

Stanovení obsahových látek propolisů různého geografického původu

MUSELÍK J.¹, MASTEIKOVÁ R.¹, SUCHÝ V.², CHALUPOVÁ Z.¹, OSTRÁ V.¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků

²Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav přírodních léčiv

Došlo 20. července 2009 / Přijato 10. srpna 2009

SOUHRN

Stanovení obsahových látek propolisů různého geografického původu

Strukturální rozmanitost obsahových látek propolisů, daná více rostlinnými zdroji, je příčinou proměnlivého složení a dosud nevyřešené standardizace. Hlavní podíl na biologických účincích je připisován flavonoidům a aromatickým kyselinám a jejich derivátům. Prezentované výsledky ilustrují proměnlivost ve složení deseti vzorků propolisů, získaných z různých oblastí ČR a dalších tří vzorků zahraničních. Pozornost byla věnována stanovení polyfenolů, obsahu flavonů a flavonolů a určení antioxidační aktivity. Výsledky potvrzují variabilitu sledovaných parametrů, i zastoupení chrysinu, galanginu, kyseliny *p*-kumarové, ferulové, skořicové a benzoové v závislosti na oblasti sběru. Bude obtížné vypracovat metodu standardizace, vhodnou pro možné aplikace propolisových přípravků. V budoucnu by se propolis mohl stát surovinou pro izolaci jednotlivých skupin biologicky aktivních látek.

Klíčová slova: propolis – flavonoidy – fenolické kyseliny – antioxidační aktivita – kapalinová chromatografie

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 179–183

SUMMARY

Determination of the constituents of propolis of different geographical origin

The structural diversity of propolis constituents, due to a larger number of plant sources, is the cause of diverse composition and the hitherto unsolved standardization. The principal share in the biological effects is ascribed to flavonoids and aromatic acids and their derivatives. The results presented in this paper illustrate the diversity of the compositions of ten propolis samples obtained from different regions of the Czech Republic and three samples from abroad. Attention was paid to the determination of polyphenols, content of flavones and flavonols and the assay of antioxidative activity. The results confirmed the variability of the parameters under study as well as the presence of chrysin, galangin, *p*-coumaric, ferulic, cinnamic and benzoic acids in dependence on the area of collection. It will be difficult to elaborate a method of standardization suitable for possible administration of propolis preparations. In the future, propolis could become a raw material for the isolation of individual groups of biologically active substances.

Key words: propolis – flavonoids – phenolic acids – antioxidative activity – liquid chromatography

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 179–183

Má

Úvod

Propolis je polykomponentní pryskyřičnatá substance, kterou včely sbírají z rostlinných zdrojů. Jeho složení podléhá změnám a závisí na vegetaci v okolí stanoviště

včel, ročním obdobím sběru i na plemenu včel. Obsahuje okolo 50–60 % balzámů, 30 % vosků, pyl a silice. Dosud bylo popsáno více než sto obsahových látek, které lze zařadit do následujících skupin: flavonoidy, aromatické kyseliny, alkoholy, aldehydy a estery, dále kumariny, ter-

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Jan Muselík, Ph.D.
Ústav technologie léků VFU
Palackého 1–3, 612 42 Brno
e-mail: muselikj@vfu.cz

peny, steroly, vosky, mastné kyseliny, aminokyseliny, vitamíny, enzymy a stopové prvky¹⁾. Tyto látky jsou zodpovědné za řadu biologických a farmakologických aktivit, jako např. antibakteriální²⁾, antiflogistické³⁾, antifungální⁴⁾, antioxidantní⁵⁾, imunomodulační⁶⁾, hepatoprotektivní⁷⁾, antivirové⁸⁾ a další. Díky těmto účinkům nachází propolis uplatnění ve zdravotnictví, kosmetice a potravinářském průmyslu⁹⁾.

