

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Dobór warunków procesu ekstrakcji kwasów fenolowych z produktów pszczelich

RENATA ŚWISŁOCKA<sup>1,2</sup>, JOLANTA PIEKUT<sup>1</sup>, WŁODZIMIERZ LEWANDOWSKI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA,  
ZAKŁAD CHEMII

<sup>2</sup> PAŃSTWOWA WYŻSZA SZKOŁA INFORMATYKI I PRZEDSIĘBIORCZOŚCI W ŁOMŻY,  
INSTYTUT TECHNOLOGII ŻYWNOSCI I GASTRONOMII

**Słowa kluczowe:** ekstrakcja, kwasy fenolowe, produkty pszczele, SPE, TLC

#### STRESZCZENIE

W pracy podjęto próby analizy jakościowej wybranych produktów pszczelich pod względem zawartości kwasów fenolowych. Są one bogatym źródłem naturalnych związków biologicznie czynnych, których właściwości profilaktyczne i lecznicze uwarunkowane są m.in. przez aktywność przeciwutleniającą. Celem niniejszej pracy była analiza miodu, pyłku kwiatowego, pierzgi oraz propolisu z wykorzystaniem technik chromatograficznych (TLC i SPE) do oceny zawartości fenolokwasów. Dobrano optymalne warunki rozdziału kwasów fenolowych. W badanych produktach pszczelich wyizolowano i zidentyfikowano kwasy: cynamonowy, galusowy, anyżowy, ferulowy, gentyzynowy, syryngowy, kawowy, waniliny oraz p-kumarowy.

#### Optimization of experimental conditions for the extraction of phenolic acids from bee products

**Keywords:** extraction, phenolic acids, bee products, SPE, TLC

#### ABSTRACT

In this work attempts were made to establish the optimal conditions for qualitative analysis of chosen bee products, in terms of content of phenolic acids. The bee products are a rich source of biologically active natural compounds the preventive and therapeutic properties of which are determined *inter alia* by their antioxidant activity. The aim of this study was to analyze the honey, pollen, bee bread and propolis using chromatographic methods (TLC and SPE) in order to evaluate the phenolic content. The optimum separation conditions for phenolic acids were selected. In the studied bee products the following acids were isolated and identified: cinnamic, gallic, anisic, ferulic, gentisic, syringic, caffeic, vanillic and p-coumaric acids.

## 1. WPROWADZENIE

Chemia produktów naturalnych od dawna cieszy się dużym zainteresowaniem środowisk naukowych. Dowodzi tego fakt, że około 60% leków przeciwnowotworowych i 75% leków przeciwzapalnych jest pochodzenia naturalnego [1]. Również obecnie stosowane konserwanty, które bazują na syntetycznych związkach chemicznych, należy zastąpić substancjami przyjaznymi dla człowieka i środowiska. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad związkami chemicznymi występującymi naturalnie, np. w ekstraktach roślinnych czy w olejkach eterycznych, jako potencjalnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi [2]. Substancjami, które w dużym stopniu decydują o aktywności biologicznej wyciągów roślinnych, są związki fenolowe. Do tej grupy związków należą: hydrokso- i metoksypochoodne kwasu benzoowego, hydrokso- i metoksypochoodne kwasu cynamonowego, kumaryny i furanokumaryny, flawonoidy, benzochinony i naftochinony, garbniki hydrolizujące i skondensowane. Związki fenolowe występują głównie jako hydroksylowe pochodne aromatycznych kwasów: benzoowego, fenylooctowego i fenylopropionowego. Najczęściej spotykane w roślinach są kwasy: *p*-hydroksybenzoowy, salicylowy, protocatecholowy, gentyzynowy, chinonowy, galusowy, orselinowy, szikimowy, wanilinowy, syringowy, *o*- i *p*-hydroksyfenylooctowy, *o*- i *p*-kumarowy, ferulowy, synapinowy, kawowy, preferowy, choryzmowy, chlorogenowy, elagowy i diferulowy. Rośliny są szczególnie wyspecjalizowane w syntezie związków aromatycznych. Z pośrednich produktów syntezy aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny i tyrozyny) pochodzą związki fenolowe. Organizmy zwierzęce są znacznie uboższe w te substancje, gdyż nie potrafią syntetyzować pierścienia aromatycznego, a właśnie z tych pośrednich produktów syntezy aminokwasów aromatycznych powstają różne polifenole [3-5]. Aktywność biologiczna związków polifenolowych wynika w dużej mierze z ich działania antyoksydacyjnego, które w znacznym stopniu opiera się na zmiataniu wolnych rodników, a także przerywaniu reakcji wolnorodnikowych.

