

*Magdalena Woźniak¹, Marta Babicka¹, Iwona Rissmann¹, Bogdan Kędzia²,
Izabela Ratajczak¹

Etanolowe ekstrakty z propolisu jako źródło biopierwiastków

The ethanolic propolis extracts as a source of bioelements

¹Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Kierownik Katedry: dr hab. nauk leśnych Izabela Ratajczak
²Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań
Dyrektor Instytutu: dr n. ekon. Robert Sobków

SUMMARY

Introduction. Propolis is one of bee products, which is increasingly widespread in medicine. An important aspect regarding propolis is research on the analysis of its chemical composition. Propolis extracts have been found to include phenolic compounds (flavonoids as well as phenolic acids and their esters), terpenes, amino acids, vitamins and elements. The elements analyzed in the propolis extracts include both macro- and microelements, such as: calcium, magnesium, iron or selenium.

Aim. The aim of the study was to determine concentration of selected elements in commercial available ethanolic extracts of propolis.

Material and methods. In three ethanolic extracts of propolis were determined concentration of 14 elements (Ca, Mg, K, Na, Zn, Si, Pb, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Cd and Ni) using flame atomic absorption spectrometry.

Results. In all propolis extracts the highest concentration among analyzed elements was determined for sodium, and in the lowest level of concentration was analyzed for copper and manganese. The concentrations of analyzed elements in extracts differed slightly and the highest differences were observed for magnesium, potassium and copper. In all examined samples the concentration of heavy metals was under detection limit of used analytical method.

Conclusions. The results of the research presented in the paper indicate that the ethanolic extracts of propolis, despite slightly differences in the concentrations of the analyzed elements, can be a rich source of macro- and microelements.

Keywords: propolis extracts, elements content, atomic absorption spectrometry

STRESZCZENIE

Wstęp. Propolis jest jednym z produktów pszczoł, który znajduje coraz szersze zastosowanie w lecznictwie. Ważny aspekt związany z badaniami propolisu stanowi analiza jego składu chemicznego. W ekstraktach propolisu stwierdzono występowanie m.in. związków fenolowych (flawonoidów oraz kwasów fenolowych i ich estrów), terpenów, aminokwasów, witamin oraz pierwiastków. Wśród pierwiastków analizowanych w ekstraktach z propolisu znajdują się zarówno makro-, jak i mikroelementy, takie jak: wapń, magnez, żelazo czy selen.

Cel pracy. Celem pracy było określenie stężenia wybranych pierwiastków w dostępnych komercyjnie, etanolowych ekstraktach z propolisu.

Material i metody. W trzech etanolowych ekstraktach z propolisu oznaczono stężenie 14 pierwiastków (Ca, Mg, K, Na, Zn, Si, Pb, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Cd i Ni) z wykorzystaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu.

Wyniki. We wszystkich ekstraktach z propolisu najwyższe stężenie spośród analizowanych pierwiastków oznaczono dla sodu, a na najniższym poziomie stężeń występowały miedź i mangan. Stężenia oznaczanych pierwiastków w ekstraktach różniły się nieznacznie, a największe różnice zaobserwowano dla magnezu, potasu i miedzi. We wszystkich badanych próbkach stężenie metali ciężkich występowało poniżej granicy oznaczalności stosowanej techniki analitycznej.

Wnioski. Wyniki badań przedstawione w pracy wskazują, że etanolowe ekstrakty z propolisu, pomimo niewielkich różnic w stężeniach oznaczanych pierwiastków, stanowią bogate źródło makro- i mikroelementów.

Słowa kluczowe: ekstrakty z propolisu, zawartość pierwiastków, spektrometria absorpcji atomowej

Wprowadzenie

Propolis jest jednym z produktów pszczelich, który znajduje coraz większe zastosowanie w leczeniu. Popularność tego surowca związana jest z aktywnością biologiczną jego ekstraktów, które charakteryzują się m.in. właściwościami przeciwtleniającymi, przeciwnowotworowymi oraz przeciwzapalnymi (1-4). Dane piśmiennictwa potwierdzają również, że ekstrakty z tego surowca hamują rozwój wielu gatunków bakterii i grzybów (1, 5-8).

