

*Agnieszka Cabaj, Lesław Juszcak

Aktywność przeciwutleniająca handlowych preparatów propolisowych

Antioxidant activity of commercial propolis preparations

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kierownik Katedry: dr hab. inż. Sławomir Pietrzyk, prof. UR

SUMMARY

Introduction. Propolis is a resinous substance collected by honey bees *Apis mellifera*. Due to a significant content of compounds with varied biological activity, propolis shows a wide spectrum of antioxidant activity. Due to increasing interest in the use of propolis in prevention and treatment of many disease entities, the commercial offer of propolis-based preparations is constantly widening. However, the properties of such commercial propolis preparations can be very diverse, which is related both to the origin of the raw material itself as well as to its purification, processing and extraction of bioactive compounds.

Aim. The aim of this study was to evaluate and compare antioxidant properties of commercial propolis preparations.

Material and methods. Ten liquid commercial propolis preparations available on the Polish market from different producers constituted the material tested.

The total content of phenolic compounds, flavonoids and phenolic acids was determined in the examined preparations. Moreover, their antioxidant activity, antiradical activity in reaction with ABTS^{•+}, DPPH[•] and OH[•], reducing ability by FRAP and CUPRAC methods and chelating ability of Fe (II) ions were evaluated.

Results. The studied propolis preparations were characterized by different content of antioxidant compounds. The total content of polyphenols ranged from 4.62 to 215.03 mg GAE/ml, flavonoids from 0.49 to 21.26 mg QE/ml and phenolic acids from 1.16 to 28.81 mg CAE/ml. The content of antioxidant-like constituents determined the antioxidant and antiradical activities as well as the reducing and chelating capacity of the individual samples. There was also a significant linear correlation ($r = 0.69$) between the declared propolis concentration in the preparation and the total polyphenol content.

Conclusions. The correlation between the content of polyphenols and antioxidant and antiradical activity as well as reducing and chelating ability was confirmed by significant values of linear correlation coefficients. It was stated that the concentration of propolis alone is not the only factor determining its antioxidant activity, which is confirmed by the lowest activity of a non-alcoholic preparation with a relatively high concentration declared by the manufacturer.

Keywords: propolis, commercial preparations, antioxidant properties, antiradical activity, reducing ability

STRESZCZENIE

Wstęp. Propolis jest substancją żywiczną zbieraną przez pszczoły miodne *Apis mellifera*. Ze względu na znaczną zawartość związków o różnicowanej aktywności biologicznej, propolis wykazuje szerokie spektrum działania przeciwutleniającego. Ze względu na wzrastające zainteresowanie stosowaniem propolisu w profilaktyce i leczeniu wielu jednostek chorobowych, ciągle poszerza się oferta handlowa preparatów na jego bazie. Jednak właściwości takich handlowych preparatów propolisowych mogą być bardzo zróżnicowane, co jest związane zarówno z pochodzeniem samego surowca, jak i z jego oczyszczeniem, obróbką i ekstrakcją związków bioaktywnych.

Cel pracy. Celem pracy była ocena i porównanie właściwości przeciwutleniających handlowych preparatów propolisowych.

Materiał i metody. Materiał badany stanowiło 10 płynnych handlowych preparatów propolisowych dostępnych na polskim rynku pochodzących od różnych producentów. W badanych preparatach oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych. Ponadto oceniono ich aktywność przeciwutleniającą, przeciwrodnikową w reakcji z ABTS^{•+}, DPPH[•] i OH[•], zdolność redukcyjną metodami FRAP i CUPRAC oraz zdolności chelatowania jonów Fe (II).

Wyniki. Badane preparaty propolisowe charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością związków o charakterze przeciwutleniającym. Całkowita zawartość polifenoli wynosiła od 4,62 do 215,03 mg GAE/ml, flawonoidów od 0,49 do 21,26 mg QE/ml, a kwasów fenolowych od 1,16 do 28,81 mg CAE/ml. Zawartość składników o charakterze przeciwutleniającym determinowała aktywność przeciwutleniającą i przeciwrodnikową oraz zdolność redukcyjną i chelatującą poszczególnych próbek. Stwierdzono również istotną korelację liniową ($r = 0,69$) pomiędzy deklarowanym stężeniem propolisu w preparacie a całkowitą zawartością polifenoli.

Wnioski. Współzależność pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą i przeciwrodnikową oraz zdolność redukcyjną i chelatującą potwierdzono istotnymi wartościami współczynników korelacji liniowej. Stwierdzono, że samo stężenie propolisu w preparacie nie jest jedynym czynnikiem decydującym o jego aktywności przeciwutleniającej, co potwierdza najniższa aktywność preparatu bezalkoholowego o stosunkowo wysokim deklarowanym przez producenta stężeniu.

Słowa kluczowe: propolis, preparaty handlowe, właściwości przeciwutleniające, aktywność przeciwrodnikowa, zdolność redukcyjna

Wprowadzenie

Propolis jest substancją żywiczną zbieraną przez pszczoły miodne *Apis mellifera*, najczęściej z liści i pąków kwiatowych, a także z łodygi i pęknięć w kory wielu gatunków drzew (1). Pszczoły wykorzystują go w celach obronnych uli jako matę odkażającą czy dezynfekującą, co chroni przed zakażeniem drobnoustrojami. Dodatkowo pszczoły pokrywają propolisem komórki plastra, w którym matka ma złożyć jaja, a także uśmiercone jadem szkodniki, aby produkty ich rozkładu nie stanowiły zagrożenia (2). W zależności od pochodzenia geograficznego można wyróżnić 7 typów propolisu: topolowy (Europa, Ameryka Północna), brzozy (Rosja), zielony brazylijski (Brazylia), czerwony (Kuba, Brazylia), śródziemnomorski (Sycylia, Grecja, Malta), clusia (Kuba, Wenezuela), pacyficzny (Region Pacyfiku) (3). Propolis charakteryzuje się barwą od żółtawo-zielonej do czerwono-ciemnobrazowej oraz aromatycznym zapachem, a stosowane ekstrakty alkoholowe lub alkoholowo-wodne mają złożony skład (4).

