

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE LÉKOVÝCH FOREM VČELÍHO PROPOLISU

JIRÍ TROUSIL, MARTIN HRUBÝ, MIROSLAV
ŠLOUF a PETR ŠTĚPÁNEK

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Heyrovského náměstí 2, 162 06 Praha 6 – Břevnov
jiri.trousil@centrum.cz

Došlo 2.10.14, přepracováno 26.2.15, přijato 3.4.15.

Klíčová slova: propolis, rozptyl světla, nanodisperze, samoasociovaný systém

Úvod

Propolis je včelí pryskyřičný produkt, který je využíván v lékařství pro řadu farmakologických účinků (imunostimulační¹, antibakteriální², protizánětlivé³, antioxidační^{1,4}, antihepatotoxické^{3,5}, fungicidní³, lokálně anestetické¹, antikancerogenní³ aj.), které vykazuje. Používanými lékovými formami jsou topicky aplikované tinktury, kloktadla a kapsle, případně tablety aplikované perorálně v případě doplňků stravy⁶.

V šedesátých letech byl propolis považován z hlediska jeho složení za velmi komplexní, ale víceméně neměnný podobně jako např. včelí jed a včelí vosk. V následujících letech však četné studie ukázaly, že složení včelího propolisu je silně závislé na regionálním původu včelstev, resp. rostlinných zdrojů využívaných včelami, a to jak z hlediska kvalitativního tak kvantitativního⁷. Udává se, že propolis je složen přibližně z 50 % pryskyřic a rostlinných balzámů, 30 % včelího vosku, 10 % esenciálních a aromatických olejů, 5 % pylu a z 5 % nečistot a jiných látek. Propolis a vodné formulace z něho připravené mají kyselý charakter, což je způsobeno obsaženými aromatickými a mastnými kyselinami, flavony a flavanony^{8–10}.

Přibližně v posledních čtyřiceti letech byl propolis předmětem zejména chemických studií sledujících jeho složení v závislosti na regionálním původu a farmakologických studií popisujících jeho biologickou aktivitu a jednotlivé farmakologické účinky^{7,8}. Dosud však nebyla publikována žádná studie zabývající se podrobněji lékovými formami propolisu. V dříve publikované práci⁶ jsme se proto zabývali přípravou, základním popisem koloidních vlastností a antibakteriálními vlastnostmi běžně užívaných kloktadel na bázi propolisu, která jsou vlastně na-

nodisperzemi, k jejichž vzniku dochází ředěním ethanolových extraktů propolisu (EEP) vodou.

Cílem této práce bylo získání detailních informací o charakteru částic, které nanoprecipitačním procesem vznikají, neboť znalost takovýchto charakteristik farmaceutických formulací je důležitá jak z hlediska jejich přípravy, tak i samotné terapie. Současně byl sledován vliv ředění na rozměrové vlastnosti precipitovaných částic a vliv regionálního původu na výše uvedené charakteristiky.

Experimentální část

Příprava tinktur, kloktadel a jejich charakterizace

Základem pro všechna měření a charakterizaci formulací propolisu byly propolisové tinktury (ethanolové extrakty propolisu, EEP). Ty byly připraveny ve čtyřech různých koncentracích výchozího ethanolu (40 %, 60 %, 80 % a 100 % v/v), přičemž jako 100% ethanol (EtOH) byl vzat komerčně dodávaný 99,8% ethanol pro UV spektrometrii (Lach-Ner, Česká republika).

Pro popsání základních vlastností výše zmíněných formulací byly připraveny formulace v rozsahu ředění 10 až 200, tzn. poměr EEP : H₂O byl odpovídající danému naředění – např. 1 : 9, 1 : 199 (v/v) atp.

Formulace byly připraveny nanoprecipitací, tj. rychlým nástřikem EEP do výchozího množství demineralizované vody za současného míchání magnetickým míchadlem.