Ważnym aspektem w badaniach dotyczących propolisu, poza jego właściwościami biologicznymi, jest analiza jego składu chemicznego. Wśród czynników mających wpływ na skład propolisu najczęściej wymieniane są m.in.: szata roślinna obszaru geograficznego, z którego surowiec jest zbierany, czas jego pozyskania, gatunek pszczoł, które go wytwarzają, oraz metoda zbioru (9-12). Propolis na ogół składa się z 50% substancji żywicznych, 10% substancji lotnych, 30% wosku pszczelego oraz 5% pyłku kwiatowego i 5% domieszek mechanicznych (9). Dotychczas w propolisie pochodzącym z różnych regionów geograficznych stwierdzono występowanie ponad 300 różnych składników, wśród których najczęściej identyfikowane są związki fenolowe – flawonoidy oraz kwasy fenolowe i ich estry (9, 13-15). Ponadto w propolisie stwierdzono obecność kwasów alifatycznych, terpenów, witamin, aminokwasów, węglowodanów oraz biopierwiastków (1, 6, 9, 16).

Produkty pszczele z powodu swojego roślinnego pochodzenia często zanieczyszczone są różnymi związkami chemicznymi, do których możemy zaliczyć m.in. chemiczne środki ochrony roślin oraz metale ciężkie (17, 18). Zawartość metali ciężkich określana jest zarówno w samym surowcu, jak i jego ekstraktach. Według danych piśmiennictwa w propolisie pochodzącym z Turcji, Hiszpanii czy Argentyny stwierdzono występowanie ołowiu (19-21). W propolisie z Mołdawii, Mongolii i Rosji oprócz ołowiu potwierdzono obecność niklu, kadmu i kobaltu (22). Również w propolisie pochodzenia krajowego stwierdzono występowanie metali ciężkich. Formicki i wsp. (23) wykazali w propolisie pochodzącym z województwa małopolskiego obecność ołowiu, kadmu oraz niklu. Także badania przeprowadzone przez Szczepną i wsp. (24) potwierdziły występowanie ołowiu i kadmu w rodzimym propolisie. Natomiast w propolisie pochodzącym z województwa wielkopolskiego oraz warmińsko-mazurskiego nie stwierdzono obecności metali ciężkich (25). Z kolei badania zawartości metali ciężkich w ekstraktach propolisu przeprowadzone przez Kędzię i wsp. (26) wskazują, że w badanym ekstrakcie

występowały arsen, ołów, miedź, cynk oraz kadm, jednak ich zawartość mieściła się w dopuszczalnych limitach stężeń dla tych pierwiastków określonych w Polskiej Normie PN-A-77627 (27). W ekstraktach z propolisu, poza szkodliwymi metalami ciężkimi, równie często oznaczane są inne pierwiastki. Wśród makro- i mikroelementów zidentyfikowanych w ekstraktach z propolisu znajdują się m.in.: wapń, magnez, żelazo, sód, potas, selen czy miedź (25, 28, 29). Dane piśmiennictwa dotyczące zawartości pierwiastków w surowym propolisie i jego ekstraktach wskazują, że stężenia pierwiastków oznaczane w propolisie występują na wyższym poziomie stężeń niż w ekstraktach z tego surowca (25, 26).

Cel pracy

Celem pracy było określenie stężenia wybranych pierwiastków w dostępnych komercyjnie, etanolowych ekstraktach z propolisu.

Materiał i metody

Ekstrakty z propolisu

W badaniach wykorzystano trzy etanolowe ekstrakty z propolisu, otrzymane przez tę samą firmę, ale z trzech różnych partii surowca. Każdy z ekstraktów propolisu zagęszczono z wykorzystaniem wyparki próżniowej (Buchi Labortechnik AG), a otrzymaną pozostałość (EEP) wykorzystano do określenia zawartości pierwiastków.

Oznaczenie stężenia pierwiastków

Zagęszczone ekstrakty propolisu o masie 0,5000 g przeniesiono do teflonowych naczyń, do których dodano 8 ml stężonego kwasu azotowego(V) (Sigma-Aldrich) i mineralizowano, wykorzystując piec mikrofalowy (CEM), zgodnie z trzyetapowym programem: 1) 400 W, temp. 100°C przez 2 min, 2) 600 W, temp. 160°C przez 5 min, 3) 1600 W, temp. 200°C przez 10 min.