Nestejnorodé složení a nevyřešená problematika standardizace jsou příčinou, proč není propolis zařazen do seznamu povolených léčiv. Navíc některé obsahové látky propolisu mohou vyvolat alergické reakce a kontaktní dermatitidy. Schopnost vyvolat kontaktní alergie byla testována u základních skupin obsahových látek propolisu (flavonoidy, hydroxyderiváty kyseliny skořicové, estery kyseliny kávové s C5 isomerními alkoholy – 3-metyl-2-butenyl ester a 3-metyl-3-butenyl ester). Byla prokázána možnost vyvolání alergie u cca 0,5 % testovaných „zdravých“ lidí. Naopak alergické reakce na propolis u pacientů léčících se na jiné alergie byly zaznamenány u přibližně 15 % testovaných dobrovolníků^{10–12)}. Přesto je i u nás propolis součástí několika volně prodejných přípravků. S tím souvisí problematika kvality, bezpečnosti, účinnosti a reprodukovatelnosti. Nelze předpokládat, že bude možné provést standardizaci propolisu na jednu jedinou obsahovou látku a že tato standardizace bude vyhovovat ve všech odvětvích, kde se propolis využívá. K tomuto účelu musí být dostupné vhodné analytické metody, které umožní kvantifikaci vybraných obsahových látek. Banková a kol. navrhuje řešení založené na formulaci různých druhů propolisu dle jejich rostlinného zdroje a tomu odpovídajícímu chemickému profilu¹³⁾.

Cílem práce je popsat postupy vhodné k analytickému hodnocení jednotlivých vzorků propolisu na základě stanovení obsahu celkových polyfenolických látek, flavonů, flavanolů a jejich antioxidantní aktivity a chromatografic-

ké stanovení vybraných obsahových látek. U analyzovaných vzorků propolisů různého geografického původu je popsána variabilita jejich chemického složení.

POKUSNÁ ČÁST

Materiál

Analyzované vzorky propolisu pocházely z různých lokalit České republiky. Dále byl analyzován propolis z Ruska, Brazílie a Kuby (tab. 1).

Při stanovení vybraných obsahových látek pomocí kapalinové chromatografie byly použity standardy galangin (Sigma), chrysin (Aldrich), kyselina benzoová (Fluka), kyselina ferulová (Aldrich), kyselina *p*-kumarová (Sigma) a kyselina skořicová (Fluka).

Ke stanovení obsahu polyfenolických sloučenin a antioxidantní aktivity byly použity chemikálie: DPPH a kvercetin (Sigma), kyselina galová a Folin-Ciocalteuovo činidlo (Fluka).

Všechny ostatní použité chemikálie byly komerčně dostupné a byly p.a. čistoty.

Metodika

Příprava propolisových extraktů

Vzorky propolisu byly zmrazeny kapalným dusíkem a důkladně rozetřeny ve třence. Připravené homogenní směsi byly použity na přípravu extraktů. Extrakty byly připraveny tak, že se navázilo 2,0 g propolisu a doplnilo se 70% ethanolem na 20,0 g. Takto byly připraveny tři vzorky extraktů od každého druhu propolisu. Po 24 hodi-

Tab. 1. Charakteristiky analyzovaných vzorků propolisu

Vzorek	Oblast sběru	Rostlinný zdroj
PM1	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	smíšený les s dominujícím zastoupením buku a jedle
PM 2	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	jehličnatý les s dominujícím zastoupením modřínu, borovice a jedle
PM 3	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	smíšený les s dominujícím zastoupením dubu, buku, smrku a modřínu
PM 4	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	jehličnatý les s dominujícím zastoupením modřínu, smrku a borovice
PM 5	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	značná druhová diverzita
PM 6	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	smíšený les s dominujícím zastoupením borovice a olše
PM 7	Plzeňský kraj (lesní komplexy na Klatovsku a na Plzni – jihu)	značná druhová diverzita
ZL	Zlínský kraj (Kelč – okres Vsetín, Beskydy)	smíšený les s dominujícím zastoupením borovice, javoru, dubu a buku
PA	Pardubický kraj (Česká Třebová – okres Ústí nad Orlicí, podhůří Orlických hor)	jehličnatý les s dominujícím zastoupením borovice a menším zastoupením smrku a modřínu
HK	Královéhradecký kraj (Potštejn – okres Rychnov nad Kněžnou, Orlické hory)	neznámý
RUS	Rusko (Pjatigorsk, Kavkaz)	neznámý
CUB	Kuba	neznámý
BRA	Brazílie	neznámý