W analizie związków fenolowych pochodzących z surowców roślinnych pierwszym, bardzo istotnym etapem jest odpowiednie przygotowanie próbek do analiz [6]. Szczególne znaczenie ma

właściwe przeprowadzenie tego procesu z zachowaniem optymalnych warunków chroniących wyjątkowo labilne związki fenolowe przed degradacją, a także uniemożliwiających w jak największym stopniu ich przejście z fazy stałej do ciekłej. Proces ten polega na wyodrębnieniu badanych związków ze złożonej mieszaniny różnorodnych substancji rozmieszczonych w poszczególnych częściach tkanek stałego produktu. W przypadku ciekłych produktów jak soki, często wystarczające jest tylko odpowiednie rozcieńczenie próbki. W materiale roślinnym związki fenolowe zawarte w wakuolach i ścianach komórkowych często są związane z innymi składnikami, jak białka i polisacharydy. Przed oznaczeniem należy je uwolnić z tkanek poprzez rozdrobnienie i rozpuszczenie w fazie ciekłej. W tym procesie należy także uwzględnić ochronę związków fenolowych przed ich utlenianiem przez enzymy obecne w badanym surowcu oraz tlen atmosferyczny, poprzez dodanie przeciwutleniaczy lub stosowanie atmosfery gazów obojętnych [7]. Związki fenolowe należy chronić przed izomeryzacją wywołaną przez promienie świetlne oraz hydrolizą chemiczną i enzymatyczną.

Na skuteczność procesu ekstrakcji mają wpływ: rodzaj rozpuszczalnika, pH, temperatura, krotkość ekstrakcji, ilość rozpuszczalnika oraz stan rozdrobnienia materiału badawczego. Dobór odpowiednich rozpuszczalników uwarunkowany jest różnorodnością związków występujących w próbach pochodzenia roślinnego oraz odmienną rozpuszczalnością różnych grup związków fenolowych w rozpuszczalnikach. Najczęściej używanym rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym jest metanol i jego roztwory wodne o różnym stężeniu. Używane są również rozpuszczalniki takie jak: aceton, octan etylu, acetonitryl oraz inne; często jest to ekstrakcja z małą wydajnością [8, 9]. Wartości pH mieszaniny ekstrakcyjnej mogą być różne i zależą od rodzaju związków oraz ich stabilności i rozpuszczalności w użytym rozpuszczalniku. Wzrost temperatury roztworu ekstrakcyjnego zwiększa skuteczność ekstrakcji. Błony komórkowe stają się bardziej rozpuszczalne, wzrasta współczynnik dyfuzji, obniża się lepkość rozpuszczalnika, lepsze są efekty procesu filtracji i sedymentacji cząstek stałych. Podwyższenie temperatury powyżej 25°C może powodować dezaktywację związków fenolowych. Jedynie w przypadku flawanonów zalecane jest ogrzewanie przez 15 minut mieszaniny

ekstrakcyjnej z metanolem do temperatury 55°C. W tych warunkach podwyższa się rozpuszczalność hesperydyny [10].

