



*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej*



Jolanta Kaleta

**ANALIZA FIZYKOCHEMICZNA PROPOLISU
I MOŻLIWOŚCI JEGO STANDARYZACJI**

Praca Doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Jan Krzek

Kraków 2007

Promotorowi

Panu Prof. dr hab. Janowi Krzekowi

Za pomoc przy wyborze interesującego tematu,
okazaną życzliwość i cenne wskazówki
przy realizacji i redagowaniu niniejszej pracy

składam serdeczne podziękowania

Panu Prezesowi Ryszardowi Tomaszewskiemu,
Panu Dyrektorowi Krzysztofowi Iszczukowi
oraz
Panu Dyrektorowi Krystianowi Sodzawicznemu

Za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej
w Przedsiębiorstwie Pszczelarsko-Farmaceutycznym
„Apipol-Farma”
oraz wszelką okazaną pomoc i życzliwość

składam serdeczne podziękowania

Koleżankom i Kolegom

Za wsparcie i pomoc przy realizacji pracy

Z serca dziękuję

SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| WYKAZ SKRÓTÓW | 4 |
| 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA | 6 |
| 1.1. Wprowadzenie | 6 |
| 1.2. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne | 8 |
| 1.2.1. Skład chemiczny | 8 |
| 1.2.2. Aktywność przeciwbakteryjna | 11 |
| 1.2.3. Aktywność przeciwgrzybiczna | 13 |
| 1.2.4. Aktywność przeciwwirusowa | 14 |
| 1.2.5. Właściwości antyoksydacyjne | 15 |
| 1.2.6. Działanie przeciwzapalne | 18 |
| 1.2.7. Działanie hepatoprotekcyjne | 19 |
| 1.2.8. Działanie przeciwnowotworowe | 20 |
| 1.3. Działania niepożądane | 21 |
| 2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY..... | 23 |
| 3. APARATURA, SPRZĘT, ODCZYNNIKI, SUBSTANCJE WZORCOWE | 26 |
| 4. METODYKA BADAŃ | 30 |
| 4.1. Materiały do badań | 30 |
| 4.1.1. Przygotowanie nalewek propolisowych do badań | 31 |
| 4.2. Metody stosowane w badaniach | 32 |
| 4.2.1. Oznaczenie składników nieorganicznych metodą AAS | 32 |
| 4.2.2. Oznaczanie kwasów fenolowych metodą HPLC | 33 |
| 4.2.3. Oznaczanie flawonoidów metodą spektrofotometryczną | 34 |

| | |
|---|----|
| 4.2.4. Oznaczenie pinocembryny, galanginy, chryzyny, octanu pinobanksyny oraz estrów kwasu kawowego metodą HPLC | 36 |
| 4.2.5. Analiza TLC etanolowych ekstraktów propolisowych | 38 |
| 4.2.6. Rozdział chromatograficzny nalewek propolisowych | 39 |
| 4.2.7. Analiza GC-MS frakcji propolisowych | 40 |
| 4.2.8. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej | 41 |
| 4.2.9. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej substancji porównawczych | 43 |
| 4.2.10. Oznaczenie aktywności przeciwgrzybiczej | 46 |
| 4.2.11. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej | 47 |
| 4.3. Walidacja metod | 48 |
| 4.4. Statystyczna ocena wyników | 50 |
| | |
| 5. ANALIZA FIZYKOCHEMICZNA | 53 |
| 5.1. Ocena chemiczna | 53 |
| 5.2. Oznaczenie składników nieorganicznych metodą AAS | 54 |
| 5.2.1. Oznaczenie zawartości jonów miedzi, cynku i żelaza | 55 |
| 5.2.2. Oznaczenia zawartości jonów metali ciężkich | 56 |
| 5.3. Analiza TLC ekstraktów propolisowych | 58 |
| 5.4. Identyfikacja i oznaczenie kwasów fenolowych | 59 |
| 5.4.1. Walidacja metody | 60 |
| 5.4.2. Oznaczenie kwasów: kawowego, p-kumarowego i ferulowego | 63 |
| 5.5. Oznaczenie flawonoidów metodą spektrofotometryczną | 68 |
| 5.6. Oznaczenie pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy metodą HPLC | 69 |
| 5.6.1. Walidacja metody | 69 |
| 5.6.2. Analiza składników w nalewkach propolisowych | 71 |
| 5.7. Oznaczenie estru 1,1-dimetyloallilowego i fenyloetylowego metodą HPLC | 76 |

| | |
|--|-----|
| 5.7.1. Walidacja metody | 77 |
| 5.7.2. Oznaczenie estrów kwasu kawowego w nalewkach | 79 |
| 5.8. Identyfikacja składników aktywnych w nalewkach propolisowych | 83 |
| 5.8.1. Analiza frakcji otrzymanych z nalewek metodą HPLC | 84 |
| 5.8.2. Analiza frakcji metodą GC-MS | 90 |
| | |
| 6. ANALIZA BIOLOGICZNA | 97 |
| 6.1. Aktywność przeciwbakteryjna | 97 |
| 6.1.1. Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej produktów oraz roztworów modelowych | 97 |
| 6.1.2. Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej frakcji propolisowych | 104 |
| 6.2. Aktywność przeciwgrzybicza nalewek propolisowych | 108 |
| | |
| 7. AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA | 112 |
| 8. DYSKUSJA WYNIKÓW | 117 |
| 9. WNIOSKI | 131 |
| 10. STRESZCZENIE | 133 |
| 11. PIŚMIENNICTWO | 136 |

WYKAZ SKRÓTÓW

LOD – limit detekcji

LOQ – granica oznaczalności

x – stężenie oznaczanego składnika,

y – pole powierzchni oznaczanego składnika,

S_y – błąd standardowy estymacji,

r – współczynnik korelacji,

p – poziom istotności,

S_b – błąd standardowy oszacowania wyrazu wolnego „b”,

S_a – błąd standardowy oszacowania współczynnika kierunkowego prostej „a”,

\bar{x} – wartość średnia;

R_s – rozdzielczość pików

RT – czas retencji

N – liczba pól teoretycznych,

Asym – współczynnik asymetrii

MIC – najmniejsze stężenie hamujące (Minimal Inhibitory Concentration)

BSTFA – N, O –bis –trimetylosilylotrifluoroacetamid

TMCS – trimetylochlorosilan

HPLC – chromatografia cieczowa wysokociśnieniowa (High Performance Liquid Chromatography)

GC – chromatografia gazowa (Gas Chromatography)

MS – spektrometria masowa

GC-MS – chromatografia gazowa z detektorem masowym

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (Thin Layer Chromatography)

ICH – Międzynarodowa Komisja ds. Harmonizacji (International Conference on Harmonization)

PN – Polska Norma

BA – bulion antybiotykowy

BAA – bulion antybiotykowy z agarem

ACN – acetonitryl

CUPRAC – metoda oznaczania aktywności antyoksydacyjnej polegająca na redukcji jonów Cu (II) do Cu (I) (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

RNA – kwas rybonukleinowy

mRNA – matrycowy (lub informacyjny) RNA (messenger RNA)

IL1 β – interleukina 1 β

NF- κ B – czynnik transkrypcyjny

NADPH – wodorofosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

TNF – czynnik martwicy nowotworu (Tumor Necrosis Factor)

ADP – adenozyndifosforan

COX – cyklooksygenaza

AAS – atomowa spektrometria absorpcyjna

SPE – ekstrakcja do fazy stałej (Solid Phase Extraction)

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Wprowadzenie

Nazwa *propolis* pochodzi z języka greckiego i składa się z dwóch słów: *pro* - dla, w obronie i *polis* – miasto, co może oznaczać w obronie miasta (1). Propolis, czyli kit pszczeli jest stosowany przez pszczoły jako materiał budulcowy, wzmacniający konstrukcję ula, uszczelniający ul przed wnikaniem wody a także utrzymujący gniazdo w odpowiednich warunkach higienicznych. Propolisem pszczoły polerują i dezynfekują wnętrza komórek w plastrach przed złożeniem w nich jaj przez królową. Znajdujący się w gnieździe propolis zabezpiecza jego wnętrze przed rozwojem drobnoustrojów i służy do mumifikacji przypadkowych owadów, a nawet drobnych gryzoni, które po wtargnięciu do gniazda zostały przez pszczoły zażądłone.

Propolis jest wytwarzany przez pszczoły ze smolistych i balsamicznych substancji pączków kwiatowych i kory wielu drzew liściastych oraz żywic występujących na uszkodzonych częściach drzew a następnie wzbogacany przez pszczoły w wosk i wydzielinę gruczołów pszczelich (2,3).

Właściwości lecznicze propolisu znane były już Starożytnym Grekom, Egipcjanom i Rzymianom. Propolis stosowano między innymi do leczenia ran i balsamowania zwłok. W 12 wieku naszej ery preparaty z propolisem były zalecane w leczeniu infekcji jamy ustnej i gardła, jak również próchnicy zębów (4). Właściwości antybiotyczne, przeciwzapalne i miejscowo znieczulające propolisu zachęcają do jego wykorzystania w terapii schorzeń skóry i błon śluzowych. Dobre efekty uzyskano w leczeniu trudnych schorzeń takich jak ropne zakażenia skóry, zakażone rany oparzeniowe, grzybice i rany popromienne. Propolis znajduje zastosowanie w leczeniu powikłanych ran

pooperacyjnych, schorzeniach otolaryngologicznych, stomatologicznych, oftalmologicznych a także w ginekologii, proktologii oraz innych (3).

Ze względu na szerokie zastosowanie propolisu w leczeniu pojawiło się na rynku wiele preparatów zawierających w składzie propolis zarejestrowanych jako leki, suplementy diety lub kosmetyki. Najpowszechniej stosowanym preparatem propolisowym, znanym od wieków, jest nalewka propolisowa ale dostępne są również inne postacie takie jak tabletki, kapsułki, maści, żele, czopki doodbytnicze, gałki dopochwowe, ekstrakty wodne i glicerolowe, pasty do zębów i płyny do płukania jamy ustnej.

Wytwarzanie preparatów leczniczych, spożywczych i kosmetycznych wymaga stosowania surowca o powtarzalnych parametrach fizykochemicznych i określonych właściwościach biologicznych w celu zagwarantowania odpowiedniej jakości, bezpieczeństwa i skuteczności terapii.

Liczne badania dowodzą, że skład chemiczny propolisu jest różny w zależności od regionu geograficznego dlatego poznanie jego składu, który jest odpowiedzialny za aktywność biologiczną wydaje się mieć istotne znaczenie dla technologii wytwarzania gotowych preparatów jak również terapii. Należy podkreślić, że próbki pochodzące z różnych rejonów świata, o zróżnicowanym składzie chemicznym wykazują podobne właściwości biologiczne co świadczy o złożoności tego problemu. Standaryzacja propolisu powinna opierać się nie tylko na analizie właściwości biologicznych ale również na analizie jakościowej i ilościowej składników chemicznych (5).

1.2. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne

1.2.1. Skład chemiczny

Skład chemiczny propolisu jest bardzo różnorodny i zależy przede wszystkim od szaty roślinnej. Przyjmuje się, że w 50 % do 55 % składa się z żywic, 25 % do 35 % to woski, 10 % substancje lotne, 5 % pyłek kwiatowy a pozostałe 5 % to różne substancje organiczne i mineralne (6).

Badania dowodzą, że pszczoły wykazują preferencję w wyborze surowca do produkcji propolisu. Propolis strefy umiarkowanej jest wytwarzany przede wszystkim z wydzieliny pączków topoli *Populus sp.* przy czym w Bułgarii, Włoszech, Szwajcarii może to być *Populus nigra* (7,8,9) w Albanii *Populus canadensis* (10) a w Kanadzie *Populus deltoides*, *Populus fremonti* lub *Populus maximowiczii* (11). Charakterystyczny dla topoli profil związków stwierdzono również w próbkach propolisu z południowej Brazylii, Urugwaju, Wenezueli (6,13,14,18). W krajach o klimacie tropikalnym pszczoły wykorzystują inne źródła. Podstawowym surowcem do produkcji propolisu brazylijskiego jest *Baccharis dracunculifolia* (6,12,15,16,17) oraz *Hyptis divaricata* (6,12) ale wskazuje się również inne rośliny takie jak *Araucaria heterophylla*, *Clusia major* i *Clusia minor* (6).

Pochodzenie propolisu z tych samych roślin nie gwarantuje jednak takiego samego składu chemicznego. Okazało się, że wydzieliny z pączków *Topoli czarnej* z rejonów Bułgarii i Albanii różnią się w sposób istotny zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym (10). Propolis z topoli zawiera w swoim składzie flawonoidy (pinocembryna, pinobanksyna, octan pinobanksyny, galangina), kwasy fenolowe (przede wszystkim kwas kawowy) oraz ich estry.

Związki chemiczne występujące w największych ilościach w próbkach propolisu europejskiego to:

- flawonoidy (kwercetyna, kemferol, galangina, naringenina, chryzyna, pochodne kwercetyny, pochodne naringeniny, pinobanksyna, octan pinobanksyny) (7,8,18,19)
- kwasy fenolowe (kwas kawowy, p-kumarowy, 3-hydroksy cynamonowy, benzoesowy, cynamonowy,) (7,9,10,20)
- estry kwasów fenolowych (ester 3-metylo-3-butenyloowy kwasu kawowego, ester pentenyloowy kwasu kawowego, ester 3-metylo-2-butenyloowy kwasu kawowego, ester benzyloowy kwasu kawowego, ester feniloetyloowy kwasu kawowego, ester 3-metylo-3-butenyloowy kwasu ferulowego, ester 3-metylo-2-butenyloowy kwasu ferulowego, ester benzyloowy kwasu trans p-kumarowego, ester cynamonowy kwasu p-kumarowego (9,10,19).

We frakcji lotnej stwierdzono obecność takich związków jak: farnesol, gwajol, dihydroeudesmol, neralidol, β -bisabolen, ester feniloetyloowy kwasu benzoesowego (21).

Skład propolisu kanadyjskiego i propolisu z Nowej Zelandii wykazuje profil związków charakterystyczny dla topoli (pinocembryna, pinobanksyna, octan pinobanksyny, galangina) (11,22). Propolis turecki różni się zawartością w zależności od miejsca zbioru. W próbkach z rejonów Kazan stwierdzono obecność kwasu izopimarowego, pochodnych androstanu, w rejonie Marmaris kwasy abietynowy, dihydroabietynowy, izomery kwasu kawowego (23), w rejonach Bursa flawonoidy, kwasy aromatyczne i ich estry, terpenoidy i ketony (24). W próbkach propolisu chińskiego zidentyfikowano akacetynę, izoramnetynę, apigeninę, pinocembrynę, kwas benzoesowy, pochodne benzaldehydu, kwas gallusowy, kawowy, p-kumarowy, ferulowy, cynamonowy i wanilinę (16,25). Z propolisu chilijskiego wyizolowano pinocembrynę, akacetynę, galanginę, izalpinę, kemferyd, prenyleptynę i charytepton oraz 17 innych związków należących do grupy fenylpropanu, benzaldehydu, dihydrobenzofuranu i baznopiron (26,27).

Wiele prac naukowych dotyczyło składu propolisu brazylijskiego. Najbardziej popularnym jest propolis o kolorze zielonym, którego źródłem jest *Baccharis dracunculifolia*. Taki propolis jest charakterystyczny przede wszystkim dla rejonów południowo-wschodnich i zawiera w swoim składzie następujące związki: prenylowe pochodne fenylopropanu, prenylowe pochodne kwasu cynamonowego w tym znana ze swoich właściwości farmakologicznych artepilina C (kwas 4-hydroksy-3,5-diprenylocynamonowy), estry prenylowych pochodnych kwasu cynamonowego (ester allilowy kwasu 3-prenylocynamonowego), benzofurany, mono i seskwiterpeny (farnesol), diterpeny typu labdanu (kwas izokupresowy, kwas agatowy), diterpeny typu klerodanu (kwas 13-symfioretikulowy), nietotne seskwiterpeny (lakton dehydrokustusowy), kwas 3-prenylocynamonowy (6,15,16).

W wodnych ekstraktach z propolisu brazylijskiego stwierdzono obecność pochodnych kwasu kawoilochinowego (16).

Składnikami obecnymi w propolisie brazylijskim są również flawonoidy (kemferyd, izosakuranetyna, kemferol, pochodne aromadendryny, pochodne kemferolu (17,18,28)), kwasy fenolowe (kwas kawowy, p-kumarowy, ferulowy, cynamonowy (17,28,29)). W próbkach z rejonów południowych oznaczono znaczne ilości 2,2-dimetylo-6-karboksyetylo-2H-1-benzopironu oraz kwasu 6-propenowego-2,2-dimetylo-8-prenylo-2H-1-benzopironu (28).

Ze związków niepolarnych w propolisie brazylijskim stwierdzono kwasy tłuszczowe o długości łańcuch od C₂₂ do C₃₄ i od C₁₆ do C₁₈ oraz alkohole pierwszorzędowe o długości łańcucha od C₂₆ do C₃₂ (30).

W północnych rejonach Brazylii występuje propolis czerwony, który zawiera w swoim składzie między innymi: pochodne fenylopropanu (metyloeugenol, trans metyloizoeugenol, trans anetol), alkohole triterpenowe

(typu α i β -amyryny, lupeol), izoflawonoidy (izosatiwan, pterokarpan, medikarpina), benzofenony (31).

1.2.2. Aktywność przeciwbakteryjna

Przeciwbakteryjne działanie propolisu zostało niejednokrotnie udowodnione w licznych badaniach naukowych przy czym znacznie większą aktywność stwierdzono wobec bakterii gram dodatnich niż gram ujemnych (32,33,34,35). Propolis działa silnie przeciwbakteryjnie w odniesieniu do szczepów *Staphylococcus aureus* i bakterie z tego rodzaju są najczęściej stosowane w badaniach do oceny propolisu (36,37,38).

Propolis posiada aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do patogenów powodujących parodontozę zębów a więc *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, bakterii z rodzaju *Fusobacterium* (39,40), *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* (40). Powstanie i rozwój próchnicy wiąże się z obecnością na powierzchni zębów bakterii takich jak *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguinis*. W eksperymentach naukowych propolis hamował wzrost powyższych mikroorganizmów oraz aktywność bakteryjnej glukozylotransferazy (41,42).

Propolis działa przeciwbakteryjnie w stosunku do *Helicobacter pylori*, bakterii odpowiedzialnej za występowanie wrzodów żołądka oraz *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* (43,44).

Sprzeczne doniesienia naukowe dotyczą aktywności propolisu wobec bakterii z rodzaju *Salmonella*, badanej in vitro i in vivo. W pierwszym przypadku inkubowano etanolowy ekstrakt z propolisu w obecności szczepów bakteryjnych *Salmonella typhimurium* i *Salmonella enteritidis*. Stwierdzono wyraźne zmniejszenie ilości bakterii w czasie inkubacji oraz wykazano działanie bakteriobójcze po 24 godzinach. Jednocześnie zastosowano 70 %

etanol jako kontrolę. Etanol wykazywał dużo mniejszy wpływ na obniżenie liczby bakterii a po 24 godzinach inkubacji stwierdzono jego działanie bakteriostatyczne na badane mikroorganizmy (45).

W drugim przypadku badano wpływ etanolowego wyciągu z propolisu i suchego propolisu na występowanie *Salmonelli* u drobiu. Badania wykazały, że tylko w przypadku etanolowego ekstraktu z propolisu, podawanego na 48 godzin przed zakażeniem drobiu następowało zahamowanie rozwoju bakterii. Autorzy wnioskowali, że za działanie przeciwbakteryjne był odpowiedzialny etanol (43).

Badania naukowe dowodzą dużej aktywności propolisu w stosunku do bakterii z rodzaju *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* (46,47), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sorbinus* (42), *Streptococcus piogenes* (42,43,48), *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae* (48), *Bacillus subtilis* (36). Słabsze działanie propolisu zaobserwowano wobec *Escherichia coli* (32,33,34,35) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (33).

W prowadzonych eksperymentach naukowych propolis wykazywał działanie synergistyczne do leków przeciwgruźliczych (streptomycyna, rifamycyna, izoniazyd) (47) oraz innych antybiotyków (np. chloramfenikol, gentamycyna, wankomycyna, tetracyklina, klindamycyna, netilmycyna (35,49,50).

Właściwości antybakteryjne propolisu mogą być efektem synergistycznego działania wielu związków obecnych w propolisie (51,52). W licznych eksperymentach szukano korelacji pomiędzy składem chemicznym a aktywnością antybakteryjną. Z jednej strony badane próbki różniły się składem chemicznym i aktywnością przeciwbakteryjną (37,38,53) natomiast w innych przypadkach stwierdzano zbliżoną aktywność próbek propolisu pomimo znacznych różnic w składzie chemicznym (54,55).

Badano również wpływ poszczególnych związków występujących w propolisie na jego aktywność przeciwbakteryjną. Bardzo dużą aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutants* i *Streptococcus sorbinus* wykazywał tt-farnesol oraz pinocembryna. Apigenina okazała się związkiem najsilniej hamującym bakteryjną glikozylotransferazę. Z propolisu chilijskiego wyizolowano aldehyd koniferylowy, pochodną dihydrobenzofuranu, acetyloviscidon o dużej aktywności w stosunku do bakterii z rodzaju *Mycobacterium* (46). Aktywność wobec *Helicobacter pylorii* stwierdzono w przypadku kwasu p-kumarowego, artepiliny C, kwasu 3-prenylo-4-dihydrocynamylocynamonowego. Izolowany z propolisu kubańskiego, poliizoprenylowany banzofenon posiadał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną (43).

Najczęściej badano aktywność etanolowego ekstraktu z propolisu ale badano również ekstrakt wodny i frakcje lotne (54,56).

1.2.3. Aktywność przeciwgrzybiczna

Aktywność przeciwgrzybiczną propolisu stwierdzono w licznych badaniach naukowych.

Najczęściej prowadzone były badania nad aktywnością propolisu w odniesieniu do grzybów z rodzaju *Candida* (35,37,52,55). Etanolowy ekstrakt z propolisu skutecznie hamował wzrost *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guiliermondi* w stężeniu poniżej 5 % (52).

Wykazano również wysoką aktywność przeciwgrzybiczą propolisu wobec 12 szczepów *Candida albicans* wyizolowanych od chorych na AIDS. Aktywność 20% etanolowego ekstraktu propolisowego była porównywalna z aktywnością nystatyny i wyższa od innych leków takich jak clotrimazol, euconazol, fluconazol, wobec których występuje lekooporność co sugeruje zastosowanie propolisu jako leku alternatywnego w leczeniu kandydiozy

u pacjentów HIV-pozytywnych (57). Propolis działa również synergistycznie do leków przeciwgrzybiczych (35,53) i mógłby mieć zastosowanie jako środek wspomagający leczenie grzybic.

Przeciwgrzybiczą aktywność propolisu wykazano ponadto wobec innych grzybów takich jak *Dermatophyta* (38,47), *Trichophyton*, *Mycosporum* (52), *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride* (56) oraz *Trichophyton verucosum* (52). W prowadzonych badaniach zaobserwowano hamujący wpływ propolisu na produkcję konidi rozrodczych i aflatoksyn przez *Aspergillus flavus* (58).

Niewątpliwie działanie przeciwgrzybicze propolisu zależy od jego składu chemicznego przy czym próbki propolisu z różnych stron świata, niejednorodne pod względem jakościowym i ilościowym wykazywały podobną aktywność przeciwgrzybiczą (55). Ze związków obecnych w propolisie właściwości przeciwgrzybicze może wykazywać pinocembryna (19).

Aktywność przeciwgrzybicza oznaczana była różnymi metodami jednakże wykazano, że najodpowiedniejszą i najbardziej obiektywną metodą jest metoda rozcieńczenia w agarze (59). Obecne w propolisie związki o małej polarności słabo dyfundują do agaru, stąd metoda dyfuzji w żelu nie jest odpowiednia do zastosowania w badaniach propolisu.

1.2.4. Aktywność przeciwwirusowa

Propolis jest znany również ze swoich właściwości przeciwwirusowych. Stwierdzono aktywność propolisu wobec wirusów grypy typu A, B (52) i wirusa *Avion* (43), reowirusów, wirusów wywołujących zakażenie torebki Bursa (37), wirusa *Vaccinia*, wirusa wywołującego chorobę Newcastle, wirusa *Herpes simplex* oraz wirusa polio (52). W mniejszym stopniu propolis hamował rozwój adenowirusa oraz wirusa

Vesicular stomatitis (52). W badaniach klinicznych prowadzonych na grupie osób zarażonych wirusem *Herpes* typu 2 zaobserwowano, że proces zdrowienia postępuje szybciej w grupie leczonej propolisem niż w grupie leczonej acyclovirem i placebo (60). Badano również aktywność propolisu wobec wirusa HIV-1. Propolis hamował ekspresję wirusa w sposób zależny od dawki (61).

Mechanizm działania propolisu może być związany z hamowaniem wnikania wirusa do komórek gospodarza (61), namnażania wirusa oraz tworzenia otoczki wirusowej (52).

Z propolisu brazylijskiego wyizolowano kwas moronowy o silnych właściwościach anty-HIV (62). Spośród innych składników propolisu właściwości przeciwwirusowe posiadają flawonoidy i estry kwasów aromatycznych a w szczególności kwas kawowy, ester izopentyłowy kwasu ferulowego oraz ester 3-metylo-2-butenyłowy kwasu kawowego (52).

1.2.5. Właściwości antyoksydacyjne

Wolne rodniki to atomy lub cząsteczki, które pozbawione jednego albo więcej elektronów dążą za wszelką cenę do ich uzupełnienia, pobierając je z cząsteczek związków znajdujących się najbliżej w komórkach. Błyskawicznie wchodzi w reakcje ze związkami chemicznymi i zabierają potrzebny elektron. Powoduje to uszkodzenia białek, tłuszczów i kwasów nukleinowych zdrowych komórek a także zmniejszenie zasobów tlenowych.

W organizmie najwięcej wolnych rodników powstaje podczas procesu metabolizmu tlenu. Nazywane są one toksycznymi metabolitami tlenu albo jego reaktywnymi formami. Powstają podczas fizjologicznych procesów w komórce. U zdrowego człowieka około 5% tlenu przekształca się w wolne rodniki. Mogą się one także tworzyć w sytuacjach niefizjologicznych, a więc podczas niedotlenienia, na skutek napromieniania promieniami

ultrafioletowymi, opalania się, palenia papierosów, spożywania niektórych substancji chemicznych czy leków wywołujących tzw. procesy nadtlennienia (oksydacyjne). Potężnym generatorem wolnych rodników są także spaliny wydobywające się z rur wydechowych samochodów.

Organizm człowieka reaguje na powstające wolne rodniki i reaktywne formy tlenu aktywując mechanizmy antyoksydacyjne do których należą: enzymy (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydazy), związki chemiczne, które reagują z wolnymi rodnikami wygaszając kaskadę reakcji wolnorodnikowych (β -karoten, kwas askorbinowy, α -tokoferol, kwas moczowy).

Zaburzenie równowagi peroksydacyjno-antyoksydacyjnej jest przyczyną wielu chorób cywilizacyjnych jak choroby układu krążenia, miażdżyca, cukrzyca, nowotwory.

Właściwości antyoksydacyjne propolisu zostały wykazane w licznych eksperymentach naukowych, w których badano zarówno zdolność do reakcji z wolnymi rodnikami jak również wpływ propolisu na utlenianie związków organicznych oraz na procesy prowadzące do powstawania wolnych rodników.

Stwierdzono, że propolis posiada zdolności zmiatania wolnych rodników w reakcji ze stabilnym rodnikiem 1,1-difenylo-2-pikrylohydrylowym (DPPH) (43,63,64,65). Ze względu na niesparowany elektron badany związek wykazuje silną absorbcję w zakresie światła widzialnego i intensywny fioletowy kolor (517 nm). Po sparowaniu elektronu zachodzi proces odbarwienia roztworu i spadek absorbcji w stosunku stechiometrycznym do ilości pobranych elektronów.

Wykazano również aktywność propolisu wobec nadtlenu alkilowego, który posiada działanie bakteriobójcze. Dodanie propolisu do mieszaniny reakcyjnej powodowało w konsekwencji wzrost bakterii na płytkach (36).

Propolis wpływa hamująco na proces utleniania kwasów tłuszczowych, głównych komponentów błon komórkowych. Kwas linolowy poddawany był procesom autooksydacji poprzez zadziaływanie wysoką temperaturą bądź promieniowaniem ultrafioletowym w obecności nadtlenu wodoru (65,66,67). Badano produkty utlenienia tzw. substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (67), poziom zredukowanego pod wpływem nadtlenu lipidów żelaza (reakcja barwna z tiocyjankiem) (68), zredukowaną formę β -karotenu (odbarwienie roztworu) (65). Proces autooksydacji kwasów tłuszczowych (kwas linolowy, linolenowy, arachidonowy) prowadzi do powstania endo- i wodoronadtlenków. Wykazano, że propolis działa hamująco na powstawanie obydwu nadtlenu (66). Wodoronadtlenki oznaczane były z zastosowaniem układu hemoglobina-błękit metylenu a endo-nadtlenki przy wykorzystaniu kwasu tiobarbiturowego, kwasu tiobarbiturowego i Fe^{3+} oraz metody LPO-586.

Badano również wpływ propolisu na peroksydację lipidów w mikrosomach wątrobowych szczura zależną od układu Fe^{3+} -ADP/kwas askorbinowy i układu Fe^{3+} -ADP/NADPH. Propolis w sposób zależny od dawki hamował utlenianie kwasów tłuszczowych (66).

Propolis wpływa również na powstawanie wolnych rodników. Wykazano jego działanie hamujące na oksydazę ksantynową, która utlenia ksantyny do kwasu moczowego (67). Proces ten jest głównym źródłem anionu ponadtlenu.

Właściwości antyoksydacyjne propolisu związane są z obecnością w jego składzie licznych związków fenolowych. Stwierdzono liniową zależność pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli i flawonoidów w badanych próbkach propolisu a aktywnością antyoksydacyjną (36,65). Z pośród związków fenolowych występujących w propolisie wysoką aktywność antyoksydacyjną wykazuje kwas kawowy (65), estry kwasów fenolowych w tym ester fenyloetylowy kwasu kawowego (65,67), ester

cynamonowy kwas kawowy(65), ester benzyłowy kwasu kawowego (65), flawonoidy (galangina (67), kemferol, kwercetyna (65)), pochodne kwasu kawowoilochinowego (43), propol (43), artepilina C (65,69), kwas 3-(3,4-dihydroksy-5-prenylofenylo-2-(E)-propenowy (43). Próbki propolisu z różnych stron świata charakteryzowały się odmienną aktywnością antyoksydacyjną (65). Niejednokrotnie badane próbki propolisu posiadały aktywność większą niż znane antyoksydanty jak witamina C i α -tokoferol (36,43).

Ponadto stwierdzono różną aktywność antyoksydacyjną tych samych próbek w zależności od rozpuszczalnika. Wodne ekstrakty propolisu brazylijskiego posiadały większą aktywność niż metanolowe natomiast metanolowe ekstrakty z propolisu holenderskiego charakteryzowały się większą aktywnością niż ekstrakty wodne (43).

1.2.6. Działanie przeciwzapalne

Propolis wykazuje różnokierunkowe działanie przeciwzapalne. Podawanie etanolowego lub wodnego ekstraktu z propolisu powodowało zahamowanie ostrego lub przewlekłego procesu zapalnego (43,70,71).

Istotne znaczenie ma wpływ propolisu na szlak metaboliczny kwasu arachidonowego. Wykazano zależne od dawki, hamujące działanie etanolowego ekstraktu z propolisu na aktywność cylooksygenazy COX 1 i COX 2 (72) oraz lipooksygenazy (73). Efektem działania propolisu była mierzona zmiana w stężeniu prostaglandyny E₂ lub prostaglandyn i leukotrienów in vitro i in vivo. Badano również wpływ poszczególnych składników propolisu na aktywność obydwu enzymów. Stwierdzono silne działanie hamujące estru fenyloetylowego kwasu kawowego na aktywność kluczowych enzymów szlaku metabolicznego kwasu arachidonowego oraz słabe działanie galanginy na aktywność cyklooksygenazy (72,73).

Ogromne znaczenie w powstawaniu i rozprzestrzenianiu się procesu zapalnego posiada interleukina 1β oraz tlenek azotu i jego metabolity. Wykazano hamujący wpływ propolisu na produkcję $IL1\beta$ i NO poprzez hamowanie ekspresji mRNA $IL1\beta$ oraz syntazy tlenu azotu (74,75). Stwierdzono również bezpośrednie działanie propolisu na aktywność katalityczną syntazy NO (75). Spośród związków obecnych w propolisie na ekspresję mRNA badanych substancji wpływały: chryzyna, galangina, kemferol oraz kwercetyna, przy czym największą aktywność obserwowano w przypadku kwercetyny (74). W badaniach naukowych wykazano również hamujące działanie propolisu na aktywność mieloperoksydazy, oksydazy NADPH, dekarboksylazy ornityny oraz hialuronidazy (76).

1.2.7. Działanie hepatoprotekcyjne

Badania właściwości hepatoprotekcyjnych propolisu prowadzone były w warunkach *in vitro* i *in vivo* na liniach komórkowych hepatocytów. Zarówno ekstrakty wodne jak alkoholowe z propolisu wykazują właściwości hepatoprotekcyjne. Jako czynniki uszkadzające wątrobę stosowano aminofenazon, czterochlorek węgla, etanol, galaktozoaminę i lipopolisacharyd (4,43,77). Podawanie propolisu powodowało obniżenie poziomu enzymów wątrobowych, triacylogliceroli w surowicy krwi oraz zmniejszenie stopnia uszkodzenia komórek obserwowane w mikroskopie elektronowym.

Z wodnego ekstraktu propolisu brazylijskiego wyizolowano pochodne kwasu kawoilochinowego o silnych właściwościach hepatoprotekcyjnych przy czym najsilniej działał ester metylowy kwasu 3,4-di-O-kawoilochinowego. Z pośród innych związków obecnych w propolisie właściwości hepatoprotekcyjne wykazywały: 3,5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanol, betuletol, kemferyd, diterpeny typu labdanu, benzofurany

A i B (43). Ponieważ uszkodzenia wątroby są skutkiem uszkodzenia błony komórkowej hepatocytów na skutek działania wolnych rodników, zmiatanie wolnych rodników ogrywa istotną rolę w działaniu hepatoprotekcyjnym. Jest to prawdopodobnie jeden z mechanizmów protekcyjnego działania propolisu na komórki wątrobowe.

1.2.8. Działanie przeciwnowotworowe

Działanie cytotoksyczne i przeciwnowotworowe propolisu zostało potwierdzone w licznych eksperymentach naukowych z użyciem różnych linii komórek nowotworowych (43,78).

Mechanizm działania propolisu jest wielokierunkowy i obejmuje wpływ propolisu na układ immunologiczny, cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, indukowanie apoptozy i nekrozy (79) oraz hamowanie uszkodzeń oksydacyjnych (80). Mysiom zainfekowanym komórkami nowotworowymi podawano 5-fluorouracyl sam i w kombinacji z wodnym ekstraktem z propolisu. Zaobserwowano, że w przypadku równoczesnego podawania propolisu nie występuje leukopenia co związane jest z wpływem propolisu na układ immunologiczny (43).

Spośród składników propolisu dwa zidentyfikowano jako związki o dużej aktywności przeciwnowotworowej: artepilinę C i ester fenyloetylowy kwasu kawowego. Artepilina C indukuje apoptozę poprzez działanie na fragmentację DNA oraz aktywuje układ immunologiczny. Działa silniej niż 5-fluorouracyl (43). Ester fenyloetylowy kwas kawowego, podobnie jak artepilina C, indukuje apoptozę i fragmentację DNA (43,81). Stwierdzono również, że hamuje aktywację NF- κ B przez TNF (82). Działanie przeciwnowotworowe wykazywały również takie związki jak: kwas kawowy, kwercetyna (79) oraz wyizolowany z propolisu brazylijskiego diterpen typu klerodanu (43)

1.3. Działania niepożądane

Pierwsze przypadki alergii na propolis stwierdzono u pszczelarzy (83). W ciągu ostatnich lat obserwuje się wzrost częstości występowania alergii co wynika ze zwiększonego zainteresowania propolisem i jego preparatami (78,79,80,81,82). W badaniach klinicznych prowadzonych wśród pacjentów hospitalizowanych (7483) w latach 1981-1987 liczba przypadków alergii kontaktowej wynosił od 1,2 % do 3,3 % podczas gdy liczba przypadków alergii kontaktowej wśród zdrowych ochotników wynosiła 0,64 %. Alergia stwierdzana była na podstawie testów skórnych z zastosowaniem 5 % etanolowego ekstraktu propolisowego (88). Wśród pacjentów z zapaleniem skóry liczba pacjentów wrażliwych na propolis wynosiła od 1,2 % do 6,6 % (87).