Skład chemiczny propolisu nie jest stały, a różnice mogą być zauważalne nawet między surowcem z sąsiednich uli. Propolis zawiera również wtórne metabolity roślinne, zróżnicowane w zależności od obszaru geograficznego (3). Dane literaturowe wskazują, że w propolisie znajduje się około 150-300 różnych substancji chemicznych (5). Mimo tak dużej różnorodności, udało się wydzielić kilka charakterystycznych grup składników, takich jak: żywice (ok. 50%), woski (ok. 30%), olejki eteryczne (ok. 10%), pyłki kwiatowe (ok. 5%), inne substancje, np. składniki mineralne (ok. 5%) (6). Główne klasy związków chemicznych propolisu obejmują m.in.: flawonoidy, fenole i związki aromatyczne, lotne olejki i terpeny (7). Podstawowymi składnikami bioaktywnymi propolisu są: kwasy fenolowe oraz flawony, flawonole i flawanony, z których najważniejsze są: apigenina, galangina, chryzyna, kwercetyna, luteolina, pinocembryna, pinobanksyna, acacetyna i kemferol (6).

W zależności od składu chemicznego propolis wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznych i farmakologicznych, w tym właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, kardioprotekcyjne, neuroprotekcyjne i inne (6). Dzięki wysokiej aktywności cytoochronnej ekstrakty z propolisu chronią ludzkie erytrocyty przed hemolitycznym działaniem wolnych rodników, co skutecznie zapobiega skutkom stresu oksydacyjnego oraz chorobom wieku starszego (8).

Za właściwości przeciwbakteryjne propolisu odpowiedzialne są estry kwasów fenolowych, a zwłaszcza estry etylowe kwasu kawowego oraz cynamonowego i estry fenylometylowe kwasu benzoowego (9). Działanie przeciwwirusowe propolisu opiera się na niszczeniu otoczki lipidowej wirusa, powodując uszkodzenia jego DNA i autolizę (10). Wykazano także, że propolis działa przeciwgrzybiczo dzięki obecności flawonoidów (11). Dużą aktywnością wykazuje się zwłaszcza pinocembryna, jak również galangina, pinostrobin i chryzyna (12). W zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika, ekstrakty propolisu w zróżnicowany sposób hamują rozwój drobnoustrojów. Stosuje się takie rozpuszczalniki, jak alkohol metylowy, alkohol etylowy, n-butyłowy, octan etylu oraz aceton (13).

Aktywność przeciwpierwotniakowa, którą odznacza się propolis, obserwuje się poprzez hamowanie wzrostu *in vitro* kultur pasożytów po inkubacji z propolisem o różnym stężeniu (11). Bliski związek między stresem oksydacyjnym a rakiem stał się tematem wielu prac naukowych (14). Stwierdzono, że propolis ze względu na silne właściwości przeciwutleniające charakteryzuje się aktywnością przeciwnowotworową, zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wykazano, że za zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych odpowiadają przede wszystkim estery fenylometylowe kwasu kawowego (CAPE) i artepilina C (15). CAPE to biologicznie aktywny składnik propolisu, który hamuje podziały komórkowe, wpływa cytotoksycznie na komórki nowotworowe oraz powoduje ich apoptozę (16). Dane literaturowe wskazują również, że na właściwości te wpływ mają również związki flawonoidowe oraz ich pochodne prenylowane. Działają one przeciwutleniająco, antyproliferacyjnie, indukując apoptozę, blokując na cykl komórkowy, inaktywując na karcynogeny. Dodatkowo zmniejszają oporność leków przeciwnowotworowych oraz działają na kilku etapach karcynogenezy, tj. inicjacji, promocji i progresji (17). Wiele dysfunkcji organizmu jest związanych ze wzrostem zawartości wolnych rodników. Propolis, który zawiera około 50 bioflawonoidów, kwalifikowany jest do grupy naturalnych produktów o działaniu przeciwutleniającym (18). Jego aktywność przeciwutleniająca koreluje z aktywnością przeciwzapalną i hepatoprotekcyjną (19). Przeciwutleniacze zapobiegają powstawaniu stresu oksydacyjnego (20), a flawonoidy i związki fenolowe są właśnie składnikami odpowiedzialnymi za aktywność przeciwutleniającą propolisu. Wychwytuja one wolne rodniki i dzięki temu chronią lipidy oraz inne związki, np. witaminę C, przed utlenieniem lub zniszczeniem przez stres oksydacyjny. Kwasy

kawowy i chlorogenowy są przeciwutleniaczami *in vitro* i chronią lipoproteiny o małej gęstości przed utlenieniem, a więc zapobiegają chorobom związanym z wiekiem (6). Ester CAPE uważany jest za jeden z najsilniejszych składników przeciwutleniających propolisu (19). Aktywność przeciwutleniająca propolisu zależy jednak od jego pochodzenia geograficznego i botanicznego (21) oraz metod i warunków otrzymywania samych ekstraktów.