Do przygotowania próbek zawierających związki fenolowe stosowany jest rozdział poszczególnych frakcji na kolumnkach SPE (solid phase extraction) w fazie ciecz-ciało stałe. Technika ta polega na selektywnym adsorbowaniu (na odpowiedniej fazie stałej) związków fenolowych z wyciągów wodnych. Możliwe jest również frakcjonowanie, oczyszczanie oraz zatężanie tych związków. Ekstrakcja w fazie ciecz-ciało stałe (SPE) jest około dwukrotnie szybsza, łatwiejsza i tańsza w porównaniu z ekstrakcją ciecz-ciecz oraz pozwala na znaczne ograniczenie zużycia rozpuszczalników. Stosowana jest do ekstrakcji związków fenolowych z produktów płynnych oraz jako metoda uzupełniająca podczas ekstrakcji tych związków z produktów stałych [11].

W pracy podjęto próby analizy jakościowej wybranych produktów pszczelich pod względem zawartości kwasów fenolowych. Są one bogatym źródłem naturalnych związków biologicznie czynnych, których właściwości profilaktyczne i lecznicze uwarunkowane są m.in. przez aktywność przeciwutleniającą. Zawartość tych związków zależy od wielu czynników, takich jak pochodzenie botaniczne, czynniki środowiskowe i klimatyczne, a także od procesu pozyskiwania miodu i innych produktów pszczelich [12]. Doniesienia naukowe nie dają jednoznacznej odpowiedzi od czego zależy aktywność antyoksydacyjna produktów pszczelich. Jedną z przyczyn tego stanu jest różnorodność metod stosowanych do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej oraz brak ich standaryzacji. Celem pracy była analiza wybranych produktów pszczelich (miodu, pyłku kwiatowego, pierzgi oraz propolisu) z wykorzystaniem technik chromatograficznych (SPE i TLC) do oceny zawartości fenolokwasów.

## 2. METODYKA

Bogatym, skoncentrowanym źródłem związków fenolowych są produkty pszczele takie jak miód, propolis czy pyłek kwiatowy w postaci obnóży pszczelich oraz pierzga. Są to produkty naturalne, nieprzetworzone, wytwarzane przez pszczoły. Głównymi składnikami tych produktów są substancje pochodzenia roślinnego. W związku z powyższym celem jest zatem prowadzenie badań, które pozwolą na wyselekcjonowanie odpowied-

nych frakcji z produktów pszczelich, zawierających znaczne ilości związków fenolowych.

Materiał do badań stanowiły miody pszczele nektarowe rzepakowy, mniszkowy, akacjowy, lipowy, lawendowy, kasztanowy, wrzosowy, eukaliptusowy, gryczany miód, miód spadziowy, nektarowo-spadziowy, miód sztuczny, pyłek kwiatowy, propolis oraz pierzga. Ekstrakcja kwasów fenolowych z miodów prowadzona była w środowisku wodnym, wodno-alkoholowym, alkoholowym i eterowym, a z propolisu – w roztworach alkoholowych. Natomiast ekstrakcja tych związków z obnóży pszczelich i pierzgi wymagała technik łączonych ze względu na obecność podwójnej otoczki celulozowej (intyny i egzyny) w ziarnach pyłku kwiatowego. Produkty pszczele były pozyskiwane bezpośrednio od pszczelarzy z regionu północno-wschodniej Polski.

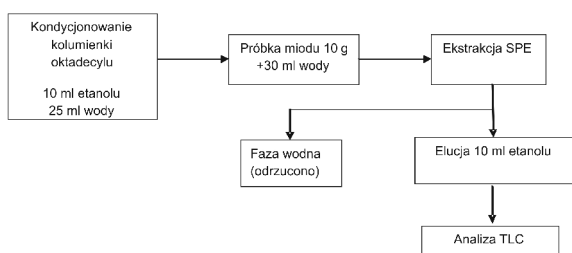
### 2.1 Przygotowanie wzorców kwasów fenolowych

Jako wzorce wykorzystano kwasy fenolowe występujące w największej ilości w produktach pszczelich, mianowicie: cynamonowy, galusowy, anyżowy, ferulowy, gentyzynowy, syringowy, kawowy, wanilinowy, p-kumarowy. Odważono po 0,5 g kwasów i rozpuszczono w 150 µl etanolu lub metanolu. Przygotowane roztwory nanoszono na płytki TLC i wyznaczono współczynnik  $R_f$ .