Alergia skórna jest najczęściej obserwowaną alergią i występuje na skutek miejscowego stosowania preparatów z propolisem (maści, kremów). Charakteryzuje się ona obecnością miejscowych ognisk zapalnych i uogólnionych zmian wypryskowych. Wyjątkowo towarzyszą temu objawy ogólne takie jak gorączka, bóle głowy, pokrzywka i dychawica oskrzelowa (85). Występowanie alergii stwierdzono również po podaniu preparatów doustnych w postaci tabletek, pasty do zębów, płynów do płukania jamy ustnej. U pacjentów obserwowano alergiczne zapalenia żołądka, duszności, obrzęk warg, zapalenie warg itp. (87).

Badania wykazały, że za działanie uczulające propolisu odpowiedzialne są przede wszystkim estry kwasu kawowego w tym ester 3-metylo-2-butenylowy (1,1-dimetyloallilowy) kwasu kawowego oraz fenyloetylowy kwasu kawowego (83,84,87,88,98). Spośród innych związków obecnych w propolisie działanie uczulające wykazują: ester benzylowy kwasu izoferulowego, ester benzylowy kwasu kawowego (89), ester benzylowy

kwasy salicylowego (83,87). Flawonoidy wykazują słabe właściwości uczulające (87).

Stwierdzono, że stosowanie preparatów propolisowych w celach leczniczych powoduje często nadwrażliwość a także alergię krzyżową bądź pseudo-krzyżową na niektóre produkty roślinne. Najczęściej obserwowano współistniejącą alergię na takie alergeny jak: Balsam Peruwiański, olejek goździkowy, eugenol, olejek sosnowy, kolendrowy, cynamonowy, miętowy, szałwiowy. Badania porównawcze składu chemicznego wykazały obecności wspólnych składników propolisu i balsamu peruwiańskiego takich jak: benzoesan benzylu, cynamonian cynamylu, cynamonian benzylu i wanilina (85). Według niektórych autorów alergia na propolis może mieć charakter wtórny na skutek stosowania innych substancji w tym balsamu peruwiańskiego (86).

Właściwości uczulające badanych alergenów są prawdopodobnie związane z łańcuchem alkilowym (im dłuższy tym większe właściwości alergizujące) oraz z obecnością 2 grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym (w organizmie dochodzi do utlenienia do reaktywnych rodników, które reagują z białkami funkcjonalnymi i strukturalnymi) (83,89).

2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Propolis stał się obiektem szerokiego zainteresowania tak ze strony badaczy jak i konsumentów. Na rynku pojawiło się w ostatnich latach ogromne zapotrzebowanie na produkty pszczele. Jednocześnie słowo propolis nie oznacza surowca o powtarzalnym składzie chemicznym a co za tym idzie właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych. Istnieje zatem potrzeba ustalenia kryteriów oceny, które gwarantowałyby właściwą jakość i bezpieczeństwo stosowania preparatów zawierających propolis.

Do podstawowych surowców używanych w produkcji farmaceutycznej i spożywczej należy koncentrat propolisowy i nalewka propolisowa dla których głównym kryterium oceny ich przydatności jest aktywność przeciwbakteryjna. Brak jest natomiast danych dotyczących składu produktów w odniesieniu do wspomnianej aktywności biologicznej.

Mając na uwadze powyższy problem w niniejszej rozprawie podjęto próby określenia składu chemicznego ekstraktów propolisowych, które stanowią surowiec używany do wytwarzania produktów farmaceutycznych i kosmetycznych. Postanowiono zatem:

1. Opracować warunki identyfikacji i oznaczenia wybranych składników propolisu, występujących w koncentratkach i nalewkach propolisowych
2. Ustalić kryteria oceny badanych produktów w zakresie tożsamości, czystości i zawartości.
3. Dokonać oceny aktywności biologicznej oraz antyoksydacyjnej w odniesieniu do zidentyfikowanych i oznaczonych składników w koncentratkach i nalewkach propolisowych

W szczegółowym zakresie prowadzone badania obejmują:

- opracowanie i walidację metod analitycznych przydatnych do oznaczania składników w produktach propolisowych
- określenie charakterystycznego „fingerprintu” produktów propolisowych pochodzących z różnych obszarów Polski
- identyfikację i oznaczenie składników w ekstraktach propolisowych
- analizę związków o działaniu niepożądanym (metale ciężkie, związki o działaniu alergizującym)
- ocenę aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i antyoksydacyjnej

Praca doktorska obok wartości naukowej obejmującej zakres nowych opracowań metodycznych oraz analizy jakościowej i ilościowej składników w ekstraktach propolisowych posiada także wartość praktyczną ujmującą problemy przy produkcji i kontroli surowców a także wyrobów gotowych w Przedsiębiorstwie Pszczelarsko-Farmaceutycznym „Apipol-Farma”.

Wyniki w prezentowanej rozprawie były częściowo przedmiotem:

a) publikacji

1. Krzek J., Kaleta J., Hubicka U, Niedźwiedź A.: *Reversed-Phase high-performance liquid chromatography determination of selected phenolic acids in propolis concentrates in terms of standardization for drug manufacturing purposes*. J.AOAC Int. **2006**, 89, 2, 352-358
2. Krzek J., Hubicka U., Kaleta J. Niedźwiedź A: *Evaluation of Densitometric TLC for Quantitative Analysis of Selected Phenolic Acids for Standardization of Propolis Concentrates*. – J. Plan. Chromatogr. **2006**, 19, 449-453.

b) doniesienia

Kaleta J., Sodzawiczny K.: *Analiza propolisu w aspekcie jego standaryzacji.*

XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Katowice 25-28 września, 2007: streszczenie T.1 s. 345, abstr. S.12.K-3

c) plakatu

1. Krzek J., Kaleta J., Hubicka U, Niedźwiedź A.: *Oznaczanie poziomu wolnych kwasów fenolowych w koncentratkach propolisu w odniesieniu do aktywności mikrobiologicznej w aspekcie jego standaryzacji.* XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego: Farmacja - tradycja i nowoczesność, Wrocław, 22-24 września, 2004: streszczenia T. 1 s. 301, abstr. SIX-P008.

2. Kowalcze E., Kaleta J., Sodzawiczny K.: *Przeciwdrobnoustrojowe działanie propolisu na przykładzie *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.* XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Katowice 25-28 września, 2007: streszczenie T.1 s. 378, abstr. S.12.P-29

3. APARATURA, SPRZĘT LABORATORYJNY, ODCZYNNIKI I SUBSTANCJE WZORCOWE

Analizy chromatograficzne

a) aparatura

- chromatograf do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (interface D-7000, autosampler L-7200, pompa 7100, detektor DAD L-7455, termostat L-7350 z Modułem Peltier), Merck, Niemcy,
- kolumna LiChrospher 100 RP-18e (5 μm), Merck, Niemcy,
- kolumna ekstrakcyjna LiChrolut RP-18, (500 mg), nr kat. 102023.0001 Merck, Niemcy,
- wagosuszarka Metler Toledo, Szwajcaria,
- zestaw do ekstrakcji do fazy stałej (SPE), Baker, Niemcy
- pH-metr 225, Mettler Toledo, Szwajcaria,
- waga analityczna AX 205, Mettler Toledo, Szwajcaria,
- żel krzemionkowy 60, 70-230 mesh, Merck, Niemcy
- kolumna szklana o wymiarach 300mm*20mm
- kolumna Purospher STAR 100 RP-18e (5 μm), Merck, Niemcy,
- chromatograf gazowy 5890 seria II, Hewlett Packard, USA
- detector masowy 5989A z analizatorem kwadrupolowym, Hewlett Packard
- kolumna:- Macherry Nagel, OPTIMA, delta 3 (30,0 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μm grubość warstwy)
- waga analityczna Sartorius, Szwajcaria,
- łaźnia wodna, Grant, Anglia
- spektrofotometr UV320, Unicam, Anglia
- komora chromatograficzna pionowa, Chromdes, Polska
- płytki pokryte żelazem krzemionkowym GF₂₅₄, Merck, Niemcy

b) odczynniki

- metanol, acetonitryl o czystości gradientowej oraz woda czystości HPLC, Merck, Niemcy
- jednowodny diwodorofosforan(V)sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), POCH, Gliwice, Polska
- wodorowęglan sodu (NaHCO_3), POCH, Gliwice, Polska
- 25 % kwas solny (HCl), POCH, Gliwice, Polska
- 96 % alkohol etylowy, POCH, Gliwice, Polska
- heksan, Merck, Niemcy
- metanol, Merck, Niemcy
- octan etylu, POCH, Gliwice, Polska
- toluen, Merck, Niemcy
- kwas octowy, POCH, Gliwice, Polska
- 96% kwas siarkowy (H_2SO_4), Merck, Niemcy
- wanilina, POCH, Polska
- 1% roztwór waniliny w kwasie stężonym (1 g waniliny rozpuszczono w 54 ml kwasu siarkowego)
- 98% kwas mrówkowy, POCH, Gliwice, Polska
- kwas octowy cz.d.a., POCH, Gliwice, Polska
- chlorek glinu (AlCl_3), Merck, Niemcy
- aceton, POCH, Gliwice, Polska
- BSTFA (N,O-bis-trimetylosilylo-trifluoroacetamid) z 1% TMCS (trimetylochlorosilan), Pierce, USA
- pirydyna, Pierce, USA
- 65 % kwas azotowy (HNO_3), POCH, Gliwice

c) substancje wzorcowe

- kwas kawowy (nr kat. 60018), Sigma- Aldrich, USA
- kwas ferulowy (nr kat. 46278), Sigma- Aldrich, USA

- kwas p-kumarowy (nr kat. 9906.1), Roth, Niemcy
- kwas benzoeswy, (nr kat. 4-7849), Supelco, USA
- kwas wanilinowy, (nr kat. 94770), Sigma- Aldrich, USA
- kwas cynamonowy (nr kat. 96340), Sigma- Aldrich, USA
- galangina (nr kat. 1114S), Extrasynthese, Francja
- pinocembryna (nr kat. 1162), Extrasynthese, Francja
- naringenina (nr kat. 1128S), Extrasynthese, Francja
- kemferol, (nr kat. 1124S), Extrasynthese, Francja
- kemferyd, (nr kat. 1123S), Extrasynthese, Francja
- chryzyna (nr kat. 1114S), Extrasynthese, Francja
- pinobanksyna, pof. Wollenweber, Technische Universität, Darmschtadt
- octan pinobanksyny, pof. Wollenweber, Technische Universität, Darmschtadt
- kwercetyna (nr kat. 83370), Sigma- Aldrich, USA
- akacetyna (nr kat. 1101S), Extrasynthese, Francja
- ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, pof. Wollenweber, Technische Universität, Darmschtadt
- ester fenyloetylowy kwasu kawowego, (nr kat. C8221), Sigma- Aldrich, USA

Analizy mikrobiologiczne

a) aparatura

- densytometr Densimat, BioMérieux, Francja
- inkubator CWE-2, Termometol, Polska
- inkubator KB 53, Binder
- inkubator BD 115, Binder
- płytki Petriego radiosterylne o średnicy 55 mm, Merck, Niemcy

b) odczynniki

- roztwór 0,85 % NaCl, nr kat: 20040 BioMérieux;
- NaCl, nr kat. 1.06404.1000, Merck, Niemcy
- bulion antybiotykowy (BA) nr kat. 105273.0500, Merck, Niemcy
- Agar- agar oczyszczony, bez inhibitorów, granulowany dla mikrobiologii, nr kat: 101614.1000 Merck, Niemcy,
- podłoże BAA (odważono 17,5 g bulionu BA oraz 15 g agaru i rozpuszczono w 1000 ml wody)
- agar Sabouraud, nr kat. 1.00918.0500, Merck, Niemcy,
- bulion antybiotykowy, nr kat. 1.05273.0500, Merck, Niemcy
- dimetylosulfotlenek

c) substancje wzorcowe

- szczep testowy Staphylococcus aureus ATCC 6538P do badania aktywności antybiotyków, Merck, Niemcy (nr kat. PR MC 0827P)
- szczep testowy Candida albicans ATCC 10231, Merck, Niemcy (nr kat PO443P)

Badanie aktywności antyoksydacyjnej

a) aparatura

- spektrofotometr UV320, Unicam,

b) odczynniki

- CuCl₂, Sigma–Aldrich, USA
- neokuproina, Sigma–Aldrich, USA
- octan amonu, Merck, Niemcy
- 96 % alkohol etylowy, POCH, Polska

c) substancje wzorcowe

- troloks, Sigma–Aldrich, USA

4. METODYKA BADAŃ

4.1. Materiały do badań

Surowy kit pszczeli ze względu na postać, obecność substancji balastowych (woski, pyłki) oraz zanieczyszczeń mechanicznych (części ula, fragmenty pszczoł) nie jest bezpośrednim surowcem do produkcji leków. Wstępna obróbka propolisu polega na ekstrakcji związków aktywnych odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym, którym najczęściej jest 96 % etanol. Etanolowe ekstrakty propolisowe różnią się zawartością propolisu w przeliczeniu na suchą masę.

Przedmiot badania w niniejszej rozprawie stanowią standaryzowane i nie standaryzowane etanolowe ekstrakty propolisowe.

Standaryzowane etanolowe ekstrakty propolisowe, tak zwane koncentraty propolisowe, są podstawowym surowcem stosowanym w produkcji farmaceutycznej i spożywczej. Deklarowana zawartość propolisu w koncentraty wynosi powyżej 60 %. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki badań dotyczą próbek koncentratów propolisowych stosowanych w Przedsiębiorstwie Pszczelarsko-Farmaceutycznym „Apipol-Farma”, używanych do produkcji leków i suplementów diety.

Nie standaryzowane etanolowe ekstrakty propolisowe to nalewki propolisowe przygotowane w warunkach laboratoryjnych z kitów pszczelich pochodzących od różnych dostawców, z różnych stron Polski. Sporządzone nalewki propolisowe zawierały do 9 % wyekstrahowanego propolisu. Nalewki badano pod kątem zawartości związków farmakologicznie czynnych oraz w kierunku aktywności mikrobiologicznej i antyoksydacyjnej. Wyniki odnoszone były do zawartości suchej masy i można je porównywać dla wszystkich produktów propolisowych.

Zastosowanie nie standaryzowanego materiału pozwoliło uzyskać większą różnorodność wyników, które można było wzajemnie ze sobą

korelować. Miejsca pochodzenia kitu pszczelego z którego następnie wykonano nalewki propolisowe przedstawiono w tabeli 1 a sposób przygotowania nalewek podano w punkcie 4.1.1.

4.1.1. Przygotowanie nalewek propolisowych do badań

Próbki kitu rozdrobniono i ekstrahowano etanolem w stosunku 1:10 przez 24 godziny. Roztwór z nad osadu zdekantowano a ekstrakcję powtórzono dwukrotnie. Połączone ekstrakty schłodzono w lodówce do temperatury $+5^{\circ}\text{C}$ w celu wytrącenia wosków i przesączono przez bibułę filtracyjną oraz watę bawełniano-wiskozową.

Tabela 1. Miejsce pochodzenia kitów pszczelich, z których sporządzono etanolowe ekstrakty propolisowe

| Numer nalewki | Miejsce pochodzenia |
|---------------|---------------------|
| 1 | Pszczela Wola |
| 2 | Wągrowiec |
| 3 | Z północy Polski |
| 4 | Piła |
| 5 | Starogard |
| 6 | Gdańsk |
| 7 | Żmin |
| 8 | Gronowo Elbląskie |
| 9 | Jasło |
| 10 | Kętrzyn |
| 11 | Jarosław |
| 12 | Wągrowiec |
| 13 | Jegłownik |
| 14 | Jarosław |
| 15 | Kraków |

4.2. Metody stosowane w badaniach

W prowadzonych badaniach stosowano różne metody analizy, które dostosowano do potrzeb własnych w oparciu o przepisy farmakopealne oraz opracowano nowe niezbędne do realizacji tematu pracy. W przypadku nowych metod dokonano niezbędnej walidacji.

4.2.1. Oznaczanie składników nieorganicznych metodą AAS

a) przygotowanie próbki

Do teflonowych naczyń ciśnieniowych odważono z dokładnością 0,1 mg około 0,5 g próbki, dodano 5,0 ml 65 % HNO_3 i pozostawiono na 24 godziny w celu wstępnej mineralizacji. Mineralizację prowadzono przy użyciu mineralizatora mikrofalowego. Roztwór po ochłodzeniu przeniesiono do próbek i uzupełniono 65 % HNO_3 do 30,0 ml.

b) przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Do oznaczenia zastosowano kalibrację wewnętrzną. W tym celu do 0,5 ml próbki dodano odpowiednią ilość roztworów wzorcowych jonów metali do uzyskania stężenia 0,50, 0,25 i 0,15 mg/kg w przypadku Fe, Cu i Zn oraz od 0,048, 0,024 i 0,012 mg/kg dla oznaczenia jonów metali ciężkich.

c) wykonanie oznaczenia

Analizę prowadzono przy użyciu atomowego spektrometru absorpcyjnego. Dla odpowiednich roztworów wzorcowych i prób badanych zawartość poszczególnych metali w próbkach odczytano z krzywych kalibracyjnych.

4.2.2. Oznaczenie kwasów fenolowych metodą HPLC

a) roztwory porównawcze

Odważono 7,00 mg kwasu kawowego, 10,00 mg kwasu p-kumarowego i 10,00 mg kwasu ferulowego z dokładnością 0,01 mg. Odważki rozpuszczono w 50,0 ml metanolu. Bezpośrednio do oznaczeń roztwory rozcieńczono metanolem w stosunku 1:10.

b) przygotowanie próbki do analizy HPLC

Ilość etanolowego ekstraktu propolisowego odpowiadającą 0,20 g suchej masy odważono z dokładnością 0,1 mg i rozcieńczono metanolem do objętości 25,0 ml. Pobrano 1,0 ml roztworu i naniesiono na kolumnę ekstrakcyjną LiChrolut RP 18 (SPE) uprzednio przemytą 2,0 ml metanolu. Do elucji użyto 3,0 ml mieszaniny złożonej z buforu fosforanowego pH~3 i acetonitrylu w stosunku 7:3. Zebrany eluat uzupełniono do objętości 5,0 ml metanolem i przesączono przez sączonek membranowy o średnicy 0,45 µm. Dla każdej próbki koncentratu przygotowano po trzy odważki.

c) warunki rozdziału:

- przepływ 1,0 ml/minutę
- pomiar w punkcie $\lambda = 320$ nm
- temperatura termostatu 25⁰ C
- faza ruchoma: A: 0,03 M NaH₂PO₄•H₂O (zakwaszony H₃PO₄ do pH=3,0)
B: acetonitryl

d) wykonanie oznaczenia

Wprowadzono na kolumnę po 20 µl roztworów wzorcowych i badanych. Elucję gradientową prowadzono w warunkach jak niżej przy użyciu fazy ruchomej o składzie:

| czas (minuty): | A (%): | B (%): |
|------------------|----------|----------|
| 0,0 | 85 | 15 |
| 40 | 50 | 50 |
| 41 | 20 | 80 |
| 45 | 20 | 80 |
| 50 | 85 | 15 |

Powierzchnie pików rejestrowano dla odpowiednich roztworów wykonując po dwa oznaczenia dla każdej próby i przyjmując za wynik wartość średnią. Zawartość kwasów fenolowych podano w procentach w przeliczeniu na suchą masę oznaczoną za pomocą wagosuszarki.

4.2.3. Oznaczenie flawonoidów metodą spektrofotometryczną

a) przygotowanie roztworów

- 2 % AlCl_3

2g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 100,0 ml 5 % roztworu kwasu octowego w metanolu

- 5 % roztwór kwasu octowego w metanolu:

Odmierzono 9,6 ml 98 % kwasu octowego do kolbki miarowej o pojemności 200,0 ml i uzupełniono metanolem do kreski

- mieszanina I:

Zmieszano octanu etylu, kwas octowy i metanol w stosunku 40:3:57,

- mieszanina II:

Zmieszano kwas octowy i metanol w stosunku 3:57

b) przygotowanie krzywej wzorcowej

Odważono z dokładnością 0,1mg około 10,00 mg kwercetyny i rozpuszczono w 100,0 ml metanolu. Do kolbek o objętości 25,0 ml odmierzone kolejno: 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 ml przygotowanego roztworu. Do każdej kolby dodano po 2,0 ml 2 % AlCl_3 i uzupełniono mieszaniną I do 25,0 ml. Po 45 minutach zmierzono absorbancję przy $\lambda=425$ nm wobec ślepej odczynnikowej (mieszanina I)

c) wykonanie oznaczenia

Odważono z dokładnością około 2,5 g nalewki propolisowej do kolby ze szlifem o objętości 100,0 ml. Dodano 20,0 ml acetonu, 5,0 ml 25 % HCl i ogrzewano 30 minut na łaźni wodnej w temperaturze ok. 60°C pod chłodnicą zwrotną. Po ochłodzeniu zawartość kolby przesączono do kolby miarowej o pojemności 100,0 ml. Sączek z osadem przeniesiono do kolby destylacyjnej, dodano 20,0 ml acetonu i ponownie ogrzewano przez 15 min pod chłodnicą zwrotną. Roztwór po ochłodzeniu, przesączono do kolby na 100,0 ml kilkakrotnie przemywając acetonem. Czynność powtórzono a następnie połączono wszystkie roztwory i uzupełniono acetonem do objętości 100,0 ml. Do rozdzielacza odmierzone 10,0 ml hydrolizatu, 15,0 ml wody destylowanej i 15,0 ml octanu etylu. Wyrzäsano przez 5 minut a następnie, po całkowitym rozdzieleniu warstw, warstwę organiczną przeniesiono do kolby o pojemności 100,0 ml a warstwę wodną ekstrahowano jeszcze dwa razy porcjami po 10,0 ml octanu etylu. Połączone wyciągi octanowe przemyto dwukrotnie 40,0 ml wody, przesączono przez miękki sączek do kolby miarowej o pojemności 50,0 ml i uzupełniono octanem etylu do podanej objętości. Następnie odmierzone po 10,0 ml roztworu octanowego do dwóch kolb o objętości 25,0 ml. Do jednej z kolb dodano 2,0 ml 2 % AlCl_3 i obie kolbki uzupełniono mieszaniną II. Po 45 minutach wykonano pomiar

absorbancji przy $\lambda=425$ nm wobec ślepej odczynnikowej (roztwór bez dodanego reagentu).

d) Obliczenie wyników

Zawartość flawonoidów wyliczono z poniższego wzoru:

$$X = (b * 100 * 1250 * 100) / a * p$$

gdzie:

X - zawartość flawonoidów w badanej próbce [%],

a - masa próbki wzięta do oznaczenia [mg];

b - zawartość flawonoidów odczytana z krzywej wzorcowej [mg/ml],

p – zawartość propolisu w nalewce

4.2.4. Oznaczanie pinocembryny, galanginy, chryzyny, octanu pinobanksyny oraz estrów kwasu kawowego metodą HPLC

a) przygotowanie roztworów porównawczych

Odważono z dokładnością 0,1 mg po 5 mg odpowiednich substancji wzorcowych (chryzyny, galanginy, pinocembryny, octanu pinobanksyny) oraz po 3,00 mg estru fenyloetylowego kwasu kawowego i estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego i rozpuszczono w 10,0 ml metanolu. Bezpośrednio do oznaczeń roztwory rozcieńczono metanolem w stosunku 1:20, 1:5 i 1:2. Wykreślono krzywe kalibracyjne zależności pola powierzchni od stężenia.

b) przygotowanie próbek

Odważono każdej z nalewek propolisowych w ilości odpowiadającej 0,4 g suchej pozostałości i rozcieńczono metanolem do objętości 25,0 ml. Pobrano 1,5 ml roztworu i wprowadzono na kolumnę ekstrakcyjną LiChrolut RP 18

(500mg) uprzednio przemytą 2,0 ml metanolu. Do elucji użyto 3,0 ml metanolu. Zebrany eluat uzupełniono do objętości 5,0 ml metanolem i przesączono przez sączeek membranowy o średnicy 0,45 μm . Każdą próbkę przygotowano w trzech powtórzeniach.

c) warunki rozdziału:

- przepływ 1,0 ml/minutę
 - temperatura termostatu 25⁰ C
 - faza ruchoma: A: woda: kwas mrówkowy: acetonitryl (950ml:50ml:25ml)
- B: metanol

d) wykonanie oznaczenia

Wprowadzono na kolumnę po 10 μl roztworów wzorcowych i badanych. Elucję gradientową prowadzono w warunkach jak niżej przy użyciu fazy ruchomej o składzie:

| czas (minuty): | A (%): | B (%): |
|------------------|----------|----------|
| 0,0 | 70 | 30 |
| 10 | 60 | 40 |
| 20 | 60 | 40 |
| 55 | 50 | 50 |
| 70 | 40 | 60 |
| 80 | 30 | 70 |
| 100 | 20 | 80 |
| 105 | 70 | 30 |

Pomiary prowadzono przy długości fali $\lambda=267$ nm dla galanginy, chryzyny, pinocembryny, octanu pinobanksyny i 320 nm dla estrów kwasu kawowego. Zawartość badanych związków oznaczono z krzywych wzorcowych.

Wykonano po trzy oznaczenia dla każdej próby przyjmując za wynik wartość średnią.

4.2.5. Analiza TLC etanolowych ekstraktów propolisowych

a) roztwory porównawcze

- flawonoidy o stężeniu 0,20 mg/ml (kwercetyna, galangina, akacetyna, apigenina, chryzyna, pinocembryna, naringenina)
- kwasy fenolowe: kawowy o stężeniu 1,20 mg/ml, kwasu p-kumarowy o stężeniu 3,70 mg/ml oraz kwas ferulowy o stężeniu 1,20 mg/ml

b) roztwory badane

Nalewkę propolisową odważono w ilości odpowiadającej 0,20 g suchej masy i rozpuszczono w 4,0 ml metanolu.

c) wykonanie oznaczenia

Na płytki TLC pokryte żelem krzemionkowym GF₂₅₄ o wymiarach 20 cm x 20 cm nakładano po 20 μ l roztworów badanych i 30 μ l roztworów wzorcowych. Płytki kondycjonowano 15 minut w oparach fazy ruchomej a następnie rozwijano chromatogram do wysokości 15 cm stosując fazę ruchomą: toluen - octan etylu - kwas octowy (68:30:2). Chromatogramy wysuszono na powietrzu, spryskano 1 % roztworem waniliny w 95 % kwasie siarkowym i ogrzewano w temperaturze 100° C przez 5 minut. Identyfikację przeprowadzono przez porównanie odpowiednich plam roztworów badanych i wzorcowych.

4.2.6. Rozdział chromatograficzny nalewek propolisowych

Opracowano i zoptymalizowano metodę rozdziału nalewek propolisowych na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym. W tym celu do 4g żelalu krzemionkowego dodano 20 ml nalewki i suszono 24 godziny w temperaturze pokojowej. Na kolumnę wypełnioną żelalem krzemionkowym nakładano 1g tak przygotowanej próbki. Rozdział prowadzono w gradiencie odczynników podanym w tabeli 2. Zbierano frakcje po 25 ml, które odparowano do suchej masy w temperaturze pokojowej a następnie zważono pozostałość po odparowaniu. Frakcje od 1 do 8 rozpuszczono w octanie etylu a frakcje 9 do 18 w metanolu.

Tabela 2. Skład i gradient rozpuszczalników stosowanych w chromatografii kolumnowej

| <i>Skład i gradient rozpuszczalników</i> | <i>Frakcja</i> |
|--|----------------|
| 100 ml, 10% octanu etylu-90% heksan | Frakcja 1 |
| 100 ml, 20% octanu etylu-80% heksan | Frakcja 2 |
| | Frakcja 3 |
| 100 ml, 30% octanu etylu-70% heksan | Frakcja 4 |
| | Frakcja 5 |
| | Frakcja 6 |
| | Frakcja 7 |
| 100 ml, 40% octanu etylu-60% heksan | Frakcja 8 |
| | Frakcja 9 |
| | Frakcja 10 |
| | Frakcja 11 |
| 100 ml, 50% octanu etylu-50% heksan | Frakcja 12 |
| | Frakcja 13 |
| | Frakcja 14 |
| | Frakcja 15 |
| 100 ml, octanu etylu | Frakcja 16 |
| 100 ml, 50% octan etylu- 50% metanol | Frakcja 17 |
| 100ml metanol | Frakcja 18 |

4.2.7. Analiza GC-MS frakcji propolisowych

a) przygotowanie roztworów porównawczych

Sporządzono roztwory substancji porównawczych w metanolu o następującym stężeniu:

| | |
|--|---------------|
| - galangina: | m=1,17 mg/ ml |
| - pinocembryna: | m=1,03 mg/ ml |
| - naringenina: | m=1,00 mg/ ml |
| - chryzyna: | m=1,00 mg/ ml |
| - pinobanksyna: | m=1,00 mg/ ml |
| - octan pinobanksyny : | m=1,00 mg/ ml |
| - kwercetyna: | m=1,25 mg/ ml |
| - akacetyna: | m=0,97 mg/ ml |
| - kwas p-kumarowy: | m=1,03 mg/ ml |
| - kwas cynamonowy: | m=1,20 mg/ ml |
| - ester 1,1-dimetylolilowy kwasu kawowego: | m=1,05 mg/ ml |
| - ester fenyloetylowy kwasu kawowego: | m=1,20 mg/ ml |

b) derywatywizacja próbki

100 µl każdej próbki odparowano w strumieniu azotu. Pozostałość rozpuszczono w 20 µl pirydyny. Następnie do każdej próbki dodano 100 µl BSTFA (N,O-bis-trimetlosilylotrifluoroacetamid) z 1% TMCS (trimetylochlorosilan) i ogrzewano w 60°C przez 30 minut.

c) warunki analizy

- kalibracja detektora masowego:- autone.U (stosując PFTBA: perfluorotributyloamina)
- odcięcie solwentu: - 4 minuta (analiza bez derywatywizacji)
- 6,25 minuta (analiza po derywatywizacji)

- zakres masowy: - 40 – 550 (dla próbek bez derywatywacji)
- 40 – 750 (próbki po derywatywacji)
- temperatura źródła: 200° C
- temperatura kwadropolu 100° C
- gaz: - hel
 - ciśnienie na wlocie: 15,0 psi
- gradient temperatury na kolumnie:
 - start 50° C (0,3 minut)
 - wzrost od 50° C do 285° C w ciągu 15 minut przy stałym wzroście 6° C/min
 - 285° C do 54 minut
- nastrzyk: - split/ splitless (1 min)
 - temperatura zaworu: 280° C

d) wykonanie analizy

Na kolumnę chromatograficzną nastrzykiwano bezpośrednio 5 µl próbki w przypadku analiz bez derywatywacji i 1 µl próbki po przeprowadzeniu w trimetylochlorosilany. Rozdzielone substancje identyfikowane były na podstawie porównania otrzymanych widm masowych z biblioteką widm lub substancjami wzorcowymi.

4.2.8. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej

a) przygotowanie szczepu testowego

Do oznaczeń stosowano szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, który przechowywano na podłożu BAA w temperaturze 4° C. W przeddzień wykonania oznaczenia pobrano niewielką ilość bakterii i posiano posiewem redukcyjnym na podłożu BAA. Płytkę inkubowano w 37° C przez 24 godziny. Bezpośrednio do oznaczenia przygotowano zawiesinę szczepu testowego

w 0,85 % roztworze NaCl, równą 0,5 jednostki w skali McFarlanda, przy użyciu densytometru (101).

b) przygotowanie etanolowych ekstraktów propolisowych do badań

Odważono etanolowych ekstraktów propolisowych do sterylnej kolby pojemności 25,0 ml w ilości odpowiadającej 75 do 90 mg propolisu i uzupełniono metanolem do podanej objętości. Roztwór wyjściowy powinien zawierać od 3000 µg/ml do 3500 µg/ml propolisu.

c) oznaczenie MIC etanolowych ekstraktów propolisowych

Z przygotowanych roztworów ekstraktów propolisowych odmierzone do 10 probówek od 0,6 ml do 0,15 ml roztworów i uzupełniono za pomocą podłoża BA do objętości 1,0 ml. Ponadto przygotowano dwie próby kontrolne: K-1 zawierającą 1,0 ml podłoża BA oraz K-2 o składzie 0,6 ml etanolu 96 % i 0,4 ml podłoża BA.

Przygotowane rozcieńczenia roztworów wyjściowych uzupełniono do 10,0 ml płynnym podłożem BAA o temperaturze 52° C. Zawartość probówek szybko wymieszano i wylano na sterylne i oznakowane płytki Petriego o średnicy 10 cm. Po zakrzepnięciu podłoża, wysiano na poszczególne płytki zawiesinę szczepu testowego, którą przy pomocy sterylnej szklanej bagietki rozprowadzono równomiernie po powierzchni płytek. Płytki inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie odczytano wyniki porównując wzrost szczepu z płytkami kontrolnymi. Płytką, zawierającą najniższe stężenie hamujące całkowicie wzrost szczepu testowego służy do odczytania wartości MIC, którą zdefiniowano jako ilość mikrogramów propolisu w 1,0 ml powodującą całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustrojów.

d) oznaczenie MIC frakcji propolisowych

W celu oznaczenia aktywności pobrano po 500 μ l, 250 μ l, 200 μ l, 150 μ l, 100 μ l, 50 μ l frakcji. Próbki odparowano do sucha w 37⁰C a następnie rozpuszczono w 500 μ l etanolu. Frakcje 1-3 rozpuszczono w 250 μ l dimetylosulfotlenku a następnie dodano 250 μ l etanolu. Do każdej frakcji dodano 500 μ l podłoża płynnego BA i dokładnie wymieszano. Następnie dodano 9,0 ml podłoża BAA. Wymieszaną zawartość wylano na płytki Petriego i posiano 10 μ l szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* o gęstości 0,5 jednostki w skali McFerlanda. Inkubowano 24 h w 37⁰ C. Aktywność mikrobiologiczna to ilość μ g frakcji w 1 ml, która całkowicie hamuje wzrost szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*.

4.2.9. Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej substancji porównawczych

a) przygotowanie roztworów substancji porównawczych

Roztwory do badań przygotowano odważając kolejno z dokładnością 0,01 mg po 5,00 mg kwasu kawowego, kwasu p-kumarowego, kwasu kawowego, kwasu benzoowego, chryzyny, pinocembryny, 7-metoksypinocembryny, galanginy, octanu pinobanksyny które rozpuszczono w 5,0 ml metanolu. Otrzymano roztwory o stężeniu około 1,0 mg/ml.

b) przygotowanie mieszanin modelowych kwasów fenolowych

Do oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej MIC (μ g/ml) mieszanin modelowych kwasów fenolowych, przygotowano roztwory metanolowe R₁ i R₂. Skład mieszanin przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Stężenia ($\mu\text{g/ml}$) kwasu kawowego, p-kumarowego i ferulowego w mieszaninach modelowych

| | R₁ | R₂ |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| kwas kawowy | 50,9 | 1201 |
| kwas p-kumarowy | 43,4 | 1344 |
| kwas ferulowy | 52,1 | 1555 |

c) przygotowanie mieszanin modelowych zawierających w składzie pinocembrynę, octan pinobanksyny, chryzynę i galanginę

Do oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej MIC ($\mu\text{g/ml}$) mieszaniny powyższych składników, przygotowano roztwory metanolowe M₁, M₂, M₃, M₄. Skład mieszanin przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Stężenia ($\mu\text{g/ml}$) pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy w mieszaninach modelowych

| | M₁ | M₂ | M₃ | M₄ |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| pinocembryna | 29 | 290 | 28 | 280 |
| octan pinobanksyny | 26 | 260 | 37 | 370 |
| chryzyna | 18 | 180 | 19 | 190 |
| galangina | - | - | 24 | 240 |

d) przygotowanie mieszanin modelowych zawierających w składzie wszystkie oznaczane składniki

Przygotowano mieszaniny modelowe P₁, P₂ i P₃ o zawartości poszczególnych składników jak przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Stężenia ($\mu\text{g/ml}$) składników w mieszaninach modelowych

| | P₁ | P₂ | P₃ |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| kwaskawowy | 8,8 | 17,5 | 35,0 |
| kwaskumarowy | 36,4 | 72,8 | 145,6 |
| kwaserulowy | 12,7 | 25,3 | 50,6 |
| pinocembryna | 70,1 | 140,2 | 280,4 |
| octan pinobanksyny | 45,2 | 90,4 | 180,8 |
| galangina | 33,2 | 66,4 | 132,8 |
| chryzyna | 34,4 | 68,8 | 137,6 |
| ester fenyloetylowy kwasu kawowego | 11,3 | 22,6 | 45,2 |
| ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | 9,1 | 18,2 | 36,4 |

d) wykonanie oznaczenia

W przypadku mieszanin modelowych M₁, M₂, M₃, M₄ do 500 μl każdego z roztworów dodano 500 μl podłoża płynnego BA i dokładnie wymieszano a następnie dodano 9,0 ml podłoża BAA. Zawartość wylano na płytki Petriego i posiano 10 μl szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* o gęstości 0,5 jednostki w skali McFerlanda. Inkubowano 24 h w 37⁰ C. Równolegle wykonano kontrolę dla 500 μl etanolu.

