

**Entwicklung einer
hochdruckflüssigchromatographischen
Methode (HPLC)
zur
qualitativen und quantitativen Bestimmung
von Flavonen
sowie weiteren Inhaltsstoffen in
Propolisextrakt**

**Institut für Pharmaanalytik
im
Chemischen Laboratorium Dr. Hermann Ulex
Glasmoorstrasse 23
22851 Norderstedt
(Hans-Joachim Mierendorff)**

Bestimmung von Flavonen in Propolisextrakt

Es sollte eine reproduzierbare und einfache Analysenmethode für Propolisextrakt handelsüblicher Qualität erstellt werden. Speziell die darin vorhandenen Flavone sind Gegenstand dieser Arbeit. Propolisextrakt ist in aller Regel der Ethanol-Extrakt von handelsüblicher Propolis.

Verunreinigungen wie Wachs, fettähnliche Verbindungen und vor allen Dingen "Schmutz" (Bienen- teile, Blüten- und Blatteile, Holz- und Borkenreste) sind im Propolisextrakt nicht mehr vorhanden. Gelegentlich werden Zusatzstoffe zum freien Fließen der leicht zusammenklebenden Substanz hinzugefügt.

Propolisextrakt besteht nicht mehr aus Flavonoiden, den Glykosiden (Zuckerbindungen) der Flavone, sondern es handelt sich um Flavone, die "Aglykone" (also den zuckerfreien Anteil) der Flavonoide.

Sie finden sich in den Pollen, die von den Bienen in die Tracht eingebracht werden. Die Flavonoide werden während des Transportes und der Lagerung u.A. durch die Bienenspeichelfermente in Zucker und Flavone aufgespalten.

Propolis findet Verwendung in der Volksmedizin als Entzündungshemmer etc. und heutzutage, meist gekapselt, als Nahrungsergänzungsmittel.

Siehe auch Anlage 1:

"Datenblätter zur Bewertung der Wirksamkeit von Wirkstoffen in kosmetischen Mitteln":

hier Propolis [CAS 85665-41-4] **Definition der Flavone**

Flavone sind die Aglykone der Flavonoide, im allgemeinen gelbe Pflanzenfarbstoffe, denen das bei den Flavonolen in 3-Stellung hydroxilierte - Grundgerüst des Flavons gemeinsam ist. Zu den wichtigen Flavonen gehören beispielsweise [Roempp, 1997]:

- Chrysin (Pappelknospen)
- Galangin (Galgantwurzel)
- Apigenin (Löwenmaul, Kamille, gelbe Dahlien)
- Luteolin (Reseda, gelber Fingerhut, Fäberwau)
- Kaempferol (Faulbaumbeeren, Rittersporn, Schlehen)
- Quercetin (Färbereichenrinde, Goldlack, Stiefmütterchen)
- Robinetin (Robinien, Akazien).

Die Zusammensetzung der verschiedenen Flavone im Propolisextrakt ist nicht einheitlich; je nach Flora und Erntezeit durch die Bienen können starke Variationen auftreten.

Bisherige Methoden zur Flavonbestimmung sind entweder nur empirisch aufgebaut oder ermöglichen nur eine summarische Angabe des Flavongehaltes. Am bekanntesten und über viele Jahre üblich war die Bestimmung des Gesamtflavongehaltes in Pflanzendrogen nach der "Methode nach DAB 8".

Hierbei werden die Flavonoide durch Salzsäurehydrolyse gespalten und die freien Flavone nach Extraktion mit Ethylacetat mit Aluminiumchlorid in einen Farbkomplex überführt und dieser bei 425 nm photometrisch vermessen.

Unbedingt ist zu beachten, daß nur die Flavonol-O-glykoside gespalten werden, nicht aber die Flavonol-C-glykoside. [Wagner, 1983]

Ebenso wurde und wird auch heute noch die zur Ermittlung der qualitativen Zusammensetzung der Gesamtflavone mit einigen bekannten Mängeln behaftete Methode der Dünnschichtchromatographie eingesetzt (Quantifizierung).

Moderne qualitativ-quantitative Analysemethoden sind die der Flüssig- und Gaschromatographie (HPLC und GC). Die Gaschromatographie scheidet wegen mangelnder thermischer Beständigkeit der Analyten und der daher erforderlichen, aber umständlichen Derivatisierung der Analyten als Analysemethode weitgehend aus.

Die HPLC stellt eine schonende und praktikable Analysemethode dar.