Cel pracy

Ze względu na wzrastające zainteresowanie stosowaniem propolisu w profilaktyce i leczeniu wielu jednostek chorobowych, ciągle poszerza się oferta handlowa producentów preparatów na jego bazie. Podstawową właściwością propolisu jest jego działanie przeciwutleniające, zależne od pochodzenia propolisu, jak również związane z jego oczyszczaniem, obróbką i przygotowaniem ekstraktu. Celem pracy była ocena i porównanie właściwości przeciwutleniających handlowych preparatów propolisowych.

Materiał i metody

Materiał badany

Materiał badawczy stanowiły handlowe preparaty propolisowe, których charakterystykę przedstawiono w tabeli 1.

Metody

Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych

Całkowitą zawartość związków fenolowych oznaczono w reakcji z odczynnikiem Folin-Ciocalteu zgodnie z metodą opracowaną przez Singleton i Rossi (22). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 760$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent kwasu galusowego w mg GAE/ml preparatu.

Oznaczanie całkowitej zawartości flawonoidów

Całkowitą zawartość flawonoidów oznaczono w reakcji z chlorkiem glinu zgodnie z metodą opracowaną przez Ardestani i Yazdanparast (23). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 510$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent kwercetyny w mg QE/ml preparatu.

Oznaczanie całkowitej zawartości kwasów fenolowych

Całkowitą zawartość kwasów fenolowych oznaczono w reakcji z odczynnikiem Arnova zgodnie z metodą opisaną przez Nalewajko-Sieliwoniuk i wsp. (24). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 490$ nm. Całkowitą zawartość kwasów fenolowych wyrażono jako ekwiwalent kwasu kawowego w mg CAE/ml preparatu.

Tab. 1. Propolisowe preparaty handlowe wykorzystane w badaniach

Preparat handlowy	Zawartość propolisu [%]	Skład/opis preparatu
P1	50	Propolis – 20,5 g (proporcja ekstraktu 10:5), alkohol etylowy – 78% (v/v), witamina C – 2050 mg, 1,4% ilość flawonoidów
P2	7	Propolis – 7%, spirytus etylowy – nie więcej niż 70% obj., woda
P3	10	Propolis – 10%, etanol – 70% (v/v)
P4	7	Propolis – 7%, etanol – nie więcej niż 65% obj., woda
P5	20	Ekstrakt wodny z propolisu – 20%, woda puryfikowana, kwas cytrynowy, sorbinian potasu, BA
P6	10	Propolis – 10%, etanol – 70% (v/v)
P7	3	Propolis – 3%, etanol – nie więcej niż 90% obj.
P8	10	Biopropolis – 10%, etanol – 70 % (v/v), woda – 20%
P9	20	Kit pszczeli w postaci 20% roztworu alkoholowego
P10	10	Bezalkoholowy ekstrakt z propolisu – 10% BA

*BA – produkt bezalkoholowy

Oznaczanie całkowitej aktywności przeciwutleniającej

Całkowitą zawartość flawonoidów oznaczono w reakcji z roztworem molibdenianu (VI) amonu zgodnie z metodą opracowaną przez Prieto i wsp. (25). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 695$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent kwasu askorbinowego w mM AAE/ml preparatu.

Oznaczanie aktywności przeciwrodnikowej w reakcji z ABTS^{•+}

Aktywność przeciwrodnikową oznaczono w reakcji z roztworem rodnika kationowego ABTS^{•+} zgodnie z metodą opracowaną przez Baltrušaitytė i wsp. (26). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 734$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent troloksu w mM TE/ml preparatu.

Oznaczanie aktywności przeciwrodnikowej w reakcji z DPPH[•]

Aktywność przeciwrodnikową oznaczono w reakcji z metanolem roztworem DPPH[•] zgodnie z metodą opracowaną przez Blois (27). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 515$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent troloksu w mM TE/ml preparatu.

Oznaczanie zdolności dezaktywacji rodnika hydroksylogowego OH[•]

Zdolność dezaktywacji rodnika hydroksylogowego oznaczono w reakcji z nadtlakiem wodoru zgodnie z metodą opracowaną przez Halliwell i wsp. (28). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 530$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent kwercetyny w mg QE/ml preparatu.

Oznaczanie zdolności redukcyjnej metodą FRAP

Zdolność redukującą oznaczono w reakcji z roztworem chlorku żelaza (III) zgodnie z metodą opracowaną przez Benzie i Strain (29). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Wynik wyrażono w mM Fe (II)/ml preparatu.

Oznaczanie zdolności redukcyjnej metodą CUPRAC

Zdolność redukującą oznaczono w reakcji z roztworem chlorku miedzi (II) zgodnie z metodą opracowaną przez Apak i wsp. (30). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 450$ nm. Wynik wyrażono jako ekwiwalent troloksu w mM TE/ml preparatu.

Oznaczanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II)

Zdolność chelatowania oznaczono w reakcji z jonami żelaza Fe²⁺ zgodnie z metodą opracowaną przez Jug i wsp. (31). Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 545$ nm.

Wszystkie pomiary absorbancji wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV/Vis V530 (Jasco, Japonia).

Analiza statystyczna

Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi otrzymanymi z trzech niezależnych powtórzeń oceniono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu Tukeya przy poziomie istotności 0,05. W celu oceny istnienia współzależności pomiędzy badanymi parametrami wyznaczono wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona, a ich istotność zweryfikowano na poziomie 0,05. Ponadto przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA). Obliczenia wykonano z wykorzystaniem programu Statistica v. 12 (Statsoft, USA).