W przypadku mieszanin modelowych R₁ i R₂ oraz P₁, P₂ i P₃ postępowano tak jak w przypadku oznaczania aktywności mikrobiologicznej etanolowych ekstraktów propolisowych przygotowując kolejne rozcieńczenia roztworów w podłożu wzrostowym (pkt. 4.2.8.c).

4.2.10. Oznaczanie aktywności przeciwgrzybiczej

a) przygotowanie szczepu wzorcowego *Candida albicans*

Do oznaczeń stosowano szczep *Candida albicans* ATCC 10231, który przechowywano na podłożu Sabouraud w temperaturze 4° C. W przeddzień wykonania oznaczenia pobrano niewielką ilość grzybów i posiano posiewem redukcyjnym na podłożu Sabouraud. Płytkę inkubowano w 22° C przez 24 godziny. Bezpośrednio do oznaczenia przygotowano zawiesinę szczepu testowego w 0,85 % roztworze NaCl, równą 0,5 jednostki w skali McFarlanda, przy użyciu densytometru.

b) przygotowanie próbki

Nalewkę propolisową odważono w ilości odpowiadającej 400 mg propolisu do kolb sterylnych o pojemności 25,0 ml. Próbkę uzupełniono metanolem do podanej objętości. Do badań próbki rozcieńczono metanolem do uzyskania stężenia w zakresie od 6000 -10000 µg/ml propolisu.

c) wykonanie oznaczenia

Do 10 próbek odmierzone kolejno od 0,65 ml do 0,15 ml roztworów ekstraktów propolisowych i uzupełniono za pomocą podłoża BA do objętości 1,0 ml. Równocześnie przygotowano dwie próby kontrolne: K-1 zawierającą 1 ml podłoża BA oraz K-2 o składzie 0,6 ml etanolu 96% i 0,4 ml podłoża BA. Zawartość próbek uzupełniono do 10,0 ml agarem Sabouraud o temperaturze 52° C, szybko wymieszano i wylano na sterylne i oznakowane płytki Petriego o średnicy 5,5 cm. Po zestaleniu podłoża na poszczególne płytki wysiano po 10 µl zawiesiny szczepu testowego o gęstości 0,5 jednostki w skali McFarlanda. Płytkę inkubowano w 22° C przez 5 dni. Odczytano wyniki porównując wzrost szczepu w próbkach badanych z próbkami kontrolnymi. Płytkę, zawierającą najniższe stężenie hamujące całkowicie

wzrost szczepu testowego służy do określenia wartości MIC, którą zdefiniowano jako ilość mikrogramów propolisu w 1 ml powodującą całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustrojów.

4.2.11. Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej

a) przygotowanie substancji porównawczej

Odważono z dokładnością 0,01 mg około 50,00 mg troloksu i rozpuszczono w 200 ml 96 % etanolu. Następnie próbkę rozcieńczono 5 razy. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej pobrano 2.5, 3.5, 5.0, 7.5 i 10.0 ml do kolb o pojemności 10,0 ml i uzupełniono etanolem do podanej objętości.

b) przygotowanie próbek

Etanolowe ekstrakty propolisowe rozcieńczono 2500 razy 96 % etanolem. Dodatkowo przygotowano roztwory substancji wzorcowych (kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas p-kumarowy, chryzyna, galangina, pinocembryna, ester fenyloetylowy kwasu kawowego) o stężeniu około 0,5 mg/ml.

c) przygotowanie roztworów

- roztwór 10^{-2} M CuCl_2 (odważono 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 250,0 ml)
- bufor octanowy pH=7,0 (odważono 19,27 g octanu amonu, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do objętości 250,0 ml)
- roztwór $7,5 \cdot 10^{-3}$ mM neokuproiny (odważono 0,039 g neokuproiny, rozpuszczono w 96 % etanolu i uzupełniono etanolem do 25,0 ml)

d) wykonanie oznaczenia

Do próbek odmierzone kolejno 1,0 ml CuCl_2 , 1,0 ml neokuproiny i 1,0 ml buforu octanowego. Następnie dodano 250 μl badanej próbki lub substancji

wzorcowej i 850 µl wody dejonizowanej. Równolegle wykonano próbę ślepą w której zamiast próbki dodano 250 µl wody dejonizowanej. Próbki inkubowano 30 minut w 50⁰ C a następnie 30 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm. Aktywność antyoksydacyjną wyrażono w mmol troloksu w przeliczeniu na suchą masę nalewek lub masę substancji porównawczej.

4.3. Walidacja metod

Opracowane metody HPLC oznaczania kwasów fenolowych, flawonoidów oraz estrów kwasu kawowego poddano walidacji. W procesie walidacji metody uwzględniono obowiązujące wymagania ICH w odniesieniu do sprawności systemu, limitu wykrywalności, granicy oznaczoności, zakresu liniowości, dokładności i precyzji (102). Dodatkowo wykonano badanie stabilności roztworów wzorcowych i badanych przygotowanych zgodnie z opisanymi metodami badania. Wyniki walidacji metod zamieszczono w tabelach 9, 14, 17 natomiast wyniki badania stabilności w tabelach 10, 15 i 18.

a) sprawność systemu

Dla każdego z badanych związków określono współczynnik asymetrii piku, rozdzielczość oraz ilość pól teoretycznych kolumny wykorzystując w tym celu wytyczne Komisji Farmakopei Europejskiej.

b) limit detekcji (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

LOD i LOQ określono z wielkości sygnału detektora pochodzącego od składnika oznaczanego i poziomu zakłóceń stosując do obliczeń wzory:

$$\text{LOD} = 3.3 * \text{H/N},$$

$$\text{LOQ} = 10 * \text{H/N},$$

w których: H – wysokość pików, N– wielkość szumów.

c) liniowość

Na kolumnę nanoszono po 5 roztworów porównawczych o wzrastających stężeniach substancji porównawczych. Liniowość określono jako zależność pól powierzchni pików [mm²] od stężenia mg/ml. Miarę liniowości oznaczanych składników przedstawiono równaniami prostych wraz z wartościami współczynników korelacji.

d) dokładność

Dokładność metody scharakteryzowano przez podanie procentu odzysku dla badanych składników. W tym celu do ekstraktów propolisowych dodano dokładnie znane ilości substancji wzorcowych w ilościach 75 %, 100 % i 125 % w stosunku do oznaczonej zawartości badanych składników. Procent odzysku (% E) obliczono na podstawie oznaczenia zawartości składnika (C) do ilości wprowadzonej do roztworu próby badanej (C_t) według wzoru:

$$\% E = \frac{C - C_0}{C_t} * 100,$$

gdzie C₀ – stężenie oznaczanych składników w propolisie

e) precyzja i precyzja pośrednia

Zgodność wyników oznaczeń sprawdzono na roztworach badanych koncentratów. Dla każdego roztworu wykonano po 6 oznaczeń. Miarą precyzji jest wielkość odchylenia standardowego (s) i względnego odchylenia standardowego (% RSD). Precyzję pośrednią określono w warunkach jak wyżej wykonując badania w innym czasie.

f) stabilność roztworów wzorcowych i badanych

Zbadano stabilność roztworów wzorcowych kwasu kawowego, p-kumarowego, ferulowego, pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny, galanginy i estru feniloetylowego kwasu kawowego oraz roztworów próbek przygotowanych zgodnie z procedurą analityczną opisaną w punktach 4.2.2 i 4.2.4. Badania miały na celu określenie wpływu czasu i temperatury na stabilność roztworów wzorcowych i badanych, które stanowiły etanolowe ekstrakty propolisowe.

Roztwory objęte badaniami podzielono na dwie części, jedną przechowywano w temperaturze pokojowej a drugą w lodówce (8°C). Po upływie kolejno 24 h, 48 h i 7 dni rejestrowano pola powierzchni pików na chromatogramach dla odpowiednich roztworów, które wykorzystano do określenia procentowej zawartości składników. Wykonano po dwa oznaczenia dla każdego z roztworów.

4.4. Statystyczna ocena wyników

W celu potwierdzenia wiarygodności wykonanych pomiarów wyniki badań oceniono statystycznie dokonując obliczeń odpowiednich parametrów jak niżej:

a) średnia arytmetyczna „ \bar{x} ”

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

gdzie:

x_i – wyniki i-tego pomiaru

n – liczba pomiarów

\bar{x} - wartość średnia z n - pomiarów

Średnia arytmetyczna powinna stanowić jak najbliższe przybliżenie wartości rzeczywistej.

b) odchylenie standardowe pojedynczego wyniku „s”:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{f}}$$

gdzie:

$f = n - 1$ - liczba stopni swobody

s - odchylenie standardowe

Wartość s służy do oceny wielkości błędu przypadkowego pomiarów.

c) względne odchylenie standardowe wyniku „RSD”

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Wartość RSD to względna wielkość odchylenia standardowego pojedynczego wyniku, określająca wielkość rozrzutu wyników czyli charakteryzująca precyzję metody.

d) regresja to funkcja wyrażająca charakter i kształt zależności między zmiennymi o równaniu:

$$y = a \cdot x + b$$

gdzie:

x, y – zmienne

a, b – współczynniki prostej

Współczynniki a i b oblicza się metodą najmniejszych kwadratów według wzorów:

$$b = \frac{n \sum (xy) - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \qquad a = \frac{\sum y - b \sum \bar{x}}{n}$$

gdzie:

n – liczba pomiarów

e) współczynnik korelacji „r” jest miarą zależności pomiędzy zmiennymi x i y:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x}) * (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 * \sum (y - \bar{y})^2}}$$

„r” przyjmuje wartość w przedziale $-1 \leq r \leq 1$. Gdy $r = \pm 1$ wtedy wszystkie punkty leżą na linii prostej; gdy $r = 0$, zmienne nie są zależne liniowo. Czyli im wartość „r” bliższa jest jedności tym silniejsza korelacja między zmiennymi. Istotną statystycznie zależność określa wielkość poziomu istotności „p” wyliczona dla współczynnika korelacji. Wartość $p \leq 0,05$ oznacza występowanie statystycznie istotnej zależności.

5. ANALIZA FIZYKOCHEMICZNA

W zakresie badań fizykochemicznych główny nacisk położono na określenie podstawowych parametrów jakościowych dla koncentratu propolisowego stanowiącego przedmiot badania. W następnym etapie dokonano identyfikacji i oznaczenia zawartości składników organicznych i nieorganicznych występujących w badanych produktach.

W badaniach posłużono się opracowanymi metodami rozdzielczymi jak HPLC, TLC, GC oraz spektralnymi jak spektrometria atomowa, spektrometria mas występującymi oddzielnie (AAS) i w połączeniu (GC-MS).

Badania identyfikacji frakcji propolisowych GC-MS wykonano w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Farmacji na Uniwersytecie w Clermont Ferrand we Francji pod kierunkiem Pani Profesor Clair Lartigu podczas pobytu naukowego w ramach Programu Leonardo da Vinci.

5.1. Ocena chemiczna

Zakres prowadzonych badań obejmował oznaczenia ujęte w monografii farmakopealnej dla gęstych wyciągów według Farmakopei Polskiej VII oraz Polskiej Normy PN-A-77627 dla koncentratu propolisowego. Określono suchą pozostałość, zawartość popiołu ogólnego i nierozpuszczalnego w 10 % HCL oraz zawartość metali ciężkich w przeliczeniu na ołów.

Wyniki przedstawiono w tabeli 6. Zawartość popiołu ogólnego w koncentracie propolisowym wyniosła od 0,10 % do 0,20 % a popiołu nierozpuszczalnego w 10 % HCl od 0,01 % do 0,04 %. W obu przypadkach zostały spełnione wymagania Polskiej Normy, w której limity dla powyższych parametrów wynoszą odpowiednio nie więcej niż 0,5 % i 0,05 %. Zawartość metali ciężkich w przeliczeniu na ołów nie przekroczyła

dopuszczalnego limitu farmakopealnego dla gęstych wyciągów 60 mg/kg (Farmakopea Polska VI).

Tabela 6. Wyniki oznaczeń chemicznych koncentratów propolisowych

| Nr próbki | Sucha pozostałość (%) | Popiół ogólny (%) | Popiół nierozp. w 10% HCl (%) | Zawartość metali ciężkich (mg/kg) |
|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 070201 | 79,8 | 0,10 | 0,02 | < 60 |
| 070301 | 76,4 | 0,20 | 0,04 | < 60 |
| 060801 | 85,6 | 0,20 | 0,01 | < 60 |
| 060301 | 80,9 | 0,10 | 0,02 | < 60 |
| 060101 | 78,1 | 0,07 | 0,02 | < 60 |
| 040901 | 76,4 | 0,20 | 0,02 | < 60 |
| 040401 | 77,2 | 0,10 | 0,01 | < 60 |
| \bar{X} | 79,2 | 0,14 | 0,02 | - |
| S | 3,29 | 0,06 | 0,01 | - |
| RSD | 4,16 | 42,2 | 50,0 | - |

Popiół nierozpuszczalny w 10 % HCl nie przekracza średniej zawartości 0,02 % w sześciu seriach produktu z wyjątkiem jednej w której zawartość jest dwukrotnie większa. Zawartość popiołu ogólnego we wszystkich próbkach nie przekracza 0,2 % przy rozrzucie wyników wokół wartości średniej mieszczących się w przedziale ± 50 %. Uwagę zwracają wyniki oznaczeń pozostałości po odparowaniu, które są porównywalne w poszczególnych seriach preparatu i nie odbiegają od średniej zawartości w większym stopniu niż ± 10 %.

5.2. Oznaczenie składników nieorganicznych metodą AAS

Badanie wykonano zgodnie z metodą przedstawioną w punkcie 4.2.1.

5.2.1. Oznaczanie zawartości jonów miedzi, cynku i żelaza

Jony miedzi, cynku i żelaza to mikroelementy o ważnym znaczeniu dla stanu prawidłowego funkcjonowania organizmu. Składniki stanowiące przedmiot badania są spotykane w różnych tkankach, spełniając często rolę czynników katalitycznych. Stężenie tych składników w pożywieniu ma istotne znaczenie ze względu na właściwości zdrowotne oraz toksyczne. Zawartość jonów miedzi, cynku i żelaza oznaczono w koncentratkach propolisowych stosowanych do produkcji leków i suplementów diety.

Wyniki przeprowadzonych badań zamieszczono w tabeli 7. Zawartość miedzi w badanych próbkach wyniosła od 1,7 mg/kg - 2,6 mg/kg, którą można porównać do zawartości w produktach spożywczych jak: mięsie (0,6 mg/kg - 2,5 mg/kg) i pieczywie (0,6 mg/kg - 2,0 mg/kg) (103).

Zawartość cynku była około dwa do kilkanaście razy większa i wynosiła od 5,6 mg/kg – 32,46 mg/kg. Dla porównania zawartość tego pierwiastka w warzywach wynosi od 2,4 mg/kg do 42,0 mg/kg, przy czym najwięcej jest w roślinach strączkowych (103).

Najwięcej w analizowanym materiale było żelaza, od 32,5 mg/kg do 72,4 mg/kg. Odpowiednio poziom tego składnika w mięsie wynosi od 23 mg/kg do 35 mg/kg. Najobfitszym źródłem żelaza jest wątroba, w której zawartość powyższego składnika mieści się w przedziale od 95 mg/kg do 180 mg/kg (103).

Zatem zawartość niezbędnych dla organizmu mikroelementów w propolisie jest dosyć wysoka jednak ze względu na stosowane dawki preparatów propolisowych nie ma to znaczenia w suplementacji diety. Jednocześnie są to stężenia bezpieczne z punktu widzenia toksykologicznego.

Tabela 7. Zawartość (mg/kg) jonów miedzi, cynku i żelaza w koncentratyach propolisowych w mg/kg

| Numer próbki | cynk | miedź | żelazo |
|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 4/2002 | 6,9 | 1,7 | 72,4 |
| 1/2001 | 6,6 | 1,8 | 38,2 |
| 4/2002 | 5,6 | 2,1 | 46,1 |
| 081205 | - | 2,4 | 39,8 |
| 040401 | 26,0 | 2,5 | 32,5 |
| 061202 | 25,5 | 2,6 | 65,3 |
| 061202 | 16,4 | 2,4 | 63,2 |
| 061202 | 31,6 | 1,7 | 70,7 |
| 031001 | 10,7 | 2,0 | 45,8 |
| 251004 | 9,6 | 2,4 | 55,2 |
| \bar{X} | 15,43 | 2,16 | 52,92 |
| S | 9,87 | 0,34 | 14,39 |
| RSD | 63,95 | 15,92 | 27,19 |

Zawartość badanych jonów metali w poszczególnych próbkach w stosunku do wartości średniej obliczonej dla dziesięciu prób mieści się w zakresie tolerancji $\pm 25\%$ dla miedzi we wszystkich próbkach w przeciwieństwie do cynku i żelaza. W przypadku żelaza sześć prób mieści się w podanej tolerancji a wszystkie pozostałe próbki mieszczą się w zakresie $\pm 50\%$ podczas gdy w przypadku cynku osiem prób mieści się w zakresie $\pm 50\%$ a jedna w $\pm 25\%$.

5.2.2. Oznaczanie zawartości jonów metali ciężkich

Zawartość metali ciężkich ze względu na wysoką toksyczność dla organizmu jest limitowana zarówno w lekach jak i w produktach spożywczych. Badaniami objęto oznaczenie kadmu i ołowiu.

W oparciu o wyniki zamieszczone w tabeli 8 stwierdzono obecność kadmu tylko w jednej próbce a zawartość jego wynosiła 0,06 mg/kg. Zawartość ołowiu w badanych koncentratkach mieściła się w zakresie od 0,12 mg/kg do 0,31 mg/kg i jest to znacznie mniej niż określony w PN limit, który wynosi odpowiednio 0,4 mg/kg dla jonów ołowiu i 0,1 mg/kg dla jonów kadmu. Fakt, że stwierdzono obecność kadmu w jednej serii wydaje się być ważną sprawą w odniesieniu do oceny czystości produktu, wykazując, że jego oznaczenie powinno być uwzględnione w ocenie produktu.

Zawartość (mg/kg) jonów ołowiu w stosunku do wartości średniej obliczonej dla dziewięciu serii mieści się w zakresie tolerancji $\pm 25\%$ w siedmiu próbach a zakresie $\pm 50\%$ w ośmiu próbach (tab.8).

Tabela 8. Zawartość (mg/kg) jonów metali ciężkich w koncentratkach propolisowych

| Numer próbki | olów | kadm |
|--------------|--------------|--------|
| 251004 | 0,125 | <0,012 |
| 4/2002 | 0,310 | <0,012 |
| 241104 | 0,13 | 0,06 |
| 201003 | 0,150 | <0,012 |
| 1/2003 | <0,125 | <0,012 |
| 040401 | 0,170 | <0,012 |
| 4/2003 | <0,125 | <0,012 |
| 061202 | 0,120 | <0,012 |
| 031001 | 0,120 | <0,012 |
| \bar{X} | 0,13 | - |
| S | 0,09 | - |
| RSD | 73,86 | - |

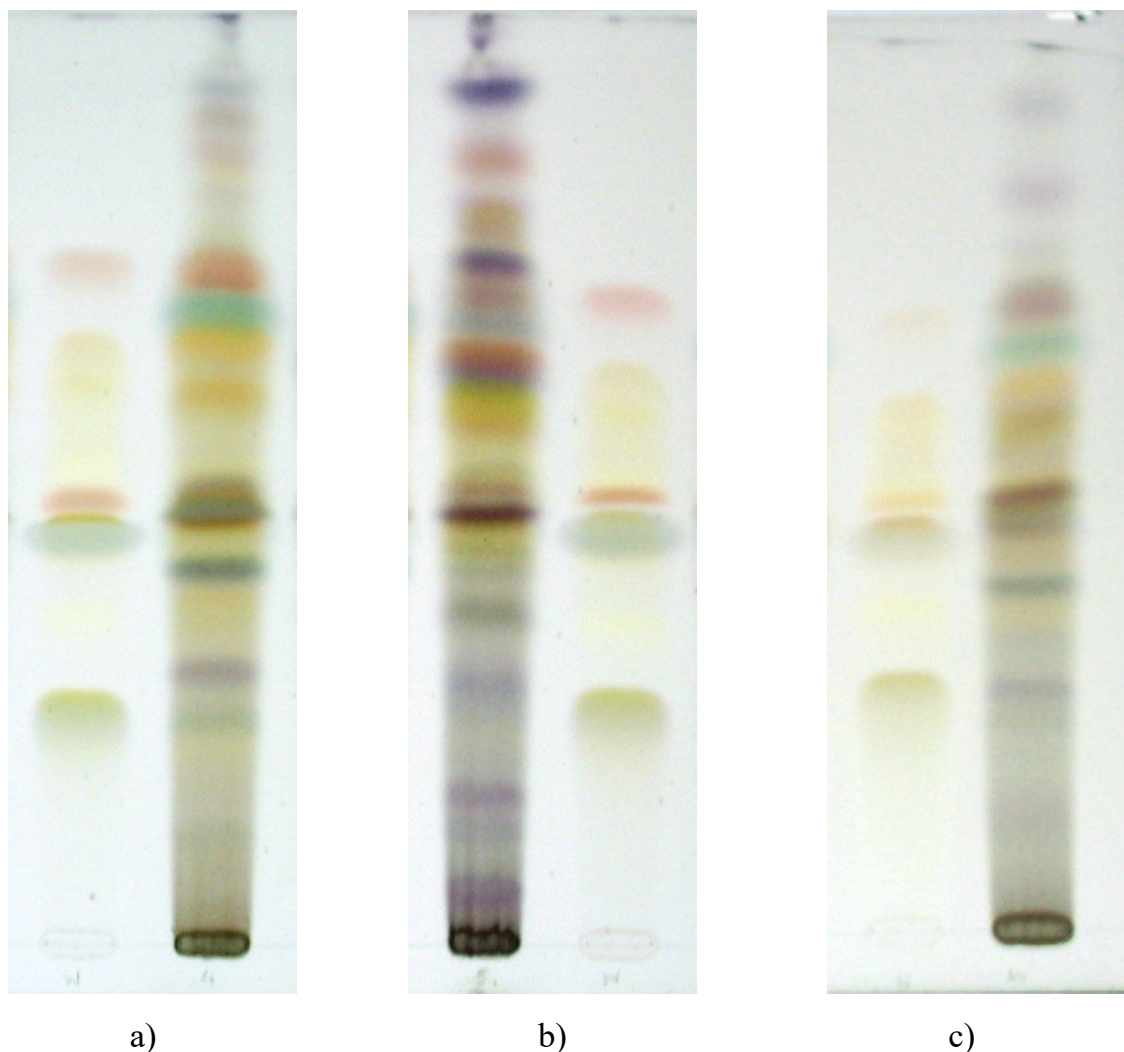
5.3. Analiza TLC ekstraktów propolisowych

Chromatografia cienkowarstwowa ma szerokie zastosowanie w ocenie surowców farmakopealnych szczególnie pochodzenia roślinnego. Do wstępnej oceny preparatów propolisowych opracowano metodę TLC, która pozwoliła na uzyskanie charakterystycznego „fingerprintu” (pkt. 4.2.5.).

Jako substancji porównawczych użyto odpowiednich roztworów składników, które zostały opisane w licznych publikacjach (7,9,28,19,104).

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że poszczególne chromatogramy różnią się intensywnością zabarwionych plam oraz ich liczbą. Identyfikacja przez porównanie chromatogramów badanych i wzorcowych jest utrudniona z uwagi na interferencję różnych związków. Można natomiast stwierdzić, że poszczególne produkty różnią się zawartością składników o czym świadczy intensywność plam na chromatogramach.

Na rysunku 1 przedstawiono chromatogramy etanolowych ekstraktów propolisowych.



Rysunek 1. „Fingerprint” TLC etanolowych ekstraktów propolisowych: a) nr 4, b) nr 5, c) nr 14. Próbkę badaną analizowano równoległe z mieszaniną substancji porównawczych, kolejno od punktu startu: kwas kawowy i kwercetyna – żółtozielona plama, apigenina – żółta, kemferol – jasnożółta pod plamą niebieską, kwas p-kumarowy i ferulowy – niebieska, naringenina – czerwona, akacetyna – żółta, kemferyd – żółtopomarańczowa, chryzyna – żółta, galangina – pomarańczowa, pinocembryna - różowa

5.4. Identyfikacja i oznaczenie kwasów fenolowych

Kwasy fenolowe to jedna z podstawowych grup związków obecnych w propolisie (5,9,10,20). Do identyfikacji i oznaczenia kwasów fenolowych opracowano metodę HPLC z elucją gradientową (pkt. 4.2.2.) Badaniami objęto koncentraty oraz nalewki propolisowe, w których prowadzono identyfikację badanych związków przez porównanie wartości czasów retencji (RT) oraz widm absorpcji.

Zawartość kwasów fenolowych oznaczono przez porównanie odpowiednich powierzchni pików substancji wzorcowych i roztworów badanych.

Badaniami objęto: kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas izoferulowy, kwas cynamonowy, kwas wanilinowy i kwas benzoesowy. W badaniach wstępnych stwierdzono, że w analizowanych partiach produktów występują następujące kwasy: kawowy, ferulowy i p-kumarowy, stąd też dalsze badania ograniczono do tych związków.

5.4.1. Walidacja metody

W opracowanych warunkach uzyskano dobry rozdział poszczególnych pików na chromatogramach, które różnią się znacząco wartościami RT: 6,72, 10,27, 11,49 minuty dla kwasu kawowego, p-kumarowego i ferulowego. Wyniki oceny jakości systemu potwierdzają jego wysoką sprawność o czym świadczą współczynniki asymetrii pików na chromatogramach oraz wysoka liczba pólki teoretycznych kolumny.

Opracowaną metodę cechuje wysoka czułość. LOD dla poszczególnych kwasów fenolowych wynosi od 0,315 µg/ml do 0,695 µg/ml, natomiast LOQ od 1,325 µg/ml do 2,42 µg/ml. Metoda charakteryzuje się szerokim zakresem liniowości przy zachowaniu bardzo dobrej korelacji „r” od 0,9996 do 0,9997. Dokładność metody określona jako procent odzysku na trzech poziomach stężeń mieści się w zakresie od 98,14 % do 101,05 % podany jako wartość średnia. Dobra precyzja metody RSD od 1,54 % do 2,27 % świadczy o powtarzalności wyników oznaczeń wykonanych przez jednego analityka jak również odtwarzalności (precyzja pośrednia) w odniesieniu do badań wykonanych w innym czasie. Szczegółowe wyniki walidacji metody zebrano w tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki walidacji metody oznaczania kwasów fenolowych w etanolowych ekstraktach propolisowych

| Kryterium | Kwas kawowy | Kwas p-kumarowy | Kwas ferulowy |
|--|--|---|---|
| Sprawność systemu | Asym = 1,14 R _s = 13,80 N = 12102 | Asym = 1,06 R _s = 13,83 N = 21859 | Asym = 0,99 R _s = 4,04 N = 21787 |
| Czas retencji (min) | 6,72 | 10,27 | 11,49 |
| Limit detekcji (µg/ml) | 0.315 | 0.325 | 0.695 |
| Granica oznaczalności (µg/ml) | 1.325 | 1.54 | 2.42 |
| Zakres liniowości (µg/ml) | 1.33 – 99.18 | 1.54 – 119,16 | 2,42 – 184.14 |
| Równanie prostej y=ax+b±Sy | a = 2.3554*10 ⁴ b= 4773.7 | a= 2.7963*10 ⁴ b= 7790,7 | a= 2.3157*10 ⁴ b= 6290 |
| Błąd standardowy współczynników a i b | Sb = 8806.5 (p=0.598) Sa= 23554,06 (p=0.0000) | Sb = 11468.7 (p=0.5098) Sa= 7790,70 (p=0,0000) | Sb = 16013 (p=0.7014) Sa= 6290,01 (p=0,0000) |
| Współczynnik korelacji | r=0.9996 | r=0.9997 | r=0.9996 |
| Odzysk (%) (wartości średnie) | \bar{x} = 98.14 | \bar{x} = 101.05 | \bar{x} = 99.42 |
| Precyzja s 201003 (n=6) | RSD= 2.27 | RSD=1,69 | RSD= 1,54 |
| Precyzja pośrednia s 201003 (n=3) | RSD= 2,49 | RSD= 1,87 | RSD= 1,4 |

W badaniach stabilności roztworów wzorcowych i badanych wykazano, że ich trwałość jest zależna od warunków, rodzaju i czasu przechowywania prób. W temperaturze do 8⁰ C zarówno roztwory porównawcze jak również i koncentraty propolisowe zachowywały stabilność w czasie 7 dni. W temperaturze pokojowej w badanym okresie podobnie zachowywały się ekstrakty propolisowe w przeciwieństwie do roztworów porównawczych kwasów fenolowych, które już po 48 h wykazywały mniejszą zawartość oznaczonych związków co pozwala sądzić, że ich trwałość w roztworach jest mniejsza (tab. 10).

Powyższe spostrzeżenia wydają się być istotne nie tylko w odniesieniu do części analitycznej ale mogą mieć także szersze znaczenie w odniesieniu do trwałości produktu wyjściowego na etapie wytwarzania postaci farmaceutycznych.

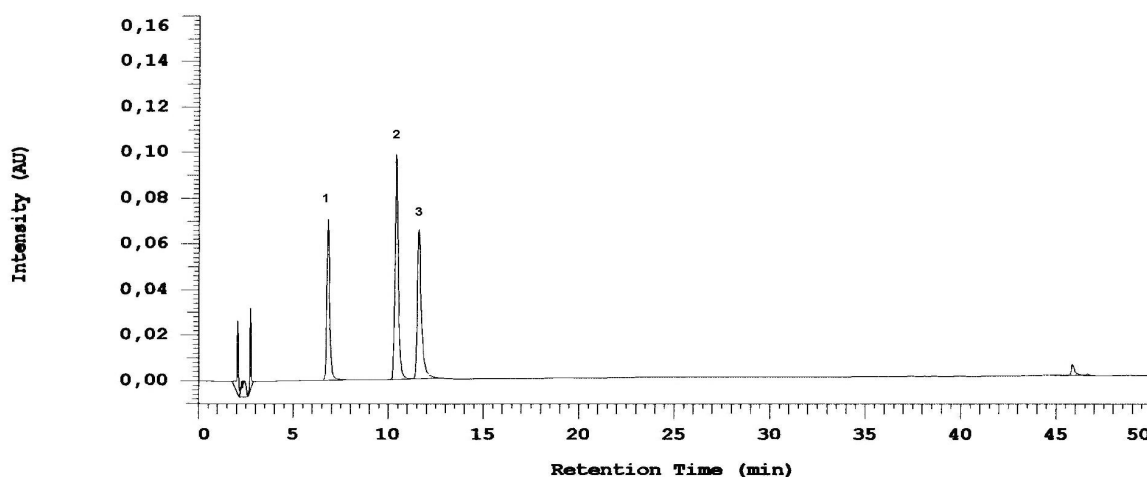
Tabela 10. Stabilność roztworów wzorcowych i badanych kwasów fenolowych. Wyniki podano w %.

| ROZTWORY PORÓWNACZE | | | | | | |
|----------------------------|------------------------|------------|----------|-----------------------------|------------|----------|
| czas przechowywania | 8⁰ C | | | temperatura pokojowa | | |
| | kawowy | p-kumarowy | ferulowy | kawowy | p-kumarowy | ferulowy |
| 24 h | 99,5 | 100,1 | 99,2 | 99,8 | 100,2 | 99,8 |
| 48 h | 99,9 | 100,5 | 100,2 | 95,8 | 100,5 | 96,7 |
| 7 dni | 101,3 | 102,3 | 101,8 | 77,5 | 97,4 | 74,6 |
| ROZTWORY BADANE | | | | | | |
| 24 h | 100,2 | 100,9 | 102,0 | 100,2 | 100,6 | 99,6 |
| 48 h | 100,6 | 101,0 | 101,2 | 101,5 | 101,8 | 101,0 |
| 7 dni | 102,4 | 101,5 | 101,9 | 98,6 | 100,3 | 96,7 |

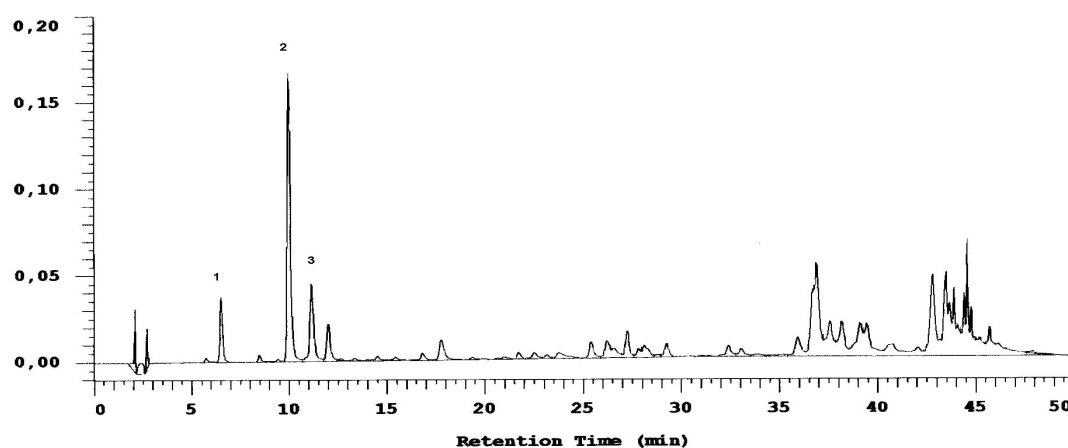
5.4.2. Oznaczanie kwasów: kawowego, p-kumarowego i ferulowego

Opracowaną metodę HPLC-RP z elucją gradientową wykorzystano do jednoczesnego oznaczenia kwasu kawowego, p-kumarowego i ferulowego w etanolowych ekstraktach propolisowych.

Przedstawione na rysunkach 2 i 3 przykładowe chromatogramy dla odpowiedniego roztworu porównawczego i próby badanej pokazują dobrze wykształcone piki pochodzące od kwasu kawowego (pik 1, RT=6,72), kwasu p-kumarowego (pik 2, RT=10,27) i kwasu ferulowego (pik 3, RT=11,49), które są dobrze rozdzielone i symetryczne. W zakresie czasu retencji od 5 minut do 15 minut na obu chromatogramach występują piki pochodzące od składników badanych. W podanym zakresie pomiarów nie występują zatem możliwości interferencji składników, które występują w próbkach badanych.