### 2.2 Ekstrakcja kwasów fenolowych z miodów

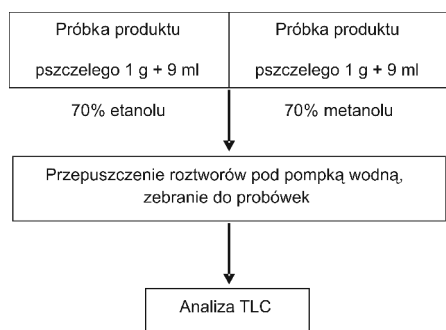
Ekstrakcję kwasów fenolowych z produktów pszczelich opisano na rysunkach 1-3. W celu wyekstrahowania kwasów fenolowych z próbek wykorzystano metodę opartą na ekstrakcji na nośniku stałym – SPE (z ang. *Solid Phase Extraction*) z użyciem kolumniek octadecylowych C18. W celu ich aktywowania przeprowadzono kondycjonowanie kolumniek, przepuszczając odpowiednio 10 ml etanolu oraz 25 ml wody dejonizowanej. Na tak przygotowane kolumniki nanoszono roztwory miodów. Po całkowitym przesączeniu próbek kolumniki przemyto 20 ml wody dejonizowanej. Zaabsorbowane na fazie stałej związki fenolowe wymywano 10 ml etanolu. Eluent etanolowy przenoszono do wyparki w celu odparowania etanolu, tak aby końcowa objętość próby wynosiła ok. 1 ml. Tak przygotowane próby nanoszono na płytki TLC (po 5 µl) za pomocą mikropipety i wstawiano do komory chromatograficznej wypełnionej wybraną fazą ruchomą. Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramy umieszczano pod lampą UV ( $\lambda=254$  i  $\lambda=366$  nm)

zaznaczając fluoryzujące plamy. Identyfikację fenolokwasów prowadzono porównując współczynniki  $R_f$  substancji zawartych w analizowanych próbkach z wartościami współczynników opóźnienia substancji wzorcowych.



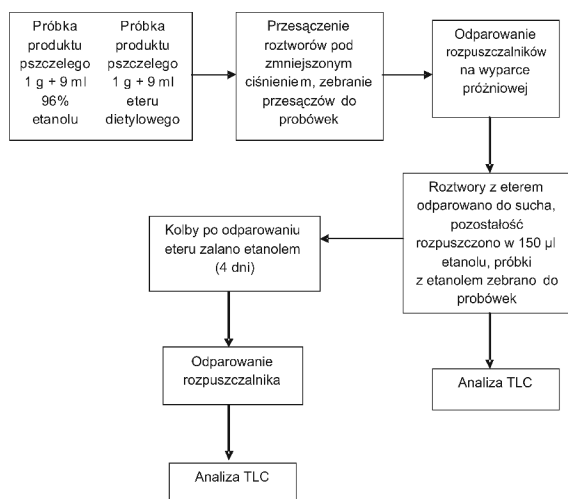
**Rysunek 1** Schemat ekstrakcji miodów (rozpuszczonych w wodzie) metodą SPE

**Figure 1** Diagram of water dissolved honey extraction by SPE



**Rysunek 2** Schemat przygotowania próbek produktów pszczelego do analizy TLC po ekstrakcji 70% etanolem, 70% metanolem

**Figure 2** Diagram of sample preparation TLC for analysis of bee products after extraction with 70% ethanol, 70% methanol



**Rysunek 3** Schemat przygotowania próbek produktów pszczelego do analizy TLC po ekstrakcji 96% etanolem i eterem dietylowym

**Figure 3** Diagram of sample preparation for TLC analysis of bee products after extraction with 96% ethanol and diethyl ether

### 3. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Ekstrakcja związków fenolowych z miodów prowadzona była w układzie ciecz-ciecz oraz ciecz-ciało stałe (SPE). Analizę jakościową obecności kwasów fenolowych w niniejszej pracy wykonano dla produktów pszczelich. Badania wykonano stosując klasyczną chromatografię cienkowarstwową TLC. Badania TLC prowadzono na płytkach (20x20 cm) pokrytych tlenkiem glinu 60 F<sub>254</sub> oraz żelazem krzemionkowym 60 F<sub>254</sub> w komorach pionowych. Do rozdzielania chromatograficznego zastosowano 8 układów rozwijających zestawionych w Tabeli 1.