Wyniki i dyskusja

Na bioaktywność produktów pszczelich wpływa wiele czynników, wśród których należy wymienić pochodzenie geograficzne, sezon i czas zbiorów, rodzaj roślin i ich skład chemiczny, a także metody pozyskiwania i przetwarzania surowca (32). Związki fenolowe, ich rodzaj i stężenie są głównymi składnikami, które odpowiadają za właściwości bioaktywne propolisu (1). Wyniki całkowitej zawartości polifenoli (TPC), flawonoidów (TFC) i kwasów fenolowych (TPAC) handlowych preparatów propolisowych zestawiono w tabeli 2. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największą zawartością polifenoli, tj. 43,55 mg GAE/ml, charakteryzował się preparat P1, natomiast najmniejszą – 0,44 mg GAE/ml – P5 BA. Preparaty P3, P6 oraz P8 o stężeniu propolisu 10% odznaczały się podobną zawartością polifenoli. Również preparaty o stężeniu 7% (P2 i P4) zawierały zbliżoną ilość związków polifenolowych (tab. 2). Największą zawartością flawonoidów – 21,26 QE/ml – charakteryzował się również preparat P1, a najmniejszą – 0,49 mg QE/ml – próbka P5 BA (tab. 2), co potwierdza znaczne zróżnicowanie w składzie poszczególnych preparatów. Podobnie w przypadku kwasów fenolowych, ich największą zawartość, tj. 28,81 mg CAE/ml, wykazywał preparat P1, natomiast najmniejszą P5 (1,16 mg CAE/ml). Analiza statystyczna wykazała istotne zróżnicowanie w zawartości tej grupy związków pomiędzy poszczególnymi próbkami ekstraktów. Ponieważ zawartość flawonoidów

Tab. 2. Całkowita zawartość związków fenolowych (TPC), flawonoidów (TFC) oraz kwasów fenolowych (TPAC) w analizowanych preparatach propolisowych

Preparat handlowy	TPC [mg GAE/ml]	TFC [mg QE/ml]	TPAC [mg CAE/ml]
P1	43,55 ^a ± 0,01	21,26 ^a ± 0,56	28,81 ^a ± 0,10
P2	17,10 ^f ± 0,22	11,67 ^e ± 0,13	22,83 ^f ± 0,02
P3	21,98 ^b ± 0,19	15,35 ^c ± 0,29	25,32 ^d ± 0,12
P4	15,95 ^g ± 0,20	12,78 ^d ± 0,09	20,78 ^g ± 0,10
P5	0,44 ⁱ ± 0,00	0,49 ^f ± 0,01	1,16 ^f ± 0,04
P6	20,69 ^c ± 0,43	16,17 ^b ± 0,04	25,35 ^d ± 0,03
P7	6,41 ^h ± 0,07	16,00 ^b ± 0,17	9,24 ^h ± 0,15
P8	17,98 ^e ± 0,20	12,10 ^e ± 0,07	23,98 ^e ± 0,05
P9	18,84 ^d ± 0,08	12,76 ^d ± 0,21	25,70 ^c ± 0,07
P10	19,43 ^c ± 0,27	15,31 ^c ± 0,07	26,25 ^b ± 0,01

*Wartości średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$

oraz kwasów fenolowych jest ściśle powiązana z całkowitą zawartością polifenoli, stwierdzono tutaj, znane z literatury, statystycznie istotne dodatnie korelacje liniowe pomiędzy całkowitą zawartością polifenoli a całkowitą zawartością flawonoidów ($r = 0,78$) oraz kwasów fenolowych ($r = 0,82$). Kluczowym czynnikiem mającym wpływ na zawartość związków polifenolowych jest stężenie samego propolisu w preparacie. Jak wskazują dane zawarte w tabeli 2, największą zawartością związków fenolowych, w tym flawonoidów i kwasów fenolowych, charakteryzował się preparat P1, który zgodnie z deklaracją producenta zawierał największe jego stężenie (50%) (tab. 1). Preparat ten posiadał również znaczny dodatek witaminy C (2050 mg), będącej przeciwutleniaczem. Z kolei preparat P5 BA, pomimo wysokiej, deklarowanej przez producenta zawartości propolisu (20%), miał najmniejszą zawartość polifenoli. Wynikać to może z różnic w metodyce pozyskiwania i ekstrakcji propolisu, co w konsekwencji wpływa na skład chemiczny ekstraktu. Surowiec do otrzymywania takich produktów, jak tabletki, kapsułki i syropy, pozyskuje się przez ekstrakcję etanolem. Metanol jako ekstrahent wykorzystuje się wyłącznie w celach badawczych. Niektóre składniki propolisu są również częściowo rozpuszczalne w wodzie, stąd też dostępność na rynku produktów na bazie wody (33). Na uwagę zasługuje również fakt, iż preparat P10 BA o stężeniu 10%, który zgodnie z deklaracją producenta również jest produktem bezalkoholowym, odznacza się

znacznie wyższą zawartością polifenoli ogółem, flawonoidów i kwasów fenolowych od próbki P5 o wyższym deklarowanym stężeniu. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotną korelację pomiędzy stężeniem propolisu deklarowanym przez producenta a całkowitą zawartością związków fenolowych ($r = 0,69$), natomiast nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem preparatu a całkowitą zawartością flawonoidów i kwasów fenolowych.