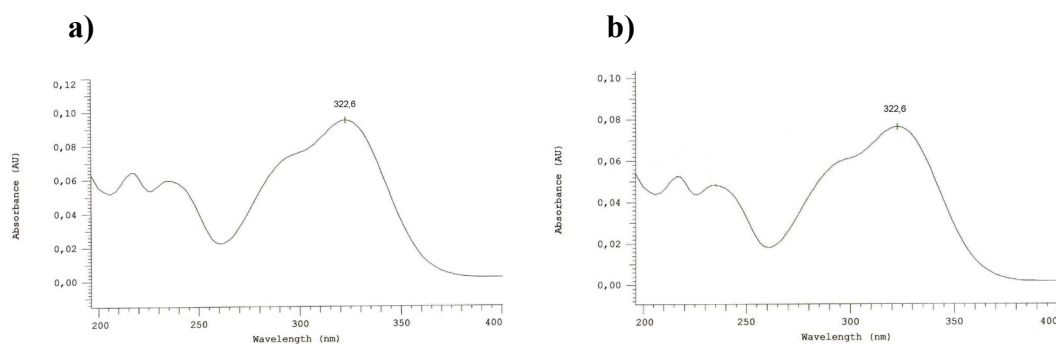


Rysunek 2. Chromatogram roztworów porównawczych; 1-kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy

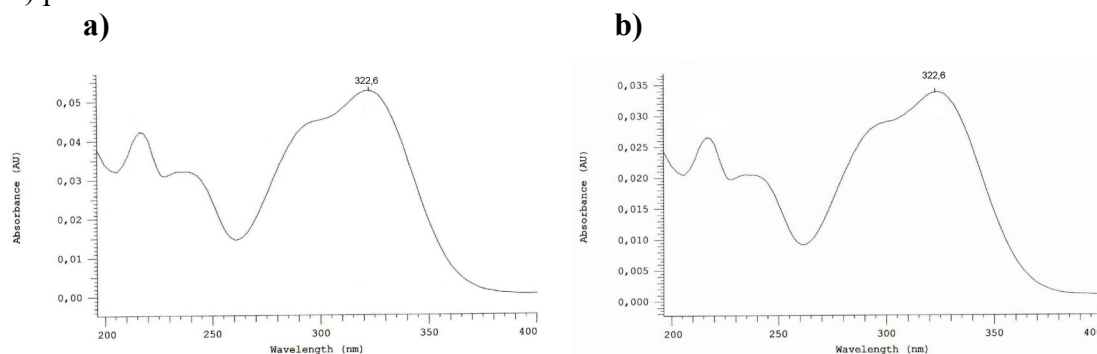


Rysunek 3. Chromatogram koncentratu propolisowego; 1-kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy

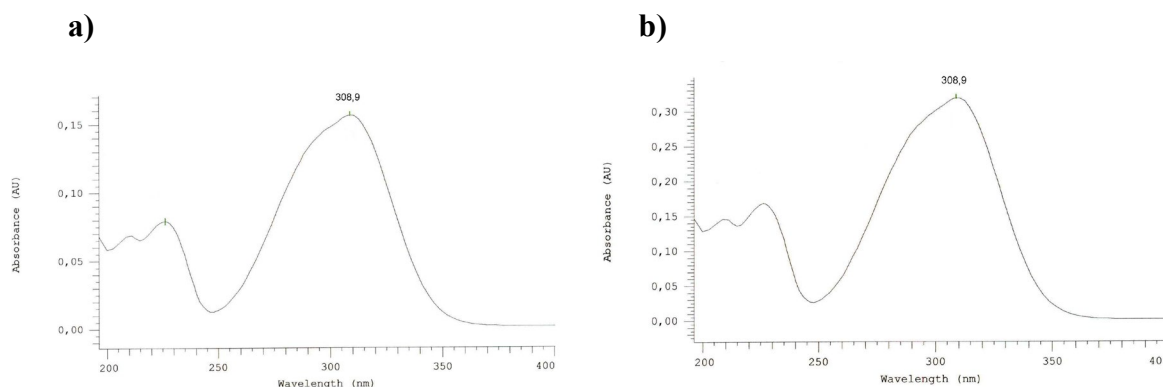
Wykorzystywane do badania tożsamości widma absorpcji są charakterystyczne dla składników pochodzących z roztworów prób badanych i substancji porównawczych (rys. 4,5,6).



Rysunek 4. Widma absorpcji roztworów kwasu ferulowego a) substancji porównawczej b) próbki



Rysunek 5. Widma absorpcji roztworów kwasu kawowego a) substancji porównawczej b) próbki



Rysunek 6. Widma absorpcji roztworów kwasu p-kumarowego a) substancji porównawczej b) próbki

Otrzymane dla odpowiednich składników badanych i porównawczych widma mają podobny przebieg co świadczy o braku interferencji składników współobecnych w propolisie na wyniki oznaczeń. Wydaje się zatem, że opracowana metoda jest specyficzna do oznaczania wybranych kwasów fenolowych.

Zgodnie z opracowaną procedurą wykonano oznaczenie kwasów fenolowych w dziesięciu próbkach koncentratów propolisowych oraz w piętnastu próbkach nalewek.

W przypadku koncentratów oznaczono: kwasu kawowego od 0,41 % do 1,00 %, kwasu p-kumarowego od 1,12 % do 3,00 % i kwasu ferulowego od 0,72 % do 1,09 % (tab.11).

Sumaryczna średnia zawartość (%) kwasu kawowego, p-kumarowego i ferulowego oznaczona w próbkach dziesięciu partii produkcyjnych mieści się w zakresie ± 25 % dla wszystkich badanych prób, podobnie jak wyniki oznaczeń kwasu ferulowego. W przypadku kwasu kawowego i p-kumarowego odpowiednio sześć i cztery próby mieszczą się w odchyleniu ± 25 % a pozostałe w odchyleniu ± 50 %.

Tabela 11. Wyniki oznaczenia zawartości (%) kwasów fenolowych w koncentratkach propolisowych

| Numer próbki | Kwas kawowy | Kwas p-kumarowy | Kwas ferulowy | suma |
|--------------|-------------|-----------------|---------------|-------------|
| 4/2002 | 0,72 | 1,94 | 1,01 | 3,67 |
| 141003 | 1,00 | 1,37 | 1,01 | 3,38 |
| 201003 | 0,98 | 1,23 | 1,09 | 3,31 |
| 070601 | 0,70 | 2,10 | 1,06 | 3,86 |
| 070301 | 0,41 | 1,96 | 0,91 | 3,28 |
| 220904 | 0,97 | 1,12 | 0,88 | 2,97 |
| 160106 | 0,60 | 3,00 | 1,01 | 4,61 |
| 081205 | 0,48 | 2,84 | 0,91 | 4,23 |
| 060101 | 0,55 | 2,83 | 0,84 | 4,22 |
| 060801 | 0,59 | 2,62 | 0,77 | 3,98 |
| 031106 | 0,63 | 2,76 | 0,72 | 4,11 |
| \bar{X} | 0,69 | 2,16 | 0,93 | 3,78 |
| S | 0,21 | 0,70 | 0,12 | 0,50 |
| RSD | 29,7 | 32,2 | 12,9 | 13,3 |

W nalewkach propolisowych (tab.12) uzyskano podobne wyniki jak w koncentratkach zwłaszcza w odniesieniu do sumy ich zawartości chociaż wyniki oznaczeń poszczególnych kwasów w nalewkach wykazują większe różnice. Kwas p-kumarowy podobnie jak w koncentratkach występuje w stężeniu większym niż pozostałe kwasy. Stężenie kwasu kawowego mieści się w przedziale od 0,23 % do 1,26 %, kwasu p-kumarowego od 1,45 % do 3,42 % a kwasu ferulowego od 0,26 % do 1,58 %. W sumie w analizowanych ekstraktach występuje od 2,35 % do 5,13 % kwasów fenolowych.

Wydaje się, że wykazane różnice w odniesieniu do zawartości poszczególnych kwasów w badanych produktach można wytłumaczyć ich pochodzeniem.

Zawartość (%) sumy poszczególnych składników w porównaniu do wartości średniej obliczonej dla piętnastu nalewek mieści się w zakresie ± 25 % dla dziesięciu nalewek oraz ± 50 % dla piętnastu nalewek. Wyniki przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Zawartość (%) kwasów fenolowych w nalewkach propolisowych

| Numer próbki | Kwas kawowy | Kwas p-kumarowy | Kwas ferulowy | Suma |
|--------------|-------------|-----------------|---------------|-------------|
| 1 | 0,35 | 2,68 | 1,06 | 4,09 |
| 2 | 0,36 | 1,81 | 0,85 | 3,02 |
| 3 | 1,26 | 2,86 | 0,26 | 4,38 |
| 4 | 0,62 | 3,42 | 0,33 | 4,37 |
| 5 | 0,23 | 1,67 | 0,45 | 2,35 |
| 6 | 0,99 | 3,09 | 0,82 | 4,9 |
| 7 | 0,54 | 1,45 | 0,42 | 2,41 |
| 8 | 0,87 | 2,84 | 0,74 | 4,45 |
| 9 | 0,47 | 1,82 | 1,37 | 3,66 |
| 10 | 0,29 | 1,64 | 1,10 | 3,03 |
| 11 | 0,34 | 2,54 | 1,52 | 4,4 |
| 12 | 0,88 | 1,50 | 0,35 | 2,73 |
| 13 | 1,02 | 3,23 | 0,51 | 4,76 |
| 14 | 0,34 | 3,32 | 1,47 | 5,13 |
| 15 | 0,41 | 2,32 | 1,58 | 4,31 |
| \bar{X} | 0,60 | 2,41 | 0,86 | 3,87 |
| S | 0,32 | 0,71 | 0,47 | 0,93 |
| RSD | 54,01 | 29,45 | 54,88 | 23,97 |

5.5. Oznaczenie flawonoidów metodą spektrofotometryczną

Flawonoidy stanowią ważną grupę związków, które występują w propolisie (5,8,18,10,19). Do oznaczania flawonoidów w etanolowych nalewkach z kitu pszczelego zastosowano metodę spektrofotometryczną, która jest polecana przez wielu autorów (5,95,96,97).

Zawartość flawonoidów oznaczono jako sumę w przeliczeniu na kwercetynę wykorzystując barwną reakcją z chlorkiem glinu (AlCl_3). Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną w punkcie 4.2.3.

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 13. Stężenie flawonoidów oznaczone w badanych próbkach mieściło się w zakresie od 2,21 % - 6,69 %.

Średnia zawartość flawonoidów oznaczona w piętnastu nalewkach wynosiła 4,78 %, w porównaniu do której procentowa zawartość oznaczonych składników w poszczególnych nalewkach była w zakresie odchylenia ± 25 % dla dziewięciu nalewek i ± 50 % dla piętnastu nalewek.

Tabela 13. Zawartość (%) flawonoidów w nalewkach propolisowych oznaczona metodą spektrofotometryczną

| Nr próbki | Zawartość flawonoidów | Nr próbki | Zawartość flawonoidów |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 1 | 4,43 | 9 | 3,68 |
| 2 | 5,15 | 10 | 4,79 |
| 3 | 6,69 | 11 | 2,21 |
| 4 | 5,25 | 12 | 5,37 |
| 5 | 6,46 | 13 | 5,17 |
| 6 | 5,03 | 14 | 2,54 |
| 7 | 6,65 | 15 | 2,81 |
| 8 | 5,42 | | |
| \bar{X} | | 4,78 | |
| S | | 1,42 | |
| RSD | | 29,68 | |

5.6. Oznaczenie pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy metodą HPLC

Wyniki oznaczenia flawonoidów metodą spektrofotometryczną były jedynie potwierdzeniem sumy ich zawartości w przeliczeniu na kwercetynę, z których to badań nie można wnioskować o zawartości poszczególnych składników. Podjęto zatem badania mające na celu opracowanie nowej metody HPLC, która pozwoli na dokładniejszą charakterystykę produktu (pkt. 4.2.4).

Przedmiot badań stanowiły nalewki propolisowe, w których oznaczeniami objęto: pinocembrynę, octan pinobanksyny, chryzynę i galanginę. Wyboru wymienionych składników do badań dokonano w oparciu o dane z piśmiennictwa (7,8,18,19) oraz dostępne substancje porównawcze.

5.6.1. Walidacja metody

Walidacja metody spełnia kryteria akceptacji dla badanych składników w zakresie sprawności systemu, czułości, liniowości, dokładności, precyzji i precyzji pośredniej.

Występujące na chromatogramach piki pochodzące od pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny czy galanginy charakteryzują się podobną symetrią i dobrą rozdzielczością. W opracowanych warunkach uzyskano wysoką liczbę pól teoretycznych w kolumnie, co wydaje się ważnym przy rozdziale związków mając na uwadze podobne właściwości fizykochemiczne.

Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką czułością oznaczania badanych składników, dla których LOD wynosi od 0,5 $\mu\text{g/ml}$ do 2,8 $\mu\text{g/ml}$, LOQ od 1,1 $\mu\text{g/ml}$ do 6,6 $\mu\text{g/ml}$, szerokim zakresem liniowości mieszczącym się od 23,4 $\mu\text{g/ml}$ do 280 $\mu\text{g/ml}$ przy dobrej korelacji $r=0,9997$. Dokładność metody jako procent odzysku mieści się w przedziale od 102,8% do 104,4%.

Precyzja i precyzja pośrednia określone wartością RSD w przypadku octanu pinobanksyny osiągnęła wartość 1 % a w przypadku pozostałych składników jest mniejsza niż 1 %. Szczegółowe wyniki zamieszczono w tabeli 14.

Tabela 14. Wyniki walidacji metody oznaczania pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy w etanolowych ekstraktach propolisowych

| Kryterium | pinocembryna | Octan pinobanksyny | chryzyna | galangina |
|--|---|--|--|--|
| Sprawność systemu | Asym = 1,16 R _s = 2,76 N = 63220 | Asym = 1,08 R _s = 2,76 N = 84931 | Asym = 1,11 R _s = 1,22 N = 113088 | Asym = 1,14 R _s = 2,27 N = 416528 |
| Czas retencji (min) | 66,7 | 70,2 | 75,9 | 77,8 |
| Limit detekcji (µg/ml) | 2,5 | 2,8 | 0,80 | 0,5 |
| Granica oznaczalności (µg/ml) | 6,6 | 6,6 | 1,1 | 1,2 |
| Zakres liniowości (µg/ml) | 26,4 - 264 | 31,7 - 317 | 23,4 - 233,5 | 28 - 280 |
| Równanie prostej y=ax+b±Sy | a= 0,47196*10 ⁷ b= -3451,74 | a= 0,3321*10 ⁷ b= 138,87 | a= 2,5601*10 ⁷ b= -13895,65 | a=1,6144*10 ⁷ b= -8924,3 |
| Błąd standardowy współczynników a i b | Sb =5877,7 (p=0.598) Sa =38704,8 p=0.0000) | Sb = 5073,6 (p=0.5098) Sa =27839,7 (p=0.0000) | Sb = 28075,6 (p=0.7014) Sa =209011,6 (p=0.0000) | Sb = 21049,8 (p=0.7014) Sa =130685,1 (p=0.0000) |
| Współczynnik korelacji | r=0.9997 | r=0.9997 | r=0.9997 | r=0.9997 |
| Odzysk (%) (wartość średnia) | 102,8 | 103,5 | 103,8 | 104,4 |
| Precyzja RSD (%), n= 7 | 0,70 | 1,04 | 0,32 | 0,44 |
| Precyzja pośrednia RSD (%), n= 3 | 0,29 | 0,50 | 0,66 | 0,81 |

Podkreślić należy, że wszystkie roztwory zarówno porównawcze jak również badane były stabilne w warunkach prowadzonych badań (tab. 15).

Tabela 15. Stabilność roztworów porównawczych i składników badanych. Wyniki przedstawiono w %.

| Czas prze- | ROZTWORY PORÓWNAWCZE | |
|------------|----------------------|----------------------|
| | 8° C | temperatura pokojowa |
| | | |

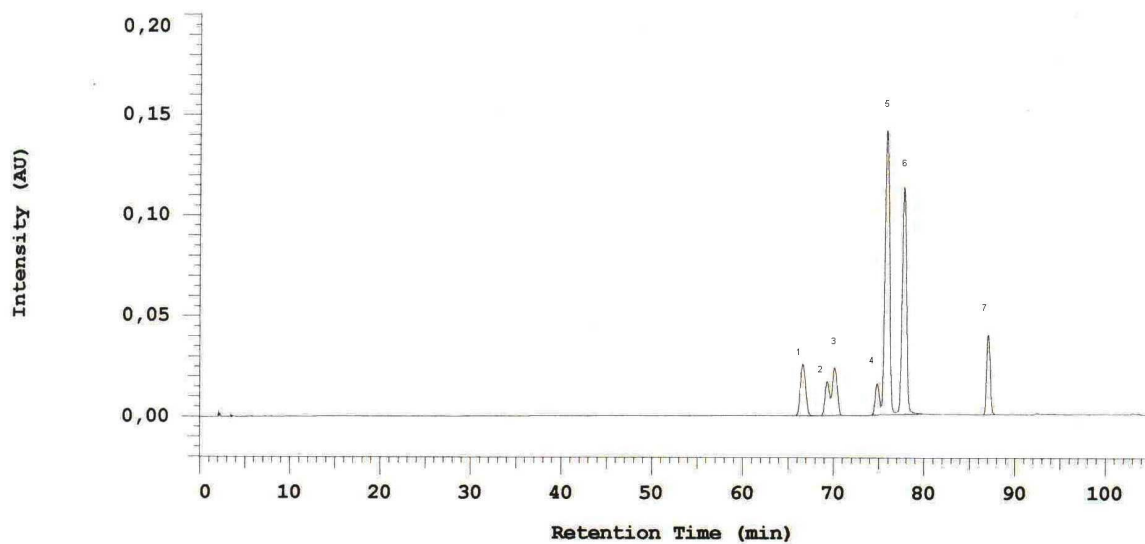
| chowywania | Pinocembryna | | | chryzyna | | | galangina | | |
|------------------------|--------------|----------|-----------|--------------|----------|-----------|--------------|----------|-----------|
| | Pinocembryna | chryzyna | galangina | pinocembryna | chryzyna | galangina | pinocembryna | chryzyna | galangina |
| 24 h | 100,6 | 99,8 | 99,2 | 100,0 | 100,0 | 99,7 | 100,0 | 100,0 | 99,7 |
| 48 h | 99,1 | 100,0 | 99,8 | 100,8 | 101,4 | 100,8 | 100,8 | 101,4 | 100,8 |
| 7 dni | 100,6 | 100,0 | 99,4 | 100,1 | 100,0 | 99,4 | 100,1 | 100,0 | 99,4 |
| ROZTWORY BADANE | | | | | | | | | |
| 24 h | 98,8 | 99,2 | 99,8 | 98,4 | 99,3 | 99,5 | 98,4 | 99,3 | 99,5 |
| 48 h | 99,6 | 100,4 | 100,7 | 99,9 | 99,5 | 99,4 | 99,9 | 99,5 | 99,4 |
| 7 dni | 100,5 | 100,8 | 101,0 | 99,9 | 100,0 | 99,0 | 99,9 | 100,0 | 99,0 |

5.6.2. Analiza składników w nalewkach propolisowych

Opracowaną i zwalidowaną metodę według punktu 4.2.4. zastosowano do analizy objętych planem badań składników w nalewkach propolisowych. W tym celu zarejestrowano odpowiednie chromatogramy dla roztworów porównawczych (rys. 7) i prób badanych (rys. 8).

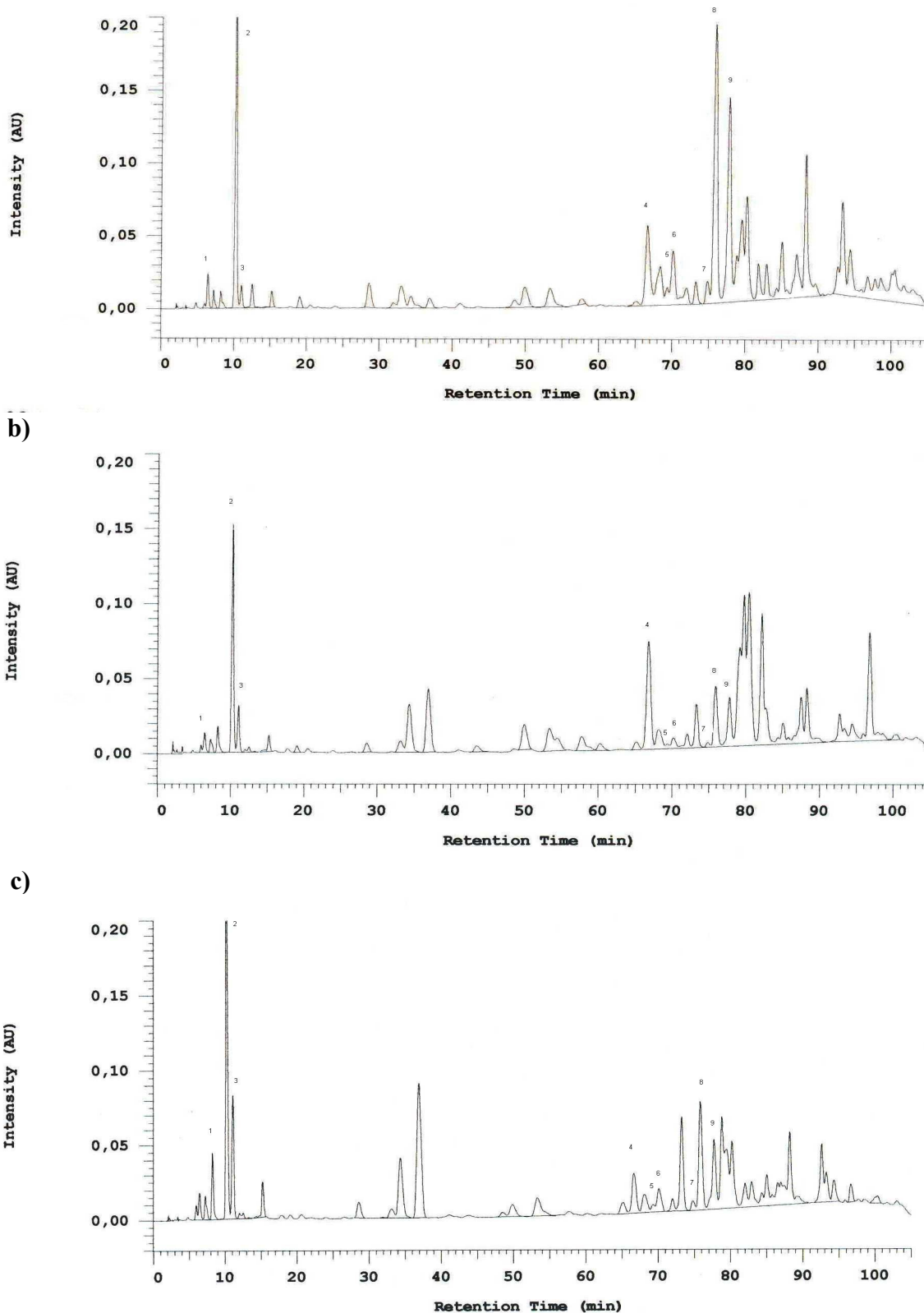
Na chromatogramach badanych obok pinocembryny (pik 4, RT=66,7), octanu pinobanksyny (pik 6, RT=70,2), chryzyny (pik 8, RT=75,9), galanginy (pik 9, RT=75,9) występują inne piki pochodzące od: kwasu kawowego (pik 1, RT=8,2), kwasu p-kumarowego (pik 2, RT=10,2), kwasu ferulowego (pik 3, RT=11,1) oraz innych związków spośród których dodatkowo zidentyfikowano ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego (pik 5, RT= 69,3) i ester fenyloetylowy kwasu kawowego (pik 7, RT=74,8).

Identyfikację składników na chromatogramach prowadzono przez porównanie odpowiednich wartości RT, natomiast wielkości pól powierzchni pod pikami wykorzystano do analizy ilościowej. Obok wartości RT do identyfikacji składników wykorzystano także widma absorpcji zarejestrowane bezpośrednio w trakcie procesu rozdzielania (rys. 9,10,11,12).



Rysunek 7. Chromatogram roztworów substancji porównawczych zarejestrowany przy $\lambda=267$ nm. 1-pinocembryna, 2- ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 3-octan pinobanksyny, 4- ester fenyloetylowy kwasu kawowego, 5-chryzyna, 6-galangina, 7-7-metoksy pinocembryna

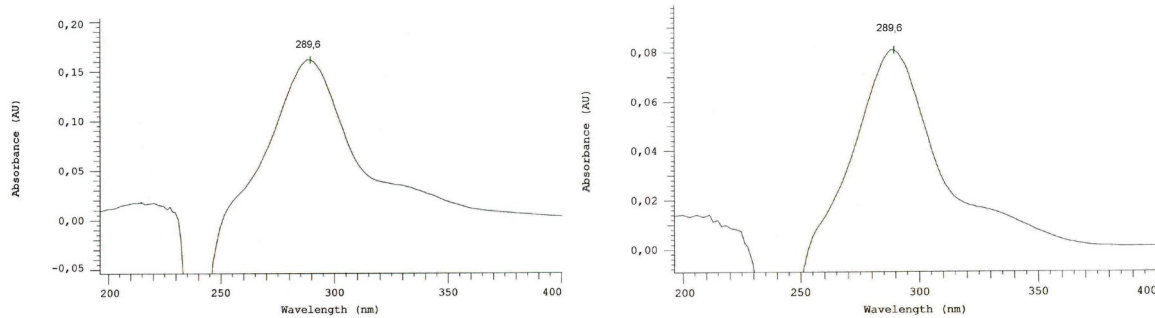
a)



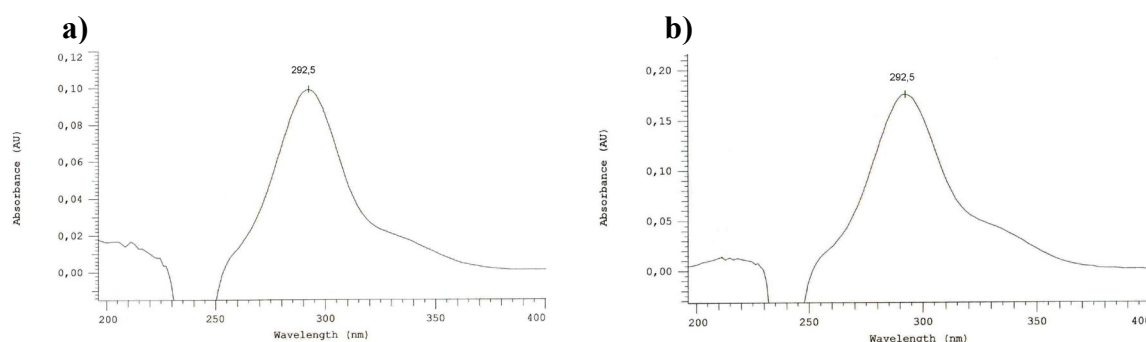
Rysunek 8. Chromatogramy etanolowych ekstraktów propolisowych; a) nr 4, b) nr 5, c) nr 14, zarejestrowany przy $\lambda=267$ nm; 1-kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy, 4-pinocembryna, 5-ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 6-octan pinobanksyny, 7- ester fenyletylowy kwasu kawowego, 8-chryzyna, 9-galangina,

a)

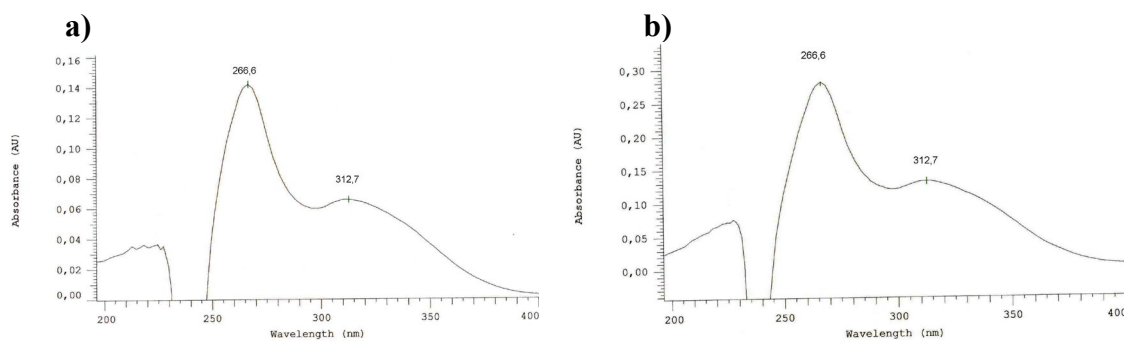
b)



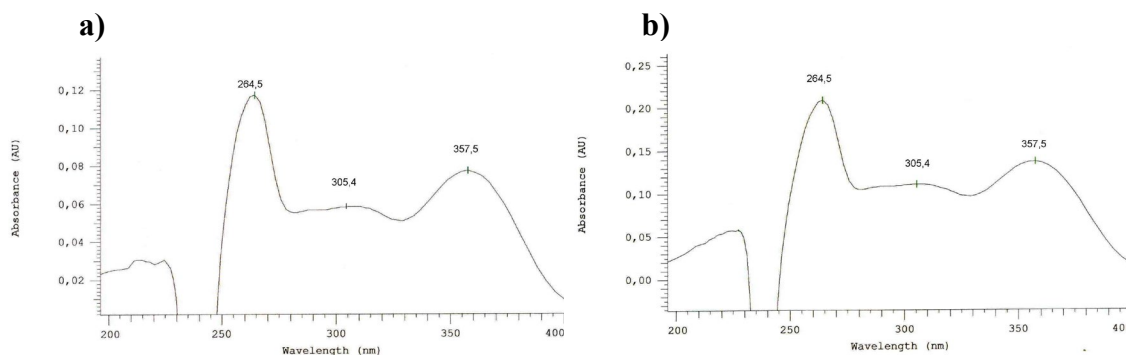
Rysunek 9. Widma absorpcji roztworów pinocembryny a) substancja porównawcza b) próbka



Rysunek 10. Widma absorpcji roztworów octanu pinobanksyny a) substancja porównawcza b) próbka



Rysunek 11. Widma absorpcji roztworów chryzyny a) substancja porównawcza b) próbka



Rysunek 12. Widma absorpcji roztworów galanginy a) substancja porównawcza b) próbka

Dokonując oceny chromatogramów otrzymanych dla poszczególnych nalewek można zauważyć, że różnią się one wielkością powierzchni pików, których położenie na chromatogramach nie ulega zmianie. Uwagę zwraca również to, że wstępna ocena produktów na podstawie charakterystycznego fingerprintu z użyciem metody TLC znajduje potwierdzenie w badaniu HPLC.

Wyniki oznaczeń ilościowych w badanych nalewkach różnią się zawartością poszczególnych składników jak również sumą ich zawartości. W największym stężeniu występuje pinocembryna w porównaniu do pozostałych składników. Średnia zawartość poszczególnych składników wyniosła odpowiednio 4,72 % pinocembryny, 3,11 % octanu pinobanksyny, 2,17 % chryzyny i 2,22 % galanginy.

Sumaryczna zawartość oznaczonych składników w stosunku do wartości średniej dla dwóch nalewek mieści się w zakresie tolerancji ± 25 % natomiast dla czternastu nalewek w zakresie ± 50 %. Szczegółowe wyniki zebrano w tabeli 16.

Tabela 16. Zawartość (%) pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy w nalewkach propolisowych

| Numer próbki | pinocembryna | octan pinobanksyny | chryzyna | galangina | suma |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|------------------|--------------|
| 1 | 4,32 | 2,40 | 1,50 | 1,33 | 9,55 |
| 2 | 4,77 | 1,91 | 1,38 | 1,33 | 9,39 |
| 3 | 6,01 | 4,87 | 3,81 | 4,15 | 18,83 |
| 4 | 5,45 | 4,33 | 2,60 | 3,12 | 15,50 |
| 5 | 6,46 | 0,91 | 0,55 | 0,74 | 8,66 |
| 6 | 5,75 | 4,50 | 3,16 | 3,13 | 16,54 |
| 7 | 6,82 | 3,54 | 2,85 | 2,91 | 16,12 |
| 8 | 5,18 | 3,98 | 3,04 | 3,17 | 15,37 |
| 9 | 3,61 | 3,03 | 2,19 | 1,75 | 10,57 |
| 10 | 4,14 | 1,58 | 0,92 | 1,03 | 7,67 |
| 11 | 1,85 | 2,14 | 1,03 | 1,15 | 6,18 |
| 12 | 5,20 | 4,76 | 3,83 | 3,53 | 17,32 |
| 13 | 5,86 | 4,57 | 3,25 | 3,70 | 17,38 |
| 14 | 2,46 | 2,05 | 0,98 | 1,09 | 6,59 |
| 15 | 2,90 | 2,15 | 1,46 | 1,24 | 7,75 |
| \bar{X} | 4,72 | 3,11 | 2,17 | 2,22 | 12,23 |
| S | 1,48 | 1,32 | 1,12 | 1,18 | 4,55 |
| RSD | 31,45 | 42,41 | 51,49 | 52,97 | 37,24 |

5.7. Oznaczenie estru 1,1-dimetyloallilowego i fenyloetylowego w nalewkach propolisowych metodą HPLC

Estry kwasu kawowego, w szczególności ester 1,1-dimetyloallilowy i fenyloetylowy kwasu kawowego, charakteryzują się silnymi właściwościami uczulającymi (83,84,87,88). Dlatego oznaczanie tych składników może mieć istotne znaczenia w procesie standaryzacji produktów propolisowych.

Oznaczenie estrów kwasu kawowego wykonano metodą HPLC opisaną w punkcie 4.2.4.

5.7.1. Walidacja metody

Metodyka oznaczania estrów 1,1-dimetyloallilowego i fenyloetylowego kwasu kawowego jest specyficzna wobec badanych składników.

Czasy retencji oznaczanych składników są powtarzalne przy kolejnych nastrzykach i nie ulegają zmianie przy zmianie objętości nastrzyku w zakresie 20 %. Nie obserwuje się także interferencji składników współobecnych występujących w produktach propolisowych ani zmian w rejestrowanych widmach w porównaniu do odpowiednich roztworów porównawczych.

System chromatograficzny pozwala uzyskać dobry rozdział pików badanych składników. Piki są symetryczne, na co wskazuje współczynnik asymetrii bliski jedności. Stwierdzono również dobrą rozdzielczość oraz wysoką liczbę pól teoretycznych na kolumnie.

Metoda charakteryzuje się dobrą czułością, LOD wynosi 0,12 $\mu\text{g/ml}$ i 0,21 $\mu\text{g/ml}$, natomiast LOQ 0,35 $\mu\text{g/ml}$ i 0,68 $\mu\text{g/ml}$ dla odpowiednich składników. Metodę cechuje dobra precyzja, którą charakteryzuje wielkość RSD mieszczącego się w przedziale od 0,54 % do 1,33 % oraz dokładność oceniona na podstawie odzysku, który wynosi około 100 % i szeroki zakres liniowości przy bardzo dobrej korelacji. Szczegółowe wyniki zebrano w tabeli 17.

Tabela 17. Wyniki walidacji metody oznaczania estrów kwasu kawowego w nalewkach propolisowych

| Kryterium | Ester fenyloetylowy kwasu kawowego | Ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego |
|--|--|--|
| Sprawność systemu | Asym = 1,01 R _s = 5,91 N = 136108 | Asym = 1,08 R _s = 0,82 N = 76100 |
| Czas retencji (min) | 74,8 | 69,3 |
| Limit detekcji (µg/ml) | 0,12 | 0,21 |
| Granica oznaczalności (µg/ml) | 0,35 | 0,68 |
| Zakres liniowości (µg/ml) | 15,4 – 153,5 | 16,5 – 164,5 |
| Równanie prostej y=ax+b±Sy | a= 1,4740*10 ⁷ b= -7677 | a = 1,6854*10 ⁷ b= -2215 |
| Błąd standardowy współczynników a i b | Sb =9871,7 (p=0.4591) Sa =111807,4 p=0.0000) | Sb = 12641,7 (p=0.8653) Sa =133576,8 (p=0.0000) |
| Współczynnik korelacji | r=0.9998 | r=0.9997 |
| Odzysk (%) (wartości średnie) | 105,3 | 108,4 |
| Precyzja RSD (%), n=7 | RSD= 0,54 | RSD=1,33 |
| Precyzja pośrednia RSD (%), n=3 | RSD= 0,96 | RSD= 0,89 |

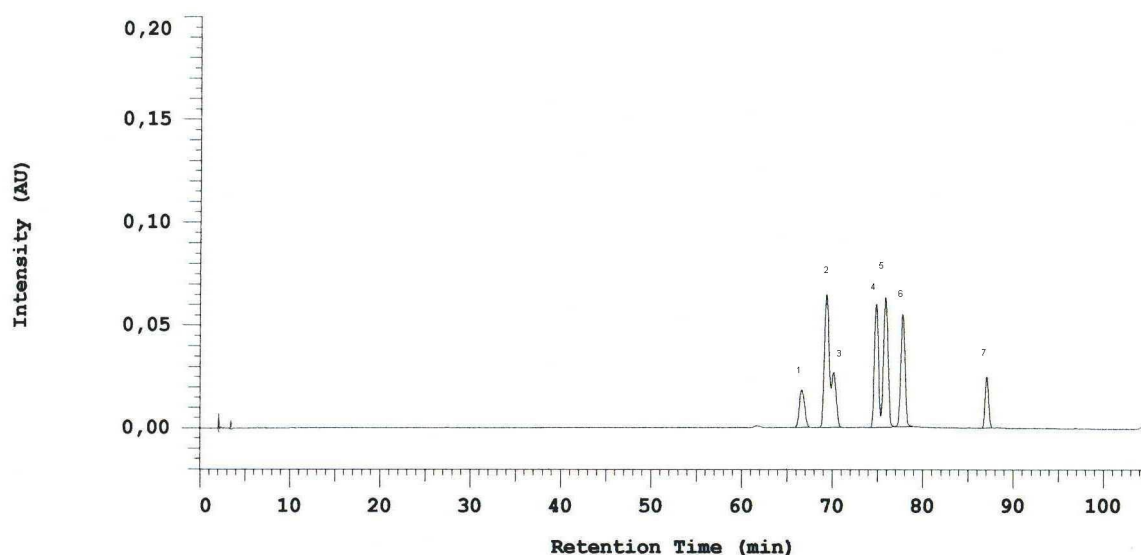
Badania stabilności wykonano dla estru fenyloetylowego kwasu kawowego, które wykazały, że związek ten jest stabilny w roztworach wzorcowych i badanych w temperaturze 8°C przez 7 dni. W temperaturze pokojowej ester fenyloetylowy kwasu kawowego jest stabilny w próbce badanej przez 7 dni a w roztworach wzorcowych przez 48 godzin (tab. 18)

Tabela 18. Stabilność roztworów porównawczych i badanych estru fenyloetylowego kwasu kawowego. Wyniki przedstawiono w %.

