

Propolis – kako dobro ga v resnici poznamo?

Pia Berglez, Mitja Kolar

Sestavine za pridelavo propolisa nabirajo čebele na smolnatih delih rastlin, v zmerno toplem pasu predvsem na topolu, kostanju, smreki, brezi in drugih drevesih. Nabrano smolo nato prenašajo v koških zadnjih nožic in jo prede-lajo z izločki svojih žlez (Šumenjak, 2011). Najpomembnejša naloga čebel v čebelji družini je obramba panja in zaščita družine, zato čebele propolis uporabljajo za premaz notranjih sten panja in popravila satovja. Uporabljajo ga tudi kot gradbeni material, s katerim izdelajo razne razpoke in špranje (Šumenjak, 2011).

Barva propolisa je odvisna od starosti in izvora oziroma vrste rastlin, na katerih je bila smolnata snov nabrana. V naravi se pojavljajo odtenki od svetlo rumene, rdeče in rjave do temno rjave barve, pa tudi odtenki zeleno rumene in zelene barve (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018) (slika 1). Tako poznamo brazilski zeleni in rdeči propolis, ruski, pacifiški, sredozemski in druge

vrste propolisa, ki se razlikujejo predvsem glede na zemljepisno območje (Elflein, 2018). Na vonj, kemijske lastnosti ter sestavo propolisa vpliva predvsem vrsta rastlin. Tako lahko ima propolis vonj po rastlinskih popkih, medu, vosku, smoli ali vaniliji. Ima praviloma grenak okus (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018).

Na količino zbranega propolisa vpliva več dejavnikov: podnebne razmere, lega in prevladujoče rastline v okolici čebelnjaka. V enem letu čebele običajno zberejo od 100 do 150 gramov propolisa na družino. Količina zbranega propolisa je odvisna tudi od vrste čebel: karpatska čebela zbere do več kot 250 gramov na družino, družina kavkaške čebele pa tudi do 1.000 gramov propolisa letno. Trdota propolisa je odvisna od temperature: sveže nabrani propolis je mehek in lepljiv, pri temperaturi, nižji od 15 stopinj Celzija, pa postane trd, krhek in lomljiv. Tališče propolisa je od 60 do 70 stopinj Celzija, lahko tudi do 100 stopinj Celzija, in-



Slika 1: Različne vrste propolisov in etanolna izvlečka.

tenzivno pa hlapi pri temperaturi, višji od 83 stopinj Celzija. Ko propolis zamrzujemo, ostane trd in lomljiv, tudi če ga ponovno segrevamo. Specifična gostota propolisa je od 1,112 do 1,136 grama na kubični centimeter.

Propolis ima lipofilne lastnosti, njegova topnost je odvisna od vrste, čistosti in temperature topila, postopka raztapljanja (mešanja in temperature) ter od velikosti delcev. Za raztapljanje propolisa najpogosteje uporabljajo sledeča topila: vodo, metanol, etanol, kloroform, diklorometan, eter in aceton, benzen in vodne raztopine natrijevega hidroksida (NaOH). Raztopine v acetonu, benzenu, metanolu, 2-odstotnem natrijevem hidroksidu

in še nekaterih drugih bazičnih topilih niso primerne za uporabo na koži in sluznicah (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018).

Propolis je sestavljen iz približno 50 odstotkov smol, 30 odstotkov voska, 10 odstotkov eteričnih olj, 5 odstotkov cvetnega prahu in drugih organskih snovi (5 odstotkov) (Alič Kavčič, 2016). Taka sestava je značilna za vse vrste propolisa, razlikuje pa se glede koncentracij določenih zvrsti. Razlike v sestavi glede na zemljepisni izvor so razvidne iz tabele I.

Tabela I: Vrste propolisa glede na zemljepisni izvor in pomembne biološko aktivne spojine (Špendal, 2014).