Po procesie mineralizacji otrzymane roztwory przesączono i rozcieńczono wodą dejonizowaną o czystości Millipore do objętości 50 ml. Proces mineralizacji dla każdej z próbek przeprowadzono trzykrotnie. W badanych ekstraktach z propolisu oznaczono zawartość 14 wybranych pierwiastków: wapnia, potasu, magnezu, sodu, żelaza, cynku, miedzi, manganu, ołowiu, krzemu, kadmu, chromu, kobaltu i niklu z wykorzystaniem spektrometru absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu (FAAS) (AA280FS, Agilent Technologies). Krzywa kalibracyjna została przygotowana na bazie serii rozcieńczeń roztworów wzorcowych oznaczanych pierwiastków

o stężeniu wyjściowym 1000 mg/ml (Sigma-Aldrich). Przedstawione wyniki są wartością średnią z trzech powtórzeń.

Wyniki i ich omówienie

Stężenie wybranych pierwiastków oznaczone w etanolowych ekstraktach z propolisu pochodzących z różnych partii surowca przedstawiono w tabeli 1.

Porównując stężenia makroelementów w etanolowych ekstraktach z propolisu, można zauważyć, że zawartość potasu, sodu i magnezu jest różna w każdym z analizowanych ekstraktów. Natomiast zawartość wapnia jest bardzo zbliżona we wszystkich badanych próbkach. Wapń jest również pierwiastkiem, dla którego oznaczono najniższe stężenie we wszystkich ekstraktach w porównaniu do stężeń pozostałych makroelementów. Jednak stężenia tego pierwiastka oznaczone w analizowanych ekstraktach są wyższe niż stężenie określone w ekstrakcie pochodzącym z województwa wielkopolskiego, które wyniosło $250,60 \pm 3,47$ mg/kg (25). Z kolei zawartość sodu odznaczała się najwyższymi wartościami w porównaniu do innych analizowanych pierwiastków. Stężenie sodu w EEP 1 zostało oznaczone na poziomie $4196,62 \pm 34,56$ mg/kg, natomiast pozostałe dwa ekstrakty charakteryzowały się niższą i zbliżoną zawartością tego pierwiastka, która wynosiła odpowiednio dla EEP 2 – $3459,28 \pm 47,00$ mg/kg oraz dla EEP 3 – $3461,21 \pm 48,42$ mg/kg. Znacząco niższe stężenia sodu odnotowano w etanolowych ekstraktach z surowca pochodzącego z województw wielkopolskiego ($303,53 \pm 4,03$ mg/kg) i warmińsko-mazurskiego ($126,58 \pm 3,29$ mg/kg) (25). Stężenia potasu i magnezu były zbliżone w ekstraktach EEP 1 i EEP 3, natomiast w EEP 2 oznaczono wyższe

stężenie potasu, a niższe magnezu w porównaniu do stężeń tych pierwiastków występujących w pozostałych ekstraktach. Stężenie magnezu w badanych ekstraktach było znacznie wyższe niż jego stężenie oznaczone w ekstraktach z propolisu przedstawionych w danych piśmiennictwa (25, 28).

Stężenia mikroelementów w trzech etanolowych ekstraktach z propolisu kształtują się na zbliżonym poziomie. Największe różnice stężeń pomiędzy ekstraktami obserwowane są w przypadku miedzi, dla której najwyższe stężenie oznaczono dla EEP 1 ($6,21 \pm 0,27$ mg/kg), a najniższe dla EEP 3 ($3,59 \pm 0,18$ mg/kg). Stężenia tego pierwiastka we wszystkich analizowanych ekstraktach z propolisu były wyższe niż stężenia oznaczone w próbkach ekstraktów z propolisu opisane przez Kędzię i wsp. (26) oraz Kaletę (29), jednak mieściły się one w dopuszczalnym limicie stężeń dla tego pierwiastka zawartym w Polskiej Normie PN-A-77627 (27).

Spośród mikroelementów najwyższe stężenie we wszystkich analizowanych ekstraktach z propolisu oznaczono dla żelaza, którego stężenie zawierało się w przedziale 26,72-27,84 mg/kg. Stężenie żelaza w analizowanych ekstraktach kształtowało się na znacznie wyższym poziomie niż w ekstraktach propolisu pochodzenia krajowego zbadanych przez Woźniak i wsp. (25) i znacząco niższym niż w próbkach ekstraktów propolisu opisanych przez Kaletę (29). Stężenie cynku w ekstraktach surowca było wyższe niż w ekstraktach z propolisu krajowego opisanych w literaturze (25, 26). Stężenie tego pierwiastka w EEP 1, wynoszące $15,65 \pm 0,24$ mg/kg, nieznacznie przekroczyło dopuszczalny limit stężenia tego pierwiastka w koncentraty propolisowych przedstawiony w PN-A-77627, wynoszący