Przeprowadzone badania miały na celu dobór fazy ruchomej, która rozdzieliłaby fenolokwasy, a następnie można byłoby zastosować ją w analizie produktów pszczelich. Kwasy fenolowe stanowią grupę składników czynnych powszechnie występujących w świecie roślinnym. Związki fenolowe jako antyoksydanty zapobiegają wielu groźnym chorobom (m.in. chorobie wieńcowej, miażdżycy, zawałowi serca, a także zapaleniu stawów), w rozwoju których istotną rolę odgrywa nadmiar aktywnych form tlenu oraz wolnych rodników [14]. Badania TLC prowadzono na płytkach pokrytych tlenkiem glinu Al60 GF<sub>254</sub> oraz na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 GF<sub>254</sub>. Na podstawie analizy literatury wybrano 6 układów rozwijających, z których faza ruchoma toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (5:4:1 v/v/v) została zmodyfikowana na potrzeby przeprowadzanych badań. Spośród ośmiu testowanych faz ruchomych (Tab. 1) najlepsze wyniki rozdzielania otrzymano dla układu Al60 GF<sub>254</sub> (heksan: toluen: octan etylu: kwas mrówkowy, 2,5:2,5:0,5; v/v/v/v).

Jakościowa analiza chromatograficzna produktów pszczelich wykazała obecność kwasów: cynamonowego, galusowego, anyżowego, ferulowego, gentyzynowego, syringowego, kawowego, wanilinowego oraz p-kumarowego. Występowanie wszystkich kwasów jednocześnie odnotowano w trzech miodach: gryczanym (3), lipowym (3) oraz wielokwiatowym (4). W wyniku przeprowadzonych badań nie zaobserwowano obecności żadnego z powyższych kwasów w miodzie leśnym (2), rzepakowym (2) oraz sztucznym. W większej ilości miodów występują kwasy: p-kumarowy oraz syringowy. Natomiast w niewielu odmianach miodu stwierdzono obecność kwasu galusowego (Tab. 2).

**Tabela 1** Zestawienie współczynników opóźnienia poszczególnych kwasów fenolowych w określonych fazach ruchomych

**Table 1** Summary of the retardation factors of individual phenolic acids at each mobile phase

Nr fazy	kwasy faza	anyżowy	cynamonowy	ferulowy	galusowy	gentyzynowy	kawowy	p-kumarowy	syryngowy	wanilinowy
2	toluen: acetonitryl (5:5) <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	toluen: acetonitryl: kwas mrówkowy (5:4:1) <sup>2</sup>	0,58	0,65	0,53	0,31	0,53	0,53	0,56	0,53	0,56
4	metanol: woda: kwas octowy (20:12,5:1) <sup>2</sup>	0,62	0,64	0,69	0,37	0,24	0,40	0,63	0,67	0,57
5	benzen: metanol: kwas octowy (48:8:4) <sup>2</sup>	0,43	0,4	0,4	0,09	0,15	0,17	0,29	0,39	0,39
6	toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (5:4:1) <sup>2</sup>	0,62	0,69	0,57	0,32	0,55	0,60	0,62	0,57	0,56
7	toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (3:5:2) <sup>3</sup>	0,85	0,91	0,84	0,67	0,82	0,80	0,82	0,82	0,82
8	toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (5:2:0,5) <sup>3</sup> płytką pokrytą tlenkiem glinu	0,45	0,59	0,40	0,19	0,36	0,32	0,41	0,39	0,39
8a	toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (5:2:0,5) <sup>3</sup> płytką pokrytą żelalem krzemionkowym	0,57	0,62	0,42	0,17	0,35	0,27	0,39	0,36	0,42