nách vyluhování byly zakalené a shluky obsahující extrakty zfiltróvány. Získaly se čiré, hnědožluté extrakty, které byly použity k analýzám.

Chromatografická analýza

Pro stanovení obsahových látek byl použit kapalinový chromatograf HP 1100 (Agilent Technologies) s kvaternární pumpou, automatickým dávkovačem a detektorem s diodovým polem. Chromatografické separace byly provedeny na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 × 50 mm; 1,8 μm). Složení rozpouštědel bylo 6 % methanolu (A), 4 % acetonitrilu (B) a 90 % 40 mM kyseliny mravenčí (C) použitých s následujícím gradientem: 12,5 % (A), 15 % (B), 72,5 % (C) do 6. minuty; 0 % (A), 28 % (B), 72 % (C) do 7. minuty; 0 % (A), 32 % (B), 68 % (C) do 20. minuty; 0 % (A), 60 % (B), 40 % (C) do 30. minuty; 0 % (A), 100 % (B), 0 % (C) do 31. minuty. Celková délka analýzy byla 35 minut. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min; teplota kolony byla 40 °C. Spektra byla snímána v rozmezí 190–400 nm. Byly dávkovány 2 μl propolisových extraktů naředěných 70% ethanolem v poměru 1 : 19 (v/v).

Stanovení celkových polyfenolických látek

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven spektrofotometricky¹⁴⁾. 700 μl vhodně naředěného propolisového extraktu bylo oxidováno Folin-Ciocalteuovým činidlem (400 μl) a potom byla reakční směs doplněna do 10,0 ml roztokem uhličitanu sodného (75 g/l). Po 2 hodinách byla suspenze odstředěna (10 min při 5000 ot./min) a byla změřena výsledná absorbance při 760 nm. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky pro kyselinu galovou. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové (GAE) v g na 100 ml vzorku propolisového extraktu.

Stanovení celkového obsahu flavonů a flavonolů

Celkový obsah flavonů a flavonolů byl stanoven spektrofotometricky¹⁵⁾. 1,0 ml vhodně naředěného propolisového extraktu bylo smícháno s 10% roztokem chloridu hlinitého (200 μl) a doplněno do 10,0 ml methanolem. Po 30 minutách byla změřena výsledná absorbance při 425 nm. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky pro kvercetin. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kvercetinu (QE) v mg na 100 ml vzorku propolisového extraktu.

Antioxidační aktivita

Schopnost zhášet radikály byla sledována spektrofotometricky¹⁴⁾ pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Vhodně naředěný propolisový extrakt (200 μl) byl doplněn do 2,0 ml 0,1 mM DPPH v methanolu a po 5 minutách byla změřena absorbance při 517 nm. Redukce DPPH byla vypočítána relativně k hodnotě absorbance v kontrolním měření a zjištěná aktivita byla porovnána s kalibrační křivkou pro kvercetin. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent antioxidač-

ní aktivity kvercetinu v μmol na 100 ml vzorku propolisového extraktu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Propolisové extrakty z různých geografických lokalit byly hodnoceny za použití několika analytických postupů. Metody stanovení celkových polyfenolických látek, flavonů, flavonolů a antioxidační aktivity jsou založeny na spektrofotometrickém měření vzniklého barevného produktu. Výsledky těchto screeningových metod byly doplněny o stanovení vybraných obsahových látek pomocí kapalinové chromatografie.