Tab. 1. Stężenie pierwiastków w ekstraktach z propolisu

Pierwiastek	Stężenie [mg/kg]		
	EEP 1	EEP 2	EEP 3
Ca	$485,85 \pm 12,08$	$496,49 \pm 1,37$	$422,60 \pm 2,04$
Mg	$1570,62 \pm 39,95$	$994,44 \pm 15,09$	$1407,01 \pm 37,87$
K	$764,39 \pm 10,32$	$1430,52 \pm 12,28$	$593,72 \pm 9,58$
Na	$4196,62 \pm 34,56$	$3459,28 \pm 47,00$	$3461,21 \pm 48,42$
Fe	$27,84 \pm 2,46$	$27,31 \pm 0,10$	$26,72 \pm 0,03$
Zn	$15,65 \pm 0,24$	$13,58 \pm 0,27$	$14,76 \pm 0,37$
Mn	$4,99 \pm 0,11$	$5,01 \pm 0,09$	$4,22 \pm 0,10$
Cu	$6,21 \pm 0,27$	$4,69 \pm 0,15$	$3,59 \pm 0,18$

Stężenia Si, Pb, Cd, Cr, Co i Ni w badanych ekstraktach występowały poniżej granicy oznaczalności

15,0 mg/kg (27). Również Kaleta (29) w 4 spośród 10 badanych próbek ekstraktów z propolisu oznaczyła znacznie wyższe stężenia cynku (zawierające się w przedziale stężeń 16,4-31,6 mg/kg) niż to zawarte w normie. Z kolei stężenie manganu w badanych ekstraktach było zbliżone do stężenia tego pierwiastka oznaczonego w ekstrakcie z propolisu pochodzącego z województwa warmińsko-mazurskiego ($4,93 \pm 0,18$ mg/kg) i niższe niż stężenie określone dla ekstraktu z surowca z województwa wielkopolskiego ($2,47 \pm 0,23$ mg/kg) (25).

We wszystkich badanych ekstraktach z propolisu stężenie 6 spośród 14 analizowanych pierwiastków, a mianowicie krzemu, ołowiu, kadmu, chromu, kobaltu oraz niklu, występowało poniżej granicy oznaczalności stosowanej metody analitycznej. Obecność metali ciężkich, takich jak ołów, kadm czy chrom, została potwierdzona w propolisie pochodzącym m.in. z Chin, Hiszpanii, Rosji czy Polski (16, 22, 23, 30). Również stężenie tych pierwiastków zostało oznaczone w ekstraktach z propolisu. Kaleta (29) stwierdziła występowanie ołowiu w ekstraktach z propolisu w zakresie stężeń 0,12-0,31 mg/kg, a Kędzia i wsp. (26) na poziomie 0,16 mg/kg. W obu przypadkach stężenia te są niższe od limitu określonego w PN-A-77627, który wynosi 0,4 mg/kg (27). Stężenie kadmu w ekstraktach z propolisu pochodzenia krajowego opisane w piśmiennictwie było również niższe niż limit dla tego pierwiastka przyjęty

w Polskiej Normie (26, 27, 29). Natomiast badania Woźniak i wsp. (25) wykazały, że stężenie ołowiu i kadmu w ekstraktach z propolisu pochodzącego z województw wielkopolskiego i warmińsko-mazurskiego mieściło się poniżej granicy oznaczalności stosowanej techniki analitycznej.

Wyniki analizy zawartości wybranych pierwiastków w etanolowych ekstraktach propolisu dostępnych komercyjnie i otrzymanych z różnych partii surowca wskazują, że pomimo niewielkich różnic w stężeniach oznaczanych składników stanowią one cenne źródło wielu pierwiastków, zwłaszcza magnezu i żelaza.

Wnioski

1. Zawartość oznaczanych makro- i mikroelementów w etanolowych ekstraktach z propolisu różniły się nieznacznie, a największe różnice w stężeniach zaobserwowano dla magnezu, potasu oraz miedzi.
2. We wszystkich ekstraktach z propolisu pierwiastkiem o najwyższym stężeniu był sód, natomiast na najniższym poziomie stężeń występowały miedź oraz mangan.
3. W ekstraktach z propolisu stężenie krzemu, ołowiu, kadmu, chromu, kobaltu i niklu znajdowało się poniżej granicy oznaczalności stosowanej techniki analitycznej.
4. Wyniki uzyskanych badań wskazują, że etanolowe ekstrakty z propolisu stanowią bogate źródło makro- i mikroelementów, zwłaszcza magnezu i żelaza.