<sup>1</sup>[13], <sup>2</sup>[14], <sup>3</sup>modyfikacje fazy 6

**Tabela 2** Występowanie kwasów fenolowych w miodach (faza ruchoma nr 1)

**Table 2** The contents of phenolic acids in honeys (mobile phase No. 1)

Kwas Odmiana miodu	anyżowy	cynamonowy	ferulowy	galusowy	gentyzynowy	kawowy	p-kumarowy	syryngowy	wanilinowy
akacyjny (2)							+	+	
eukaliptusowy	+	+	+		+	+	+	+	+
gryczany (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
gryczany (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
gryczany (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
kasztanowy					+	+	+	+	
lawendowy					+	+	+	+	
leśny (1)	+	+	+				+	+	+
leśny (2)									
lipowy (1)	+	+	+		+	+	+	+	+

lipowy (2)	+	+	+				+	+	+
lipowy (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mniszkowy	+	+	+				+	+	+
nektarowo-spadziowy (1)	+	+	+				+	+	+
nektarowo-spadziowy (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
rzepakowy (1)	+	+	+				+	+	+
rzepakowy (2)									
spadziowy	+	+	+		+	+	+	+	+
sztuczny									
wielokwiatowy (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
wielokwiatowy (2)							+	+	
wielokwiatowy (3)	+	+	+		+	+	+	+	+
wielokwiatowy (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
wielokwiatowy (5)	+	+	+		+	+	+	+	+
wrzosowy	+	+	+		+	+	+	+	+
ze spadzi iglastej							+	+	

+obecność kwasu w danym miodzie

**Tabela 3** Występowanie kwasów fenolowych w miodach (faza ruchoma nr 8)

**Table 3** The contents of phenolic acids in honeys (mobile phase No. 8)

Kwas	Miody								
	anyżowy	cynamonowy	ferulowy	galusowy	gentyzynowy	kawowy	p-kumarowy	syryngowy	wanilinowy
akacjowy (1)	+		+	+	+	+	+	+	+
akacjowy (2)					+	+		+	+
eukaliptusowy	+		+				+		
gryczany (1)					+	+		+	+
gryczany (2)					+	+		+	+
gryczany (3)	+		+	+	+	+	+	+	+
kasztanowy				+	+	+		+	+
lawendowy					+	+		+	+
leśny (1)				+	+	+		+	+
leśny (2)				+	+	+		+	+
lipowy (1)	+		+	+	+	+	+	+	+
lipowy (2)	+		+	+	+	+	+	+	+
lipowy (3)	+		+	+	+	+	+	+	+
mniszkowy	+	+	+		+	+	+	+	+
nektarowo-spadziowy (1)	+		+	+	+	+	+	+	+
nektarowo-spadziowy (2)	+		+		+	+	+	+	+
rzepakowy (1)	+		+		+	+	+	+	+
rzepakowy (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
spadziowy	+		+		+	+	+	+	+
sztuczny									
wielokwiatowy (1)					+	+		+	+
wielokwiatowy (2)					+	+		+	+
wielokwiatowy (3)				+	+	+		+	+
wielokwiatowy (4)	+		+	+	+	+	+	+	+
wielokwiatowy (5)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
wrzosowy	+		+	+	+	+	+	+	+
ze spadzi iglastej	+		+		+	+	+	+	+