Písmenná zkratka v níže užívaném značení formulací odlišuje regionální původ vzorků propolisu, číslo uvedené za zkratkou odpovídá objemovému zlomku ethanolu, použitého pro přípravu EEP a poslední číslo udává naředění formulace.

Statický rozptyl světla

Hodnota poměru R_G/R_H (shape-factor), kde R_G je gyrační poloměr a R_H hydrodynamický poloměr, a druhý viriální koeficient A_2 byly získány pomocí statického rozptylu světla (SLS) a dynamického rozptylu světla (DLS). Měření byla provedena na přístroji ALV (ALV-GmbH, Německo) v úhlovém rozsahu 40–150 °, při teplotě 25 °C. Zdrojem záření byl He-Ne laser o výkonu 30 mW a vlnové délce 632,8 nm. Hodnoty R_G i A_2 byly určeny z diagramu dle Berryho, který byl sestaven vynesením $\sqrt{Kc}/R$ proti $(q^2 + kc)$, kde K je soubor optických konstant, c hmotnostní koncentrace, R Rayleighův poměr, q rozptylový vektor daný vztahem $(4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2)$, λ vlnová délka primárního i rozptýleného světla, n index lomu rozpouštědla, θ rozptylový úhel a k libovolná konstanta, volená tak, aby měl výsledný graf vhodné rozměry.

Dynamický rozptyl světla

Měření DLS bylo prováděno při úhlu 173° na přístroji ZetaSizerNano-ZS ZEN3600 (Malvern, UK). Zdrojem záření byl He-Ne laser o výkonu 4,0 mW a vlnové délce 632,8 nm. Pro reprezentaci dat byly použity průměrné pozice píků v distribuci intenzity. Hydrodynamický průměr částic (D_H) byl spočítán z difuzního koeficientu (D) použitím Stokesovy-Einsteinovy rovnice (1):

$$D = k_B T / 3\pi\eta D_H \quad (1)$$

kde T je termodynamická teplota, η dynamická viskozita rozpouštědla a k_B Boltzmannova konstanta^{6,11}.

Měření zeta potenciálu (elektroforetický rozptyl světla) bylo prováděno na stejném přístroji. Elektroforetická pohyblivost byla matematicky převedena na zeta potenciál aproximací dle Smoluchowského^{6,12}.

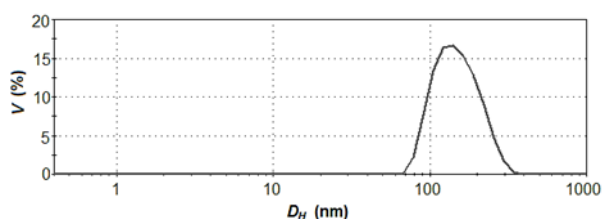
Transmisní elektronová mikroskopie

Mikroskopická analýza byla prováděna na přístroji Tecnai G2 Spirit Twin (FEI, Česká republika), při urychlovacím napětí 120 kV, v režimu světlého pole (bright field imaging). Formulace byly pro TEM připraveny nakápnutím kapky o objemu 2 μ l na standardní měděnou TEM síťku pokrytou předem připraveným, několik nanometrů tenkým uhlíkovým filmem. Ihned po nakápnutí byla přebytečná kapalina zespodu rychle odsáta proužkem filtračního papíru, pro minimalizaci morfologických změn vzorku. TEM síťky byly dosušeny při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Za výše popsaných experimentálních podmínek se pozadí (uhlíkový film) jeví jako světlé, zatímco nanočástice (formulace včelího propolisu) jsou tmavší.