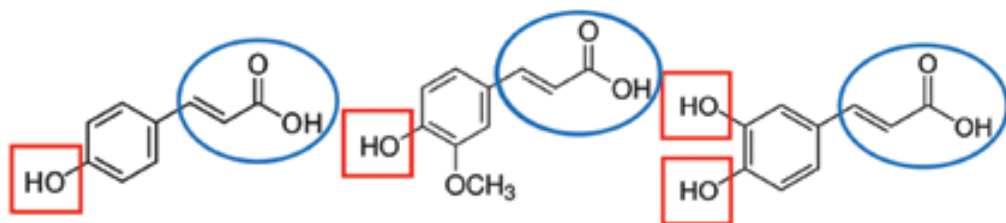
VRSTA PROPOLISA	ZEMLJEPIJNI IZVOR	BIOLOŠKO AKTIVNE SPOJINE
TOPOLOV	Evropa, S. Amerika, netropski del Azije, Nova Zelandija	flavoni, flavanoni, cimetna kislina in njeni estri
ZELENI	Brazilija	prenilirane p-kumarinske kisline, diterpenske kisline
BREZOV	Rusija	flavoni in flavanoni (drugačni kot v topolovem propolisu)
RDEČI	Kuba, Mehika, Brazilija	izoflavonoidi (izoflavoni, pterokarpani)
MEDITERANSKI	Sicilija, Grčija, Malta	diterpeni (kislina tipa labdan)
PACIFIŠKI	Tajvan, Indonezija	C - prenilirani flavanoni

Izvlečki propolisa lahko vsebujejo hidroksicimetne kisline in njihove estre, stilbene, flavonoide (flavonole, flavone, flavanone, dihidroflavanole, halkone), terpene, aromatske aldehide in alkohole, maščobne kisline in β -steroidne, to pa so tudi najpomembnejše organske spojine, ki so v propolisu (Alič Kavčič, 2016). Poznanih in izoliranih je bilo več kot 300 sestavin z biološko aktivnostjo. Propolis vsebuje še kumarin, maščobne kisline in njihove estre,

mikrohranila (minerale: magnezij, kalcij, kalij, natrij, baker, cink, mangan, železo, srebro, cezij, lantan, antimon, aluminij, vanadij in silicij (Marcucci, 1995; Pasupuleti, Sammugam, Ramesh, Gan, 2017), vitamine B1, B2, B6, C in E (Pasupuleti, Sammugam, Ramesh, Gan, 2017), aminokisliline in encime (sukcinat dehidrogenaza, glukozo-6-fosfataza, adenozin trifosfataza in kislota fosfataza (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018; Pasupuleti, Sammugam, Ramesh, Gan, 2017)). Vsebuje lahko sledeče

flavonoide: pinocembrin, acacetin, krizin, rutin, luteolin, kamferol, apigenin, miricetin, katehin, naringenin, galangin in kvercetin, dve pomembni fenolni kisline (slika 2) (kavno in cimetno kislino), derivat stilbena (resveratrol) in druge (Pasupuleti, Sammugam, Ramesh, Gan, 2017).

Slika 2: Od leve proti desni si sledijo p-kumarinska, ferulična in kavna kislina.



Propolis uporabljamo v naravni obliki ali v obliki izvlečkov, takega dodajamo v zdravila, dietetične pripravke, prehranska dopolnila ali kozmetične izdelke (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018). Pred ekstrakcijo je treba propolis ustrezno pripraviti. Odstraniti je treba grobe delce in odvečen vosek ter ga zdrobiti v manjše delce ali zmleti v prah. Kadar je propolis preveč lepljiv, ga ohladimo, zamrznemo ali pa povečamo stično površino propolisa s topilom tako, da ga mehansko preoblikujemo v tanke lističe ali trakove (Krell, 1996).

Namen ekstrakcije je odstraniti rastlinske sekundarne metabolite od nečistoč (na primer čebeljega voska) za analizo ali bioteste. Za

ekstrakcijo najpogosteje uporabljajo 70-odstotni etanol. Tako pripravljene izvlečke lahko posušimo za nadaljnjo uporabo. Obstajajo tudi številni alternativni ekstrakcijski postopki. Za biološke teste uporabljajo različna topila: metanol, različne etanolno-vodne mešanice (80-, 90- in 96-odstotne), glicerol, vodo, pa tudi dimetilsulfoksid (DMSO). V vodi je topne manj kot 10 odstotkov mase propolisa (Bankova, Bertelli, Borba, Conti in sod., 2016).

Za ekstrakcijo različnih bioaktivnih in drugih komponent propolisa uporabljajo različna topila, nekatera od njih so skupaj s snovmi, ki jih ekstrahiramo, zbrana v tabeli II.