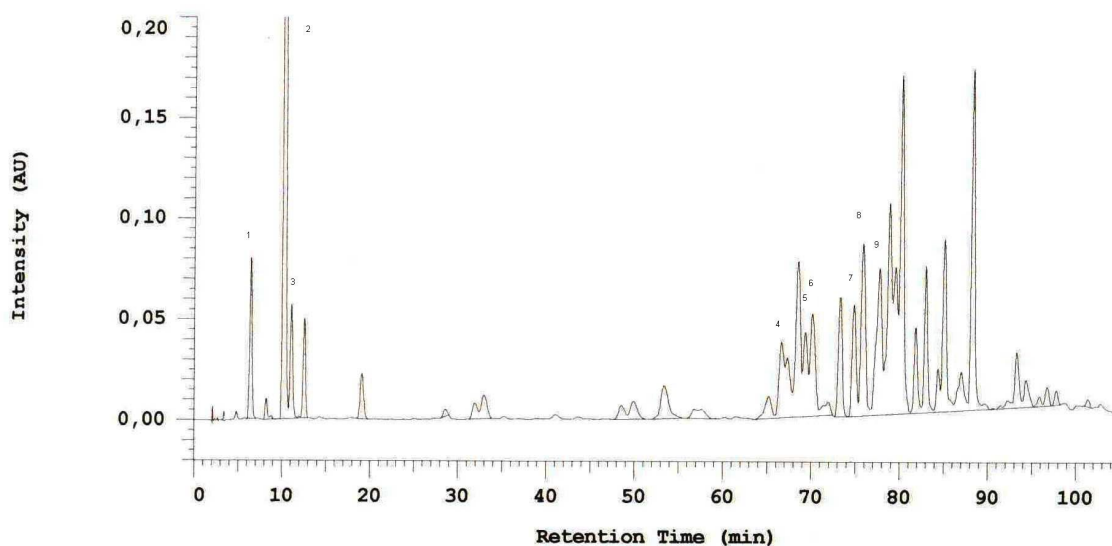
| Czas przechowywania | Roztwory wzorcowe | | Roztwory badane | |
|---------------------|-------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | 8°C | temperatura pokojowa | 8°C | temperatura pokojowa |
| 24 h | 99,0 | 99,3 | 99,3 | 99,1 |
| 48 h | 98,0 | 100,1 | 100,2 | 98,9 |
| 7 dni | 98,6 | 95,5 | 100,8 | 99,0 |

5.7.2. Oznaczenie estrów kwasu kawowego w nalewkach

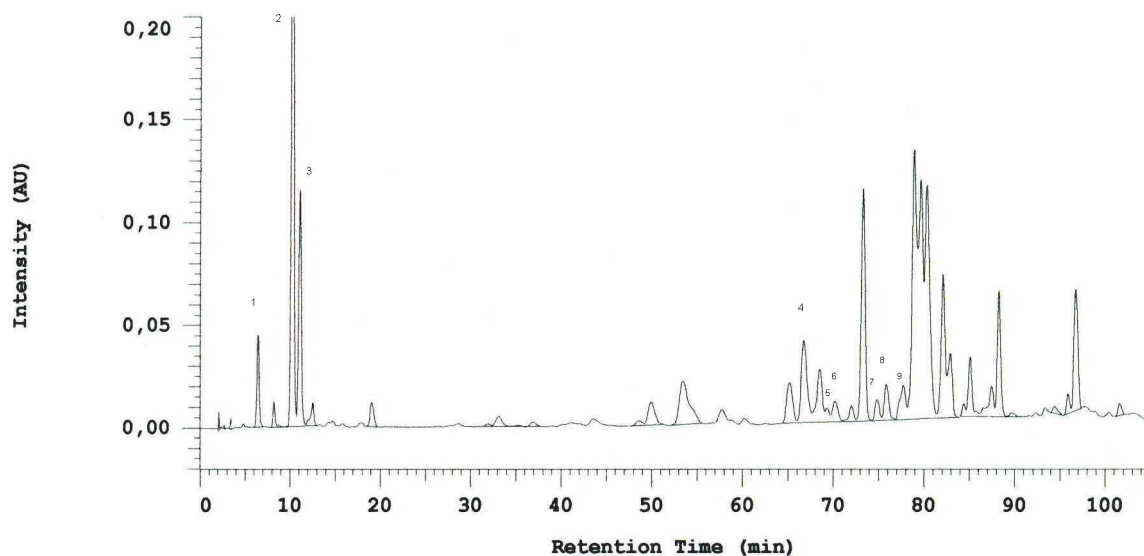
W nalewkach propolisowych oznaczono dwa podstawowe, zidentyfikowane w kicie pszczelim alergeny: ester fenyloetylowy kwasu kawowego i ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego. Tożsamość badanych związków potwierdzano poprzez porównanie czasów retencji oraz widm absorpcji składników porównawczych i badanych. Na rysunkach 13 i 14 (a,b,c) przedstawiono chromatogramy substancji wzorcowych oraz nalewek, które zarejestrowano przy $\lambda=320$ nm a na rysunku 15 i 16 widma absorpcji dla odpowiednich związków.



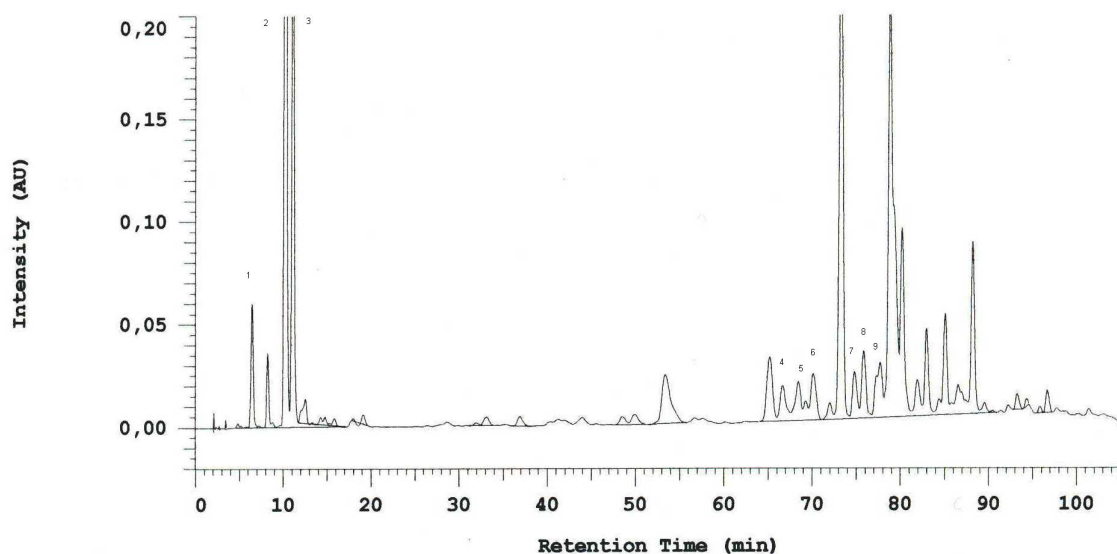
Rysunek 13. Chromatogram roztworów substancji porównawczych ($\lambda=320$ nm): 1-pinocembryna, 2-ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 3-octan pinobanksyny, 4-ester fenyletylowy kwasu kawowego, 5-chryzyna, 6-galangina, 7-7-metoksy pinocembryna



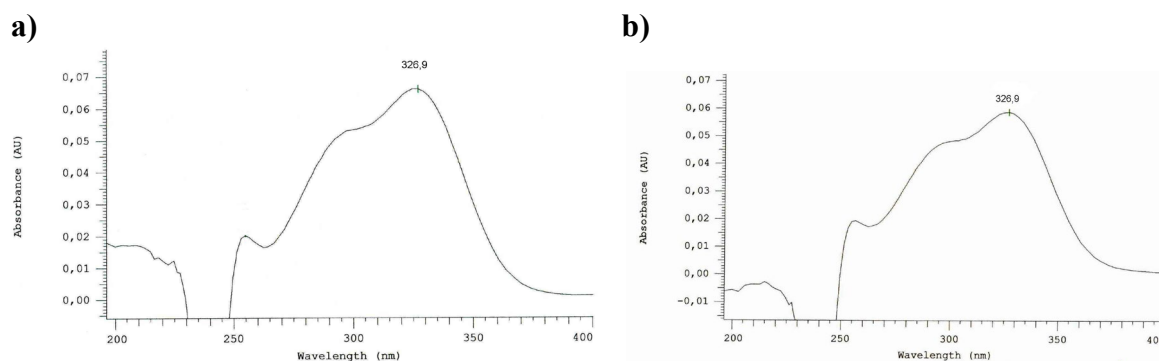
Rysunek 14 a. Chromatogram nalewki propolisowej nr 4 ($\lambda=320$ nm), 1- kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy, 4-pinocembryna, 5-ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 6-octan pinobanksyny, 7-ester fenyletylowy kwasu kawowego, 8-chryzyna, 9-galangina,



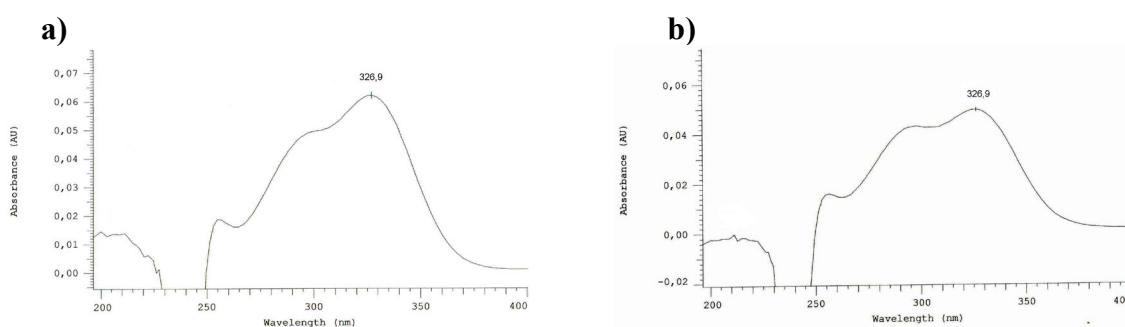
Rysunek 14 b. Chromatogram nalewki propolisowej nr 4 ($\lambda=320$ nm), 1- kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy, 4-pinocembryna, 5-ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 6-octan pinobanksyny, 7-ester fenyletylowy kwasu kawowego, 8-chryzyna, 9-galangina,



Rysunek 14 c. Chromatogram nalewki propolisowej nr14 ($\lambda=320$ nm); 1- kwas kawowy, 2-kwas p-kumarowy, 3-kwas ferulowy, 4-pinocembryna, 5-ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, 6-octan pinobanksyny, 7-ester fenyletylowy kwasu kawowego, 8-chryzyna, 9-galangina,



Rysunek 15. Widma absorpcji roztworów estru fenyloetylowego kwasu kawowego
a) substancja porównawcza, b) próbka badana



Rysunek 16. Widma absorpcji roztworów estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego
a) substancja porównawcza, b) próbka badana

Analizowane nalewki różnią się znacząco zawartością poszczególnych estrów. Suma oznaczanych składników mieści się w przedziale od 0,35 % do 2,62 % w przeliczeniu na suchą masę. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego występuje w nieco większej ilości w porównaniu do estru 1,1-dimetyloallilowego. Łączna zawartość głównych alergenów występujących w propolisie nie przekracza wartości 3 % (tab.19). Biorąc po uwagę, że powszechnie stosowane preparaty propolisowe zawierają około 5 % propolisu zawartość składników o działaniu uczulających w jednym gramie preparatu wynosi nie więcej niż 1,5 mg.

W przyjętych kryteriach odchyień od wartości średniej tylko w dwóch nalewkach oznaczona zawartość składników charakteryzuje się rozrzutem

w zakresie $\pm 25\%$ a w siedmiu nalewkach w zakresie $\pm 50\%$, w pozostałych odchylenia są większe.

Tabela 19. Zawartości (%) estrów kwasu kawowego w nalewkach z kitu pszczelego

| nalewka | Ester fenyloetylowy kwasu kawowego | Ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | suma |
|-----------|------------------------------------|---|-------------|
| 1 | 0,46 | 0,32 | 0,78 |
| 2 | 0,55 | 0,33 | 0,88 |
| 3 | 1,16 | 0,96 | 2,12 |
| 4 | 1,17 | 0,85 | 2,02 |
| 5 | 0,23 | 0,12 | 0,35 |
| 6 | 1,11 | 1,08 | 2,18 |
| 7 | 0,82 | 0,89 | 1,71 |
| 8 | 1,24 | 0,84 | 2,08 |
| 9 | 0,58 | 0,56 | 1,13 |
| 10 | 0,31 | 0,31 | 0,62 |
| 11 | 0,48 | 0,35 | 0,82 |
| 12 | 1,78 | 0,84 | 2,62 |
| 13 | 1,20 | 0,89 | 2,09 |
| 14 | 0,55 | 0,17 | 0,72 |
| 15 | 0,47 | 0,46 | 0,92 |
| \bar{X} | 0,81 | 0,60 | 1,40 |
| S | 0,44 | 0,32 | 0,73 |
| RSD | 54,81 | 53,64 | 52,19 |

5.8. Identyfikacja składników aktywnych w nalewkach propolisowych

Tak jak już wielokrotnie podkreślano propolis jest produktem złożonym zawierającym wiele różnych struktur organicznych, które mogą wykazywać aktywność biologiczną (7,8,10,16,18,19). Znane są przykłady

działania leczniczego jak również niepożądanego, które są przypisywane określonym związkom (5,19,43,46,52).

Zwraca się również uwagę na fakt, że aktywność biologiczna może wynikać z synergistycznego działania składników obecnych w propolisie.

Postanowiono przeprowadzić rozdział chromatograficzny nalewek propolisowych na poszczególne frakcje i zbadać ich aktywność przeciwbakteryjną w odniesieniu do poszczególnych składników.

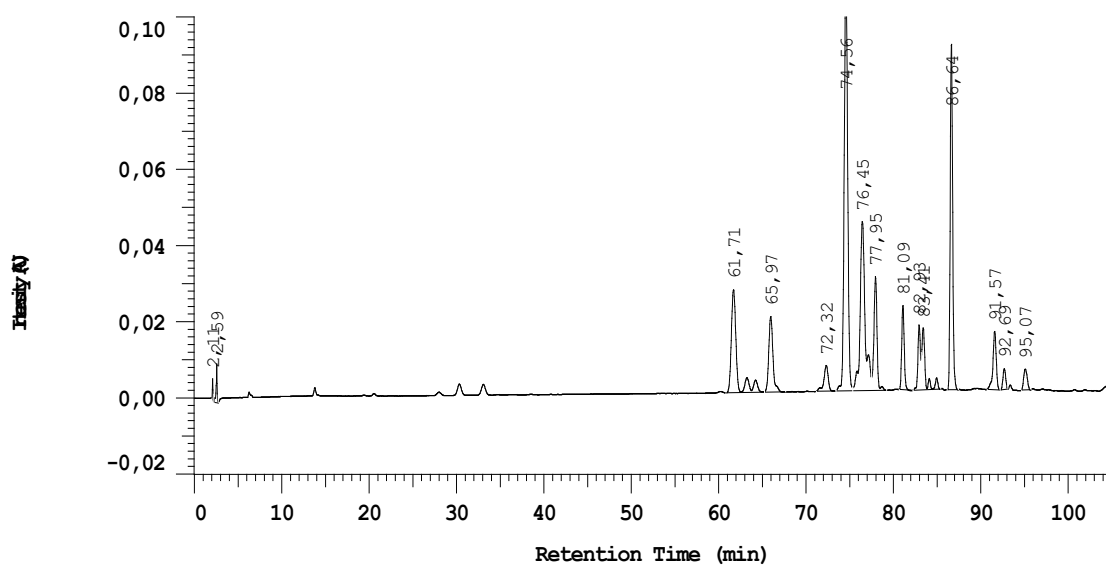
Fracjonowanie na kolumnie chromatograficznej pozwoliło zawęzić skład chemiczny analizowanych prób oraz uzyskać próbki o różnej zawartości i wzajemnych proporcjach tych samych składników dzięki czemu możliwe było oszacowanie, które składniki mają wpływ na aktywność przeciwbakteryjną.

Do badań pobrano trzy serie etanolowych ekstraktów propolisowych, które różniły się znacznie składem. Wstępną ocenę produktów badanych wykonano metodą chromatografii cienkowarstwowej według punktu 4.2.5. Następnie dokonano rozdziału badanych produktów na frakcje metodą chromatografii kolumnowej według procedury opisanej w punkcie 4.2.6. W wyniku przeprowadzonego procesu otrzymano 18 frakcji, które następnie badano metodami HPLC, GC-MS oraz oznaczono ich aktywność przeciwbakteryjną w odniesieniu do szczepu *Staphylococcus aureus*.

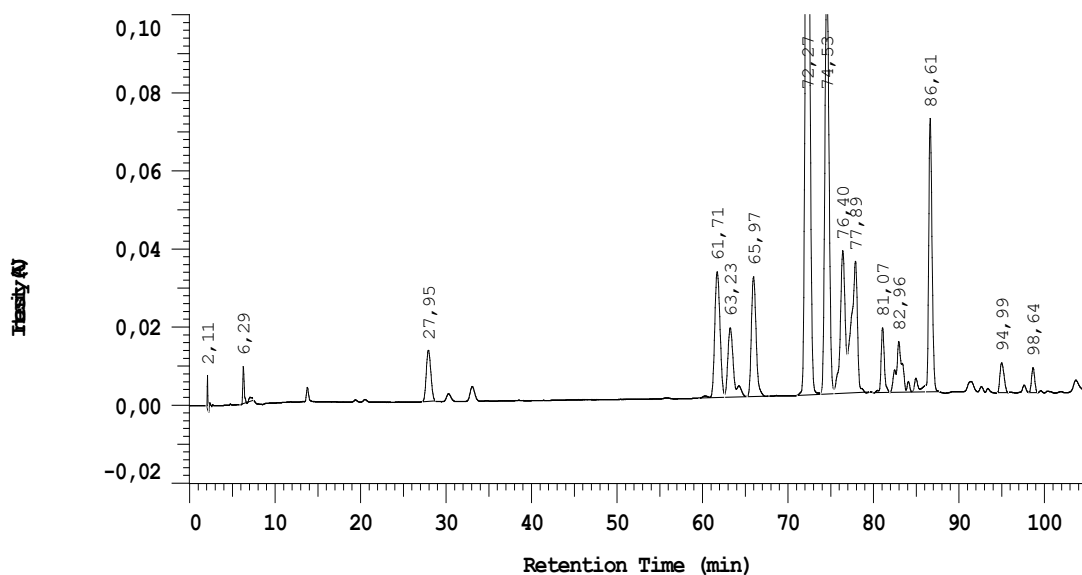
5.8.1 Analiza frakcji otrzymanych z nalewek metodą HPLC

Do badań zastosowano wcześniej opracowaną i zwalidowaną metodę HPLC opisaną w punkcie 4.2.4. Do detekcji wykorzystano dwie długości fali $\lambda = 267$ nm do oznaczania pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny, galanginy, 7-metoksypinocembryny i $\lambda = 320$ nm w przypadku kwasów fenolowych.

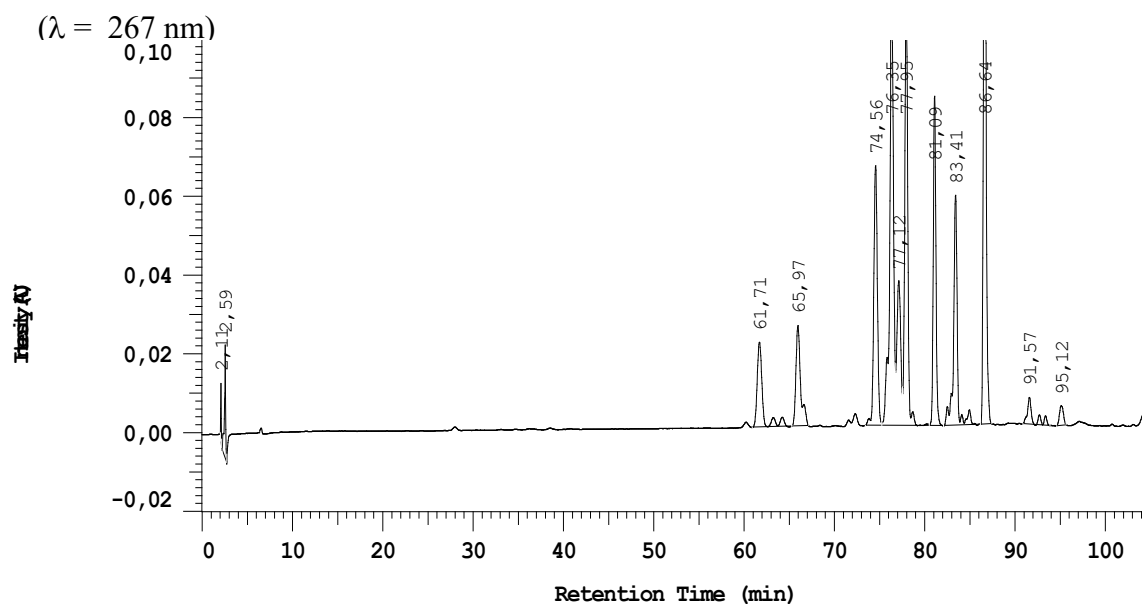
Podczas rozpuszczania stwierdzono, że poszczególne frakcje różnią się między sobą obecnością i stężeniem różnych związków chemicznych. Pierwsze frakcje są najmniej polarne i ich polarność rośnie wraz z numerem frakcji. Obecność pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny, galanginy i 7-metoksy-pinocembryny stwierdzono we frakcjach od 1 do 9 a kwasy fenolowe we frakcjach od 10 do 17. Przykładowe chromatogramy dla frakcji 5 i frakcji 6, otrzymanych z nalewki nr 4, przedstawiono na rysunkach 17 (a, b) i 18 (a, b).



Rysunek 17 a. Chromatogram frakcji 5 otrzymanej z nalewki propolisowej nr 4 ($\lambda = 267 \text{ nm}$)

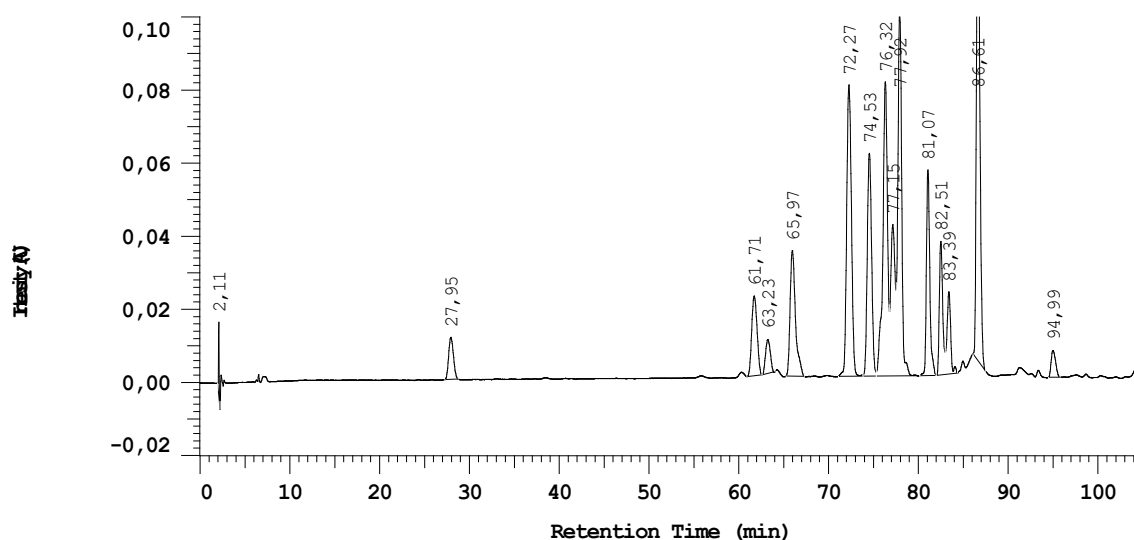


Rysunek 17 b. Chromatogram frakcji 6 otrzymanej z nalewki propolisowej nr 4



Rysunek 18 a. Chromatogram frakcji 5 otrzymanej z nalewki propolisowej nr 4

($\lambda = 320 \text{ nm}$)



Rysunek 18 b. Chromatogram frakcji 6 otrzymanej z nalewki propolisowej nr 4

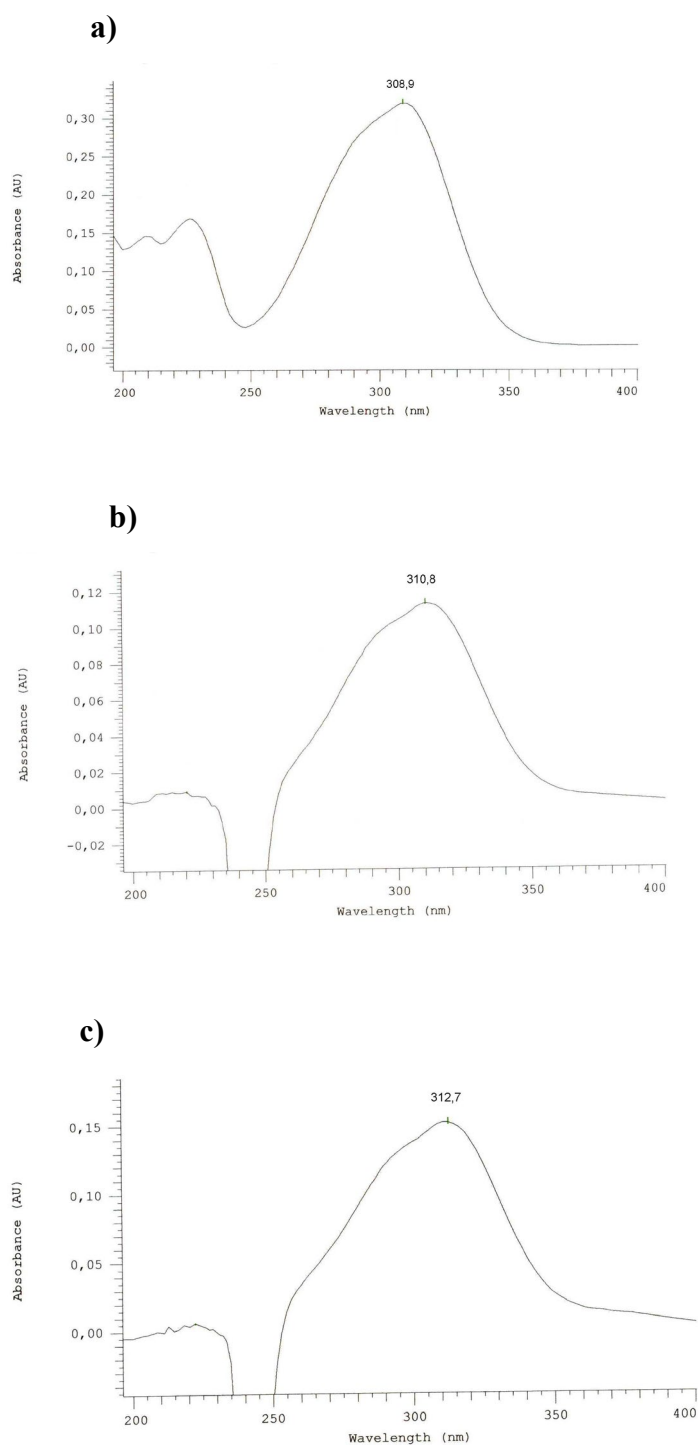
($\lambda = 320 \text{ nm}$)

Obok zidentyfikowanych na chromatogramach składników znajdują się także inne dodatkowe piki o różnych czasach retencji i widmach absorpcji (tab. 20).

Spośród składników, których tożsamości nie potwierdzono, uwagę zwraca obecność związków o charakterystycznym widmach absorpcji i różnych maksimach absorpcji przy $\lambda=310,8$ nm i 308,9 nm oraz 312,7 nm, co sugeruje, że badane składniki mogą należeć do pochodnych kwasu p-kumarowego, którego widmo absorpcji przedstawione na rysunku 19 jest podobne. Fakt, że spośród oznaczanych kwasów kwas p-kumarowy występuje w największych ilościach potwierdza to przypuszczenie.

Tabela 20. Maksima absorpcji związków znajdujących się we frakcjach najbardziej aktywnych. Kolorem zielonym wyróżniono związki zidentyfikowane, kolejno od góry: pinocembryna, octan pinobanksyny, chryzyna, galangina.

| Czas retencji | Nalewka 4 | | Nalewka 5 | | Nalewka 14 | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Fracja 5 | Fracja 6 | Fracja 5 | Fracja 6 | Fracja 6 | Fracja 7 |
| 30,1 | - | - | - | 260,5 | 260,5 | - |
| 33,0 | - | - | 264,5 | 264,5 | 264,5 | 264,5 |
| 61,7 | 289,6 | 289,6 | 289,6 | 288,1 | 288,1 | 288,1 |
| 63,2 | 288,1 | 288,1 | - | - | - | 288,1 |
| 66,0 | 292,5 | 292,5 | - | 292,5 | - | 292,5 |
| 72,3 | - | 266,6 | - | 266,6 | - | 266,6 |
| 74,6 | 264,5; 310,8;360,6 | 264,5; 308,9;357,5 | - | 264,5; 310,8;357,5 | 264,5; 308,9;357,5 | 264,5; 308,9;357,5 |
| 76,35 | 312,7 | 312,7 | 312,7 | 312,7 | 310,8 | 310,8 |
| 77,12 | - | 312,7 | - | 324,7 | 320,5 | 324,7 |
| 77,95 | 312,7 | 312,7 | 310,8 | 310,8 | 308,9 | 308,9 |
| 81,1 | 312,7 | 312,7 | 310,8 | 310,8 | 310,8 | 310,8 |
| 83,4 | 312,7 | 312,7 | 310,8 | 310,8 | 310,8 | 310,8 |
| 86,6 | 256,7;312,7 | 256,7; 12,7 | 260,5;312 | 260,5;312 | 260,5;310,8 | 260,5; 10,8 |
| 95,71 | - | - | 266,6;63,7 | 266,6;346,3 | - | - |



Rysunek 19. Widma absorpcji: a) kwasu p-kumarowego, b) związku chemicznego o czasie retencji 76,30, frakcja 7, nalewka nr 14, c) związku chemicznego o czasie retencji 77,90, frakcja 6, nalewka nr 4

W badanych frakcjach oznaczono zawartość 7-metoksypinocembryny, pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy. Wyniki oznaczeń zebrane w tabelach 21, 22 i 23 potwierdzają największe stężenie powyższych składników we frakcjach otrzymanych z nalewki propolisowej nr 4, mniejsze w frakcjach otrzymanych z nalewki nr 14 a najmniejsze w nalewce nr 5.

Tabela 21. Zawartość (mg/ml) składników we frakcjach otrzymanych z nalewki nr 4

| Frakcja | 7-metoksy pinocembryna | pinocembryna | octan pinobanksyny | galangina | chryzyna | suma |
|---------|---------------------------|--------------|-----------------------|-----------|----------|---------------|
| 1 | 0,7020 | | | | | |
| 2 | 0,7031 | | | | | |
| 3 | 0,1900 | | | | | |
| 4 | | 0,9329 | | 0,4330 | | 1,3659 |
| 5 | | 0,6404 | 0,5626 | 0,4041 | | 1,6070 |
| 6 | | 0,6154 | 0,7911 | 0,4561 | 0,5349 | 2,3974 |
| 7 | | 0,1261 | 0,7987 | 0,1991 | 0,4028 | 1,5266 |
| 8 | | 0,1000 | 0,4109 | | 0,3402 | 0,8511 |
| 9 | | | | | | |

Tabela 22. Zawartość (mg/ml) składników we frakcjach otrzymanych z nalewki nr 5

| Frakcja | 7-metoksy pinocembryna | pinocembryna | octan pinobanksyny | galangina | chryzyna | suma |
|---------|---------------------------|--------------|-----------------------|-----------|----------|---------------|
| 1 | - | | | | | |
| 2 | 0,1656 | | | | | |
| 3 | 0,3191 | | | | | |
| 4 | | 0,0883 | | | | 0,0883 |
| 5 | | 0,1514 | | 0,0443 | | 0,1957 |
| 6 | | 0,2344 | | 0,0922 | | 0,3266 |
| 7 | | 0,7160 | | 0,0949 | 0,0717 | 0,8826 |
| 8 | | 0,7751 | | 0,0328 | 0,0859 | 0,8937 |
| 9 | | 0,5003 | | | 0,0215 | 0,5218 |

Tabela 23. Zawartość (mg/ml) składników we frakcjach otrzymanych z nalewki nr 14

| Frakcja | 7-metoksy pinocebryna | pinocebryna | octan pinobanksyny | galangina | chryzyna | suma |
|---------|--------------------------|-------------|-----------------------|-----------|----------|---------------|
| 1 | - | | | | | |
| 2 | 0,2397 | | | | | |
| 3 | 0,1718 | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | 0,1472 | | | | 0,1472 |
| 6 | | 0,3257 | | 0,1614 | | 0,4870 |
| 7 | | 0,2065 | 0,3932 | 0,1664 | 0,1210 | 0,8870 |
| 8 | | 0,2480 | 0,2352 | 0,0682 | 0,2062 | 0,7576 |
| 9 | | 0,1071 | 0,0652 | 0,0193 | 0,1074 | 0,2990 |

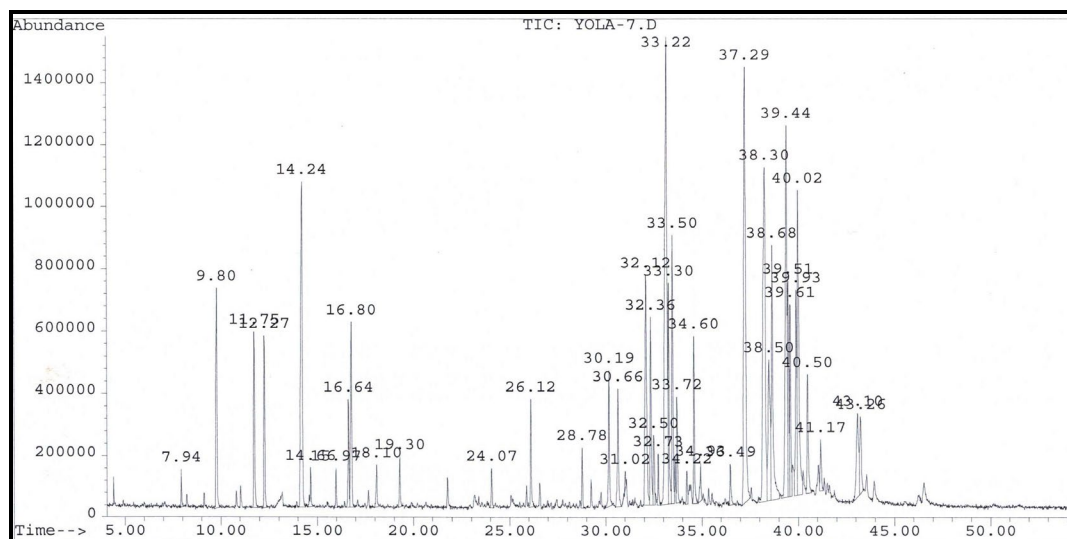
5.8.2. Analiza frakcji metodą GC-MS

Frakcje otrzymane z nalewki propolisowej nr 4 poddano analizie metodą GC-MS przedstawioną w punkcie 4.2.7. Analizę wykonano w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Farmacji na Uniwersytecie w Clermont Ferrand we Francji. Oznaczenia prowadzono po rozpuszczeniu składników w metanolu oraz po derywatywacji w postaci trimetylochlorosilanów.

Próbki zawierające składniki lotne analizowano bez derywatywacji metodą GC-MS. Identyfikację prowadzono przez porównanie otrzymanych sygnałów z biblioteką widm. Na rysunku 20 przedstawiono chromatogram frakcji nr 6 a w tabeli 24 składniki, których obecność stwierdzono w badanych frakcjach. Związki, których prawdopodobieństwo występowania określono powyżej 90 % to: alkohol fenylometylowy, alkohol feniloetylowy, 2,3-dihydrobenzofuran, 2-propanon-1-fenyl, 2-propen-1-ol,3-fenyl, 5-hydroksy-7-metoksyflawanon.