Kolejnym istotnym czynnikiem mającym wpływ na aktywność propolisu jest jego skład, który różni się ze względu na pochodzenie geograficzne (6). W opisie dostarczonym wraz z produktem brakuje informacji w tym zakresie, jednak dane literaturowe wielokrotnie potwierdzają wpływ pochodzenia propolisu na jego skład, właściwości i aktywność biologiczną. W Polsce najczęściej źródłem propolisu są pączki liściowe topoli czarnej (*Populus nigra*) oraz różne gatunki olszy (*Alnus*) i brzozy (*Betula*), co świadczy o różnorodności zarówno składu, jak i właściwości propolisu (34).

Związki fenolowe, w tym flawonoidy i kwasy fenolowe, są składnikami odpowiedzialnymi za aktywność przeciwutleniającą propolisu. Wychwytyują one wolne rodniki i dzięki temu chronią lipidy oraz inne związki, np. witaminę C lub polifenolowe związki o charakterze barwników (35). Całkowitą aktywność przeciwutleniającą handlowych preparatów propolisowych przedstawiono na rycinie 1. Jej wartości

mieściły się w zakresie od 4,62 do 215,03 mM AAE/ml. Najwyższą aktywnością, tj. 215,03 mM AAE/ml, charakteryzował się preparat P1, który wykazał 2 razy większą aktywność od preparatu P3. Najmniejszą aktywnością przeciwutleniającą, równą 4,62 mM AAE/ml, charakteryzuje się preparat P5 BA. Wynik ten znacząco różni się od pozostałych próbek, których aktywność zawierała się w przedziale 42,80-215,03 mM AAE/ml. Preparat P10 BA, mimo iż jest produktem bezalkoholowym i ma niższe stężenie aniżeli P5 BA,

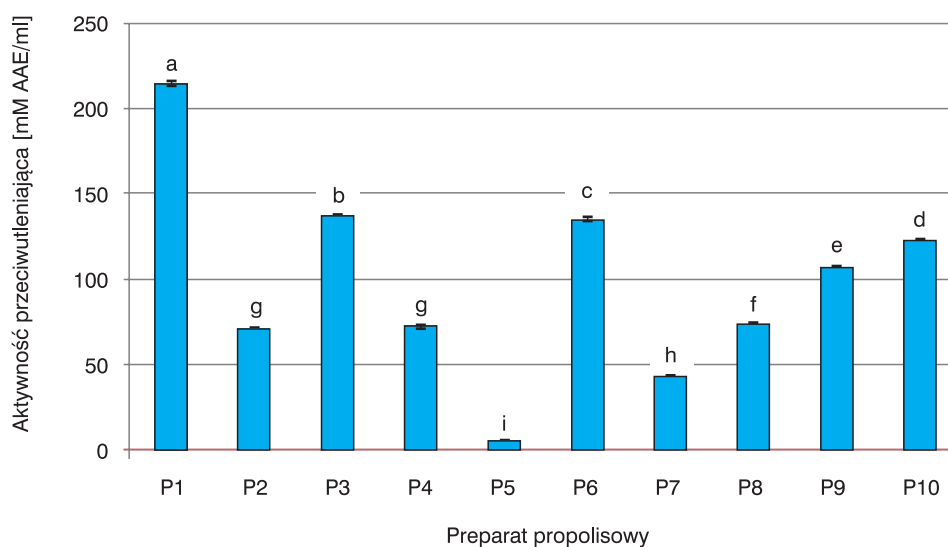
charakteryzuje się znacznie wyższą aktywnością. Wykazano istotnie dodatnią korelację liniową pomiędzy całkowitą aktywnością przeciwutleniającą a całkowitą zawartością polifenoli ($r = 0,95$), całkowitą zawartością flawonoidów ($r = 0,81$) i całkowitą zawartością kwasów fenolowych ($r = 0,82$).

Przeciwutleniacze są związkami redukującymi, dlatego metody oznaczania ich aktywności opierają się na pomiarze redukcji danego indykatora przez przeciwutleniacze. W tabeli 3 zestawiono wyniki aktywności

Tab. 3. Aktywność przeciwrodnikowa analizowanych preparatów propolisowych

Preparat handlowy	ABTS ^{•+} [mM TE/ml]	DPPH [•] [mM TE/ml]	OH [•] [mg QE/ml]
P1	0,66 ^c ± 0,00	3,73 ^a ± 0,00	1425,77 ^b ± 1,76
P2	0,58 ^d ± 0,00	1,35 ^e ± 0,00	1562,56 ^a ± 1,60
P3	0,93 ^a ± 0,01	2,06 ^b ± 0,01	1126,92 ^e ± 1,76
P4	0,39 ^h ± 0,01	1,51 ^d ± 0,01	793,08 ^h ± 1,15
P5	0,0030 ⁱ ± 0,00	0,70 ⁱ ± 0,02	416,03 ⁱ ± 0,97
P6	0,72 ^b ± 0,00	1,58 ^c ± 0,01	1068,33 ^f ± 1,18
P7	0,14 ⁱ ± 0,00	0,94 ⁱ ± 0,02	795,77 ^h ± 1,68
P8	0,45 ^g ± 0,01	1,01 ^h ± 0,00	1400,38 ^d ± 1,39
P9	0,54 ^e ± 0,01	1,13 ^g ± 0,01	996,79 ^g ± 1,73
P10	0,49 ^f ± 0,00	1,21 ^f ± 0,00	1412,44 ^c ± 1,55