Tab. 2. Antioxidační aktivita a celkové obsahy polyfenolických látek, flavonů a flavonolů ve studovaných vzorcích propolisu

Vzorek	Celkový obsah polyfenolických látek (GAE g/100 ml)	Celkový obsah flavonů a flavonolů (QE mg/100 ml)	Antioxidační aktivita (QE μmol/100 ml)
PM1	1,152 ± 0,030	43,2 ± 0,7	686 ± 4
PM 2	1,634 ± 0,046	101,2 ± 0,6	901 ± 3
PM 3	1,328 ± 0,036	90,9 ± 2,4	529 ± 22
PM 4	1,886 ± 0,021	105,2 ± 4,0	1078 ± 10
PM 5	1,803 ± 0,048	92,8 ± 0,8	956 ± 3
PM 6	1,146 ± 0,011	49,5 ± 0,6	892 ± 9
PM 7	1,737 ± 0,037	96,7 ± 0,8	1021 ± 3
ZL	2,034 ± 0,062	405,0 ± 3,1	2591 ± 124
PA	1,828 ± 0,038	376,2 ± 1,2	1866 ± 46
HK	2,487 ± 0,035	482,8 ± 7,3	3348 ± 38
RUS	2,262 ± 0,148	417,4 ± 11,8	1030 ± 54
CUB	0,093 ± 0,004	4,9 ± 0,1	33 ± 9
BRA	1,512 ± 0,016	61,1 ± 0,7	533 ± 10

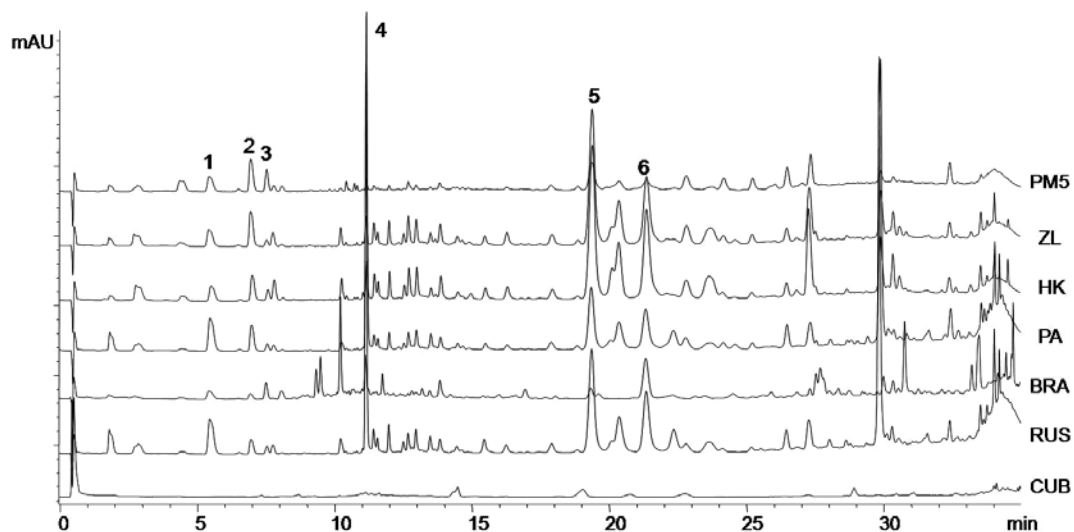
Výsledky jsou uvedeny jako průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

Byla proměřena antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolických látek, flavonů a flavonolů několika propolisů z České republiky a dále vzorky z Ruska, Brazílie a Kuby (tab. 1). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 2. Zjištěná antioxidační aktivita byla v rozmezí hodnot 33–3348 μmol ekvivalentu kvercetinu/100 ml propolisového extraktu. Celkový obsah fenolických látek byl v rozmezí hodnot 0,093–2,487 gramů ekvivalentu kyseliny galové/100 ml propolisového extraktu a celkových obsah flavonů a flavonolů byl v rozmezí hodnot 4,9–483 mg ekvivalentu kvercetinu/100 ml propolisového extraktu. U studovaných propolisových extraktů byly nalezeny několikanásobně vyšší obsahy celkových flavonů a flavonolů u vzorků ze Zlínského (ZL), Pardubického (PA), Královéhradeckého (HK) kraje a ruského propolisu. Antioxidační aktivita byla výrazně vyšší u vzorků ZL, PA a HK. Tato zjištění lze pravděpodobně vysvětlit různými rostlinnými zdroji v daných lokalitách. Vyjma kubánského vzorku, který vykazoval při všech analýzách