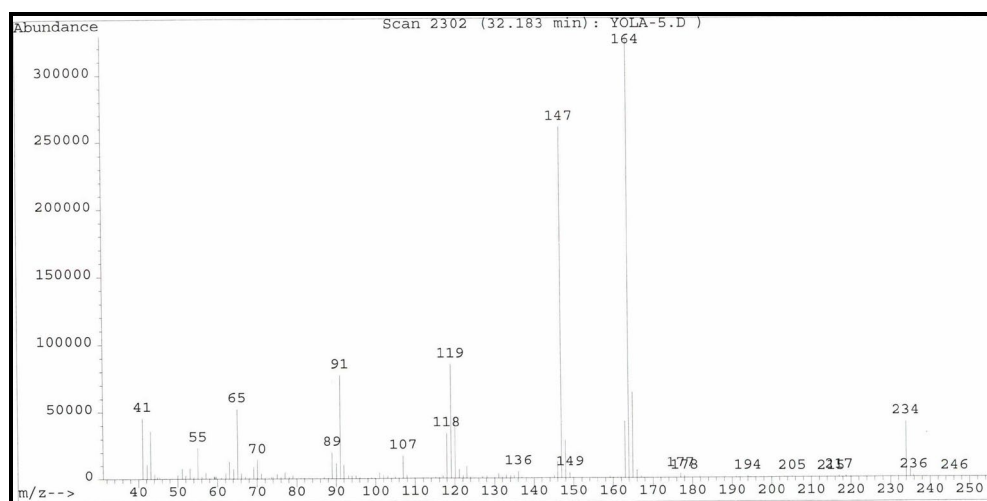
Tabela 24. Związki chemiczne występujące we frakcjach otrzymanych z nalewki nr 4

| Czas retencji | Nazwa | Masa molekularna |
|----------------------|--|-------------------------|
| 9,8 | alkohol fenylometylowy | 108 |
| 11,88 | alkohol fenyletylowy | 122 |
| 12,26 | 2-propanon,1-fenyl | 134 |
| 14,2 | 2,3-dihydrobenzofuran, | 120 |
| 16,7 | ? | 150 |
| 16,8 | 2-propen-1-ol,3-fenyl | 134 |
| 23,58 | β - eudesmol | 222 |
| 30,2 | ? | 220 |
| 32,2 | ? | 234 |
| 32,4 | ? | 232 |
| 33,2 | ? | 232 |
| 33,4 | ? | 232 |
| 33,5 | ? | 232 |
| 34,6 | ? | 262 |
| 37,2 | 2-propen-1-one,1-(2,6-dihydroksy- 4-metoksyfenyl) 3-fenyl | 270 |
| 37,3 | 5-hydroksy-7-metoksyflawanon | 270 |
| 38,3 | ? | 254 |
| 38,47 | ? | 296 |
| 38,68 | 4-H-1-benzopyran-4-on,2,3-dihydro- 5,7-dihydroksy-2-fenyl | 256 |
| 39,4 | kwask 3-(4-hydroksyfenylo) 2-propionowy | 164 |
| 39,5 | ? | 284 |
| 39,91 | ? | 272 |
| 40,02 | ? | 298 |
| 40,05 | 4-H-1-benzopyran-4-on,5-hydroksy,7- metoksy-2-fenyl | 268 |
| 41,38 | 5-hydroksy-4',7-dimetoksyflawanon | 300 |

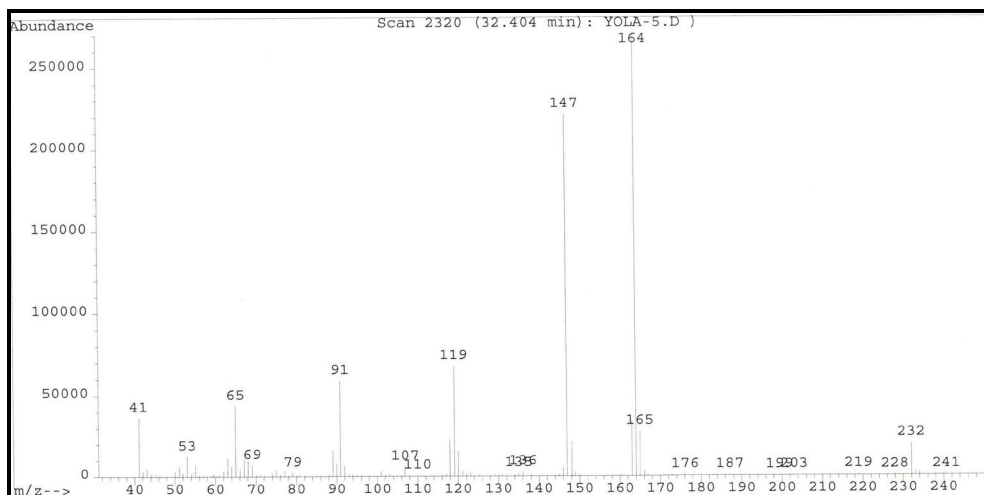


Rysunek 20. Chromatogram GC frakcji nr 6

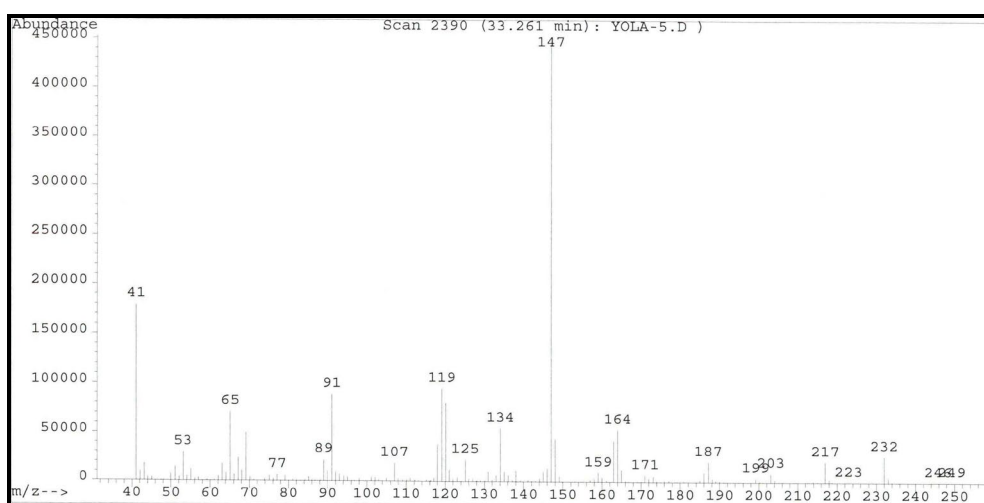
W frakcjach propolisowych stwierdzono obecność grupy związków o masie molekularnej 232 i 234, których widma masowe zamieszczono na rysunku 21, 22, 23, 24, 25. Są to prawdopodobnie te same związki, których widmo absorpcji miało podobny przebieg do widma kwasu p-kumarowego.



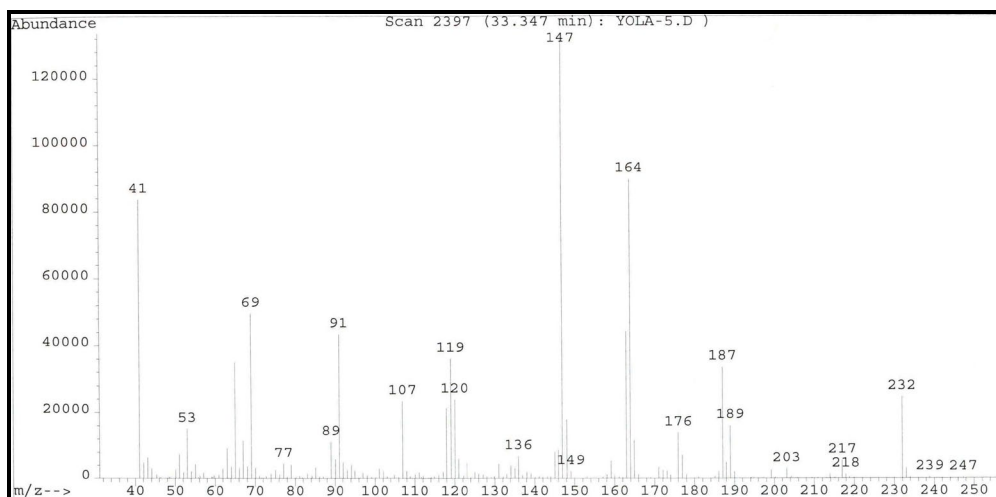
Rysunek 21. Widmo masowe składnika chemicznego obecnego w frakcji 6; masa molekularna 234, czas retencji 32,2



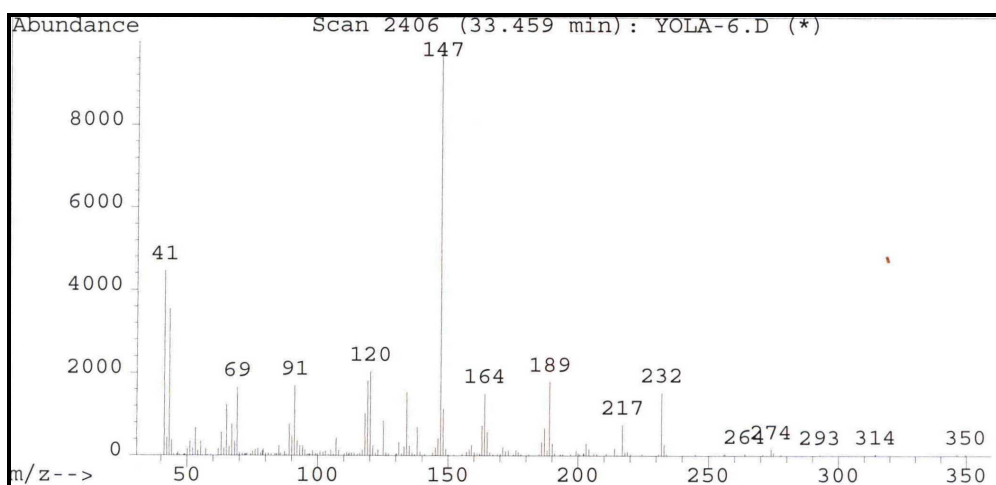
Rysunek 22. Widmo masowe składnika chemicznego obecnego w frakcji 6; masa molekularna 232, czas retencji 32,4



Rysunek 23. Widmo masowe składnika chemicznego obecnego w frakcji 6; masa molekularna 232, czas retencji 33,3



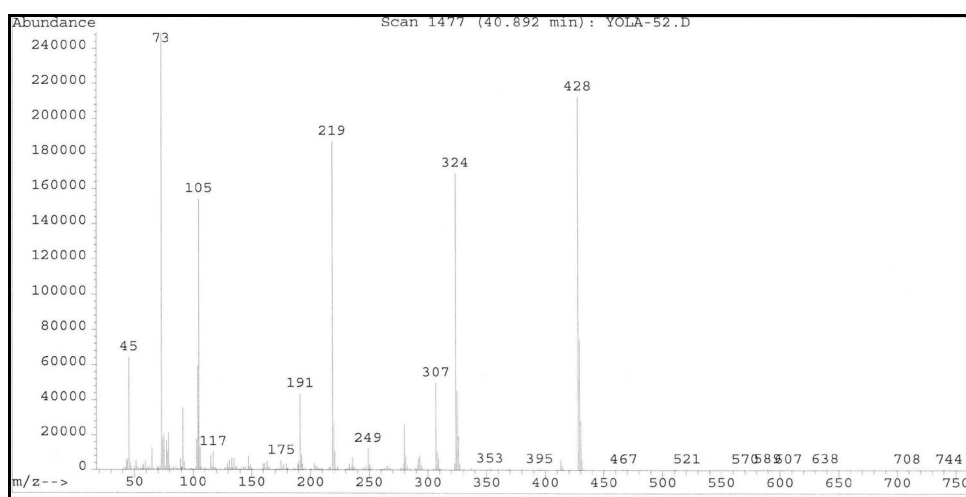
Rysunek 24. Widmo masowe składnika chemicznego obecnego w frakcji 6; masa molekularna 232, czas retencji 33,3



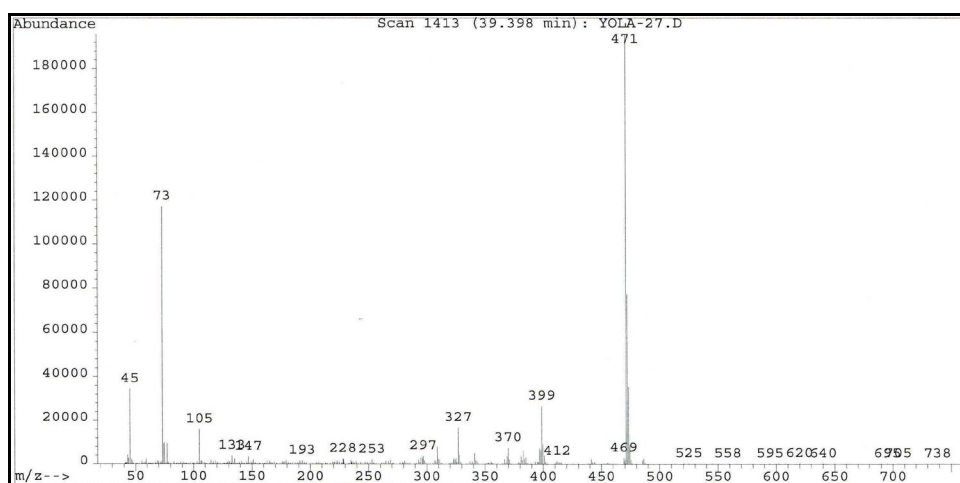
Rysunek 25. Widmo masowe składnika chemicznego obecnego w frakcji 6; masa molekularna 232, czas retencji 33,5;

W celu identyfikacji frakcji, w których znajdują się małe związki o charakterze polarnym poddano je derywatywacji. Jako odczynnik derywatyżujący zastosowano BSTFA (N,O-bis-trimetylosilylotrifluoroacetamid) z 1% TMCS (trimetylochlorosilan). Na rysunku 26, 27, 28, 29, 30

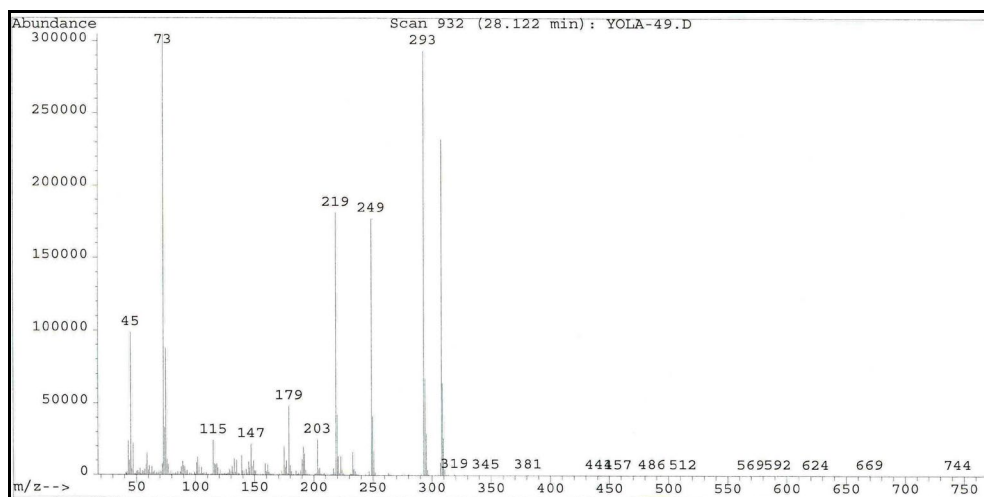
przedstawiono przykładowe widma masowe składników, których tożsamość potwierdzono metodą HPLC. Do zidentyfikowanych połączeń należą: pinocembryna, pinobanksyna, galangina, kwas p-kumarowy, kwas ferulowy, kwas kawowy. Stwierdzono również w badanych frakcjach obecność znanego ze swoich właściwości alergizujących estru dimetyloallilowego kwasu kawowego. We frakcji 17 zidentyfikowano cukry, między innymi sacharozę.



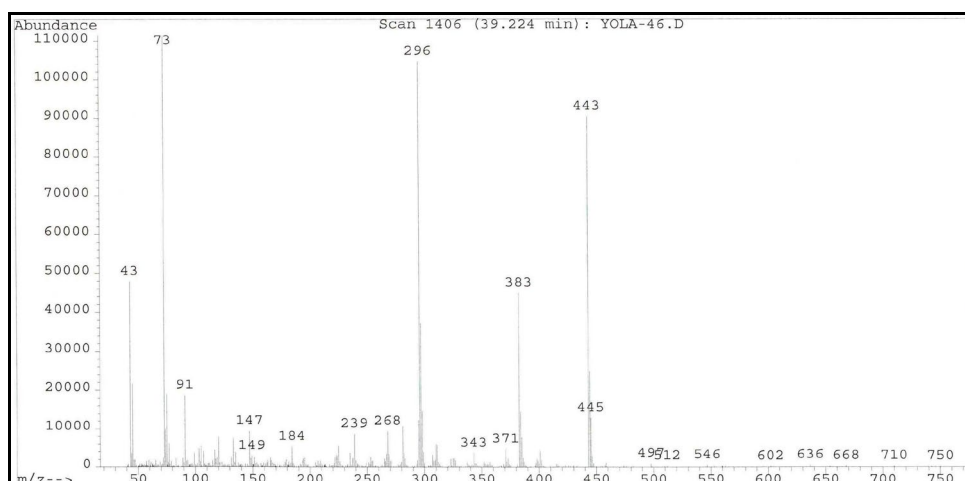
Rysunek 26. Widmo masowe estru feniloetylowego kwasu kawowego



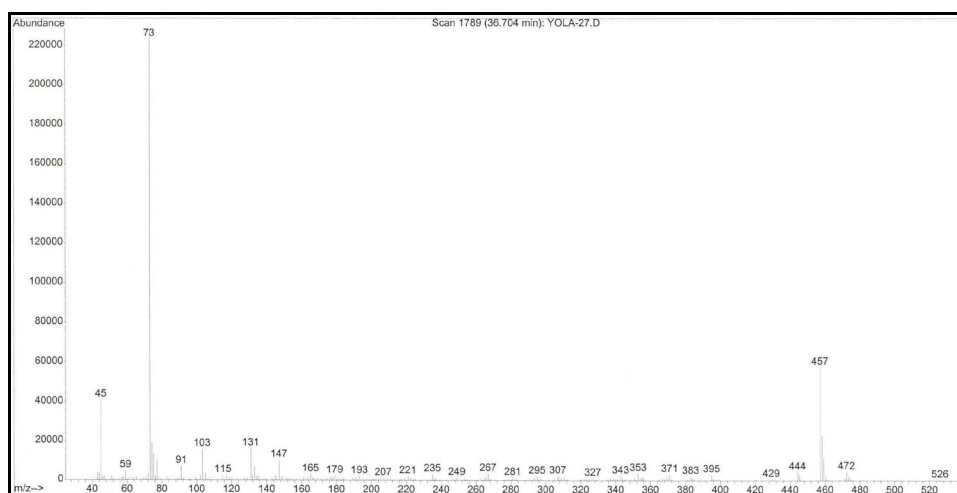
Rysunek 27. Widmo masowe galanginy



Rysunek 28. Widmo masowe kwasu p-kumarowego



Rysunek 29. Widmo masowe octanu pinobanksyny



Rysunek 30. Widmo masowe pinocembryny

6. ANALIZA BIOLOGICZNA

Liczne badania naukowe na temat propolisu dowodzą jego właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych i przeciwwirusowych (32,35,37,40,48,52). Wysoka aktywność propolisu wobec szerokiej gamy mikroorganizmów ma szczególne znaczenie biorąc pod uwagę fakt, że nie są znane przypadki występowania lekooporności na preparaty propolisowe.

6.1. Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną zbadano w odniesieniu do szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC, który jest stosowany do badania aktywności antybiotyków zgodnie z wymaganiami farmakopealnymi. Badanie wykonano zgodnie z metodą przedstawioną w punkcie 4.2.8 oraz 4.2.9.

6.1.1. Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej produktów oraz roztworów modelowych

Badania aktywności przeciwbakteryjnej wykonano dla dziesięciu partii koncentratów i piętnastu partii nalewek, w których uprzednio dokonano identyfikacji i oznaczeń ilościowych składników metodą HPLC.

Badania prowadzono dla produktów propolisowych oraz odpowiednich składników porównawczych występujących pojedynczo lub w mieszaninach modelowych.

W przypadku koncentratów, które były surowcem standaryzowanym, przeznaczonym do produkcji, oznaczona aktywność w badanych partiach produktów była porównywalna i wynosiła dla wartości średnich od 120 µg/ml do 150 µg/ml (tab. 25).

Tabela 25. Wyniki oznaczenia aktywności mikrobiologicznej MIC ($\mu\text{g/ml}$) w koncentratkach propolisowych

| Numer próbki | | Numer próbki | |
|--------------|------------|--------------|-----|
| 4/2002 | 120 | 070301 | 128 |
| 141003 | 121 | 070201 | 126 |
| 201003 | 124 | 060801 | 150 |
| 300807 | 125 | 060301 | 136 |
| 070601 | 124 | 060101 | 127 |
| \bar{X} | 128 | | |
| S | 9 | | |
| RSD | 7 | | |

Znacznie większe różnice stwierdzono w przypadku nalewek, w których aktywność przeciwbakteryjna wahała się od 50 $\mu\text{g/ml}$ do 155 $\mu\text{g/ml}$. Średnia aktywność wynosiła 103 $\mu\text{g/ml}$, a zatem była podobna do aktywności oznaczonej w koncentratkach (tab. 26).

Tabela 26. Wyniki badania aktywność przeciwbakteryjnej nalewek propolisowych

| Nr nalewki | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | Nr nalewki | MIC ($\mu\text{g/ml}$) |
|------------|--------------------------|------------|--------------------------|
| 1 | 155 | 9 | 133 |
| 2 | 135 | 10 | 92 |
| 3 | 101 | 11 | 98 |
| 4 | 79 | 12 | 68 |
| 5 | 110 | 13 | 50 |
| 6 | 105 | 14 | 106 |
| 7 | 95 | 15 | 109 |
| 8 | 107 | | |
| \bar{X} | 103 | | |
| S | 26 | | |
| RSD | 25 | | |

Występujące różnice aktywności poszczególnych nalewek wydają się być związane z pochodzeniem propolisu z różnych źródeł co potwierdzają liczne doniesienia z piśmiennictwa (26,27,30,31).

Poszukując związku pomiędzy składnikami występującymi w produktach propolisowych oraz aktywnością biologiczną wykonano badania z wybranymi składnikami, które według danych innych badaczy są za nią odpowiedzialne.

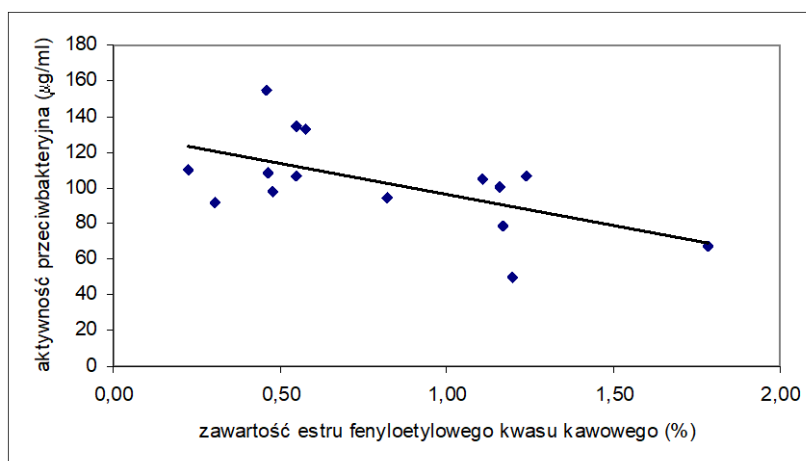
Badano zależność aktywności antybakteryjnej od zawartości kwasów fenolowych, estrów kwasów fenolowych, flawonoidów oraz poszczególnych składników oznaczanych w ekstraktach propolisowych. Wielkości współczynników korelacji uzyskanych dla poszczególnych zależności umieszczono w tabeli 27.

Tabela 27. Wartość współczynnika korelacji „r” zależności aktywność przeciwbakteryjna od zawartości składników oznaczonych w propolisie

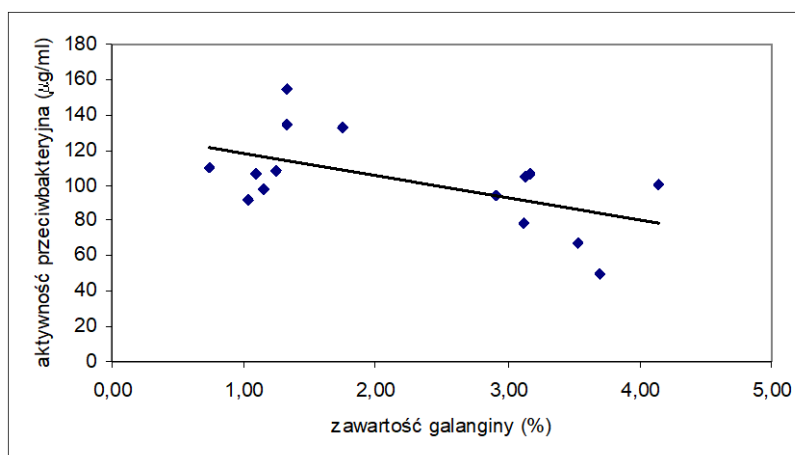
| Badane składniki | r | Poziom istotności „p” |
|---|---------------|------------------------------|
| flawonoidy | - 0,20 | 0,4763 |
| kwas kawowy | - 0,47 | 0,0748 |
| kwas p-kumarowy | - 0,16 | 0,5245 |
| kwas ferulowy | 0,44 | 0,0973 |
| ester fenyloetylowy kwasu kawowego | - 0,59 | 0,0217 |
| ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | - 0,49 | 0,0666 |
| pinocembryna | - 0,27 | 0,3225 |
| octan pinobanksyny | - 0,51 | 0,0530 |
| chryzyna | - 0,46 | 0,0831 |
| galangina | - 0,56 | 0,0308 |

Statystycznie istotną zależność ($p \leq 0,05$) stwierdzono pomiędzy zawartością estru fenyloetylowego kwasu kawowego i galanginą a wielkością aktywności przeciwbakteryjnej. Współczynnik korelacji, który określa siłę związku pomiędzy tymi parametrami wyniósł odpowiednio $r = -0,59$ i $r = -0,56$. Powyższe zależności przedstawiono na wykresach (rys. 31, 32).

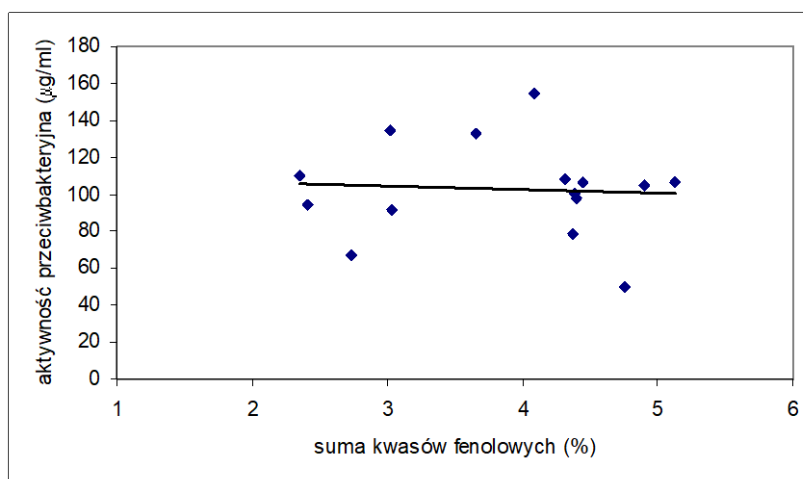
Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że wpływ kwasów fenolowych jest niewielki, co wykazano już we wcześniejszej publikacji (104). Zależność aktywności przeciwbakteryjnej od sumy kwasu kawowego, p-kumarowego i ferulowego przedstawiono na rysunku 33 wykazując słabą korelację.



Rysunek 31. Wykres zależności aktywności przeciwbakteryjnej od zawartości estru fenyloetylowego kwasu kawowego



Rysunek 32. Wykres zależności aktywności przeciwbakteryjnej od zawartości galanginy



Rysunek 33. Wykres zależności aktywności przeciwbakteryjnej od łącznej zawartości kwasów fenolowych

Podobne badania oceny aktywności mikrobiologicznej przeprowadzono dla roztworów substancji porównawczych kwasu kawowego, ferulowego, p-kumarowego, pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy. Biorąc pod uwagę najbardziej aktywne frakcje propolisowe, których aktywność wynosiła od 18 µg/ml do 34 µg/ml aktywność powyższych składników zbadano na poziomie stężenia 50 µg/ml. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że żaden z oznaczanych składników nie wykazywał aktywności antybakteryjnej w stosunku do *Staphylococcus aureus* w stężeniu 50 µg/ml.

Na podstawie wyników oznaczenia zawartości kwasów fenolowych w badanych koncentratkach propolisowych przygotowano mieszaniny modelowe kwasów fenolowych o stężeniach porównywalnych w jakich występują w koncentratkach oraz kilkakrotnie większym a następnie zbadano ich aktywność przeciwbakteryjną. Analizowane mieszaniny modelowe nie hamowały wzrostu szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*.

Aktywności nie wykazywały również mieszaniny modelowe zawierające w swoim składzie pinocembrynę, octan pinobanksyny, chryzynyę i galanginę o stężeniu i proporcjach jakie stwierdzono we frakcjach propolisowych nr 5 i 6 nalewki 4. Aktywność przeciwbakteryjną stwierdzono jedynie w mieszaninie modelowej M₄ o dziesięciokrotnie większym stężeniu niż występujące we frakcji nr 6.

W tabeli 28 i 29 przedstawiono badane stężenia składników w roztworach porównawczych i ich mieszaninach.

Tabela 28. Badane stężenia składników (µg/ml) w roztworach porównawczych i mieszaninach modelowych kwasów fenolowych

| | Roztwór porównawczy | Mieszaniny modelowe | |
|----------------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| | | R ₁ | R ₂ |
| kwas kawowy | 50,0 | 3,6 | 84,1 |
| kwas p-kumarowy | 50,0 | 3,6 | 108,9 |
| kwas ferulowy | 50,0 | 3,0 | 94,1 |
| | Suma | 10,2 | 287,1 |

Tabela 29. Badane stężenia składników ($\mu\text{g/ml}$) w roztworach porównawczych i mieszaninach modelowych galanginy, chryzyny, pinocembryny i octanu pinobanksyny.

| | Roztwór porównawczy | Mieszanki modelowe | | | |
|-----------------------|------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
| galangina | 50,0 | - | - | 1,2 | 12 |
| chryzyna | 50,0 | 0,9 | 9 | 1,0 | 10 |
| pinocembryna | 50,0 | 1,5 | 15 | 1,4 | 14 |
| octan pinobanksyny | 50,0 | 1,3 | 13 | 1,9 | 19 |
| Suma | | 3,7 | 37 | 5,5 | 55 |

Biorąc pod uwagę średnie zawartości kwasu kawowego, kwasu ferulowego, kwasu p-kumarowego, pinocembryny, octanu pinobanksyny, galanginy i chryzyny oraz estru fenyloetylowego i 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego w badanych nalewkach propolisowych, przygotowano mieszaniny modelowe powyższy składników o zawartości odpowiadającej 50 %, 100 % i 200 % (P₁, P₂, P₃) w stosunku do wartości oznaczonych.

Mieszanina modelowa P₂ o zawartości badanych składników porównywalnej do zawartości w produktach propolisowych nie wykazywała aktywności przeciwbakteryjnej w odniesieniu do szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*. Aktywność przeciwbakteryjną wykazała mieszanina P₃ o stężeniu składników jakie zamieszczono w tabeli 30. Analizując sumę zawartości pinocembryny, chryzyny, octanu pinobanksyny oraz galanginy (48,8 $\mu\text{g/ml}$) w roztworze mieszaniny modelowej P₃, stwierdzono, że jest ona porównywalna z sumą zawartości tych składników w również aktywnej mieszaninie M₄ (55 $\mu\text{g/ml}$). Zatem pozostałe związki, a więc kwasy fenolowe i estry kwasu kawowego, których stężenie w badanych mieszaninach modelowych było odpowiednie do stężenia w badanych nalewkach propolisowych ze względu na niską zawartość bądź niską aktywność nie wpływają znacząco na aktywność przeciwbakteryjną propolisu.

Tabela 30. Stężenie składników ($\mu\text{g/ml}$) w mieszaninie P₃ hamujące wzrost szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*.

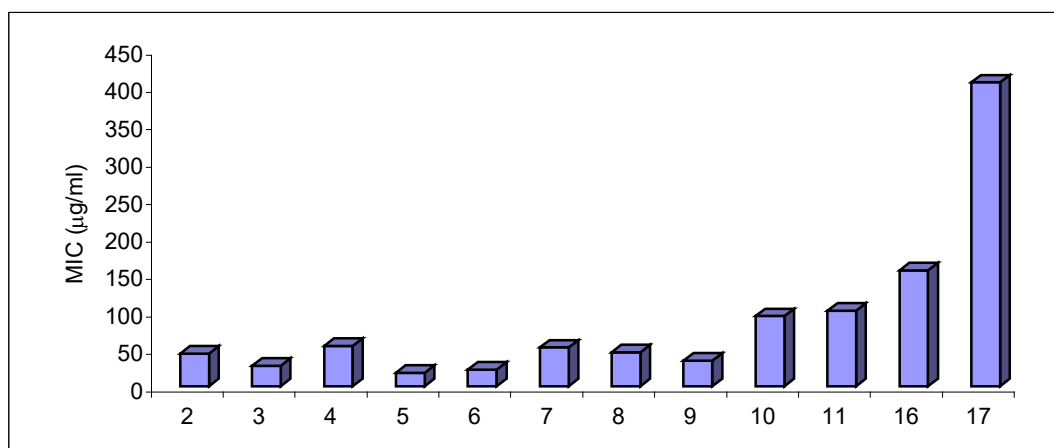
| | P ₃ | |
|--|----------------|--|
| kwaskawowy | 2,1 | Suma wszystkich składników: 62,7 $\mu\text{g/ml}$ |
| kwaskumarowy | 8,7 | |
| kwakerulowy | 3,0 | |
| pinocembryna | 16,8 | Suma pinocembryny, chryzyny, octanu pinobanksyny, galanginy: 48,8 $\mu\text{g/ml}$ |
| octan pinobanksyny | 10,8 | |
| galangina | 8,0 | |
| chryzyna | 8,3 | |
| ester fenyloetylowy kwasu kawowego | 2,7 | |
| ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | 2,2 | |

6.1.2. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej frakcji propolisowych

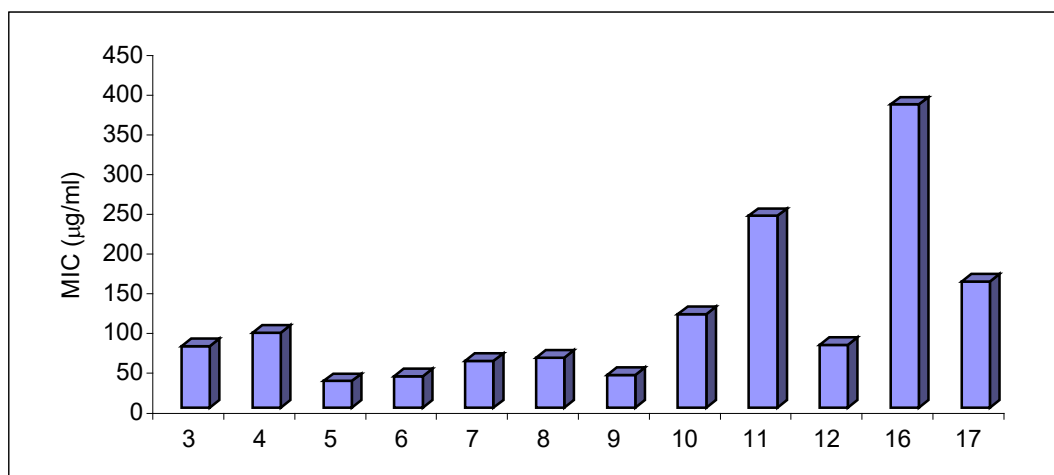
Frakcje propolisowe otrzymane w punkcie 5.8.1 poddano ocenie mikrobiologicznej w celu określenia ewentualnego wpływu oznaczanych składników na ich aktywność. Ze względu na dużą ilość analizowanych próbek dla każdej frakcji wyznaczono przedział aktywności pomiędzy ilością mikrolitrów analitu pobranego do analizy, która hamuje całkowicie wzrost szczepu wzorcowego a ilością mikrolitrów, która takiego działania nie wykazuje. Ponadto wyznaczono MIC dla frakcji najbardziej aktywnych.