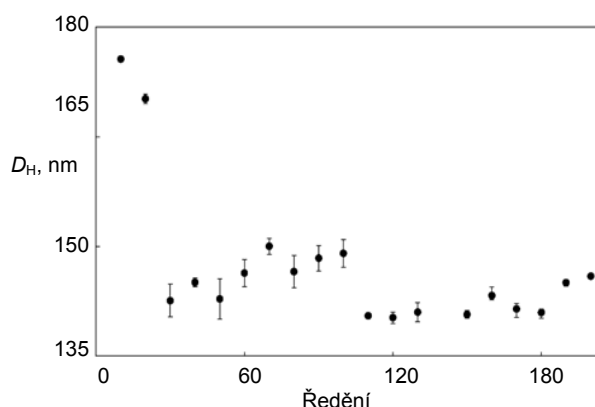
Výsledky a diskuse

Charakterizace samoasociovaného systému

Velikost precipitovaných částic a míru polydisperzity ilustruje obr. 1. V průběhu ředění se hydrodynamický průměr prakticky nemění – formulace vykazují hodnoty D_H přibližně 240 nm pro málo ředěné formulace (ředění 10 a 20), resp. 150 nm pro formulace připravené vyšším ředě-



Obr. 1. Typická distribuce objemu (V) precipitovaných částic (DLS). Formulace PA-40-10

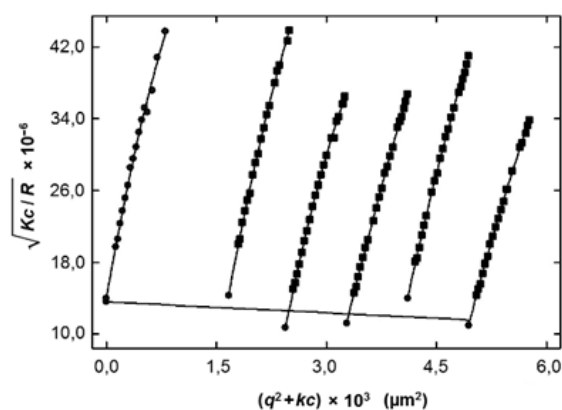


Obr. 2. Závislost hydrodynamického průměru (D_H) na ředění. Formulace připravené ředěním ethanolického extraktu propolisu připraveného z 80% EtOH

ním (30 a více). D_H málo ředěných formulací (ředění 10 a 20) jsou značně vychýleny od trendu (obr. 2, tab. I), který se u následujících formulací projevuje. Současně jsou tyto málo ředěné formulace náchylné k agregaci a vzniku sekundárních částic během několika hodin po přípravě.

Kyselé pH a negativní hodnoty zeta potenciálu částic (viz tab. I) koresponduje s charakterem složek propolisu.

Měření SLS (obr. 3) poskytlo hodnotu druhého viriálního koeficientu $A_2 = -3,056 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^3 \text{ g}^{-2}$ a hodnotu poměru $R_G/R_H = 0,787$. Druhý viriální koeficient obecně poskytuje informace o interakcích rozpouštědlo-částice, jeho záporná hodnota indikuje špatné rozpouštědlo vůči částicím a současně převládající vliv přitažlivých sil mezi částicemi. Hodnota A_2 tak vysvětluje vznik rozměrově



Obr. 3. Diagram dle Berryho. Vyhodnocení SLS koncentrační řady 0,030–0,089 mg ml^{-1} sušiny (tj. rozsah ředění přibližně 660–1800) ve formulaci připravené ředěním extraktu připraveného z 80% EtOH; K je soubor optických konstant charakterizující danou soustavu z hlediska optických parametrů, c hmotnostní koncentrace, R Rayleighův poměr, q rozptylový vektor, jednotkou svislé osy je $\sqrt{\text{mol/g}}$

Tabulka I

Srovnání pH, hydrodynamického průměru (D_H) a zeta potenciálu (ζ) se směrodatnými odchylkami (SD) u vybraných formulací připravených z regionálně odlišných vzorků surového propolisu