Tabela II: Topila in komponente propolisa, ki jih določena topila ekstrahirajo (Wagh, 2013).

VODA	METANOL	ETANOL	KLOROFORM	DIKLOROMETAN	ETER	ACETON
antociani škrob čreslovine saponini terpenoidi polipeptidi lektini	antociani terpenoidi saponini čreslovine ksantoksilini totarol kvasinoidi laktoni flavoni fenoni polifenoli polipeptidi lektini	čreslovine polifenoli poliacetileni terpenoidi steroli alkaloidi	terpenoidi flavonoidi	terpenoidi čreslovine polifenoli poliacetileni steroli alkaloidi	alkaloidi terpenoidi kumarin maščobne kisline	flavonoli

Ob najpogosteje uporabljeni etanolni ekstrakciji in maceraciji so bili za trdne matrike razviti sodobni postopki za hitro in učinkovito ekstrakcijo organskih spojin z mikrovalovi (MAE) in ultrazvokom (UE). Z obema postopkoma je mogoče znatno skrajšati ekstrakcijski čas in povečati izkoristek ekstrakcije propolisa. Za fenolne spojine in flavonoide se je ekstrakcija z mikrovalovi pokazala kot zelo hitra ekstrakcijska metoda v primerjavi z maceracijo in ekstrakcijo z ultrazvokom, je pa zelo slabo selektivna, dodatno pa so se ekstrahirale tudi znatne količine voska, kar je nezaželeno. Poleg tega je daljše obsevanje z mikrovalovi povzročilo znižanje vsebnosti ekstrahiranih aktivnih sestavin, verjetno zaradi njihove razgradnje. Ekstrakcija z ultrazvokom se je pokazala kot najučinkovitejša, upoštevajoč izkoristek, kratek čas ekstrakcije (30 minut) ter visoko selektivnost (Trusheva, Trunkova, Bankova, 2007).

Za določanje kakovosti propolisa uporabljajo sledeče parametre: videz, barvo, vonj, okus, strukturo, koncentracijo in fizikalno-kemijske lastnosti (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018). Različne vrste propolisa imajo različno kemijsko sestavo, zato bi bilo treba oblikovati enotna merila za standardizacijo in nadzor kakovosti. Za posamezne vrste propolisa bi bilo smiselno določiti posebna merila glede na koncentracije bioaktivnih spojin oziroma sekundarnih metabolitov, ki jih določena vrsta vsebuje (Bankova, Bertelli, Borba, Conti in sod., 2016).

Po predlogu *Mednarodne komisije za med (International Honey Commission, IHC)* so merila kakovosti, ki naj se uporabljajo za vse vrste propolisa ne glede na rastlinski izvor in vsebnosti sekundarnih rastlinskih metabolitov, naslednji:

- količina snovi, ki se raztopi v 70-odstotnem etanolu (najmanj 45-odstotnem),
- vsebnost vode (največ 8 odstotkov),
- vsebnost voska (različne priporočene vrednosti),

- mehanske nečistoče (največ 6 odstotkov),
- vsebnost pepela (največ 5 odstotkov).

Za ločevanje in čiščenje propolisa uporabljajo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), tankoplastno kromatografijo (TLC) in plinsko kromatografijo (GC). Za določanje sestavin uporabljajo masno spektrometrijo (MS), jedrsko magnetno resonanco (NMR) in sklopljeno plinsko kromatografijo z masno selektivno detekcijo (GC-MS). GC-MS se uporablja za določanje kemijske sestave propolisa, za kontrolo kakovosti in standardizacijo propolisa. Za določanje kemijske sestave uporabljajo še tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (LC-MS). Masno spektrometrijo uporabljajo za ugotavljanje botaničnega izvora in sestave propolisa. Jedrska magnetna resonanca (NMR) s primarno obdelavo podatkov in statističnimi metodami je uveljavljena metoda za preučevanje propolisa, saj omogoča razvoj dovolj učinkovitih modelov za klasifikacijo propolisa. Najboljši rezultati so običajno pridobljeni z ^1H NMR. Za analizo mineralov najpogosteje uporabljajo elektrotermično atomsko absorpcijsko spektroskopijo (ET-AAS) ali plazemske tehnike (ICP-OES ali ICP-MS) (Puc, Kožar, Treven, Korošec, 2018).