Badaniami objęto frakcje pochodzące z trzech nalewek tj. 4, 5 i 14. Spośród analizowanych frakcji aktywność przeciwbakteryjną wykazywało 12 z 18 frakcji w przypadku nalewki nr 4 i nr 5 oraz 8 z 18 w przypadku nalewki 14. Większość uzyskanych frakcji propolisowych wykazywała aktywność przeciwbakteryjną co jest potwierdzeniem hipotezy, że aktywność propolisu jest sumą aktywności wielu związków.

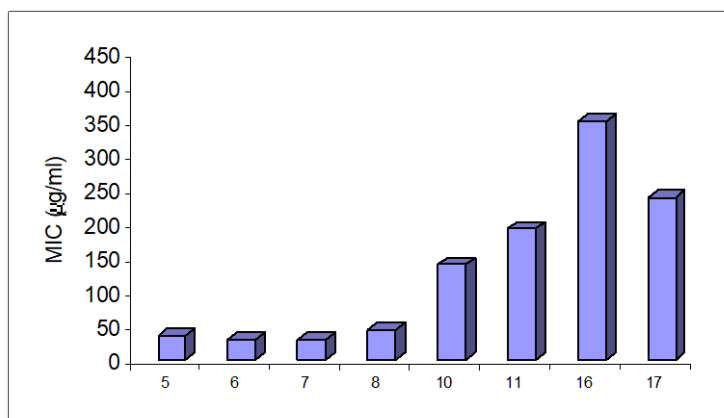
Poszczególne frakcje różnią się wielkością aktywności przy czym najbardziej aktywne były frakcje 5 i 6 w nalewce propolisowej nr 4 (18 $\mu\text{g/ml}$ i 22 $\mu\text{g/ml}$), frakcja 6 w nalewce 5 (36 $\mu\text{g/ml}$) oraz frakcje 6 i 7 w nalewce propolisowej nr 14 (29 $\mu\text{g/ml}$ i 29 $\mu\text{g/ml}$). Szczegółowe wyniki przedstawiono na rysunkach 34, 35, 36 oraz w tabeli 31.



Rysunek 34. Aktywność mikrobiologiczna frakcji otrzymanych z nalewki propolisowej nr 4. Na wykresie przedstawiono frakcje, które wykazywały aktywność przynajmniej dla objętości badanej 500 μl . Aktywności nie wykazywały frakcje 12, 13, 14, 15, 18. Im mniejsza wysokość słupka tym większa aktywność.



Rysunek 35. Aktywność mikrobiologiczna frakcji otrzymanych z nalewki propolisowej nr 5. Na wykresie przedstawiono frakcje, które wykazywały aktywność przynajmniej dla objętości badanej 500 μl . Aktywności nie wykazywały frakcje 1, 2, 13, 14, 15, 18



Rysunek 36. Aktywność mikrobiologiczna frakcji otrzymanych z nalewki propolisowej nr 14. Na wykresie przedstawiono frakcje, które wykazywały aktywność przynajmniej dla objętości badanej 500 µl. Aktywności nie wykazywały frakcje 1, 2, 3, 4, 9, 12, 13, 14, 15, 18,

Tabela 31. Aktywność mikrobiologiczna (MIC) frakcji otrzymanych z nalewki propolisowej nr 4, 5 i 14 wyrażona w µg/ml.

| Frakcja nr | Nalewka 4 | Nalewka 5 | Nalewka 14 |
|------------|-----------|-----------|------------|
| 1 | - | - | - |
| 2 | 44 | - | - |
| 3 | 34 | 78 | - |
| 4 | 54 | 94 | - |
| 5 | 18 | 34 | 34 |
| 6 | 22 | 40 | 29 |
| 7 | 52 | 59 | 29 |
| 8 | 45 | 63 | 44 |
| 9 | 34 | 41 | - |
| 10 | 94 | 118 | 138 |
| 11 | 101 | 242 | 120 |
| 12 | - | 79 | - |
| 13 | - | - | - |
| 14 | - | - | - |
| 15 | - | - | - |
| 16 | 155 | 382 | 349 |
| 17 | 406 | 159 | 236 |
| 18 | - | - | - |

Porównano wielkości otrzymanych aktywności z wynikami analiz fizykochemicznych. Wykazano, że frakcje aktywne zawierają w swoim składzie pinocembrynę, octan pinobanksyny, chryzynę i galanginę. Jednak w wyniku szczegółowej analizy wyników stwierdzono, że maksimum zawartości zarówno poszczególnych składników jak również ich sumy przypada na frakcje mniej aktywne. Na przykład aktywność frakcji 6 otrzymanej z nalewki nr 4 wynosi 22 $\mu\text{g/ml}$ przy sumarycznej zawartości oznaczonych składników wynoszącej 2,34 mg/ml. Dla porównania aktywność frakcji 5 otrzymanej z nalewki nr 5 wynosi 34 $\mu\text{g/ml}$ przy ich sumarycznej zawartości wynoszącej zaledwie 0,20 mg/ml. Ponadto we frakcji 5 (nalewka nr 5) nie stwierdzono obecności octanu pinobanksyny i chryzyny. Wydaje się również, że zawartość pozostałych składników tej frakcji tj. galanginy i chryzyny nie wpływa w znaczący sposób na aktywność ponieważ większe stężenie tych składników stwierdzono w mniej aktywnej (59 $\mu\text{g/ml}$) frakcji 7 (nalewka 5).

W celu potwierdzenia powyższych wyników przygotowano mieszaniny modelowe o zawartości i proporcji składników stwierdzonych w frakcji 5 i 6 (nalewka 4). Przeprowadzone badania potwierdziły, że powyższe składniki w stężeniu w jakim występują w frakcjach aktywnych nie wykazują aktywności przeciwbakteryjnej. Działanie przeciwbakteryjne mieszaniny o stężeniu dziesięciokrotnie większym niż obserwowane w frakcji 6 dowodzi, że nie można wykluczyć wpływu powyższych substancji na całkowitą aktywność propolisu.

W wyniku analizy HPLC oraz GC-MS w frakcjach najbardziej aktywnych stwierdzono obecność grupy związków o masie molekularnej 232 i 234, o podobnym widmie masowym i widmie absorpcji. Analiza widm pozwala przypuszczać, że są to pochodne kwasu p-kumarowego. Obecność tych składników w frakcjach aktywnych sugeruje, że mogą posiadać

właściwości przeciwbakteryjne jednak potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga przeprowadzenia szerszej zakrojonych badań.

Kwasy fenolowe stwierdzono w frakcjach od 10 do 17, których aktywność wynosiła powyżej 100 µg/ml lub które nie wykazywały w ogóle aktywności. Jest to potwierdzeniem wyników uzyskanych dla mieszanin modelowych kwasów fenolowych, które nie wykazywały aktywności mikrobiologicznej.

6.2. Aktywność przeciwgrzybicza nalewek propolisowych

Badanie wykonano zgodnie z metodą przedstawioną w punkcie 4.2.10. a otrzymane wyniki zebrano w tabeli 32. Stwierdzono, że badane próbki w odróżnieniu do aktywności przeciwbakteryjnej wykazywały znaczną różnicę w aktywności przeciwgrzybiczej. Otrzymano wyniki, które mieściły się w przedziale od 181 µg/ml do 933 µg/ml.

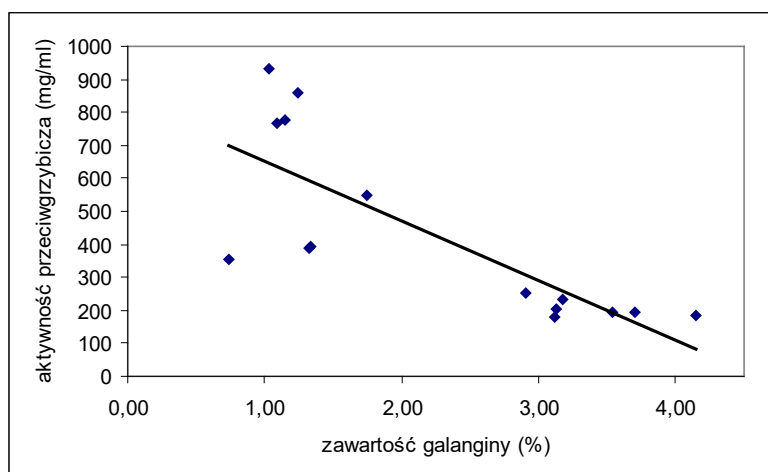
Tabela 32. Wyniki badania aktywność przeciwgrzybiczej nalewek propolisowych

| Nr nalewki | MIC (µg/ml) | Nr nalewki | MIC (µg/ml) |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 1 | 386 | 9 | 550 |
| 2 | 394 | 10 | 933 |
| 3 | 183 | 11 | 776 |
| 4 | 181 | 12 | 193 |
| 5 | 353 | 13 | 194 |
| 6 | 202 | 14 | 767 |
| 7 | 251 | 15 | 859 |
| 8 | 235 | | |
| \bar{X} | | 430,5 | |
| S | | 274,0 | |
| RSD | | 63,60 | |

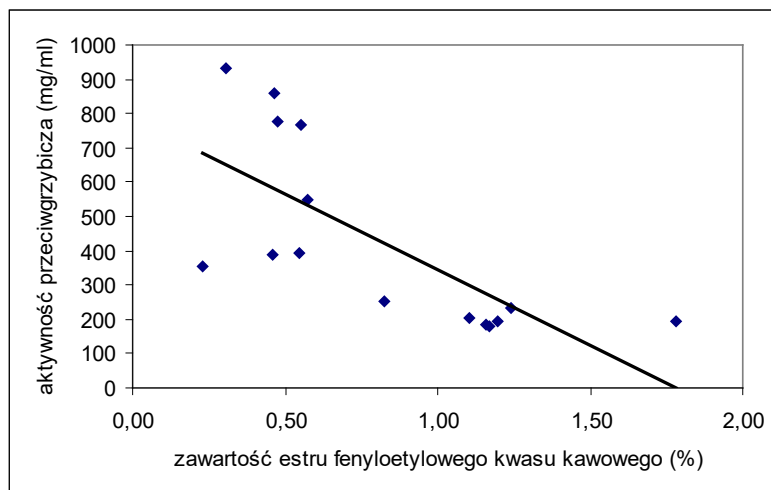
Analogicznie jak w przypadku aktywności przeciwbakteryjnej badano zależność aktywności przeciwgrzybiczej od zawartości flawonoidów, kwasu kawowego, kwasu p-kumarowego, kwasu ferulowego, pinocembryny, octanu pinobanksyny, galanginy i chryzyny w analizowanych nalewkach propolisowych. Istotną statystycznie korelację stwierdzono w przypadku pinocembryny ($r=-0,82$), galanginy ($r=-0,78$), chryzyny ($r=-0,75$), octanu pinobanksyny ($r=-0,73$), estru fenyloetylowego kwasu kawowego ($r=-0,77$), estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego ($r=-0,70$), kwasu kawowego ($r=-0,68$) oraz sumy flawonoidów oznaczonych metodą spektrofotometryczną ($r=-0,75$). Na podkreślenie zasługuje fakt, że zaobserwowano również statystycznie istotną korelację ($r=0,86$) pomiędzy ilością kwasu ferulowego a mierzoną wielkością aktywności przy czym wzrostowi ilości kwasu ferulowego towarzyszy spadek aktywności. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 33 oraz na wykresach (rys. 37, 38, 39).

Tabela 33. Wielkości współczynnika korelacji „r” zależności aktywności przeciwgrzybiczej od zawartości substancji oznaczonych w nalewkach propolisowych

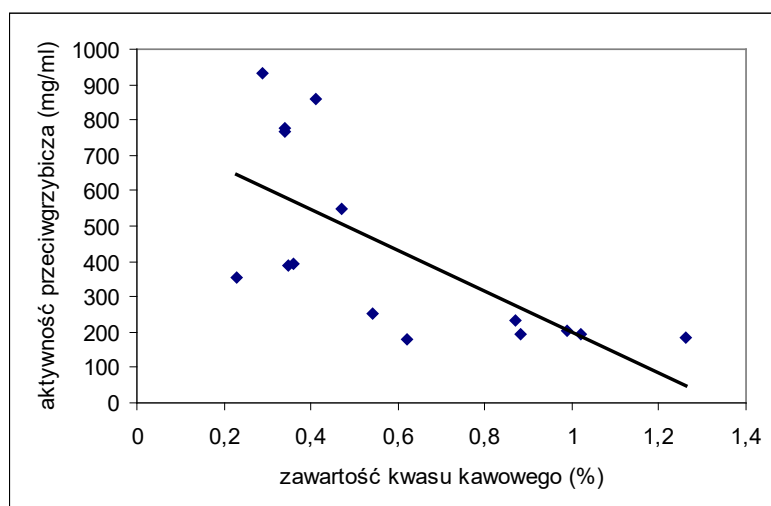
| Badane związki | r | Poziom istotności „p” |
|---|--------|-----------------------|
| flawonoidy | - 0,75 | 0,0013 |
| kwas kawowy | - 0,68 | 0,0049 |
| kwas p-kumarowy | - 0,18 | 0,5245 |
| kwas ferulowy | 0,86 | 0,0000 |
| ester fenyletylowy kwasu kawowego | - 0,71 | 0,0028 |
| ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | - 0,71 | 0,0033 |
| pinocembryna | - 0,82 | 0,0002 |
| octan pinobanksyny | - 0,73 | 0,0022 |
| chryzyna | - 0,75 | 0,0012 |
| galangina | - 0,78 | 0,0006 |



Rysunek 37. Wykres zależności aktywności przeciwgrzybiczej od zawartości galanginy



Rysunek 38. Wykres zależności aktywności przeciwwgrzybiczej od zawartości estru fenyloetylowego kwasu kawowego



Rysunek 39. Wykres zależności aktywności przeciwwgrzybiczej od zawartości kwasu kawowego

7. AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA

Z punktu widzenia dzisiejszej wiedzy podaż na składniki o właściwościach przeciwutleniaczy i zmiataczy wolnych rodników posiada istotne znaczenie z uwagi na rolę jaką spełniają dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Właściwości antyoksydacyjne propolisu badane były wielokrotnie przez różnych autorów przy zastosowaniu różnych technik analitycznych (43,63,65,66,67).

W niniejszym opracowaniu zastosowano po raz pierwszy w analizie propolisu, metodę CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) (98).

Metoda polega na redukcji jonów Cu (II) do Cu (I), przy czym reaktywne grupy OH-Ar polifenoli zostają utlenione do odpowiednich chinonów. Jony miedzi występują w kompleksie z neokuproiną. Zredukowana forma kompleksu jest barwna i wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda=450$ nm. Aktywność antyoksydacyjna została wyrażona w odniesieniu do troloksu zastosowanego jako substancja odniesienia. Badanie wykonano metodą przedstawioną w punkcie 4.2.11.

Dodatkowo wykonano badanie właściwości antyoksydacyjnych w roztworach porównawczych dla wybranych składników, których obecność stwierdzono w propolisie.

Wyniki aktywności antyoksydacyjnej zamieszczono w tabeli 34. Wszystkie badane próbki wykazały silną aktywność antyoksydacyjną co jest zgodne z badaniami innych autorów. Otrzymano wyniki, które mieszczą się w przedziale od 55,43 mmol/g do 77,95 mmol/g.

Wyniki aktywności antyoksydacyjnej składników w roztworach porównawczych, które występują w propolisie przedstawiono w tabeli 35. Wszystkie badane składniki wykazywały aktywność antyoksydacyjną. Największą aktywność wyrażoną ilością mmol troloksu na 1 g masy badanej

substancji stwierdzono w przypadku kwasu kawowego (232,1 mmol/g). Wysoką aktywność posiadał również ester fenyloetylowy kwasu kawowego (164,4 mmol/g) i galangina (139,8 mmol/g). Najmniejszą aktywność stwierdzono w przypadku chryzyny (63,9 mmol/g).

Tabela 34. Aktywność antyoksydacyjna etanolowych ekstraktów propolisowych metodą CUPRAC (mmol troloksu w przeliczeniu na suchą masę nalewek).

| Nalewka | (mmol/g suchej masy) | Nalewka | (mmol/g) |
|-----------|----------------------|---------|----------|
| 1 | 57,00 | 9 | 68,23 |
| 2 | 61,72 | 10 | 49,45 |
| 3 | 71,40 | 11 | 61,77 |
| 4 | 65,13 | 12 | 77,95 |
| 5 | 55,43 | 13 | 68,24 |
| 6 | 73,13 | 14 | 60,61 |
| 7 | 63,65 | 15 | 63,14 |
| 8 | 70,40 | | |
| \bar{X} | | 64,5 | |
| S | | 7,4 | |
| RSD | | 11,5 | |

Tabela 35. Aktywność antyoksydacyjna substancji wzorcowych

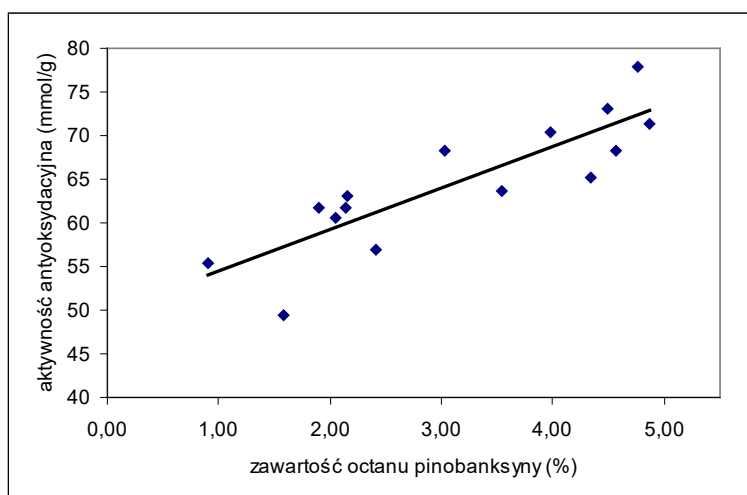
| Substancja badana | Aktywność antyoksydacyjna (mmol/g) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Kwas kawowy | 232,1 |
| Kwas ferulowy | 112,4 |
| Kwas p-kumarowy | 116,6 |
| Chryzyna | 63,9 |
| Galangina | 139,8 |
| Pinocembryna | 96,8 |
| Ester fenyloetylowy kwasu kawowego | 164,4 |

W celu określenia zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a zawartością badanych związków przeprowadzono analizę korelacji dla kwasu kawowego, kwasu p-kumarowego, kwasu ferulowego, pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy. Miarą badanych zależności jest współczynnik korelacji, którego wartości przedstawiono w tabeli 36. W tabeli 35 przedstawiono również wartość poziomu istotności „p”, którego wartość mniejsza lub równa 0,05 oznacza występowanie istotności statystycznej.

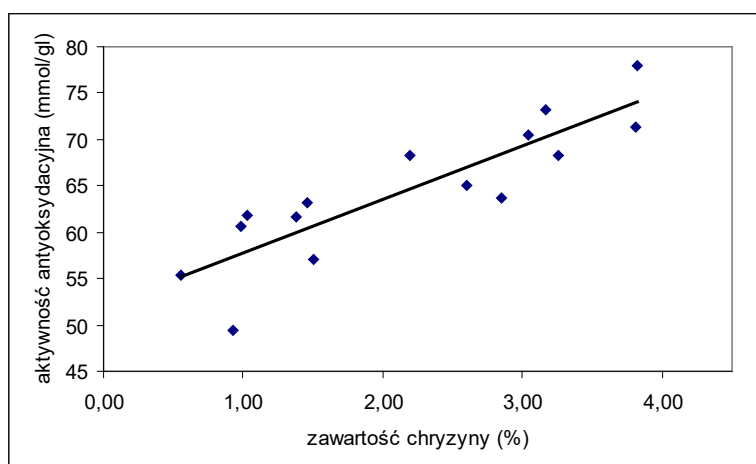
Statystycznie istotną zależność stwierdzono w przypadku zawartości kwasu kawowego ($r=0,81$), estru fenyloetylowy kwasu kawowego ($r=0,87$), estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego ($r=0,79$), galanginy ($r=0,80$), octanu pinobanksyny ($r=0,85$) i chryzyny ($r=0,87$). Na rysunkach 40, 41, 42 przedstawiono wykresy zależności dla związków najbardziej aktywnych.

Tabela 36. Wartość współczynnika korelacji „r” zależności aktywność antyoksydacyjna od zawartości substancji oznaczanych w nalewkach propolisowych

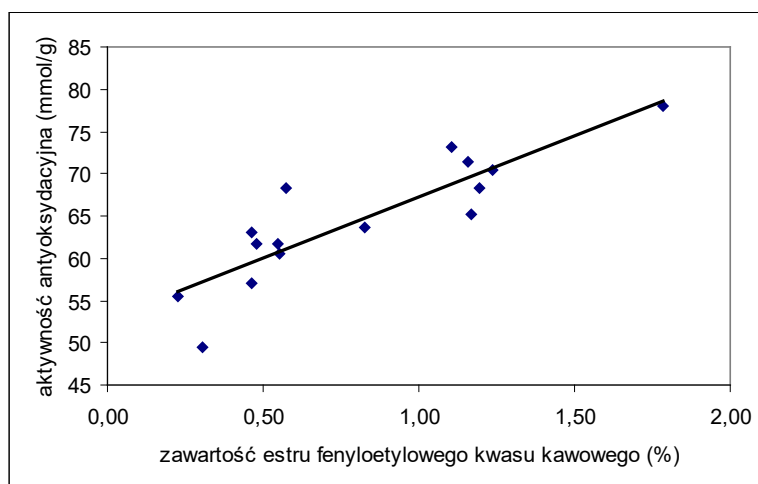
| Badane związki | r | Poziom istotności „p” |
|---|-------------|------------------------------|
| flawonoidy | 0,19 | 0,5001 |
| kwas kawowy | 0,81 | 0,0003 |
| kwas p-kumarowy | 0,21 | 0,4425 |
| kwas ferulowy | - 0,37 | 0,1755 |
| ester fenyloetylowy kwasu kawowego | 0,87 | 0,0000 |
| ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego | 0,79 | 0,0005 |
| pinocembryna | 0,27 | 0,3386 |
| octan pinobanksyny | 0,85 | 0,0000 |
| chryzyna | 0,87 | 0,0000 |
| galangina | 0,80 | 0,0004 |



Rysunek 40. Wykres zależności aktywności antyoksydacyjnej od zawartości octanu pinobanksyny



Rysunek 41. Wykres zależności aktywności antyoksydacyjnej od zawartości chryzyny



Rysunek 42. Wykres zależności aktywności antyoksydacyjnej od zawartości estru fenyloetylowego kwasu kawowego

Analiza korelacji w pewnym stopniu pokryła się z analizą właściwości antyoksydacyjnych uzyskanych dla czystych substancji wzorcowych. Różnice mogą wynikać z wzajemnego oddziaływania tych składników w złożonej mieszaninie jaką jest propolis.

8. DYSKUSJA WYNIKÓW

Propolis znany jest od czasów starożytnych a zainteresowanie jego zastosowaniem znacznie wzrosło w ostatnich 30 latach. W odpowiedzi na zapotrzebowanie na rynku pojawiło się wiele preparatów z propolisem zarejestrowanych jako leki, suplementy diety czy kosmetyki.

Produkcja tych preparatów wymaga stosowania surowca o odpowiedniej jakości w celu zagwarantowania skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Powszechnie stosowanym sposobem standaryzacji jest oznaczanie aktywności mikrobiologicznej w stosunku do szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*.

Propolis jest bardzo skomplikowaną mieszaniną różnych związków chemicznych, przy czym różne związki mogą dawać ten sam efekt terapeutyczny. Dlatego zasadne jest poszerzenie tej standaryzacji o analizę składników chemicznych, które są odpowiedzialne za aktywność biologiczną. Problemem staje się zdefiniowanie, które związki chemiczne i jakimi metodami analitycznymi badane w najlepszy sposób określą jakość stosowanego surowca.

Stąd też w pierwszym etapie badań postanowiono dokonać wyboru odpowiednich metod analitycznych, które były niezbędne do realizacji tematu badań.

Do oceny ogólnej badanych produktów w kierunku oznaczenia połączeń nieorganicznych zastosowano metody farmakopealne półilościowe oraz ilościowe, które są powszechnie zalecane do badania czystości. Do identyfikacji i oznaczania zawartości składników czynnych propolisu stosowano metody chromatograficzne jak: HPLC, TLC, GC (7,8,10,11,20,30,37).

W celu oznaczenia składników aktywnych, tj. kwasów fenolowych, flawonoidów, estrów kwasu kawowego opracowano metodę HPLC z użyciem

detektora diodowego. Zastosowanie tego typu detektora pozwala na jednoczesną identyfikację występujących w analizie związków chemicznych na podstawie widm absorpcji, które można porównać z widmami substancji porównawczych lub dostępnymi w piśmiennictwie naukowym co jest szczególnie istotne w przypadku oznaczania składników, dla których brak jest odpowiednich substancji porównawczych.

Do badań zastosowano metodę HPLC-RP z elucją gradientową, która pozwala na dobre rozdzielenie składników badanych od innych znanych jak również bliżej nieokreślonych. Biorąc pod uwagę złożony skład ekstraktów propolisowych w wielu przypadkach analiza ekstraktów była niemożliwa i wymagała przygotowania analitu do badań.

Do wstępnego oczyszczenia ekstraktów propolisowych zastosowano ekstrakcję do fazy stałej na kolumnie RP-18, natomiast do rozdzielenia chromatograficznego użyto kolumnę Lichrospher 100 RP-18e w przypadku kwasów fenolowych i kolumnę Purospher 100 RP-18e w przypadku pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny, galanginy, pochodnych kwasu kawowego i innych. Fazę ruchomą przygotowano przez zmieszanie w odpowiednich proporcjach roztworów A: 0,03 M NaH_2PO_4 zakwaszonego H_3PO_4 do $\text{pH}=3,0$ oraz B: acetonitrylu w celu uzyskania gradientu w przypadku kwasów fenolowych oraz A: woda-kwas mrówkowy-acetonitryl (950ml-50 ml-25ml) i B: metanol do oznaczania flawonoidów.

Opracowane metody HPLC do realizacji podjętych badań zwalidowano przez określenie czułości, dokładności, precyzji, specyficzności, liniowości i stabilności roztworów.

Uzyskano wysoką czułość metod, dobrą dokładność i precyzję oraz szeroki zakres liniowości przy zachowaniu stabilności roztworów w czasie potrzebnym do wykonania badania (tab. 9,14,17). Metody wykazywały się specyficznością wobec składników oznaczanych tj. pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny, galanginy, kwasu kawowego, kwasu

p-kumarowego, kwasu ferulowego oraz estru fenyloetylowego i 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego.

Do wstępnej oceny jakościowej propolisu opracowano metodę TLC, którą posłużono się do określenia charakterystycznego „fingerprintu” produktów propolisowych pochodzących od różnych dostawców.

Dla potwierdzenia tożsamości badanych związków jak również identyfikacji nowych połączeń zastosowano do badań metodę GC-MS, którą wykorzystano do analizy próbek po dokonaniu rozdziału produktów propolisowych metodą chromatografii kolumnowej.

W zakresie analizy fizykochemicznej wykorzystano także inne metody jak farmakopealną metodę spektrofotometryczną do oznaczania flawonoidów, która jest często zalecana przez wielu autorów jako odpowiednia do standaryzacji propolisu (95,95,96,97).

Badanie aktywności biologicznej przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze przy użyciu wzorcowych szczepów *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. W licznych pracach naukowych dotyczących oceny aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej propolisu stosowano różne metody analityczne i różne szczepy mikroorganizmów, dlatego nie zawsze otrzymane wyniki badań są porównywalne (18,31,35,44,54).

Właściwości antyoksydacyjne produktów propolisowych zbadano metodą CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) opartą na redukcji jonów Cu (II) do Cu (I) w środowisku obojętnym (98).

Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej oraz antyoksydacyjnej miały charakter porównawczy, ułatwiający postępowanie przy ustaleniu kryteriów fizykochemicznych w odniesieniu do rodzaju i zawartości składników w procesie standaryzacji badanych produktów. Badaniami objęto nie tylko ekstrakty propolisowe ale także roztwory

pojedynczych składników oraz mieszaniny modelowe o składzie podobnym do badanych produktów.

W ocenie produktów przeznaczonych do zastosowania w terapii obok oceny składników czynnych uwzględnia się także badania ogólne w zakresie czystości, które muszą być spełnione. Stąd też w pierwszym etapie badań dokonano analizy związków nieorganicznych obejmujących jony miedzi, cynku, żelaza oraz ołowiu i kadmu.

Obecność metali takich jak miedź, żelazo i cynk ma znaczenie z punktu widzenia suplementacji diety. Zawartość miedzi w badanych próbkach mieściła się w zakresie od 1,7 mg/kg do 2,6 mg/kg, cynku od 5,6 mg/kg do 31,6 mg/kg oraz żelaza od 32,5 mg/kg do 42,4 mg/kg. Są to stężenia odpowiednio bezpieczne z punktu widzenia toksykologicznego.

Oznaczona zawartość jonów miedzi i cynku była niższa niż publikowane dane dotyczące zawartości tych metali w próbkach rosyjskiego propolisu, w których średnia zawartość wynosiła odpowiednio 4,35 mg/kg miedzi i 58,6 mg/kg cynku (3).

Metale ciężkie są określone jako niepożądane zanieczyszczenia, które są limitowane we wszystkich produktach żywnościowych i leczniczych a ich obecność wynika z zanieczyszczenia środowiska. Obecność kadmu stwierdzono tylko w jednej próbce, którego stężenie wynosiło 0,06 mg/kg natomiast stężenie ołowiu w badanych koncentraty mieściło się w zakresie od 0,12 mg/kg do 0,31 mg/kg. Wyniki zawartości sumy metali ciężkich w przeliczeniu na ołów w koncentraty propolisowych nie przekraczały ustalonego limitu farmakopealnego dla gęstych wyciągów, który wynosi 60 mg/kg (Farmakopea Polska VI).

Dla pełniejszej charakterystyki badanych ekstraktów propolisowych w pracy przedstawiono wyniki oznaczeń suchej pozostałości, zawartości popiołu ogólnego oraz popiołu nierozpuszczalnego w 10% HCl.

Wszystkie przebadane partie produktu charakteryzowały się podobną pozostałością po odparowaniu i wysuszeniu do stałej masy, którą stanowią związki nietlotne. Zawartość popiołu ogólnego wyniosła od 0,01 % do 0,20 % a popiołu nierozpuszczalnego w 10 % HCl od 0,01 % do 0,04 %. W obu przypadkach zostały spełnione wymagania Polskiej Normy „Koncentrat propolisowy”, w której limity dla powyższych parametrów wynoszą odpowiednio nie więcej niż 0,5 % i 0,05 %.

W poszukiwaniu zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a rodzajem i zawartością składników oznaczonych w produktach badanych, stwierdzono, że wszystkie produkty wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne w przeciwieństwie do roztworów składników porównawczych.

Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów propolisowych wynosiła od 50 µg/ml do 155 µg/ml co jest porównywalne z danymi innych autorów, według których aktywność oznaczona wobec szczepów *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* wynosiła 80-120 µg/ml (36).

W przypadku aktywności przeciwgrzybiczej otrzymano wyniki w zakresie od 181µg/ml do 933 µg/ml stosując jako szczep wzorcowy *Candida albicans*.

Badane próbki wykazywały ponadto wysoką aktywność antyoksydacyjną co również jest zgodne z wynikami innych autorów (35,65,67). Uzyskano wyniki, których wartości mieściły się w przedziale od 55,43 mmol/g do 77,95 mmol/g.

W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań chromatograficznych można stwierdzić, że podstawowymi składnikami propolisu są kwasy fenolowe, flawonoidy oraz estry kwasów fenolowych.

Szczegółowe badania wykazały obecność kwasu kawowego, ferulowego i p-kumarowego.

Zawartość kwasu kawowego w badanych próbkach mieściła się w przedziale od 0,23 % do 1,26 %, kwasu p-kumarowego od 1,45 % do 3,42 % a kwasu ferulowego od 0,26 % do 1,58 %. W sumie w poszczególnych ekstraktach oznaczono od 2,35 % do 5,13 % kwasów fenolowych.

W przypadku porównania sumarycznej zawartości kwasów fenolowych w stosunku do wartości średniej wykazano, że na piętnaście badanych prób dziesięć mieści się w tolerancji ± 25 %, natomiast wszystkie w tolerancji ± 50 %.

We wszystkich badanych próbkach występowało wysokie stężenie kwasu p-kumarowego, którego zawartość była od dwa do dziesięć razy wyższa niż pozostałych kwasów fenolowych. Podobne wyniki uzyskali także inni badacze w odniesieniu do polskiego propolisu (20, 105).

Kwasy kawowy, ferulowy i p-kumarowy były także przedmiotem wcześniejszych badań w próbkach propolisu pochodzących z Niemiec, Francji, Austrii (38), Bułgarii (9), Albanii (10) a także Urugwaju, Chin i Brazylii (36, 12, 28). Analizując dostępne w licznych pracach wyniki można stwierdzić, że stężenie omawianych kwasów, ich wzajemny stosunek oraz współwystępowanie z innymi kwasami fenolowymi jest zależne od pochodzenia propolisu.

W badaniach biologicznych wykazano, że roztwory porównawcze kwasów fenolowych nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnej w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*, podobnie jak mieszaniny modelowe, o stężeniu i proporcji składników odpowiednio do ich zawartości w koncentratkach propolisowych oraz w stężeniu kilkakrotnie większym (tab.28, rys. 34).

Analiza korelacji pomiędzy zawartością kwasu kawowego, kwasu ferulowego i kwasu p-kumarowego w badanych nalewkach propolisowych

a oznaczoną aktywnością przeciwbakteryjną nie wykazała statystycznie istotnej zależności pomiędzy badanymi parametrami.

Wyniki tych badań są zgodne z doniesieniami innych autorów, według których kwasy fenolowe posiadają znikomą aktywność w odniesieniu do *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sorbinus* (41).

W przypadku badania właściwości przeciwgrzybiczych kwasów fenolowych istotną korelację stwierdzono w przypadku kwasu kawowego ($r=0,68$).

W odróżnieniu od stosunkowo słabej aktywności przeciwbakteryjnej i nieco większej przeciwgrzybiczej, kwasy fenolowe wykazywały wysoką aktywność antyoksydacyjną wyrażoną ilością mmol troloxu na 1 g masy badanej substancji, której wartość dla najbardziej aktywnego kwasu kawowego wyniosła 232 mmol/g.

Przeprowadzona analiza korelacji wykazała silną zależność pomiędzy zawartością kwasu kawowego w nalewkach propolisowych a ich aktywnością antyoksydacyjną. Wartość współczynnika korelacji, który określa stopień badanych zależności wyniosła $r=0,81$. W przypadku kwasu ferulowego i kwasu p-kumarowego nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie.

W trakcie prowadzonych badań wykazano, że kwasom fenolowym towarzyszą ich pochodne, z których na uwagę zasługują niektóre estry, zwłaszcza ester 1,1-dimetyloallilowy i fenyloetylowy kwasu kawowego, znane ze swoich właściwości uczulających (83,84,87,88,98), jak również właściwości antyoksydacyjnych (65,67), przeciwzapalnych (72,73), przeciwnowotworowych (43,81,82).

Zawartość badanych składników wyniosła odpowiednio od 0,23 % do 1,78 % estru fenyloetylowego kwasu kawowego oraz od 0,17 % do 1,08 % estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego, sumarycznie od 0,35 % do 2,62 %.

W odniesieniu do wartości średniej oznaczona zawartość estrów kwasów fenolowych mieściła się w przedziale $\pm 25\%$ w dwóch nalewkach a w przedziale $\pm 50\%$ w dziesięciu nalewkach.

Mając na uwadze wspomniane działanie uczulające omawianych estrów należałoby postawić pytanie czy i w jakim stężeniu substancje te działają uczulająco.

Według niektórych autorów próg uczulający dla propolisu wynosi powyżej 20% jego zawartości natomiast w odniesieniu do mieszaniny estrów kwasu kawowego, w której $54,2\%$ stanowi ester 1,1,-dimetyloallilowy kwasu kawowego, $7,9\%$ ester fenyloetylowy kwasu kawowego, $28,3\%$ ester 3-metylo-3-butenylowy kwasu kawowego i $4,3\%$ ester 2-metylo-2-butenylowy kwasu kawowego, wynosi od 3% do 10% (83,84,87).

W przypadku estru fenyloetylowego stwierdzono istotną statystycznie zależność zarówno w odniesieniu do aktywności przeciwbakteryjnej $r=-0,59$ jak i przeciwgrzybiczej $r=-0,71$. Stężenie estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego dobrze korelowało z aktywnością przeciwgrzybiczną, $r=-0,71$.

Statystycznie istotną korelację stwierdzono także pomiędzy stężeniem badanych składników a aktywnością antyoksydacyjną. Współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio $r=0,87$ dla estru fenyloetylowego i $r=0,79$ dla estru 1,1-dimetyloallilowego kwasu kawowego.

