДСТУ ISO 11290-1:1996, IDT]. К. : Держспоживстандарт України, 2004. 22 с.

Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коліформ. Метод підрахування колоній (ISO 4832:2006, IDT) : ДСТУ ISO 4832:2015

Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахування колоній за температури 30^0С (ISO 4833:2003, IDT) : ДСТУ ISO 4833:2006

Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Методика виявлення Salmonella spp. (ISO 6579:2002, IDT) : ДСТУ ISO 6579:2006

Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахування колоній, культивованих за температури 25^0С (ISO 7954:1987, IDT) : ДСТУ ISO 7954:2006

Молочко маточне бджолине. Технічні умови : ДСТУ 4666:2006 [Чинний з 15.08.2006]. Київ: Держстандарт України, 2007. 22 с.

Прополіс (бджолиний клей). Технічні умови : ДСТУ 4662:2006 [Чинний з 15.08.2006]. Київ: Держстандарт України, 2007. 18 с.

Продукти харчові. Методи визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів : ДСТУ 8446:2015

Продукти харчові. Метод визначення дріжджів і плісеневих грибів: ДСТУ 8447:2015

Продукти харчові. Метод виявлення та визначання Bacillus cereus : ДСТУ 8040:2015

Давидова Г. І., Захарія А. В., Гоцька С. М. та ін. Дослідження складових дієтичних добавок-апіфітокомпозицій за мікробіологічними показниками. *Бджільництво України*, 2018. Вип. 3. С. 35–42.

Давидова Г. І., Гоцька С.М., Постоєнко В.О., Корбут О.В. 30-річний досвід застосування апіфітокомпозицій в медичній практиці. *Бджільництво України*, 2022. Вип.8. С.19-28. https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2022.8.03

Давидова Г., Тодорова В., Гоцька С. Чорний кмин (*Nigella sativa L.*) – перспективна рослина для апіфітотерапії. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини. Збірник праць XV Міжнародної міждисциплінарної наук.-практ. конф. (8-9 квітня 2022 року) / За ред. проф. Т.М. Ганича. – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2022, с.45-46.

Постоєнко В.О., Боднарчук Л.І., Патика В.П. Методи оцінки якості та стандартизації апіфітопрепаратів у формі мазей. Науково-методичні рекомендації. / за редакцією академіка УААН В.П. Патики. – Київ, 2004. 30с.

Постоєнко В.О., Кравецький Л.Й., Кокта О.Д. Фізико-хімічні дослідження мазей апіфітопрепаратів. *Агроекологічний журнал*, 2003. № 3. С.64-66.

Постоєнко В.О., Засєкін Д.А. Антиоксидантна дія апіфітопрепаратів при патологіях органів травлення у тварин. *Науковий вісник Національного аграрного університету*, 2004. Вип. 72. С. 201-205.

Постоєнко В.О. Оптимізація процесу екстракції каротиноїдів з рослинної сировини. *Наукові записки Тернопільського державного педагогічного університету ім. В.Гнатюка*. Серія: Біологія, 2004. № 1-2. С.10-13.

Постоєнко В.О., Засєкін Д.А., Кокта О.Д. Антиоксидантна активність апіфітопрепарату „Прана” при лікуванні бронхолегеневих захворювань у тварин. *Аграрна наука і освіта*, 2004. Т. 5, № 3-4. С. 90-93.

Постоєнко В.О. Наукові основи біотехнології та використання апіфітопрепаратів ветеринарного призначення: дис. … докт. с.-г. наук: 03.00.20. Київ, 2005. 338 с.

Тихонов О. І., Ярних Т. Г., Черних В. П., Зупанець І. А., Тихонова С. О. Теорія та практика виробництва лікарських препаратів прополісу / за ред. акад. О. І. Тихонова. Харків : Основа, 1998. 384 с.

Тихонов О. І., Бобро С. Г., Блажеєвський М. Є. Кількісне визначення вмісту фенольних сполук у гелі з фенольним гідрофобним препаратом прополісу та алезаїновою кислотою. Фармацевтичний журнал. 2016. № 1. С. 45–48.

Davydova H., Postoienko V., Zakharia A., Hotska S. Propolis (Bee glue) is a unique component of the apiphytocomposition dietary supplements. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*, 2016. P.64-68.

Bagameri L., Baci G. M., Dezmirean D. S. Royal Jelly as a Nutraceutical Natural Product with a Focus on Its Antibacterial Activity. *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 6. P. 1142. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061142

Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M., Malaspina O., Palma M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honey bees (Apis mellifera). *Peptides.* 2004. V. 25. № 6. P. 919–28. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016

Fratini F., Cilia G., Mancini S., Felicioli A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res*. 2016. № 192 P. 130–141. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007

Huang S., Zhang C. P., Wang K., Li G. Q., Hu F. L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. 2014. V. 19. № 12. P. 19610–19632. https://doi.org/10.3390/molecules191219610

Matseliukh B.P., Zakhariia A.V., Davydova H,I., Hotska S.M. Antimicrobial activity of bee queen larvae and royal jelly. *Microbiological Journal*. 2022. 4. P.72-76. https://microbiolj.org.ua/en/archiv/2022-tom-84/4-jul-aug-tom-84/2022-84-4-07/

Miguel M. G., Nunes S., Dandlen S. A., Cavaco A. M., Antunes M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (Apismellifera L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*. 2014. V. 34. № 1. P. 16–23. https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100002

Nichitoi M. M., Josceanu A. M., Isopescu R. D., Isopencu G. O., Geana E. I.,Ciucure C. T., Lavric V. Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Sci. Rep*. 2021. № 11. P. 20113.

Nina N., Quispe C., Jiménez-Aspee F. et al. Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules.* 2015. V. 20. № 10. P. 18144–18167. https://doi.org/10.3390/molecules201018144

Pereira A. S., Seixas F. R. M. S., Aquino Neto F. R. Própolis: 100 Anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. *Quimica Nova*. 2002. Vol. 25. № 2. P. 321–326. https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200021

Przybyłek I., Karpiński T. M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 2019. № 24. P. 2047. https://doi.org/10.3390/molecules24112047

Ratajczak M., Kaminska D., Matuszewska E., Hołderna-Kedzia E., Rogacki J., Matysiak J. Promising Antimicrobial Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Molecules.* 2021. №. 26. P. 4007. https://doi.org/10.3390/molecules26134007

Yang Y. C., Chou W. M., Widowati D. A., Lin I. P., Peng C. C. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018. V. 18. № 1. P. 202. https://doi.org/10.1186/s12906-018-2267-9