Wartości średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$



Ryc. 1. Całkowita aktywność przeciwutleniająca preparatów propolisowych. Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$

przeciwrodnikowej preparatów propolisowych wobec kationorodnika ABTS^{•+}, który jest redukowany przez przeciwutleniacze w zależności od ich stężenia, aktywności i czasu trwania reakcji. Największą aktywność przeciwrodnikową 0,93 mM TE/ml wykazał preparat P3, natomiast najmniejszą P5 BA, dla którego aktywność wynosi jedynie 0,003 mM TE/ml. Stwierdzono statystycznie istotne korelacje liniowe pomiędzy aktywnością przeciwrodnikową wobec ABTS^{•+} a całkowitą zawartością związków fenolowych ($r = 0,71$), całkowitą zawartością flawonoidów ($r = 0,62$), całkowitą zawartością kwasów fenolowych ($r = 0,86$). Aktywność przeciwrodnikową badanych preparatów oceniono również w reakcji z rodnikiem DPPH[•]. Największą aktywnością (3,73 mM TE/ml) w stosunku do tego rodnika wykazywał preparat P1, natomiast najmniejszą – P5 BA (0,70 mM TE/ml). Podobnie jak w poprzednim przypadku, wykazano wysoki dodatni współczynnik korelacji liniowej pomiędzy wynikami aktywności przeciwrodnikowej w reakcji z DPPH[•] a całkowitą zawartością związków fenolowych ($r = ,91$), całkowitą zawartością flawonoidów ($r = 0,68$) i całkowitą aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,87$). Rodnik hydroksylowy ([•]OH) jest najbardziej toksycznym i reaktywnym wolnym rodnikiem, który powstaje m.in. w reakcji Fentona. Jest też silnym utleniaczem, a jego potencjał redoks zależy od pH środowiska (36). W tabeli 3 przedstawiono wyniki zdolności preparatów propolisowych do dezaktywacji rodnika hydroksylowego. Największą aktywność w tym

zakresie wykazał preparat P2 (1562,56 mg QE/ml), natomiast najmniejszą P5 BA (416,03 mg QE/ml). Wykazano istotną pozytywną korelację liniową pomiędzy zdolnością do dezaktywacji rodnika hydroksylowego a TPC ($r = 0,67$) i TPAC ($r = 0,79$). Natomiast deklarowane przez producenta stężenia preparatu korelowały istotnie jedynie z aktywnością wobec DPPH[•] ($r = 0,77$). Również nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem różnych rodników, na co wpływ może mieć zróżnicowany profil związków fenolowych występujących w poszczególnych preparatach. Jak podają Socha i wsp. (34), związki obecne w propolisie odznaczają się różną aktywnością przeciwrodnikową, np. kwasy p-kumarowy i izoferulowy wykazują wysoką aktywność wobec rodnika DPPH[•], z kolei galangina wykazuje znacznie wyższą aktywność przeciwrodnikową w badaniu z DPPH[•] niż ABTS^{•+}.

Właściwości redukujące handlowych preparatów propolisowych oznaczono również metodami wykorzystującymi zdolność do redukcji jonów metali (tab. 4). Największą zdolnością redukcyjną oznaczoną metodą FRAP charakteryzował się preparat P1 (989,14 mM Fe (II)/ml), natomiast najmniejszą – P5 BA (20,90 mM Fe (II)/ml). Wyniki te istotnie korelują z całkowitą zawartością związków fenolowych ($r = 0,96$), flawonoidów ($r = 0,77$) i kwasów fenolowych ($r = 0,69$), a także z całkowitą aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,87$) i przeciwrodnikową z reakcji z DPPH[•] ($r = 0,91$). Zdolność

Tab. 4. Właściwości redukujące i zdolność chelatowania jonów żelaza Fe²⁺

Preparat handlowy	FRAP [mM Fe(II)/ml]	CUPRAC [mM TE/ml]	ChA Fe(II) [%]
P1	989,14 ^a ± 2,09	1,05 ^a ± 0,03	34,36 ^a ± 0,20
P2	385,98 ^d ± 3,76	0,21 ^c ± 0,00	10,05 ^g ± 0,10
P3	331,33 ^f ± 1,81	0,24 ^b ± 0,01	22,14 ^c ± 0,07
P4	386,48 ^d ± 0,18	0,7 ^d ± 0,00	5,22 ^h ± 0,11
P5	20,90 ^h ± 0,05	0,01 ^e ± 0,00	1,17 ⁱ ± 0,13
P6	415,34 ^b ± 0,66	0,26 ^b ± 0,00	12,31 ^f ± 0,10
P7	245,79 ^g ± 3,43	0,15 ^d ± 0,00	2,36 ^f ± 0,08
P8	362,91 ^e ± 2,42	0,24 ^b ± 0,00	27,85 ^b ± 0,11
P9	396,51 ^c ± 4,15	0,26 ^b ± 0,00	16,38 ^e ± 0,11
P10	331,09 ^f ± 0,74	0,23 ^{b,c} ± 0,00	19,43 ^d ± 0,08