+obecność kwasu w danym miodzie

**Tabela 4** Występowanie kwasów fenolowych w produktach pszczelich

**Table 4** The contents of phenolic acids in bee products

Kwasy Produkty pszczele	anyżowy	cynamonowy	ferulowy	galusowy	gentyzynowy	kawowy	p-kumarowy	syryngowy	wanilinowy
	Produkty pszczele ekstrahowane 70% metanolem (faza nr 1)								
Pierzga (1)				+					
Propolis (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% etanolem (faza nr 1)									
Pyłek kwiatowy (1)						+			
Ekstrakt propolisowy w etanolu	+	+	+		+		+	+	+
Pierzga (1)				+					
Produkty pszczele ekstrahowane 96% etanolem (faza nr 1)									
Pyłek kwiatowy (2)				+					
Pierzga (1)				+					
Pierzga (2)				+					
Propolis (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele rozpuszczone w eterze, ekstrahowane 96% etanolem (faza nr 1)									
Pierzga (2)	+	+	+				+	+	+
Propolis (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% metanolem (faza nr 6)									
Pyłek kwiatowy (1)	+					+	+		
Pyłek kwiatowy (2)	+		+		+	+	+	+	+
Pierzga (1)	+		+		+	+	+	+	+
Pierzga (2)			+		+	+	+	+	+
Propolis (1)		+	+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% etanolem (faza nr 6)									
Pyłek kwiatowy (1)			+		+	+		+	+
Pyłek kwiatowy (2)			+		+	+		+	+
Pierzga (1)			+	+	+	+		+	+
Pierzga (2)				+					
Propolis (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% metanolem (faza nr 7)									
Pyłek kwiatowy (1)	+		+		+	+	+	+	+
Pierzga (1)	+		+		+		+	+	+
Propolis (1)	+		+		+		+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% etanolem (faza nr 7)									
Pierzga (1)	+		+		+	+	+	+	+
Ekstrakt propolisowy w etanolu	+	+	+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 70% etanolem (faza nr 8)									
Propolis (1)			+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+		+		+	+	+	+	+
Produkty pszczele ekstrahowane 96% etanolem (faza nr 8)									
Propolis (1)	+	+	+		+	+	+	+	+
Propolis (2)	+	+	+		+	+	+	+	+

+obecność kwasu w danym miodzie

W Tabeli 3 zestawiono analizę miodów pod względem występowania kwasów fenolowych (do rozdziału chromatograficznego zastosowano fazę ruchomą nr 8). Obecność wszystkich kwasów wykazano tylko w miodzie wielokwiatowym (5). W dziesięciu miodach stwierdzono występowanie ośmiu na dziewięć analizowanych fenolokwasów. Kwasy gentyzynowy, kawowy, syringowy oraz wanilinowy znajdują się w sześciu miodach. W przeciwieństwie do fazy nr 1, obecność kwasu galusowego stwierdzono w trzynastu miodach. W miodzie eukaliptusowym oznaczono tylko trzy kwasy: anyżowy, ferulowy oraz p-kumarowy.

Głównymi fenolokwasami zidentyfikowanymi przez Yao i wsp. [13] w miodach australijskich były kwasy: galusowy, chlorogenowy, ferulowy, kawowy, kumarowy. Kwasy te występowały w różnych ilościach, w zależności od odmiany miodu. W miodach pochodzących z Nowej Zelandii stwierdzono obecność kwasu cynamonowego, benzoowego, wanilinowego i hydroksyl benzoowego, przy czym najwięcej fenolokwasów zawierał miód wrzosowy. Porównując wyniki uzyskane w niniejszej pracy z danymi literaturowymi zauważyć można, że analizowany miód lawendowy charakteryzuje się zdecydowanie mniejszą ilością kwasów fenolowych. Andrade i wsp. [15] w miodzie portugalskim lawendowym wykryli i oznaczyli jedenaście kwasów fenolowych, w tym kwas galusowy. Natomiast w przeprowadzonych badaniach tego kwasu nie oznaczono.