Kontaminanti, ki jih najdemo v propolisu, so predvsem ostanki pesticidov in snovi, ki se pri čebelarjenju uporabljajo za tretiranje čebel: antibiotiki, akaricidi (sredstva za zatiranje pršic) in podobno (Elflein, 2018). Mejna vrednost ostankov (MVO) je določena v *Evropski farmakopeji*. Tabela III prikazuje najpogostejše neželene skupine onesnažil v propolisu, ob tem pa so navedene še analzne metode, ki jih uporabljamo za določanje. Pripisane so tudi meje določljivosti za posamezno metodo.

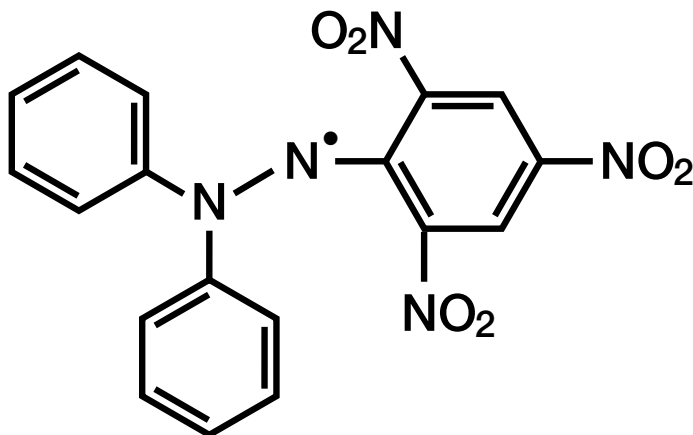
Tabela III: Analizne metode, ki jih uporabljamo za določanje neželenih skupin onesnažil v propolisu (Elflein, 2018).

NEŽELENE SKUPINE ONESNAŽIL	ANALIZNE METODE	MEJA DOLOČLJIVOSTI (LOQ)
pesticidi, repelenti, akaricidi, druge snovi za tretiranje čebel	GC-MS/MS, LC-MS/MS	< 0,01 mg/kg (10 µg/kg)
antibiotiki	LC-MS/MS, LC-HRMS	< 2 µg/kg (neobjavljeno) < 0,1 do 0,5 µg/kg (prepovedano)
pirolizidin alkaloidi	LC-MS/MS	< 1 µg/kg
GMO	PCR	0,01 %
alergeni	PCR, ELISA, MALDI-TOF	Od 0,01 do 0,3 %
težke kovine	ICP-MS, ICP-OES, ET-AAS	Od 0,001 do 0,01 mg/kg

Antioksidativni učinek propolisa je pogojen predvsem s prisotnostjo fenolnih kislin (rožmarinske, klorogenske, kavne in ferulične kisline) in fenolnega aldehida vanilina, drugi viri navajajo tudi hidroksicimetne kisline in njihove estre, fenetil ester kavne kisline, ester cimetne kisline ter flavonoide (kampferol, kvercetin, galangin, tektokrizin, genkvanin, 5-hidroksi-4,7-dimetoksiflavon, piloin in pinostrobin halkon) (Puc, Kožar,

Treven, Korošec, 2018; Alič Kavčič, 2016; Zilius, Ramanauskien, Briedis, 2013). Fenolne spojine prekinajo verižne reakcije lipidov, zavirajo kemiluminescenčne reakcije, lovijo različne reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in tako naprej (Fonseca in sod, 2011).

Fenolne kisline v propolisu so soodgovorne za antioksidativno delovanje zaradi hidroksilnih skupin (na primer ene v kuma-