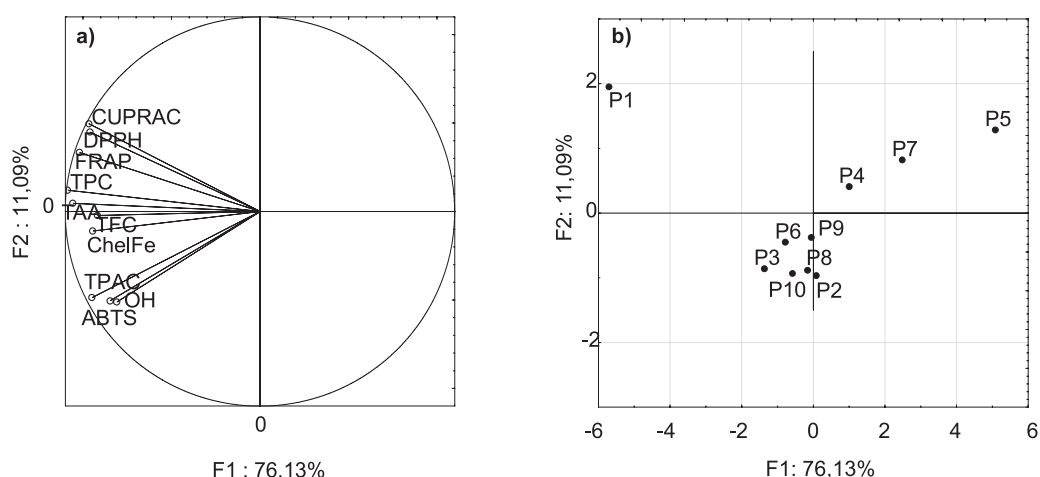
*Wartości średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$

redukcją badanych preparatów propolisowych oznaczono również metodą CUPRAC (tab. 4). Podobnie jak w przypadku metody FRAP, największą zdolnością redukującą charakteryzował się preparat P1, natomiast najmniejszą – próbka P5 BA, co potwierdza bardzo silna dodatnia korelacja liniowa ($r = 0,92$) pomiędzy wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem tych dwóch metod. Ponadto wyniki uzyskane metodą CUPRAC istotnie korelowały z całkowitą zawartością związków fenolowych ($r = 0,92$) i flawonoidów ($r = 0,69$), aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,84$) i przeciwrodnikową w reakcji z DPPH* ($r = 0,93$). Ponadto stwierdzono istotną korelację pomiędzy deklarowanym przez producenta stężeniem preparatów a zdolnością redukcyjną wyznaczoną metodą FRAP ($0,73$) oraz CUPRAC ($r = 0,86$).

Dodatkowym parametrem w ocenie badanych preparatów było określenie ich zdolności do chelatowania jonów żelaza (II) (tab. 4). Reakcje chelatowania polegają na tworzeniu kompleksów metali, np. z jonami żelaza lub miedzi, przez związki posiadające grupy funkcyjne, jak flawonoidy. W wyniku tego procesu zdolność metali ciężkich do katalizowania reakcji utleniania ulega zahamowaniu (37). Podobnie do poprzednich wyników, najwyższą aktywność wykazał preparat P1 (34,36%), a najmniejszą P5 BA (1,17%). Zdolność badanych preparatów do chelatowania jonów Fe (II) istotnie dodatnio korelowała z całkowitą zawartością polifenoli ($r = 0,84$), kwasów fenolowych ($r = 0,75$) oraz aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,79$), przeciwrodnikową w reakcji z rodnikami: ABTS*+ ($r = 0,63$), DPPH* ($r = 0,67$), *OH ($r = 0,72$), a także zdolnością redukcyjną w metodzie CUPRAC ($r = 0,75$) i FRAP ($r = 0,73$).

Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji pomiędzy zdolnością do chelatowania jonów Fe (II) a deklarowanym stężeniem propolis w preparatach.

Przeprowadzona analiza składowych głównych (PCA) pozwoliła uzyskać projekcję zmiennych na płaszczyznę czynników pod kątem zastosowanych metod (ryc. 2a) oraz rzut przypadków na płaszczyznę czynników (ryc. 2b). Dwie pierwsze główne składowe wyjaśniają 76,13 i 11,09% wariacji zmiennych pierwotnych. Potwierdzono tu występowanie dodatniej korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami CUPRAC, DPPH i FRAP, następnie między wynikami całkowitej zawartości związków fenolowych, całkowitą aktywnością przeciwutleniającą, całkowitą zawartością flawonoidów i chelatowaniem jonów żelaza (II), jak również pomiędzy wynikami całkowitej zawartości związków fenolowych, ABTS*+ i zdolności dezaktywacji rodnika *OH. Z kolei analizując rycinę 2b, można zaobserwować, które preparaty handlowe są do siebie podobne pod względem właściwości przeciwutleniających, a które znacząco różnią się od siebie. Spośród wszystkich preparatów najbardziej wyróżnia się P1, który jako jedyny leży w II ćwiartce układu współrzędnych. Posiadał on najwyższe, deklarowane stężenie propolisu (50%), stąd tak duża jego aktywność przeciwutleniająca. W I ćwiartce znajdują się preparaty, które odznaczała niska aktywność przeciwutleniająca, tj. P4 o stężeniu propolisu 7%, P5 BA o stężeniu 20% i P7 z 3% stężeniem propolisu. Pozostałe preparaty umieszczone są w III ćwiartce, co świadczy o ich dużym podobieństwie. Są to preparaty P3, P6, P8 o stężeniu propolisu 7% i P10 BA o stężeniu 10%. Preparaty P2 (7%) i P9 (20%) znajdują się na granicy III i IV ćwiartki.