Formulace ^a	pH	$D_H \pm SD$ ^b [nm]	$\zeta \pm SD$ [mV]
PA-40-10	3,86	$254,7 \pm 6,1$	$-17,9 \pm 0,4$
PB-40-10	3,73	$232,4 \pm 1,0$	$-23,0 \pm 0,7$
PC-40-10	3,78	$277,5 \pm 2,6$	$-28,4 \pm 0,8$
PD-40-10	3,78	$323,0 \pm 10,6$	$-7,8 \pm 0,8$
PE-40-10	3,96	$237,6 \pm 0,8$	$-24,8 \pm 0,2$
PA-80-50	4,11	$120,9 \pm 0,3$	$-32,1 \pm 0,7$
PB-80-50	4,12	$144,1 \pm 0,7$	$-26,5 \pm 0,5$
PC-80-50	4,19	$145,5 \pm 0,6$	$-29,5 \pm 0,3$
PD-80-50	4,05	$176,8 \pm 0,3$	$-29,4 \pm 0,9$
PE-80-50	4,10	$144,2 \pm 1,1$	$-26,9 \pm 1,0$

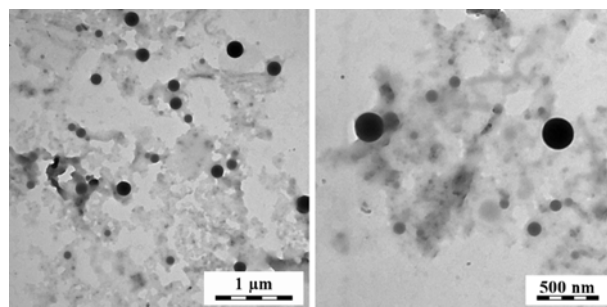
^a Písmenná zkratka v označení formulace odlišuje regionální původ vzorků propolisu, číslo uvedené za zkratkou odpovídá objemovému zlomku ethanolu, použitého pro přípravu EEP a poslední číslo udává míru naředění formulace; ^b SD – směrodatná odchylka

odlišných částic v málo ředěných formulacích (obr. 4) a současně zmiňovanou destabilizací starších nanodisperzí. Poměr $R_G R_H$ (shape factor) blízký hodnotě 0,775 indikuje homogenní koule ve smyslu charakteru částice¹³.

Analýza TEM potvrdila výše diskutované výsledky, tj. precipitací dochází ke vzniku plných kulových částic (obr. 5), jejichž průměr koresponduje s hodnotami D_H získanými pomocí DLS. Mikrofotografie TEM málo naředěných formulací ukazují tvorbu agregátů (obr. 4) pozorovanou na DLS jako velikostně odlehle částice.

Obecně lze říci, že snímky ukazují v zásadě tři typy struktur:

- tmavé sférické útvary o rozměrech řádově ve stovkách nanometrů, objemově majoritní složka, pravděpodobně nanočástice pryskyřičné složky propolisu,
- hranaté ostře ohraničené nanočástice, často s paralelními proužky svědčícími o přítomnosti krystalické fáze¹⁴ – pravděpodobně nanokrystaly vzniklé vykrys-



Obr. 5. Mikrofotografie padesátkrát naředěné formulace PA-80-50. Nanočástice s difúzní strukturou na pozadí

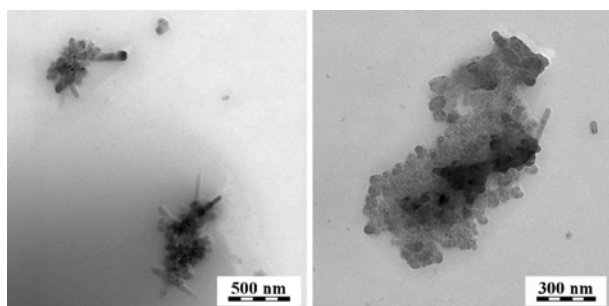
talizováním nízkomolekulárních složek propolisu nebo rozpustných anorganických příměsí,

- difúzní amorfni neostře ohraničené struktury – pravděpodobně nekystalizující či špatně kystalizující, ve vodě rozpustné frakce propolisu, případně i organické nečistoty.

Vliv regionálního původu

Formulace připravené ze sledovaných vzorků surového propolisu byly podrobeny vzájemnému srovnání z hlediska pH, hydrodynamického průměru a zeta potenciálu, přičemž sledovány byly vždy formulace připravené desetinasobným naředěním ethanolového extraktu připraveného ze 40% (v/v) EtOH a padesátinasobným naředěním extraktu připraveného z 80% (v/v) EtOH.