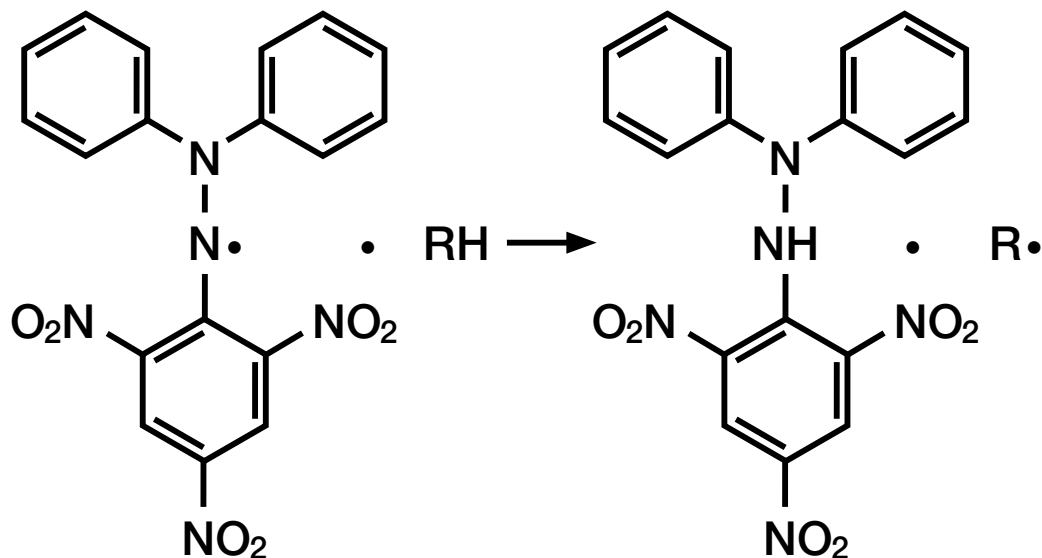
Slika 3: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH•).

rinski in ferulični ter dveh v kavni kislini, slika 2). V raziskavah neetanolnih izvlečkov (Kubiliene in sod., 2015) (vodnega izvlečka brazilskega in tuškega propolisa) so ti izkazovali zmožnost lovljenja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH•), H_2O_2 , $O\cdot$ in $\cdot OH$ radikalov. DPPH• je stabilen radikal, ki lahko reagira s spojinami, ki donirajo vodikov atom (slika 3).

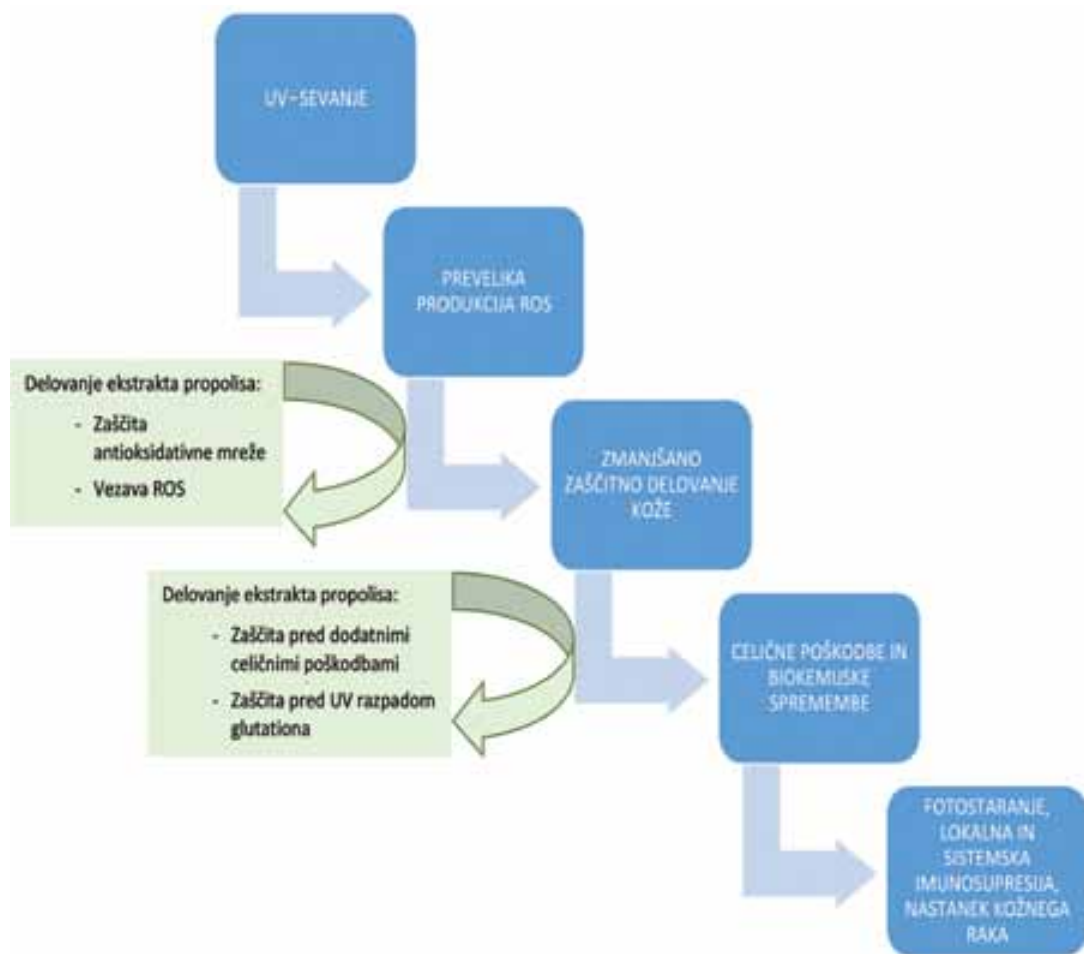
Delovanje ekstrakta propolisa:

- zaščita pred dodatnimi celičnimi poškodbami,
- zaščita pred ultravijoličnim razpadom glutaciona,
- različno pripravljene izvlečki propolisa se razlikujejo glede zmožnosti vezave DPPH-radikalov, vodni izvlečki pa so pokazali višjo antioksidantno aktivnost kot etanolni izvlečki (slika 4) (Bankova, Bertelli, Borba, Conti in sod., 2016).

Zaradi protimikrobnih, protiglivičnih in antioksidantnih lastnosti propolis pogosto uporabljajo v kozmetičnih izdelkih, na primer v šamponih, ustnih vodah in zobnih pastah, kremah, balzamih za ustnice in ostalih izdelkih, kjer je bil iz propolisa predhodno odstranjen vosek (Wagh, 2013). Številna poročila o propolisu dokazujejo širok spekter njegovega protibakterijskega delovanja. Pripisujejo ga: pinocembrinu, galanginu, pinobanksinu, pinobanksin-3-acetatu, p-kumarinski kislini in estrom kavne kisline (Alič Kavčič, 2016). Poleg že naštetih lastnosti propolis deluje proti prhljaju in gubam, ugodno deluje na lase, uporablja se kot tonik, dezinficent (razkužilo), konzervans, deodorant in zaščita pred ultravijoličnimi žarki (Krell, 1996). V raziskavah je bilo ugotovljeno, da ferulična kislina, ki se nahaja v propolisu, omogoči stabilizacijo vitamina C in prepreči njegovo oksidacijo (Ingredients To Die For a Aroma Alternatives® Ltd. Co., 2019).



Slika 4: DPPH• se ob vezavi z radikalom razbarva, kar lahko analiziramo spektrofotometrično.



Slika 5: Mesta, kjer bi propolis potencialno zaustavil negativne vplive UVB-sevanja.

V kozmetiki se uporabnost polifenolov povečuje, saj jim pripisujemo interakcije z elektromagnetnim valovanjem, ki zmanjšajo vpliv ultravijoličnega sevanja na kožo. Zavrhalno delujejo na vnetne procese, oksidativni stres in poškodbe DNA (slika 5) (Gregoris in sod., 2010).

Na antioksidativno učinkovitost najbolj vpliva prisotnost kavne kisline in njenega derivata galangina. Drugi derivati so

prav tako dobri antioksidanti, a so prisotni v zelo nizkih koncentracijah. Pripravek za zaščito pred soncem bi moral vsebovati do 4 odstotke kavne kisline, da bi dosegel zaščitni faktor 20 (komercialno uporabljeni ultravijolični filter tinosorb S mora biti za doseganje enake vrednosti zaščitnega faktorja v izdelku prisoten v 10 odstotkih) (Gregoris in sod., 2010).

Slovarček:

DMSO. Dimetilsulfoksid je organožveplova spojina s kemijsko formulo C₂H₆OS.

HNMR. Protonska nuklearna magnetna resonanca je spektroskopska metoda za določanje strukture, ki izkorišča magnetne lastnosti vodikovih jeder v molekulah.