Tab. 3. Kvantitativní zastoupení vybraných obsahových látek ve studovaných vzorcích propolisu

Vzorek	Kyselina <i>p</i> -kumarová	Kyselina ferulová	Kyselina benzoová	Kyselina skořicová	Chrysin	Galangin
PM1	1712 ± 151	1207 ± 162	845 ± 112	43 ± 7	368 ± 26	347 ± 24
PM 2	1762 ± 24	1477 ± 9	722 ± 16	49 ± 5	1275 ± 35	833 ± 14
PM 3	2553 ± 103	1475 ± 84	858 ± 91	40 ± 2	840 ± 21	808 ± 25
PM 4	2464 ± 315	1973 ± 189	2459 ± 310	64 ± 7	1090 ± 60	754 ± 33
PM 5	819 ± 13	689 ± 14	1081 ± 13	59 ± 4	345 ± 11	181 ± 4
PM 6	2710 ± 292	1977 ± 62	2145 ± 291	68 ± 2	401 ± 3	328 ± 6
PM 7	1082 ± 109	685 ± 65	1074 ± 96	56 ± 6	163 ± 14	137 ± 16
ZL	883 ± 79	718 ± 62	305 ± 28	145 ± 10	1625 ± 101	1360 ± 117
PA	1776 ± 30	524 ± 10	335 ± 6	1627 ± 29	784 ± 15	790 ± 26
HK	740 ± 29	511 ± 15	520 ± 8	194 ± 2	1950 ± 108	1773 ± 145
RUS	1776 ± 141	288 ± 25	340 ± 29	1700 ± 128	1167 ± 96	1015 ± 71
CUB	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
BRA	368 ± 24	102 ± 6	850 ± 55	222 ± 13	< 10	< 10

Výsledky jsou uvedeny v µg/ml jako průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.



Obr. 1. Chromatogramy vzorků propolisu z různých lokalit kyselina *p*-kumarová (1), kyselina ferulová (2), kyselina benzoová (3), kyselina skořicová (4), chrysin (5), galangin (6)

velmi nízké obsahy sledovaných látek, byly zjištěné rozdíly v obsahu celkových polyfenolických látek mezi jednotlivými vzorky menší než u předchozích dvou testů (antioxidační aktivita a stanovení celkového obsahu flavonů a flavonolů). Vzorek s nejvyšším obsahem polyfenolických látek (HK) obsahoval přibližně dvojnásobné množství těchto látek než vzorek PM6.

U všech studovaných propolisových extraktů byla provedena jednoduchá regresní analýza mezi antioxidační aktivitou a celkovým obsahem polyfenolických látek a celkovým obsahem flavonů a flavonolů. Zjištěné korelační koeficienty ukazují na signifikantní lineární závislost mezi množstvím obsažených látek a schopností redukovat DPPH ($r > 0,73$; $p < 0,01$).

Pomocí kapalinové chromatografie byly v propolisových extraktech kvantifikovány kyselina *p*-kumarová, ferulová, benzoová, skořicová a flavonoidy chrysin a galangin (tab. 3). Ze získaných výsledků vyplývá, že obsahy sledovaných látek se mění velmi významně v závislosti na lokalitě sběru. V kubánském propolisu byly všechny stanovované látky pod limitem stanovení, což souhlasí s výsledky spektrofotometrických metod. Rostlinné zdroje pro tento propolis byly tedy značně odlišné než u ostatních analyzovaných vzorků a obsahovaly jen velmi málo polyfenolických látek a neobsahovaly pro propolis typické fenolické kyseliny (obr. 1). Brazílský propolis neobsahuje chrysin a galangin, což lze opět vysvětlit odlišnými rostlinnými zdroji v dané oblas-

ti. Výsledky analýz vzorků z České republiky potvrzují výrazný vliv lokality sběru a rostlinných zdrojů na množství obsahových látek. Ruský propolis byl obsahem stanovených látek podobný výsledkům získaných při analýzách propolisů z České republiky.