Piśmiennictwo

1. Wagh VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Evid Based Compl Alt Vol* 2013.
2. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M i wsp. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat Prod Res* 2015; 29(5):416-22.
3. Yang H, Dong Y, Du H i wsp. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 2011; 16:3444-55.
4. Barbaric M, Miskovic K, Bojic M i wsp. Chemical composition of the ethanolic extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 135:772-8.
5. Agüero MB, Svetaz L, Baroni V i wsp. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Ind Crop Prod* 2014; 57:166-73.
6. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E i wsp. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 2009; 116:452-61.
7. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Aktywność antybiotyczna propolisu krajowego i europejskiego. *Post Fitoter* 2013; (2):97-107.
8. Woźniak M, Ratajczak I, Kwaśniewska P i wsp. Badanie aktywności ekstraktów propolisowych wobec wybranych gatunków grzybów pleśniowych. *Post Fitoter* 2015; 16(4):205-9.
9. Kędzia B. Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych regionów świata. *Post Fitoter* 2006; (1):23-35.
10. Papotti G, Bertelli D, Bortolotti L i wsp. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J Agric Food Chem* 2012; 60:2852-62.
11. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 2005; 99:69-73.
12. Teixeira EW, Message D, Negri G i wsp. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *eCAM* 2008; 7(3):307-15.
13. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM i wsp. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Compl Alt Vol* 2013.
14. Gardana C, Scaglianti M, Pietta P i wsp. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biom* 2007; 45:390-9.
15. Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biom* 2006; 42:354-61.

16. Gong S, Luo L, Gong W i wsp. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chem* 2012; 134:583-8.
17. Bogdanov S. Contaminants of bee products. *Apidol* 2006; 37:1-18.
18. Conti ME, Botre F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environ Monit Assess* 2001; 69:267-82.
19. Matin G, Kargar N, Buyukisik HB. Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecol Eng* 2016; 90:331-5.
20. Finger D, Filho IK, Torres YR i wsp. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014; 92:259-64.
21. Sales A, Alvarez A, Areal MR i wsp. The effect of different propolis harvest methods on its lead content determined by ET AAS and UV-visS. *J Hazard Mater* 2006; A137:1352-6.
22. Golubkina NA, Sheshnitsan SS, Kapitalchuk M i wsp. Variations of chemical element composition of bee and beekeeping products in different taxons of the biosphere. *Ecol Indic* 2016; 66:452-7.
23. Formicki G, Greń A, Stawarz R i wsp. Metal content in honey, propolis, wax and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol J Environ Stud* 2013; 22(1):99-106.
24. Szczęśna T, Rybak-Chmielewska H, Kim C-W. Heavy metals (Cd and Pb) on propolis. *Pszczel Zesz Nauk* 1999; 43:227-32.
25. Woźniak M, Ratajczak I, Kędzia B i wsp. Zawartość wybranych pierwiastków w propolisie i jego etanolowym ekstrakcie. *Post Fitoter* 2016; 17(1):3-7.
26. Kędzia B, Gnusowski B, Mścisz A i wsp. Badanie zawartości metali szkodliwych dla zdrowia w propolisie i koncentracje propolisowym. *Mat z XXXVIII Nauk Konf Pszczel, Puławy* 2001.
27. PN-A-77627 (1996): Koncentrat propolisu.
28. Kędzia B. Skład chemiczny propolisu polskiego. Cz. II. Nowe badania. *Post Fitoter* 2009; (2):122-8.
29. Kaleta J. Analiza fizykochemiczna propolisu i możliwości jego standaryzacji. Praca doktorska. Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Kraków 2007.
30. Bonvehi JS, Bermejo FJO. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environ Monit Assess* 2013; 185:6035-47.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 29.03.2018

zaakceptowano/accepted: 10.04.2018

Adres/address:

*dr nauk leśnych Magdalena Woźniak

Katedra Chemii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

tel.: +48 (61) 848-78-38

e-mail: magdalena.wozniak@up.poznan.pl