Obok omawianych kwasów fenolowych i ich estrów ważną grupę związków obecnych w propolisie stanowią flawonoidy. Stężenie tych składników, oznaczone metodą spektrofotometryczną wynosiło od $2,21\%$ do $6,69\%$ a rozrzut wyników w stosunku do średniej zawartości dla dziewięciu nalewek mieścił się w zakresie $\pm 25\%$ a dla piętnastu w zakresie $\pm 50\%$.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności w przypadku aktywności przeciwbakteryjnej i antyoksydacyjnej w przeciwieństwie do aktywności przeciwgrzybiczej $r=-0,75$, co jest zgodne z danymi innych

autorów według których, flawonoidy wykazują aktywność przeciwgrzybiczą w stosunku do *Candida albicans* (90).

W etanolowych ekstraktach propolisowych zidentyfikowano i oznaczono ilościowo metodą HPLC pinocembrynę, chryzynę, octan pinobanksyny i galanginę. Zawartość poszczególnych składników wynosiła od 1,85 % do 6,82 % pinocembryny, od 1,58 % do 4,76 % octanu pinobanksyny, od 0,51 % do 3,83 % galanginy i od 0,74 % do 4,15 % chryzyny. Suma oznaczanych składników wynosiła od 6,18 % do 18,83 %.

Poszczególne serie badanych produktów charakteryzowały się większą zmiennością zawartości badanych składników w porównaniu do kwasów fenolowych. Stosując przyjęte kryterium oceny $\pm 25\%$ i $\pm 50\%$ w stosunku do zawartości średniej, w trzech nalewkach z piętnastu zawartość tych składników mieściła się w przedziale $\pm 25\%$ a w piętnastu w zakresie $\pm 50\%$.

Biorąc pod uwagę średnią zawartość oznaczanych składników stwierdzono, że stosunek stężenia pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy wynosił 2,9 : 1,5: 1,0: 1,0.

Pinocembryna, octan pinobanksyny, chryzyna i galangina oznaczone zostały również przez innych autorów w próbkach propolisu europejskiego (8,10,18,19), chińskiego, urugwajskiego (25,36), kanadyjskiego (11) i brazylijskiego (12), którzy wykazali, że ich zawartość jest różna i zależy od pochodzenia produktów (10,11,18,25,36).

Badania aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych składników oraz ich mieszanin modelowych wykazały, że pinocembryna, galangina, chryzyna i octan pinobanksyny nie są aktywne przeciwbakteryjnie w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Aktywność przeciwbakteryjną stwierdzono natomiast w przypadku mieszaniny modelowej M_4 o dziesięciokrotnie większym stężeniu omawianych składników niż oznaczone w najbardziej aktywnych frakcjach propolisowych.

Wyniki analizy korelacji, wykazały jednak statystycznie istotną zależność $r=-0,56$ w przypadku galanginy.

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że przeciwbakteryjnej aktywności propolisu mogą towarzyszyć inne składniki ich stężenie oraz synergistyczne oddziaływanie na co zwracają uwagę inni badacze (41,91,92).

Potwierdzeniem tej hipotezy wydają się być wyniki dla mieszanin modelowych, które zawierały galanginę, octan pinobanksyny, pinocembrynę i chryzynę, kwas kawowy, kwas p-kumarowy, kwas ferulowy oraz estry kwasu kawowego. Aktywność wykazywała mieszanina modelowa P₃ o zawartości składników 200% w stosunku do średniej ich zawartości w nalewkach propolisowych.

Znacznie lepszą korelację uzyskano w ocenie aktywności przeciwgrzybiczej analizowanych składników, dla której współczynniki korelacji odpowiednio wyniosły $r=-0,82$ dla pinocembryny, $r=-0,73$ dla octanu pinobanksyny, $r=-0,75$ dla chryzyny i $r=-0,78$ dla galanginy.

Zadawalające korelacje uzyskano pomiędzy zawartością oznaczonych w nalewce propolisowej składników a aktywnością antyoksydacyjną, które wyniosły w przypadku octanu pinobanksyny $r=0,85$, chryzyny $r=0,87$ oraz galanginy $r=0,80$ w odróżnieniu do pinocembryny, w przypadku której nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie $r=0,27$.

W poszukiwaniu zależności pomiędzy zawartością składników oznaczanych w ekstraktach propolisowych a ich aktywnością przeciwbakteryjną poszerzono badania o wyniki analizy frakcji otrzymanych po chromatograficznym rozdzielaniu ekstraktów propolisowych, które stanowiły nalewki 4, 5 i 14 różniące się „fingerprintem”.

W pierwszych frakcjach od 1 do 9 wykazano obecność 7-metoksy-pinocembryny, octanu pinobanksyny, galanginy, pinocembryny i chryzyny, w dalszych, od 10 do 18, występowały kwasy fenolowe. Należy podkreślić, że obok zidentyfikowanych składników na chromatogramach

występowały inne piki świadczące o obecności związków, które nie były przedmiotem dotychczasowych badań. Związki te charakteryzowały się widmami absorpcji z charakterystycznymi maksimami absorbancji przy $\lambda=310,8$ nm, 308,9 nm oraz 312,7 nm.

Stąd też podjęto dalsze badania metodą GC-MS mające na celu ich identyfikację.

Opierając się na zarejestrowanych sygnałach i ich porównaniu z biblioteką widm, stwierdzono obecność związków, z których cztery posiadają identyczną masę molekularną 232 a jeden 234. Widma masowe zawierały te same fragmenty a różniły się jedynie ich proporcją, co pozwala przypuszczać, że są to te same składniki, których nie udało się zidentyfikować z uwagi na brak odpowiednich substancji porównawczych oraz danych katalogowych. Z dużym prawdopodobieństwem stwierdzono natomiast obecność w próbkach badanych: alkoholu fenylometylowego, alkoholu fenyletylowego, 2,3-dihydrobenzofurnu, 2-propanonu-1-fenylu, 2-propenu-1ol,3-fenylu, 5-hydroksy-7-metyksyflawanonu. Spośród wymienionych składników niektóre były także opisane przez innych autorów (6,94).

W kolejnym etapie zbadano aktywność przeciwbakteryjną otrzymanych frakcji a otrzymane wartości odniesiono do wyników analiz fizykochemicznych.

Większość uzyskanych frakcji propolisowych wykazywała aktywność przeciwbakteryjną i jest to potwierdzeniem hipotezy, że aktywność propolisu jest sumą aktywności wielu związków. Jednak ich wpływ na aktywność przeciwbakteryjną jest różny. Frakcje od 1 do 9, w których oznaczono ilościowo pinocembrynę, 7-metoksypinocembrynę, chryzynę, galanginę i octan pinobanksyny, były znacznie bardziej aktywne niż frakcje 10 do 18, w których występowały kwasy fenolowe.

Najbardziej aktywne były frakcje 5 i 6 w nalewce propolisowej nr 4 (18 $\mu\text{g/ml}$ i 22 $\mu\text{g/ml}$), frakcja 6 w nalewce 5 (36 $\mu\text{g/ml}$) oraz frakcje 6 i 7

w nalewce propolisowe nr 14 (29 $\mu\text{g/ml}$ i 29 $\mu\text{g/ml}$). W wyniku szczegółowej analizy danych stwierdzono, że maksymalna zawartość składników zidentyfikowanych, tj. pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy we frakcjach aktywnych, rozpatrywanych pojedynczo jak również jako suma nie idzie w parze w maksymalną aktywnością przeciwbakteryjną.

Potwierdzeniem powyższych spostrzeżeń były wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej mieszanin modelowych o zawartości składników porównywalnej do zawartości w frakcjach najbardziej aktywnych. Badane mieszaniny nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnej. Aktywność przeciwbakteryjna stwierdzono jedynie w przypadku mieszaniny modelowej M_4 o dziesięciokrotnie większym stężeniu składników. Zatem aktywność przeciwbakteryjna badanych frakcji zależy również od innych składników.

Badania metodami HPLC i GC-MS wykazały w frakcjach najbardziej aktywnych związki chemiczne o masie molekularnej 232 i 234 oraz inne zidentyfikowane jako alkohole aromatyczne, 2,4-dihydrobenzofuran, 2-propen-1-ol,3-fenyl, 2-propanon-1-fenyl, które mogą być odpowiedzialne za aktywność przeciwbakteryjną. Potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga jednak poszerzonych badań.

W oparciu o uzyskane wyniki ustalono zakres badań, który może być wykorzystany do oceny fizykochemicznej ekstraktów propolisowych, w odniesieniu do identyfikacji, oceny czystości i oznaczenia zawartości wybranych składników (tab. 37).

Tabela 37. Proponowany zakres badań ekstraktów propolisowych

| Kryterium | Parametr | Limit |
|----------------------|---|--|
| tożsamość | analiza TLC | położenie i intensywność plam roztworu badanego powinna odpowiadać plalom roztworów porównawczych pkt. 5.3 |
| | analiza HPLC | czasy retencji i widma absorpcji powinny być zgodne dla odpowiednich składników stanowiących przedmiot badania na chromatogramach roztworów badanych i porównawczych |
| czystość | a) zawartość składników uczulających: | |
| | - ester 1,1-dimetyloalilowy kwasu kawowego | 0,17% - 1,08% |
| | - ester fenyloetylowy kwasu kawowego | 0,23% - 1,78% |
| b) metale ciężkie | | |
| - ołów | < 0,4 mg/kg | |
| - kadm | < 0,1 mg/kg | |
| c) sucha pozostałość | > 60 % | |
| zawartość | a) kwasy fenolowe | |
| | - suma | 2,41 % - 5,13 % |
| | - kwas kawowy | 0,23 % - 1,26 % |
| | - kwas p-kumarowy | 1,45 % - 3,42 % |
| | - kwas ferulowy | 0,26 % - 1,58 % |
| | b) flawonoidy (metoda spektrofotometryczna) | 2,21 % - 6,69 % |
| | c) | |
| | - pinocembryna | 1,85 % - 6,82 % |
| | - octan pinobanksyna | 0,91 % - 4,87 % |
| | - chryzyna | 0,55 % - 3,83 % |
| - galangina | 0,74 % - 4,15 % | |

| | | |
|---------------------------|---|-----------------------|
| Aktywność biologiczna | a) aktywność przeciwbakteryjna | 50 µg/ml - 155 µg/ml |
| | b) aktywność przeciwgrzybicza | 181 µg/ml - 933 µg/ml |
| Aktywność antyoksydacyjna | mmol troloksu na gram produktu (metoda CUPRAC) | 49,5 – 78,0 |

Wyniki zebrane w tabeli stanowią jedynie dane uzyskane w trakcie przeprowadzonych badań, które należy traktować jako wytyczne do ewentualnych dalszych badań zmierzających do określenia wymagań dla uzyskania produktu o znacznie węższych zakresach zawartości poszczególnych składników.

Przemawiają za takim podejściem wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów propolisowych (tab. 25 i 26), które pomimo zróżnicowanej zawartości składników będących przedmiotem badań wykazują podobną aktywność wobec *Staphylococcus aureus*. Znacznie większa zależność występuje w przypadku aktywności przeciwgrzybiczej i antyoksydacyjnej, które wydają się być bardziej zależne od rodzaju i stężenia oznaczanych składników.

Zdając sobie sprawę z poważnych trudności jakie występują w ocenie produktów pochodzenia naturalnego, w którego składzie występuje wiele związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych a także działaniu niepożądanym, podjęte w pracy doktorskiej badania wnoszą istotne wartości poznawcze w odniesieniu do składu produktu oraz poszerzenia wiedzy na temat zależności aktywności biologicznej i antyoksydacyjnej od zawartości oraz rodzaju składników.

WNIOSKI

1. Opracowano warunki oceny jakości ekstraktów propolisowych w zakresie badania tożsamości, czystości i zawartości składników wykazujących aktywność biologiczną i antyoksydacyjną.
2. Dokonano identyfikacji składników propolisu oraz zbadano ich udział w odniesieniu do aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i antyoksydacyjnej
3. Opracowano nowe metody z wykorzystaniem HPLC do oznaczania składników o działaniu terapeutycznym (kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas p-kumarowy, pinocembryna, octan pinobanksyny, galangina) i niepożądanym (ester 1,1-dimetyloallilowy i fenyloetylowy kwasu kawowego).
4. Metodą GC-MS potwierdzono obecność związków stanowiących przedmiot badania a ponadto zidentyfikowano: alkohol fenyloetylowy, alkohol fenyloetylowy, 2,3-dihydrobenzofuran, 2-propanon-1-fenyl, 2-propen-1-ol,3-fenyl.
5. Wykazano działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i antyoksydacyjne badanych ekstraktów propolisowych.
6. Stwierdzono, że składniki oznaczone w ekstraktach propolisowych, użyte do badań w roztworach modelowych indywidualnie oraz w mieszaninach wykazują słabą aktywność przeciwbakteryjną.

7. Ustalono zakres badań do oceny zawartości ekstraktów propolisowych używanych do wyrobów farmaceutycznych i spożywczych, przy zachowaniu tolerancji odchyłań w odniesieniu do wyników oznaczeń.

8. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań wydaje się, że powinny być one dalej kontynuowane w relacji struktura-zawartość-aktywność biologiczna i antyoksydacyjna

10. STRESZCZENIE

Przedmiotem badania są etanolowe ekstrakty propolisowe z obszaru Polski, które analizowano w celu ustalenia składu chemicznego i identyfikacji związków biologicznie aktywnych. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano i oznaczono kwas kawowy, kwas p-kumarowy, kwas ferulowy, pinocembrynę, octan pinobanksyny, galanginę, chryzynę oraz ester feniloetylowy i 1,1-dimetyloalilowy kwasu kawowego.

Dla potrzeb prowadzonych badań opracowano metody analityczne, które charakteryzowały się specyficnością, czułością, dobrą precyzją i dokładnością oraz liniowością co wykazano podczas walidacji.

Obecne w próbkach kwasy fenolowe to: kwas kawowy, kwas p-kumarowy oraz kwas ferulowy. We wszystkich badanych próbkach zawartość kwasu p-kumarowego była wyższa niż pozostałych kwasów fenolowych. Stężenie kwasu kawowego mieściło się w przedziale od 0,23 % do 1,26 %, kwasu p-kumarowego od 1,45 % do 3,42 % a kwasu ferulowego od 0,26 % -1,58 %. W sumie w analizowanych ekstraktach występowało od 2,35 % do 5,13 % kwasów fenolowych.

Zawartość flawonoidów oznaczono metodą spektrofotometryczną i otrzymano wartości w przedziale od 2,21 % do 6,69 %.

Obok flawonoidów oznaczonych metodą spektrofotometryczną w etanolowych ekstraktach propolisowych stwierdzono i oznaczono ilościowo stosując metodę HPLC pinocembrynę, chryzynę, octan pinobanksyny i galanginę. Zawartość poszczególnych składników wynosiła odpowiednio: 1,85 % do 6,82 % pinocembryny, 1,58 % do 4,76 % octanu pinobanksyny, 0,51 % do 3,83 % galanginy i 0,74 % do 4,15 % chryzyny. Suma analizowanych związków mieściła się w przedziale od 6,18 % do 18,83 %.

Badaniami objęto także estry fenyloetylowy i 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, które traktowane są jako silne alergeny. Suma obydwu składników wynosiła od 0,35 % do 2,62 % w przeliczeniu na suchą masę.

Etanolowe ekstrakty propolisowe poddano badaniu aktywność przeciwbakteryjnej w odniesieniu do szczepu *Staphylococcus aureus* i przeciwgrzybiczej w odniesieniu do szczepu *Candida albicans*. Oznaczona aktywność przeciwbakteryjna mieściła się w przedziale od 50 µg/ml do 155 µg/ml a aktywność przeciwgrzybicza od 181 µg/ml do 933 µg/ml.

Do zbadania właściwości antyoksydacyjnych etanolowych ekstraktów propolisowych zastosowano metodę CUPRAC opartą na redukcji jonów miedzi (II) do miedzi (I). Wyniki podane zostały w odniesieniu do troloksu, jako substancji porównawczej, w przeliczeniu na gram propolisu. Badane próbki wykazywały wysoką aktywność antyoksydacyjną a uzyskane wartości mieściły się w przedziale od 49,45 mmol/g do 77,95 mmol/g.

Porównano wyniki zawartości poszczególnych składników z wynikami aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i antyoksydacyjnej. Do oceny posłużono się bezpośrednią analizą substancji wzorcowych oraz ich mieszanin modelowych a także zastosowano metody statystyczne.

Aktywność przeciwbakteryjna, przeciwgrzybicza i antyoksydacyjna zależy od więcej niż jednej grupy związków przy czym na podstawie prowadzonych badań stwierdzono, że aktywność przeciwbakteryjna tylko w pewnym stopniu zależy od zawartości pinocembryny, octanu pinobanksyny, chryzyny i galanginy, nie zależy natomiast od zawartości kwasów fenolowych.

Na podstawie analizy korelacji stwierdzono silną zależność aktywności przeciwgrzybiczej od zawartości flawonoidów, kwasu kawowego i jego estrów, pinocembryny, galanginy, octanu pinobanksyny oraz chryzyny.

Największą aktywność antyoksydacyjną spośród składników propolisu posiadał kwas kawowy i jego estry oraz galangina.

W poszukiwaniu związków aktywnych dokonano rozdziału wybranych nalewek na frakcje przy pomocy chromatografii kolumnowej a otrzymane frakcje poddano analizie HPLC, GC-MS oraz ocenie aktywności mikrobiologicznej.

W ocenie produktów przeznaczonych do zastosowania w terapii obok oznaczenia zawartości składników czynnych uwzględnia się także badania ogólne w zakresie czystości, które muszą być spełnione. Stąd też obok analizy związków organicznych badaniami objęto także składniki nieorganiczne dokonując oznaczeń między innymi jonów miedzi, cynku, żelaza oraz ołowiu i kadmu.

Zawartość powyższych składników wynosiła odpowiednio od 1,7 mg/kg do 2,6 mg/kg jonów miedzi, od 5,6 mg/kg do 31,6 mg/kg jonów cynku oraz od 32,5 mg/kg do 42,4 mg/kg jonów żelaza. Kadm stwierdzono tylko w jednej próbce i zawartość jego wynosiła 0,06 mg/kg natomiast zawartość ołowiu w badanych koncentratkach mieściła się w zakresie od 0,12 mg/kg do 0,31 mg/kg.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Salatino A., Weinstein Teixeira E., Negri G., Massage D.: *Origin and chemical variation of Brazilian propolis*. eCAM, **2005**, 2(1), 33-38
2. Ellnain-Wojtaszek M.: *Produkty pszczele - cenne leki medycyny naturalnej*. Sąddecki Bartnik, **1998**
3. Tichonov A.I., Jarnych T.G., Czernych W.P., Zypaniec I.A., Tichonova S.A.: *Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatów propolisowych*. Apipol-Farma, **2004**
4. Castaldo S., Capasso F.: *Propolis, an old remedy used in modern medicine*. Fitoterapia, **2002**, 73, Suppl.1, S1-S6
5. Bankowa V.: *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*. J Ethnopharmacol., **2005**, 100, 114-117
6. Kędzia B., Hołoderna-Kędzia E.: *Skład chemiczny propolisu w świetle dotychczasowych badań*. Herba Pol., **1991**, XXXVIII, 2, 95-110
7. Pietta P.G., Gardana C. Pietta A.M. *Analytical methods for quality control of propolis*. Fitoterapia, **2002**, 73 Suppl. S7-S20
8. Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G. *Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results*. Z. Naturforsch., **2002**, 57c, 530-533

-
9. Bankova V., Dyulgerov a., Popov S., Evstatieva L., Kuleva L., Pureb O., Zamjansan Z.: *Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin*. *Apidologie*, **1992**, 23,75-85
10. Bankova V., Popov S.: *Phenolics in Albanian poplar buds and their relationship to propolis*. *Fitoterapia*, **1994**, LXV, No. 4
11. García-Viguera C., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A.: *Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC*. *Z. Naturforsch.* **1993** 48c, 731-735
12. Park Y.K., Alencaro S.M., Aguiar C.L. *Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2502-2506
13. Tomás-Barberán F. A., García-Viguera C., Vit-Olivier P., Ferreres F., Tomás-Lorente F.: *Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela*. *Phytochemistry*, **1993**, 34 (1), 191-196
14. Kumazawa S., Hyashi K., Kajiya K., Ishii T., Hamasaka T., Nakayama T.: *Studies of the constituents of Uruguayan propolis*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4777-4782
15. Weinstein Teixeira E., Negri G., Meira R.M.S.A., Massage D. Salatino A.: *Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry*. *eCAM*, **2005**, 2(1), 85-92
16. Midorikawa K., Banskota A.H., Tezuka Y., Nagaoka T., Matsushige K., Message D., Huertas A.A.G., Kadota S.: *Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis*. *Phytochem Anal.*, **2001**, 12, 366-373

-
17. Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Sforcin J.M., Frete X., Kujumgiev A., Maimoni-Rodella R., Popov S., *Phytochemical evidence for The plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state*. Z. Naturforsch. **1999**, 54c, 401-405
18. Kosalec I., Bakmaz M., Papeljnjak S.: *Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia*. Act. Pharm. **2003**, 53, 275-285
19. Hegazi. A.G., Faten K. Abd el Handy , fayrouz A.M. Abd Allah. *Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis*. Z. Naturforsch. **2000**, 55c, 70-75
20. Maciejewicz W., Daniewski M., Dzido T.H., Bal K. *GC-MS and HPLC analysis of phenolic acid extracted from propolis and from Populus nigra buds exudates*. Chem. Anal. **2002**, 47, 21-30
21. Maciejewicz W., Scheller S., Daniewski M., *Gas chromatography-mass spectrometry investigation of propolis analysis of sesquiterpenes*. Acta Polon. Pharm. **1983**, XL(2), 251-253
22. Markham K.R., Mitchell K.A., Wilkins A.L., Daldy J. A., Lu Y.: *HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis*. Phytochemistry, **1996**, 42 (1), 205-211
23. Kartal M., Kaya S., Kurucu S.: *GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey*. Z. Naturforsch. **2002**, 57c, 905-909
24. Sorkun K., Süer B., Salih B., *Determination of chemical composition of Turkish propolis*. Z. Naturforsch. **2001**, 56c, 666-668

-
25. Bonvehí J.S., Coll F.V.: *Phenolic composition of propolis from China and from South America*. Z. Naturforsch. **1994**, 49c, 712-718
26. Munoz O., Pena R.C., Ureta E., Montenegro G., Caldwell C., Timmermann B.N.: *Phenolic compounds of propolis from Central Chilean Matorral*. Z. Naturforsch. **2001**, 56c, 273-277
27. Valcic S., Montenegro G., Mujica A.M., Avila G., Franzblau S., Singh M.P., Maiese W.M., Timmermann B.N.: *Phytochemical, morphological and biological investigation of propolis from Central Chile*. Z. Naturforsch. **1999**, 54c, 406-416,
28. Marcucci M.C., Ferreres F., Custódio A.R., Ferreira M.M.C., Bankova V.S., Garcia-Viguera C., Bretz W.A.: *Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions*. Z. Naturforsch. **2000**, 55c, 76-81
29. Tazawa S., Warashina T., Noro T.: *Studies on The constituents of Brazilian propolis*. Chem. Pharm. Bull. **1999**, 47(10), 1388-1392
30. Pereira A. S., Norsell M., crdoso J.N., Neto R. A.: *Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. **2000**, 48, 5226-523,
31. Trusheva B., Popova M., Bankova V., Simova S., Marcucci M.C., Miorin P.L., da Rocha Pasin F., Tsvetkova I.: *Bioactive constituents of Brazilian red propolis*. eCAM, **2006**, 3(2), 249-254

-
32. Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankowa V.: *Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition*. *Phytomedicine*, **2005**, 12, 221-228
33. Keskin N., Hazir S. K. Hüsni Can Baser, Kürkçüoglu M.: *Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis*. *Z. Naturforsch.* **2001**, 56c, 1112-1115
34. Prytyk E., Dantas A.P., Salomão K., Pereira A.S., Bankova V.S., De Castro S.L., Aquino Neto F.N.: *Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian Propolis*. *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 88, 189-193
35. Stepanović S., Antić N., Dakić I., Švabić-Vlahović M.: *In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs*. *Microbiol. Res.* **2003**, 158, 353-357
36. Serra Bonvehi J., Ventura Coll F.: *Study on Propolis Quality from China and Uruguay*. *Z. Naturforsch.* **2000**, 55c, 778-784
37. Faten K. Abd el Handy, Hegazi A.G: *Egyptian propolis: 2-chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta Propolis*. *Z Naturforsch.* **2002**, 57c, 386-394
38. Hegazi. A.G., Faten K. Abd el Handy , Fayrouz A.M. Abd Allah.: *Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis*. *Z. Naturforsch.* **2000**, 55c, 70-75

39. Santos F.A., Bastos E.M.A.F., Maia A.B.R.A., Uzeda M., Carvalho M.A.R., Farias L. M., Moreira E.S.A. *Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogenes*. *Phytother. Res.* **2003**, 17, 285-289
40. Santos F.A., Bastos, E.M.A. Rodrigues P.H., De Uzda M., De Covalho M.A.R., De Macedo Farias L., Moreira E.S.A.: *Susceptibility of Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens (and porphyromonas gingivalis) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents*. *Anaerobe.*, **2002**, 8, 9-15
41. Koo H., Rosalen P.L., Cury J.A., Park Y.K., Bowen W. H.: *Effects of compounds Found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**, vol.46, no.5, 1302-13409
42. Sawaya A.C.H.F., Souza K.S., Marcucci M.C., Cunha I.B.S., Shimizu M.T.: *Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their ii vitro activity against gram-positive bacteria*. *Braz. J.Microbiol.*, **2004**, 35
43. Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S.: *Recent progress in pharmacological research of propolis*. *Phytother. Res.* **2001**, 15, 561-571
44. Boyanova L., Derejian S., Koumanova R., Katsarov N., Gergova G., Mitov I., Nikolov R. Krastev Z.: *Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report*. *J. med microbiol.* **2003**, 52, 417-419

-
45. Orsi R.O., Sforcin J.M., Rall V.I.M., Funari S.R.C., Barbosa L., Fernandes J.R.A.: *Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of Propolis produced in two regions of Brazil*. J.Venom.Anim.Toxins incl.Trop.Dis. **2005**, 11 (2), 109-116
46. Valcic S., Montenegro G., Mujica A.M., Avila G., Franzblau S., Singh M.P., Maiese W.M., Timmermann B.N.: *Phytochemical, morphological and biological investigation of propolis from Central Chile*. Z. Naturforsch. **1999**, 54c, 406-416
47. Scheller S., Dworniczak Sz., Waldemar-Klimek K., Rajca M., Tomczyk A., Shani J.: *Synergism between ethanolic extract of Propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria*. Z. Naturforsch. **1999**, 54c, 549-553
48. Frocht J., Hansen S.H., Nielsen J.V., Van den Berg-Segers A., Riezler R.; *Bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1993**, 43 (II), nr 8
49. Fernandes Junior A., Belestrin E.Ch., Betoni J.E.C., De Oliveira Orsi R., De Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M., Montelli A.C.: *Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs*. Mem Ins Oswaldo Cruz, **2005**, 100 (5), 563-566
50. Krol W., Scheller S., Shani J., Pietsz G., Czuba Z.: *Synergistic effect of ethanolic extract propolis and antibiotics on the growth of Staphylococcus aureus*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1993**, 43(I), no. 5, 607-609

-
51. Christov R., Bankova V., Tsvetkova I., Kujumgiev A., Delgado Tejera A.: *Antibacterial furofuran lignans from Canary islands propolis*. *Fitoterapia*, **1999**, 70, 89-92
52. Marcucci M.C.: *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. *Apidologie*, **1995**, 26, 83-99
53. Hegazi A.G., Faten K., Abd el Handy: *Egyptian propolis: I- antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt Propolis*. *Z. Naturforsch.* **2001**, 56c, 82-88
54. Bankova V., Christov R., Kujumgiev A., Marcucci M.C., Popov S.: *Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis*. *Z. Naturforsch.* **1995**, 50c, 167-172
55. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Yu., Bankova V., Christov R., Popov S.: *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. *J. Ethnopharmacol.*, **1999**, 64, 235-240
56. Garedew A., Schmolz E., Lamprecht I.: *Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different Propolis extracts: an in vitro approach*. *Thermochimica Acta*, **2004**, 422, 115-124
57. Martins R.S., Pereira E.S., Lima Jr. S.M., Senna M.I.B., R.A. Mesquita., Santos V.R.: *Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of Candida albicans collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis*. *J. Oral Sci.*, **2002**, 44(1), 41-48

-
58. Ghaly M.F., Ezzat S.M., Sarhan M.M.: *Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi*. Folia Microbiol. **1998**, 43(2), 156-160
59. Sawaya A.C.H.F., Palma A.M., Caetano F.M., Marcucci M.C., Da Silva Cunha I.B., Araujo C.E.P., Shimizu M.T.: *Comparative study of in vitro methods used to analyze the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida*. Lett Appl Microbiol., **2002**, 35, 203-207.
60. Vynograd N., Vynograd I., Sosnowski Z.: *A comparative multi-center study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV)*. Phytomedicine, **2000**, 7(1), 1-6
61. Gekker G., Hu S., Spivak M., Lokensgard J.R., Peterson P.K.: *Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures*. J. Ethnopharmacol., **2005**, 102, 158-163.
62. Ito J., Chang F-R., Wang H-K., Park Y.K., Ikegaki M., Kilgore N., Lee K-H.: *Anti-AIDS agents.48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and The New melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis*. J.Nat.Prod. **2001**, 64, 1278-1281
63. Li-Chang Lu, Yue-Wen Chen, Cheng-Chun Chou. *Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan*. J. Food Drug Anal., **2003**, Vol. 11, no 4, 277-282 J.

-
64. Hegazi A.G., Abd El Hady F.K.: *Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands*. Z. Naturforsch. **2002**, 57c, 395-402
65. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T.: *Antioxidant activity of propolis of various geographic origins*. Food Chem, **2004**, 84, 329-339.
66. Shinohara R., Ohta Y., Hayashi T., Ikeno T.: *Evaluation of antilipid peroxidative action of propolis ethanol extract*. Phytother. Res., **2002**, 16, 340-347
67. Russo A., Longo R., Vanella A.: *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin*. Fitoterapia, **2002**, 73, Suppl 1, S21-S29
68. Yeun-hwa Gu: *Antioxidant activity and anti-tumor immunity by Agaricus, propolis and paffia in mice*. Graduate Shool of Science, Suzuka University of Medical Science. <http://www.brazilianpropolis.org>
69. Shimizu K., Ashida H., Matsuura Y., Kanazawa K.: *Antioxidative bioavailability of artepilin C in Brazilian propolis*. Arch. Biochem. Biophy. **2004**, 424, 181-188
70. Khayyal M.T., El-Ghazaly M.A., El-Khatib A.S.: *Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract*. Drugs Exptl.Clin.Res. **1993**, XIX (5), 197-203

-
71. Borrelli F., Maffia P., Pinto L., Ianaro A., Russo A., Capasso F., Ialenti A.: *Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract*. *Fitoterapia*, **2002**, suppl.1, S53-S63
72. Rossi A., Ligresti A., Longo R., Russo A., Borrelli F., Sautebin L.: *The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages*. *Phytomedicine*, **2002**, 9, 530-535
73. Mirzoeva O.K., Calder P.C.: *The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response*. *Prostaglandins Leukot and Essent Fatty Acids*, **1996**, 55 (6), 441-449
74. Błonska M., Bronikowska J., Pietsz G., Czuba ZP., Scheller S., Krol W.: *Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages*. *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, 91, 25-30
75. Song Y.S., Park E-H., Hur G.M., Ryu Y.S., Kim Y.M., Jin Ch.: *Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity*. *J. Ethnopharmacol.*, **2002**, 80, 155-161
76. De Almeida E.C., Menezes H.: *Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review*. *J. Venom. Anim.Toxins*, **2002**, 8 (2)
77. Hoepfner E.M.: *Fiedler encyklopedie of excipient*. Editio Cantor Verlag Aulendorf, **2002**
78. Burdock G.A.: *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. *Food Chem. Toxicol.*, **1998**, 36, 347-363.

79. Oršolić N., Knežević A.H., Šver L., Terzić S., Bašić I.: *Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds*. J. Ethnopharmacol., **2004**, 94, 307-315.
80. Om-Ali El-khawaga Y., Salem T.A, Elshal M.F.: *Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice*. Clin Chim Acta, **2003**, 338, 11-16.
81. Borrelli F., Izzo A.A., Di Carlo G., Maffia P., Russo A., Maiello F.M., Capasso F., Mascolo N.: *Effect of propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon*. Fitoterapia, Suppl.1, **2002**, S38-S43.
82. Natarajan K., Singh S., Burke T.R., Grunberger JR.D.: *Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B*. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, **1996**, 93, 9090-9095
83. Wollenweber E., Hausen B.M., Greenaway W.: *Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru*. Bull. Groupe Polyphenols, **1990**, 15, 112-120
84. Hausen B.M., Wollenweber E., H. Senff H., Post B.: *Propolis allergy (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester*. Contact dermatitis, **1987**, 17, 171-177
85. Grzywa Z.: *Możliwość alergii w leczeniu kitem pszczelim*. Wiadomości lekarskie, **1983**, 36 (nr12).
86. Rudzki E., Grzywa Z.: *Pierwotna i wtórna alergia na kit pszczeli (propolis)*. Przegląd dermatologiczny, **1987**, 74 (nr1)

-
87. Walgrave S.E., Warshaw E.M., Glesne L.A.: *Allergic Contact dermatitis from propolis*. *Dermatitis*, **2005**, 16(4), 209-215
88. Hegyi E., V.Suchy V., Nagy M.: *Zur frage der propolisallergie*. *Hautarzt*, **1990**, 41, 675-679
89. Hausen B.M., Evers P., Stüwe H.-T., König W.A., Wollenweber E.: *Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru*. *Contact dermatitis*, **1992**, 26, 34-44
90. Stângaciu Şt.: *A guide to the composition and properties of propolis*. *Apiacta*, **1998**, 3
91. Cushnie T.P.T., Lamb A.J.: *Assessment of the antibacterial activity of galangina against 4-quinolone resistant strains of Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, **2006**, 13, 187-191.
92. Pepeljnjak S., Kosalec I.: *Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, **2004**, 240, 111-116
93. Wollenweber E., Asakawa Y., Schillo D., Lehmann U., Weigel H.: *A novel caffeic acid derivative and other constituents of Populus bud excretion and propolis (bee glue)*. *Z.Naturforsch.* **1987**, 42c, 1030-1034
94. Uzel A., Sorkun K., Oncag O., Cogulu D., Gencay O. Salih B.: *Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples*. *Microbiological Res*, **2005**, 160, 189-195

-
95. Kosalec I., Papeljnjak S., Bakmaz M., Vladimir-Knežević S.: *Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products*. Acta Pharm., **2005**, 55, 423-430
96. Nagy M., Grančai D.: *Colorimetric determination of flavanones in propolis*. Pharmazie, **1996**, 51, 100-101
97. Ellnain-Wojtaszek M., Marcinek A., Kowalewski Z., Hladoń B., Sloderbrach A.: *Standaryzacja wyciągów z propolisu za pomocą ilościowego oznaczenia flawonoidów*. Herba Pol, **1990**, XXXVI, 4, 145-153
98. Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S.E.: *Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method*. J. Agric. Food Chem., **2004**, 52, 7970-7981.
99. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K.: *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study*. J. Agric. Food Chem., **2002**, 50, 3122-3128.
100. Then M., Szentmihályi, Sárközi Á., Szöllősi Varga I.: *Examination on antioxidant activity in the greater celandine (Chelidonium majus L.) extracts by FRAP method*. Acta Biologica Szegediensis, **2003**, 47(1-4), 115-117.
101. Christofilogiannis P. *Current inoculation methods in MIC determination*. Aquaculture, **2001**, 96, 297-302

102. Tavernieres I., De loose M., Van Bockstaele E. *Trends in quality in analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance.* Trends Analyt Chem, **2004**, 23 (8), 535-552

103. Łoś-kuczera M.: *Produkty spożywcze, skład i wartość odżywcza.* Instytut Żywności i Żywienia im. Prof. A. Szczygła, Warszawa 1990

104. Krzek J., Kaleta J., Hubicka U, Niedźwiedź A.: *Reversed-Phase high-performance liquid chromatography determination of selected phenolic acids in propolis concentrates in terms of standardization for drug manufacturing purposes.* J.AOAC Int. **2006**, 89, 2, 352-358

105. Krzek J., Hubicka U., Kaleta J. Niedźwiedź A: *Evaluation of Densitometric TLC for Quantitative Analysis of Selected Phenolic Acids for Standardization of Propolis Concentrates.* – J. Plan. Chromatogr. **2006**, 19, 449-453.