Dosažené výsledky potvrzují problematičnost „normalizace“ propolisu jako suroviny pro medicínské využití. Nicméně použité analytické postupy jsou vhodné pro analýzy propolisu a mohou sloužit jako kontrolní metody. Pro získání alespoň částečně „normalizované“ suroviny by bylo nutné vytvořit kvantitativní kritéria například na obsahy celkových polyfenolických látek, celkových flavonů a flavonolů a vybraných obsahových látek stanovených pomocí HPLC. Existuje celá řada látek s výrazným zastoupením a vysokou biologickou aktivitou, potenciálně vhodných pro standardizaci, které se ale vyskytují jen v některých typech propolisu z určitých oblastí¹³. Z tohoto důvodu není možná univerzální standardizace propolisu. Je zapotřebí ji vztáhnout ke konkrétnímu rostlinnému druhu, případně lokalitě a odpovídajícímu chemickému profilu.

Tato práce vznikla za podpory projektu E 3694, PROPOCREAM, identifikační kód OE 235.

LITERATURA

1. **Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S.:** *Phytother. Res.*, 2001; 15, 561–571.
2. **Lu, L. C., Chen, Y. W., Chou, C. C.:** *Int. J. Food Microbiol.*, 2005; 102, 213–220.
3. **Borrelli, F. et al.:** *Fitoterapia*, 2002; 73 Suppl. 1, 53–63.
4. **Sawaya, A. C. H. F. et al.:** *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002; 35, 203–207.
5. **Moreira, L. et al.:** *Food Chem. Toxicol.*, 2008; 46, 3482–3485.
6. **Sforcin, J. M.:** *J. Ethnopharmacol.*, 2007; 113, 1–14.
7. **Banskota, A. H. et al.:** *Phytomedicine*, 2001; 8, 16–23.
8. **Gekker, G. et al.:** *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 102, 158–163.
9. **Lucrecia, L. et al.:** *Food Sci. Technol.*, 2009; 42, 1422–1427.
10. **Hegyí, E., Suchý, V., Nagy, M.:** *Hautarzt*, 1990; 41, 675–679.
11. **Hausen, B. M. et al.:** *Contact Dermatitis*, 1987; 17, 163–170.
12. **Hausen, B. M. et al.:** *Contact Dermatitis*, 1987; 17, 171–177.
13. **Bankova, V.:** *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 100, 114–117.
14. **Šmejkal, K. et al.:** *Molecules*, 2007; 12, 1210–1219.
15. **Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V.:** *Chem. Cent. J.*, 2007; 1, 1–4.

Abstrakta z akcí ČFS v časopisu Česká a slovenská farmacie

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie nabízí možnost zveřejňovat limitované množství abstrakt z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností, například symposií, seminářů, pracovních dnů apod.

Jednotlivá abstrakta (písmo Courier New, velikost 12, řádkování 2), by neměla přesáhnout 1 rukopisnou stranu formátu A4.

Počet abstrakt předem dohodnou předsedové příslušných sekcí, které akci pořádají, případně osoby zodpovědné za akci s redakcí časopisu, která poskytne i bližší informace.

Lze zveřejnit rovněž na internetových stránkách ČFS (www.cfs-cls.cz)

Kontakt:

doc. RNDr. Pavel Komárek, PhD., vedoucí redaktor, Katedra farmaceutické technologie a kontroly léčiv IPVZ
100 05 Praha 10, Ruská 85, e-mail: komarek@ipvz.cz, tel.: 271 019 278