

УДК 57.013:615:638.178.8

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АПИТОКСИНА

Бутенко Л.И., Мыкоц Л.П., Туховская Н.А., Степанова Н.Н., Сысоева Т.Н., Васина Т.М.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, e-mail: ninatuk@mail.ru

Апитоксин (пчелиный яд) – аморфный порошок кремового цвета. Большая часть химических компонентов пчелиного яда исследована как с точки зрения химической структуры и свойств, так и их физиологической активности. Молекулы полимера меняют свои физико-химические свойства под влиянием pH среды. В кислой среде они существуют в виде полимерных катионов, в щелочной – полимерных анионов. При некотором pH, присущем разным по природе полимерам, макромолекула представляет собой полиамфион и находится в изоэлектрическом состоянии. Цель. Изучение влияния pH среды на вязкость растворов апитоксина, установление изоэлектрической точки и изучение сорбционной способности по отношению к ионам свинца (II) (Pb²⁺). Материалы и методы. Вискозиметрический метод для определения изоэлектрической точки апитоксина с использованием капиллярного вискозиметра Оствальда; определение сорбционной емкости апитоксина по отношению к ионам свинца (II) методом комплексонометрического титрования. Результаты. Найдена величина изоэлектрической точки pH = 3,7, в которой функционирует белок, свидетельствующая о том, что апитоксин относится к полиэлектролитам, являясь более сильной кислотой, чем основанием. Установлено наличие сорбционной способности по отношению к ионам Pb²⁺. Получены величины адсорбции экспериментальные и рассчитанные по уравнениям Лэнгмюра и Фрейндлиха, построены изотермы адсорбции, показана применимость уравнений для описания процесса адсорбции. Степень извлечения ионов свинца составила 17,5%, что свидетельствует о детоксикационной способности апитоксина по отношению к экзогенным токсинам. Изучена кинетика процесса сорбции и определены кинетические характеристики. Заключение. Найденные параметры физико-химических величин позволяют изучать биологическую активность и прогнозировать возможные технологические процессы для практического использования апитоксина.

Ключевые слова: апитоксин, изоэлектрическая точка, детоксикационная способность, адсорбция, кинетика сорбции, сорбционная емкость, кинетические характеристики

SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF APITOXIN

Butenko L.I., Mykots L.P., Tukhovskaya N.A., Stepanova N.N., Sysoeva T.N., Vasina T.M.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, e-mail: ninatuk@mail.ru

Apitoxin (bee venom) is an amorphous powder of cream color. Most of the chemical components of bee venom were studied both in terms of chemical structure and properties, and their physiological activity. Polymer molecules change their physical and chemical properties under the influence of pH. In acidic environment they exist in the form of polymeric cations, in alkaline – polymeric anions. At a certain pH, the inherent different nature of the polymers, the macromolecule is polyanion and is located in the isoelectric state. Goal. To study the effect of pH on the viscosity of apitoxin solutions, to establish an isoelectric point, and to study the sorption capacity with respect to lead(II) ions (Pb²⁺). Materials and methods. Viscometric method for determining the isoelectric point of apitoxin using Ostwald capillary viscometer; determination of the sorption capacity of apitoxin with respect to lead ions (II) by complexometric titration. Results. The value of the isoelectric point pH = 3,7, in which the protein functions, indicating that the apitoxin belongs to polyelectrolytes, being a stronger acid than the base. The presence of sorption capacity with respect to Pb²⁺ ions was established. The adsorption values are obtained experimentally and calculated from the Langmuir and Freundlich equations, the adsorption isotherms are constructed, the applicability of the equations to describe the adsorption process is shown. The degree of extraction of lead ions was 17.5%, which indicates the detoxification ability of apitoxin in relation to exogenous toxins. The kinetics of the sorption process is studied and the kinetic characteristics are determined. Conclusion. The found parameters of physical and chemical quantities allow to study biological activity and to predict possible technological processes for practical use of apitoxin.

Keywords: apitoxin, isoelectric point, detoxification ability, adsorption, sorption kinetics, sorption capacity, kinetic characteristics

Апитоксин (пчелиный яд) – аморфный порошок кремового цвета. Химический состав изучен достаточно полно: преобладают органические соединения, содержащие: углерод (43,6%), водород (7,1%), азот (13,6%), серу (2,6%) [1–3]. Неорганические вещества апитоксина составляют 3% сухой массы и включают макроэлементы (фосфор, кальций, магний, медь), при этом натрий и калий отсутствуют. Большая часть

химических компонентов [4, 5] исследована как с точки зрения химической структуры [6] и свойств, так и их физиологической активности [7].