Poza miodami w pracy podjęto również próby analizy jakościowej kwasów fenolowych z innych produktów pszczelich. Badaniom poddano pyłek kwiatowy, pierzgę oraz propolis. Produkty te ekstrahowane były 70% etanolem, 70% metanolem, 96% etanolem oraz eterem dietylowym. Z otrzymanych wyników można wywnioskować, że w pyłku kwiatowym oraz pierdze występują związki fenolowe, które znajdują się wewnątrz ziarna pyłku, co ograniczało identyfikację kwasów fenolowych. Natomiast w propolisie analiza ta przebiegała bez większych problemów. W badaniach dotyczących pierzgi oraz pyłku kwiatowego można zaobserwować obecność kwasów galusowego, niekiedy anyżowego, cynamonowego, p-kumarowego, syringowego oraz wanilinowego, natomiast w przypadku propolisu można wyróżnić obecność wszystkich analizowanych kwasów fenolowych prócz galusowego. W Tabeli 4 przedstawiono występowanie określonego kwasu w danym produkcie pszczelim. Badania miały również

na celu dobór odpowiedniego ekstrahenta. W tym celu próbki ekstrahowano metanolem, etanolem, eterem dietylowym oraz DMSO (dimetylosulfotlenkiem). Na podstawie analizy wyników stwierdzono, że DMSO nie nadaje się do ekstrakcji kwasów fenolowych.

#### 4. WNIOSKI

Przeprowadzone badania własne oraz analiza otrzymanych wyników pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Pochodzenie, odmiana oraz gatunek miodu mają istotny wpływ na różnorodność kwasów fenolowych w nim występujących.
2. Spośród dziewięciu analizowanych kwasów fenolowych w badanych produktach pszczelich wyizolowano i zidentyfikowano wszystkie kwasy.
3. Najlepsze do rozdziału fenolokwasów okazały się dwie fazy ruchome: heksan: toluen: octan etylu: kwas mrówkowy (2:5:2,5:0,5; v/v/v/v) oraz toluen: mrówczan etylu: kwas mrówkowy (5:2:0,5 v/v/v). W pozostałych układach rozwijających wykazano zbliżone wartości współczynników opóźnienia.
4. Spośród użytych do badań płytek TLC optymalne warunki rozdziału uzyskano przy zastosowaniu tlenku glinu Al60 GF<sub>254</sub> jako fazy stacjonarnej.

Pracę wykonano w ramach projektu nr N N312 111838.



## LITERATURA

- [1] Newman D.J., Cragg G.M., Sinader K.M., Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, 66, 2003, 1022-1037.
- [2] Cowan M.M., Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 1999, 564-582.
- [3] Daniel O., Meier M.S., Schlatter J., Frischhnecht P., Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides, *Environ. Health. Perspect*, 107(1), 1999, 109-114.
- [4] Bais A.J., Murphy P.J., Dry I.B., The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development, *Aust. J. Plant. Physiol.*, 27(5), 2000, 425-433.
- [5] Hipskind J.D., Paiva N.L., Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 13, 2000, 551-562.
- [6] Tura D., Robards K., Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants, *J. Chromatogr. A*, 975, 2002, 71-93.
- [7] Skrede G., Wrolstad R.E., Durst R.W., Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), *J. Food Sci.*, 65(2), 2000, 357-364.
- [8] Kalt W., Forney C.F., Martin A., Prior R.L., Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 47(11), 1999, 4638-4644.
- [9] Lu Y., Foo L.Y., Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chem.*, 68, 2000, 81-85.
- [10] Robards K., Li X., Antolovich M., Boyd S., Characterization of citrus by chromatographic analysis of flavonoids, *J. Sci. Food Agric.*, 122, 1997, 11-34.
- [11] Alonso-Salces R.M., Barranco A., Corta E., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., A validated solidliquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurized liquid extraction, *Talanta*, 65(3), 2005, 654-662.
- [12] Kaškonienė V., Maruška A., Kornýšova O., Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey, *Cheminė Technologija*, 3(52), 2009, 74-80.
- [13] Yao L.H., Jiang Y.M., Singanusong R., Datta N., Raymond K., Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication, *Food Chem.*, 86, 2003, 169-177.
- [14] Wolski T., Gliński J., Metabolity stresowe i inne substancje biologicznie czynne jako naturalne czynniki odporności roślin, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 461, 1998, 67-87.
- [15] Andrade P., Ferreres F., Amaral M.T., Analyses of honey phenolic acids by HPLC its application to honey botanical characterization, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 20(14), 1997, 2281-2288.