Maceracija. Tehnološki postopek, ki omogoča podaljšani stik vzorca - propolisa z izbranim topilom, kar je posebej pomembno za povišanje izkoristka ekstrakcij.

MAE. Ekstrakcija z mikrovalovi je postopek uporabe mikrovalov za segrevanje topil, kar olajša prehajanje komponent iz vzorca – propolisa - v topilo.

Mednarodna komisija za med (International Honey Commission, IHC). Ustanovljena je bila leta 1990. Z njo so želeli ustvariti novi svetovni standard o medu. Leta 1997 so prvič izšle harmonizirane metode Mednarodne komisije za med.

MVO. Mejna vrednost ostankov je največja količina snovi, ki lahko ostane v živilih, ko se snov uporablja v skladu z navodili za uporabo, in ne vpliva na zdravje ljudi.

ROS. Reaktivne kisikove zvrsti so zelo reaktivne spojine, ki v svoji kemijski strukturi vsebujejo kisik. Imajo pomembno vlogo v celičnem signaliziranju in obrambnih mehanizmih proti škodljivim mikroorganizmom, v previsokih koncentracijah pa povzročajo oksidativni stres.

SPF. »Sun protection factor« oziroma zaščitni faktor je relativno merilo za čas, ko nas varovalni pripravek za sončenje še varuje pred UVB-žarki.

UE. Ultrazvočna ekstrakcija (tudi ekstrakcija z ultrazvokom) je metoda, ki jo ponavadi uporabljajo za ekstrakcijo iz trdnih vzorcev (trdna-tekoča ekstrakcija). Na izkoristek ekstrakcije vpliva več spremenljivk (ultrazvočna moč, frekvenca, temperatura, lastnosti reaktorja in interakcije med topilom in vzorcem).

Literatura:

Alič Kavčič, S., 2016: *Protimikrobno delovanje etanolnih ekstraktov propolisa. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.*
Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., in sod., 2016: *Standard methods for Apis mellifera propolis research. Journal of Apicultural Research, 58 (2): 1-49.*

Elflein, L., 2018: *Safety of Bee Products. Apifuture Symposium 2018. (Izročki.)*

Fonseca, Y. M., in sod., 2011: *Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV- Induced Oxidative Stress. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011: 8.*

Gregoris, E., in sod., 2010: *Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. International Journal of Pharmaceutics, 405: 97-101.*

Ingredients To Die For a Aroma Alternatives® Ltd. Co., 2019: *ingredientsstodiefor.com. (Spletni medij.) Dostopno na: <https://bit.ly/30xsCoK>. (28. 4. 2019.)*
International Honey Commission [spletni medij]. Dostopno na: <http://www.ihc-platform.net/>. (25. 4. 2019.)

Krell, R., 1996: *Value-added products from beekeeping. Fao Agricultural Services Bulletin No. 124. (Spletni medij.) Dostopno na: <https://bit.ly/2HNlxId>. (25. 4. 2019.)*

Kubiliene, L., in sod., 2015: *Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15.*

Marcucci, M. C., 1995: *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26 (2): 83-99. (Spletni medij.) Dostopno na: <https://bit.ly/2A54xKC>. (25. 4. 2019.)*

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S. H., 2017: *Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017: 1259510.*

Puc, M., Kožar, J., Treven, K., Korošec, M., 2018: *Propolis v prehranskih dopolnilih. (Vrsta medija.) Ljubljana: Covirias. Dostopno na: <https://bit.ly/2Eu6vGr>. (25. 4. 2019.)*

Špental, A., 2014: *Literaturni pregled in analiza podatkov o prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo čebelje proizvode na slovenskem tržišču. Magistrsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.*

Šumenjak, M. M., 2011. *Čebela se predstavi. Učbenik za ljubitelje čebel. (e-knjiga). 3. izdaja. Ljubljana: Čebelarska zveza Slovenije. Dostopno na: <https://bit.ly/2K2iqPh>. (30. 4. 2019.)*

Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., 2007: *Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study. Chemistry Central Journal, 1 :13.*

Zilius, M., Ramanauskien, K., Briedis, V., 2013: *Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin In Vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.*

Wagb, V. D., 2013: *Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. Advances in Pharmacological Sciences, 2013: 308249.*