Из физико-химических свойств оценены молекулярная масса, поверхностная активность [8, 9]. Показано, что мелиттин из мономера в растворе переходит в тетрамер, но при этом поверхностно-активные свойства сохраняются [10, 11]. Из факторов,

влияющих на активность апитоксина, изучены: температура, свет, влага, O_2 , окислители и восстановители, ферменты [12].

Цель нашей работы: изучение влияния рН среды на вязкость растворов апитоксина, установление изоэлектрической точки и изучение его сорбционной способности по отношению к ионам свинца (II) (Pb^{2+}).

Молекулы полимера меняют свои физико-химические свойства под влиянием рН среды [13]. В кислой среде они существуют в виде полимерных катионов, в щелочной – полимерных анионов. При некотором рН, присущем разным по природе полимерам, макромолекула представляет собой полиамфион и находится в изоэлектрическом состоянии [14].

Цель исследования: определить изоэлектрическое состояние макромолекулы апитоксина.

Материалы и методы исследования

Определение изоэлектрической точки растворов апитоксина проводили капиллярным методом с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда [15].

Количество ионов свинца в фильтрате в различные промежутки времени определяли комплексонометрическим титрованием.

Комплексообразующую способность рассчитывали по отношению изменения массы связавшихся ионов свинца к массе сорбента.

Результаты исследования и их обсуждение

Для определения изоэлектрической точки растворов апитоксина использовали надежный и простой в исполнении метод по минимуму вязкости с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда. Измеряли относительную вязкость серии ацетатных буферных растворов с добавлением одинакового количества апитоксина (0,8%). В изоэлектрическом состоянии макромолекулы свернуты в клубок, наименее гидратированы. Поэтому минимальной вязкостью будет обладать раствор с рН, соответствующим изоэлектрическому состоянию.

Результаты эксперимента представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Найденная величина изоэлектрической точки $pH = 3,7$ свидетельствует о том, что апитоксин является более сильной кислотой, чем основанием. У каждого полиэлектролита (белка) изоэлектрическая точка обычно соответствует рН среды, в которой функционирует белок. Это обстоятельство

учитывается при технологических процессах, использующих его, влияет на скорость протекания физиологических процессов.

Таблица 1
Зависимость времени течения водных растворов апитоксина от рН среды

| № п/п | рН буферного раствора | Время t , с | Относительная вязкость $\eta_{отн.}$ |
|-------|-----------------------|---------------|--------------------------------------|
| 1 | H_2O | 12 | |
| 2 | 3,2 | 24,2 | 2,02 |
| 3 | 3,7 | 18,53 | 1,54 |
| 4 | 4,2 | 28,62 | 2,39 |
| 5 | 4,7 | 27,71 | 2,31 |
| 6 | 5,2 | 27,96 | 2,33 |
| 7 | 5,7 | 31,52 | 2,67 |

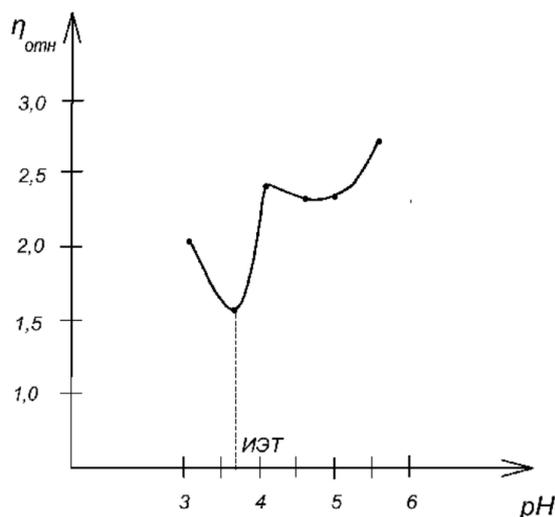


Рис. 1. Зависимость относительной вязкости растворов апитоксина от рН среды

В настоящее время актуален вопрос детоксикации организма с использованием природных сорбентов, освобождающих организм от эндогенных и экзогенных токсинов. Поэтому далее исследовали сорбционную емкость апитоксина по отношению к ионам свинца (II) и изучили кинетические характеристики процесса сорбции.