Ryc. 2a, b. Projekcja zmiennych na płaszczyznę czynników (a) oraz rzut przypadków na płaszczyznę czynników (b)

Wnioski

1. Badane preparaty propolisowe charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością związków o charakterze przeciwutleniających. Całkowita zawartość polifenoli wynosiła od 4,62 do 215,03 mg GAE/ml, flawonoidów od 0,49 do 21,26 mg QE/ml, a kwasów fenolowych od 1,16 do 28,81 mg CAE/ml.
2. Zawartość składników o charakterze przeciwutleniających determinowała aktywność przeciwutleniającą i przeciwrodnikową oraz zdolność redukcyjną i chelatującą poszczególnych próbek, co zostało potwierdzone wysokimi wartościami współczynników korelacji liniowej pomiędzy wartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą preparatów.
3. Stwierdzono istotną korelację liniową ($r = 0,69$) pomiędzy deklarowanym stężeniem propolisu w preparacie a całkowitą zawartością polifenoli. Chociaż najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazywała się próbka o największym stężeniu, najniższą aktywnością odznaczał się preparat bezalkoholowy o stosunkowo wysokim stężeniu (20%). Wynika z tego, że o aktywności przeciwutleniającej nie decydują wyłącznie składniki propolisu, co potwierdza również brak istotnej korelacji pomiędzy stężeniem propolisu a zawartością flawonoidów i kwasów fenolowych.

Piśmiennictwo

1. Santana Andradea JK, Denadaia M, Santos de Oliveira Ch i wsp. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Internat* 2017; 101:129-38.
2. Wolska K, Górka A, Adamiak A. Właściwości przeciwbakteryjne propolisu. *Postępy mikrobiologii* 2016; 55(4):343-50.
3. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 2011; 133:253-60.
4. Wagh VD. Propolis: A Wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advan Pharmacol Sci* 2013, article ID 308249: 2.
5. Isidorow WA. Alchemia pszczół – Pszczoły i produkty pszczele oczami chemika. Stróże, Wyd Sąddecki Bartnik 2013.
6. Farooqui T, Farooqui AA. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience* 2012; E4:779-93.
7. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM i wsp. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Compl Alternat Med* 2013; article ID 697390.
8. Woźniak M, Kwiatkowska A, Hołderna-Kędzia E i wsp. Aktywność biologiczna ekstraktów z propolisu. *Post Fitoter* 2021; 22(1):8-13.
9. Kubina R, Kabała-Dzik A, Wojtyczka RD i wsp. Przeciwbakteryjne działanie galanginy zawartej w propolisie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. *Farmaceutyczny przegląd naukowy* 2009; 8:24-6.
10. Czarnecki R. Propolis w Apiterapii. *Apiter Forum* 2013; 5-36.
11. Wagh VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci* 2013; ID 308249.
12. Woźniak M, Kwaśniewska-Sip P, Babicka M i wsp. Skład chemiczny etanolowego ekstraktu z propolisu i jego aktywność biologiczna wobec grzybów pleśniowych. *Post Fitoter* 2021; 19(2):86-91.
13. Woźniak M, Ratajczak I, Kwaśniewska P i wsp. Badanie aktywności ekstraktów propolisowych wobec wybranych gatunków grzybów pleśniowych. *Post Fitoter* 2015; 16(4):205-9.
14. Carochi M, Ferreira ICFR. The role of phenolic compounds in the fight against cancer – a review. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2013; 13:1236-58.
15. Siemionow K. Propolis – charakterystyka i zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku 2013; 22-4.
16. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. 1. Ester fenyletylowy kwasu kawowego (CAPE). *Post Fitoter* 2020; 21(3):177-84.
17. Hołderna-Kędzia E. Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. 2. Związki flawonoidowe. *Post Fitoter* 2020; 21(4):250-6.
18. Rufatto LC, dos Santos DA, Marinho F i wsp. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific J Tropical Biomed* 2017; 7(7):591-8.
19. Bogdanov S. Propolis: composition, health, medicine: a review. *Bee Product Science* 2017; 1-44.
20. Koss-Mikołajczyk I, Baranowska M, Namieśnik J i wsp. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji. *Post Hig Med Dośw* 2017; 71:602-17.
21. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 2004; 84:329-39.
22. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enology and Viticulture* 1965; 16:144-58.
23. Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem* 2007; 104:21-9.
24. Nalewajko-Sieliwoniuk E, Pliszko A, Nazaruk J i wsp. Comparative analysis of phenolic compounds in four taxa of *Eriogonum acris* s. l. (*Asteraceae*). *Biologia* 2019; 74:1569-77.
25. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999; 269(2):337-41.
26. Baltrušaitytė V, Venskutonis PR, Čeksterytė V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem* 2007; 101(2):502-14.
27. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181(4617):1199-200.

28. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1):215-9.
29. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth Enzymol* 1999; 299:15-27.
30. Apak R, Güçlü K, Özyürek M i wsp. 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 Agricult Food Chem* 2004; 52(26):7970-81.
31. Jug M, Končić MZ, Kosalec I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT – Food Sci Technol* 2014; 57(2):530-7.
32. Akhir R, Bakar MA, Sanusi S. Antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee bread and propolis extracts. *AIP Conference Proceedings* 2017; 1891(1):020090.
33. 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 Alternat Med* 2013; article ID 697390.
34. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M i wsp. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natur Product Res* 2014; 29:416-22.
35. Sulaiman GM, Al Sammarrae KW, Ad'hiah AH i wsp. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:2415-21.
36. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Reakcja Fentona – z mroków historii. *Kosmos – Problemy nauk biologicznych* 2014; 63(3):309-14.
37. Majewska E, Kowalska J, Drużyńska B i wsp. Wartość odżywcza i antyoksydacyjna produktów pszczołach. *Bromat Chem Toksykol* 2016; XLIX(3):360-4.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 08.07.2021

zaakceptowano/accepted: 13.10.2021

Adres/address:

*mgr inż. Agnieszka Cabaj

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności

Wydział Technologii Żywności

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

tel.: +48 (12) 662-47-46

e-mail: agnieszka.grabeus@urk.edu.pl