Hodnoty sledovaných veličin se napříč vzorky liší jen mírně (tab. I). Lze tedy říci, že až na drobné odchylky



Obr. 4. Mikrofotografie desetkrát naředěné formulace PA-40-10. Krystalicity (vlevo), resp. agregáty nanočástic (vpravo)

sledované veličiny, resp. formulace, řádově odpovídají ostatním formulacím v rámci daného ředění.

Závěr

Ředěním ethanolických extraktů propolisu dochází k nanoprecipitaci, dispergované částice vykazují hydrodynamický průměr přibližně 240 nm, resp. 150 nm pro málo, resp. více ředěné (30 a více) formulace. Částice lze označit za homogenní koule, přičemž použité metody pro popis charakteru a velikosti částic (SLS, DLS, TEM) navzájem konfirmovaly jimi poskytnuté výsledky. Kromě těchto nanočástic jsou na snímcích TEM vidět i nanokrystalita a difúzní struktury; pravděpodobně se jednalo o mikroskopické nečistoty a příměsi ve vzorku.

Vlastnosti formulací se v závislosti na regionálním původu studovaných vzorků propolisu řádově nelišily a ve většině případů stejně ředěných formulací si s ohledem na opakovatelnost přípravy formulací vzájemně korespondovaly.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR č. P208/10/1600, grantu AV ČR č. M200501201 a grantu TAČR č. TA04020318.

LITERATURA

1. Silici S., Kutluca S.: J. Ethnopharmacol. 99, 69 (2005).
2. Velikova M., Bankova V., Tsvetkova I., Kujumgiev A., Marcucci M. C.: Fitoterapia 71, 693 (2000).
3. Uzel A., Sorkun K., Öncü Ö., Çoğulu D., Gençay Ö., Salih B.: Microbiol. Res. 160, 189 (2005).
4. Volpert R., Elstner E. F.: Z. Naturforsch. C 48, 851 (1993).
5. Banskota A. H., Tezuka Y., Prasain J. K., Matsushige K., Saiki I., Kadota S. J.: Nat. Prod. 61, 896 (1998).
6. Trousil J., Pánek J., Hrubý M., Matějková J., Kučka J., Štěpánek P.: J. Pharm. Invest. 44, 15 (2013).
7. Bankova V.: J. Evidence-Based Complementary Altern. Med. 2, 29 (2005).
8. Trousil J.: *Bakalářská práce*. VŠCHT Praha 2014.
9. Minedžajan G. Z., Richter J.: *Zázrak jménem propolis*. Eko-konzult, Bratislava 2010.
10. Burdock G. A.: Food Chem. Toxicol. 36, 347 (1998).
11. Štěpánek P., Koňák Č.: Adv. Colloid Interface Sci. 21, 195 (1984).
12. Hrubý M., Filippov S., Pánek J., Nováková M., Maczková H., Kučka J., Větvicka D., Ulbrich K.: Macromol. Biosci. 10, 916 (2010).
13. Schärfl W.: *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Springer, Berlín 2007.
14. Fultz B., Howe J. M.: *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*, kap. 7. Springer, Berlín 2001.

J. Trousil, M. Hrubý, M. Šlouf, and P. Štěpánek
(*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Preparation and Characterization of Drug Forms of Bee Propolis**

Propolis is a resinous bee product possessing various interesting pharmacological properties which is widely used in traditional medicine for its broad spectrum of pharmacological effects. It is used in a wide range of dosage forms such as tinctures, gargles, pills and capsules, while the mentioned solid forms are also used in dietary supplements. Preparation of gargles by diluting tinctures with water leads to nanoprecipitation and the propolis droplets are dispersed in the self-associated system. The goal of this study was to describe precipitated nanoparticles of bee propolis depending on their character in terms of dynamic and static light scattering and other physicochemical methods.