К навеске апитоксина (0,15 г) добавляли 10 мл 0,1 М раствора ацетата свинца и доводили водой очищенной до 100 мл.

Отфильтровывали образовавшийся рыхлый осадок. Количество ионов свинца в фильтрате в различные промежутки времени определяли комплексонометрическим титрованием.

Таблица 2

Изменение концентрации Pb^{2+} после его сорбции на апитоксине

| t, мин | Объем титранта, мл | Содержание Pb^{2+} , мг | Концентрация катиона Pb^{2+} , ммоль/л | Степень извлечения Pb^{2+} , % | Комплексообразующая способность, мг/г |
|--------|--------------------|---------------------------|--|----------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 4,0 | 82,9 | 40,0 | – | – |
| 5 | 3,6 | 74,6 | 26,0 | 8,9 | 49,3 |
| 10 | 3,5 | 72,5 | 35,0 | 12,5 | 69,3 |
| 20 | 3,4 | 70,4 | 34,0 | 15,0 | 83,3 |
| 30 | 3,3 | 68,4 | 33,0 | 17,5 | 96,7 |
| 40 | 3,3 | 68,4 | 33,0 | 17,5 | 96,7 |

Титрование проводили в среде ацетатного буферного раствора при $pH = 5,5$ в присутствии индикатора ксиленолового оранжевого.

Комплексообразующую способность рассчитывали по отношению изменения массы связавшихся ионов свинца к массе сорбента.

Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Результаты показали наличие сорбционной способности, которую количественно можно выразить величиной адсорбции (A). Экспериментальная адсорбция определялась отношением количества катионов свинца, сорбированных апитоксином (ΔC , ммоль/л), с учетом используемого объема раствора (V , л) к массе сорбента (m , кг). Коэффициент распределения (K_p) ионов свинца между раствором и сорбентом определяли по отношению величины предельной адсорбции к равновесной концентрации.

Было проведено соответствие экспериментальной адсорбции с величинами, рассчитанными по уравнениям Лэнгмюра и Фрейндлиха, и построены изотермы адсорбции.

Уравнение изотермы адсорбции Лэнгмюра:

$$A = A_{\infty} \frac{KC_p}{1 + KC_p},$$

где A_{∞} – предельная адсорбционная емкость, ммоль/л;

C_p – равновесная концентрация ионов Pb^{2+} , ммоль/л;

K – константа адсорбционного равновесия.

Постоянные параметры уравнения Лэнгмюра (A_{∞} , K) определяли графически по зависимости $1/A$ от $1/C_p$ (рис. 2).

Константу адсорбционного равновесия находили в соответствии с зависимостью: $1/(A_{\infty} \cdot K) = \text{tg}\alpha$.

Величина A_{∞} составила 14,3, $K = 0,08$.

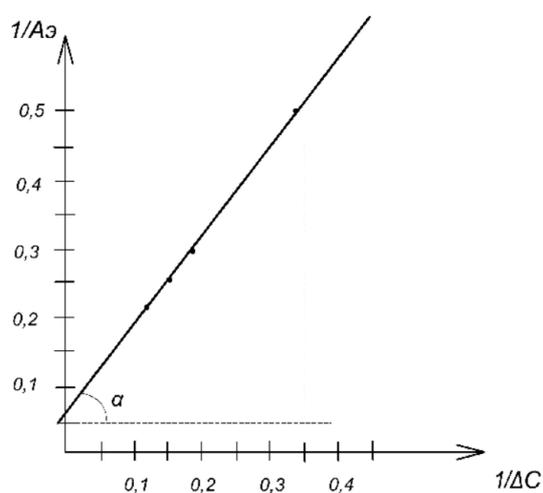


Рис. 2. Графическое определение констант уравнения Лэнгмюра

Для определения адсорбции по уравнению Фрейндлиха

$$A = K \cdot C_p^{1/n},$$

где K и $1/n$ – эмпирические константы, уравнение логарифмировали:

$$\lg A = \lg K + 1/n \lg C_p$$

Константы определялись графически по зависимости $\lg A$ от $\lg C_p$.

При экстраполяции прямая отсекает от оси ординат отрезок равный $\lg K$, а тангенс угла наклона его к оси абсцисс равен $1/n$ (рис. 3). Найденные величины констант составили: $K = 0,93$; $1/n = 0,84$.

Результаты представлены в табл. 3.

Графическая интерпретация зависимости найденных величин адсорбции от времени представлена на рис. 4.

Соотношение величин адсорбции экспериментальной и рассчитанной по уравнениям близко к единице, что свидетельствует о применимости двух уравнений

к исследуемым условиям адсорбции. Однако на рис. 4 видно, что к экспериментальной величине адсорбции ближе изотерма Фрейндлиха. Можно предположить, что поверхность сорбента неоднородная, пористая. Коэффициент распределения ионов Pb^{2+} между раствором и сорбентом составил 0,67.

Кинетические характеристики процесса сорбции, порядок реакции комплексообразования и константу скорости определяли

по зависимости: $\ln C$ от t и $\ln(1-F)$ от t , где F – степень достижения равновесия в системе (рис. 5, 6). Данные для построения графиков, изображенных на рис. 5, 6, приведены в табл. 4.

Линейность зависимости $\ln C$ от t позволяет утверждать, что процесс сорбции проходит по кинетике первого порядка. Найденная по тангенсу угла наклона прямой (рис. 6) к оси абсцисс константа скорости составила $0,011 \text{ мин}^{-1}$.

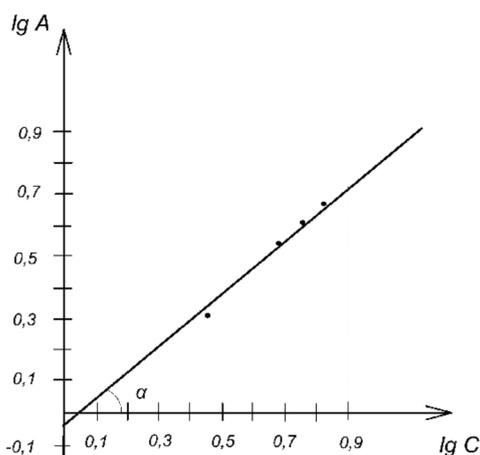


Рис. 3. Графическое определение констант уравнения Фрейндлиха

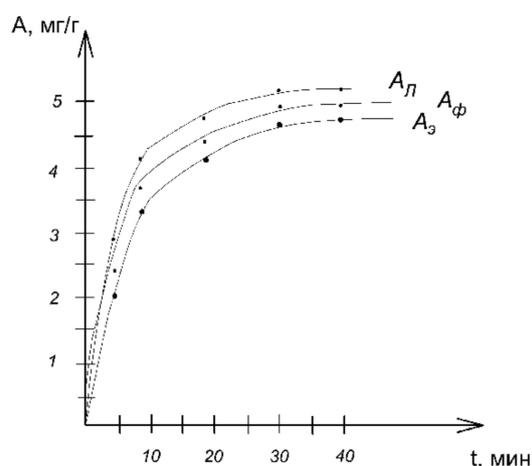


Рис. 4. Кинетика адсорбции ионов Pb^{2+}

Таблица 3

Зависимость величины адсорбции ионов Pb^{2+} от времени и концентрации

| t, мин | C Pb^{2+} , ммоль/л | ΔC | $A_{ЭК}$ | $1/A_3$ | $1/\Delta C$ | $\lg A_3$ | $\lg \Delta C$ | $A_{Л}$ | $A_{Ф}$ | $A_3/A_{Л}$ | $A_3/A_{Ф}$ | K_p |
|--------|-----------------------|------------|----------|---------|--------------|-----------|----------------|---------|---------|------------------------|------------------------|------------------|
| 0 | 40 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 5 | 37 | 3 | 2,0 | 0,50 | 0,33 | 0,30 | 0,477 | 2,77 | 2,34 | 0,72 | 0,85 | 0,67 |
| 10 | 35 | 5 | 3,3 | 0,30 | 0,20 | 0,52 | 0,698 | 4,09 | 3,59 | 0,81 | 0,92 | 0,67 |
| 20 | 34 | 6 | 4,0 | 0,25 | 0,17 | 0,60 | 0,778 | 4,64 | 4,19 | 0,86 | 0,99 | 0,67 |
| 30 | 33 | 7 | 4,7 | 0,21 | 0,14 | 0,67 | 0,845 | 5,13 | 4,77 | 0,92 | 0,99 | 0,67 |
| | | | | | | | | | | $A_3/A_{Л}(cp) = 0,83$ | $A_3/A_{Ф}(cp) = 0,94$ | $K_p(cp) = 0,67$ |

Таблица 4

Зависимость $\ln C$ и $\ln(1-F)$ от времени

| t, мин | C Pb^{2+} , ммоль/л | $\ln C$ | $F = A_3/A_{\infty}$ | $\ln(1-F)$ |
|--------|-----------------------|---------|----------------------|------------|
| 5 | 37 | 3,61 | 0,14 | -0,151 |
| 10 | 35 | 3,56 | 0,23 | -0,262 |
| 20 | 34 | 3,53 | 0,28 | -0,328 |
| 30 | 33 | 3,50 | 0,33 | -0,398 |

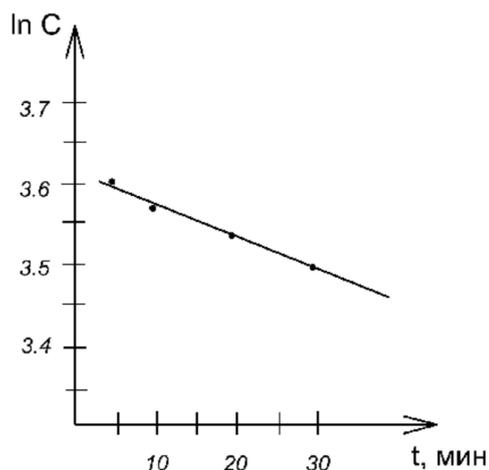


Рис. 5. Зависимость $\ln C$ от времени адсорбции

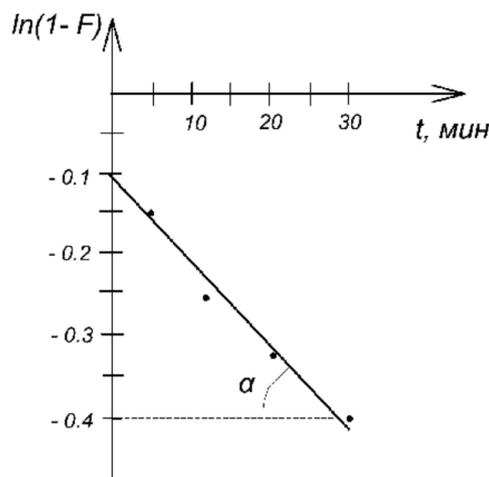


Рис. 6. Зависимость $\ln(1-F)$ от времени при сорбции ионов Pb^{2+}

Заключение

В результате исследования зависимости относительной вязкости растворов апитоксина от pH среды показано, что апитоксин относится к полиэлектролитам, изоэлектрическая точка его соответствует $pH = 3,7$.

Установлено наличие сорбционной способности по отношению к ионам Pb^{2+} . Получены величины адсорбции экспериментальные и рассчитанные по уравнениям Лэнгмюра и Фрейндлиха, построены изотермы адсорбции, показана применимость уравнений для описания процесса адсорбции. Степень извлечения ионов свинца составила 17,5%, что свидетельствует о детоксикационной способности апитоксина по отношению к экзогенному токсину – катионам свинца.

Изучена кинетика процесса сорбции, установлено, что процесс сорбции проходит по кинетике первого порядка. Небольшая величина скорости свидетельствует о быстром протекании процесса сорбции, равновесие наступает в течение 30 мин.

Найденные параметры физико-химических величин позволяют изучать биологическую активность и прогнозировать возможные технологические процессы для практического использования апитоксина.

Апитоксин был предоставлен индивидуальным предпринимателем г. Майкопа Краснодарского края Сердиным Юрием Павловичем.

Список литературы / References

1. 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. Т. 6. № 4. С. 351–366. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-351-366.

Butenko L.I., Kuleshova S.A., Podgornaya J.V., Mykots L.P., Dmitriev A.B. Physico-Chemical Studies of Apitoxin and Products on its Basis // Pharmacy and Pharmacology. 2018. Vol. 6. № 4. P. 351–366 (in Russian).

2. Su C.J., Lee M.T., Liao K.F., Shih O., Jeng U.S. Interplay of entropy and enthalpy in peptide binding to zwitterionic phospholipid membranes as revealed from membrane thinning. Phys. Chem. Chem. Phys. 2018 Oct 31; 20(42):26830-26836. DOI: 10.1039/c8cp02861c.

3. Niazi Z.R., Khan N., Khan S., Alam M., Kamal M.A. Potential Application of Venom Proteins in Designing of Medicines for Treating Human Neurodegenerative Disorders. Protein Pept Lett. 2018;25(7):633-642. Review. DOI: 10.2174/092986652566180614120407.

4. Scala E., Pirrotta L., Uasuf C.G., Mistrello G., Amato S., Guerra E.C., Locanto M., Meneguzzi G., Giani M., Cecchi L., Abeni D., Asero R. Aedes communis Reactivity Is Associated with Bee Venom Hypersensitivity: An in vitro and in vivo Study. Int. Arch. Allergy Immunol. 2018;176(2):101-105. DOI: 10.1159/000488866.

5. Dos Santos-Pinto J.R.A., Perez-Riverol A., Lasa A.M., Palma M.S. Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. Toxicon. 2018 Jun 15; 148:172-196. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.029.

6. Park J., Kwon O., An H.J., Park K.K. Antifungal Effects of Bee Venom Components on Trichophyton rubrum: A Novel Approach of Bee Venom Study for Possible Emerging Antifungal Agent. Ann Dermatol. 2018 Apr; 30(2):202-210. DOI: 10.5021/ad.2018.30.2.202.

7. Kang Y.M., Chung K.S., Kook I.H., Kook Y.B., Bae H., Lee M., An H.J. Inhibitory effects of bee venom on mast cell-mediated allergic inflammatory responses. Int J. Mol. Med. 2018 Jun; 41(6):3717-3726. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3558.

8. Somwongin S., Chantawannakul P., Chaiana W. Toxicon. Antioxidant activity and irritation property of venoms from Apis species. 2018 Apr; 145:32-39. DOI:10.1016/j.toxicon.2018.02.049.

9. Liu G., Zhu Z., Yang Y., Sun Y., Yu F., Ma J. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. Environ Pollut. 2018 Dec 1; 246:26-33. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.11.100.

10. Solanki A., Boyer T.H. Physical-chemical interactions between pharmaceuticals and biochar in synthetic and real urine. Chemosphere. 2018 Nov 27; 218:818-826. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.179.

11. Cantu J, Gonzalez D.F., Cantu Y., Eubanks T., Parsons J.G. Thermodynamic and Kinetic study of the removal of Cu²⁺ and Pb²⁺ ions from aqueous solution using Fe₇S₈ nanomaterial. *Microchem J.* 2018 Jul; 140:80-86. DOI: 10.1016/j.microc.2018.04.003.

12. Wu D., Feng M., Wang Z.X., Qiao K., Tachibana H., Cheng X.J. Molecular and biochemical characterization of key enzymes in the cysteine and serine metabolic pathways of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasit Vectors.* 2018 Nov 26; 11(1):604. DOI: 10.1186/s13071-018-3188-7.

13. Fukuba S., Akizuki T., Hoshi S., Matsuura T., Shujaa Addin A., Okada M., Tabata Y., Matsui M., Tabata M.J., Sugiura-Nakazato M., Izumi Y. Comparison between different isoelectric points of biodegradable gelatin sponges incorporating β -tricalcium phosphate and recombinant human fibroblast growth factor-2 for ridge augmentation: A preclinical study of saddle-type defects in dogs. *J. Periodontal Res.* 2018 Nov 25. DOI: 10.1111/jre.12628.

14. Perez-Alday E.A., Li-Pershing Y., Bender A., Hamilton C., Thomas J.A., Johnson K., Lee T.L., Gonzales R., Li A., Newton K., Tereshchenko L.G. Comparison between different isoelectric points of biodegradable gelatin sponges incorporating β -tricalcium phosphate and recombinant human fibroblast growth factor-2 for ridge augmentation: A preclinical study of saddle-type defects in dogs. *Comput Biol Med.* 2018 Nov 17;104:127-138. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2018.11.013.

15. Васина Т.М., Мыкоц Л.П., Туховская Н.А., Зяблицева Н.С., Белоусова А.Л., Компанцев В.А. Исследование сорбционной способности пектина, полученного кислотным экстрагированием из кожуры семян люпина // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 112. № 5. С. 115–117.

Vasina T.M., Mykoc L.P., Tuchowska N.A., Zyablitseva N.S., Belousova A.L., Kompancev V.A. The Study of Sorption Ability of the Pectin, Obtained by Lemon Acid Extraction from the Skin of Lupine's Seeds // Sibirskij medicinskij zhurnal. 2012. V. 112. № 5. P. 115–117 (in Russian).