Die meisten modernen Veröffentlichungen zur Analytik der Flavone stammen aus dem Raum der Levante und der Türkei. Eine umfangreiche und wichtige Veröffentlichung ist die "Flavonoid-Analyse" von Bankova [1982].

Abweichend vom damaligen Sprachgebrauch handelt es sich hier um eine Trennung der Flavone. Allerdings standen zum Zeitpunkt des Erstellens u.A. dieser Arbeit im Oktober 1981 noch nicht ausreichend reine Flavone zur Identifikationsbestimmung zur Verfügung.

Da es sich bei den für diese Methodenentwicklung maßgeblichen Flavonen um solche südamerikanischer Herkunft handelt (hier Uruguay), wird vorausgesetzt, daß das Flavonspektrum dem der gängigen örtlichen Hauptpflanzen (bienenrelevant) entspricht. Tabelle 1 zeigt einen Auszug dort vorkommender Pflanzenarten mit Angaben über Vorkommen (1 = häufig / 4 = selten) sowie die örtlichen Trivialnamen.

Tabelle 1: Vorkommen wichtiger flavonhaltiger Pflanzen

Häufigkeit	Wissenschaftlicher Name	Trivialname
1	Acacia caven	Espinillo
1	Salix - Arten (Salicaceae)	Sauce
2	Scutia buxifolia	Coronilla
2	Schimus longifolius	Molle
2	Tabebuia ipe	Lapacho
2	Gleditsia amorphoidea	Espina corona
2	Pinus - Arten (Pinaceae)	Pino
2	Araucaria - Arten (Araucariaceae)	Arucaria
3	Rapanea laeteviren	Canelló
3	Entolobium contortisiliquium	Tombó
3	Lithraea brasiliensis	Aruera
3	Colletia paradoxa	Espina de la cruz
3	Momosoidea -Arten	Acacia
4	Celtis spinosa	Tala
4	Blepharocalyx tweedii	Arrayán
4	Eucalyptus - Arten (Myrtaceae)	Eucaliptus

Methodenplan

- Es sollten vorhandene bzw.. gelieferte Propolisextraktmuster in Methanol gelöst werden (eventuell filtriert) und daraufhin versucht werden, eine weitgehende Auftrennung der einzelnen Flavonbestandteile, zunächst ohne Identifizierung der Einzelsubstanzen, zu erreichen.
- Dabei sollte bewußt auf eine Gradientenelution verzichtet werden, um eine weitgehende Auftrennung auch durch einfach ausgestattete Laboratorien zu ermöglichen.

Entsprechend der vorkommenden Pflanzenarten im Ursprungsgebiet der Propolis, wurden, soweit handelsüblich, die entsprechenden Flavone käuflich erworben.

Vorhandene Flavone zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: vorhandene Flavone

Name	CAS-Nr.	chemische Bezeichnung	Molgewicht
Naringenin	[480-41-1]	4",5,7-Trihydroxyflavonon C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,26
Quercetin	[6151-25-3]	3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon C ₁₅ H ₁₀ O ₇	338,27
Chrysin	[480-40-0]	5,7-Dihydroxyflavon C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,24
Galangin	[548-83-4]	3,5,7-Trihydroxyflavon C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,25
Pinocembrin	n.n.	5,7-Dihydroxyflavonon C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,25
Hesperetin	[520-33-2]	3",5,7-Trihydroxy-4"-methoxyflavonon C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,27
Morin	[480-16-0]	2",3,4",5,7-Pentahydroxyflavon C ₁₅ H ₁₀ O ₇	338,27
Kaempferol	[520-18-3]	3,4",5,7-Tetrahydroflavon C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,24
Pinostrobin	[480-37-5]	5,6-Dihydroxy-7-methoxyflavonon C ₁₆ H ₁₄ O ₄ (fälschlich als Pinocembrin-7-Methylether bezeichnet)	270,29

Allfällig auftretende Inhaltsstoffe (Phenolcarbonsäuren) wurden erworben.

Methodenentwicklung

Reinsubstanzen

Da Flavone bei der HPLC nur mit den Methoden der UV-Absorption detektierbar sind, wurden die Spektren der vorhandenen Reinsubstanzen zwischen 195 und 395nm aufgezeichnet.

Hierbei können die vorhandenen Flavone aufgrund ihrer optischen Eigenschaften in zwei Gruppen aufgeteilt werden.

Die Verbindungen Chrysin und Galangin zeigen ein deutliches Maximum bei 268nm, die Verbindungen Naringenin, Pinocembrin und Hesperetin zeigen deutliche Absorptionsmaxima bei 286nm. Der Mittelwert liegt bei 275nm. (Abbildung 1)

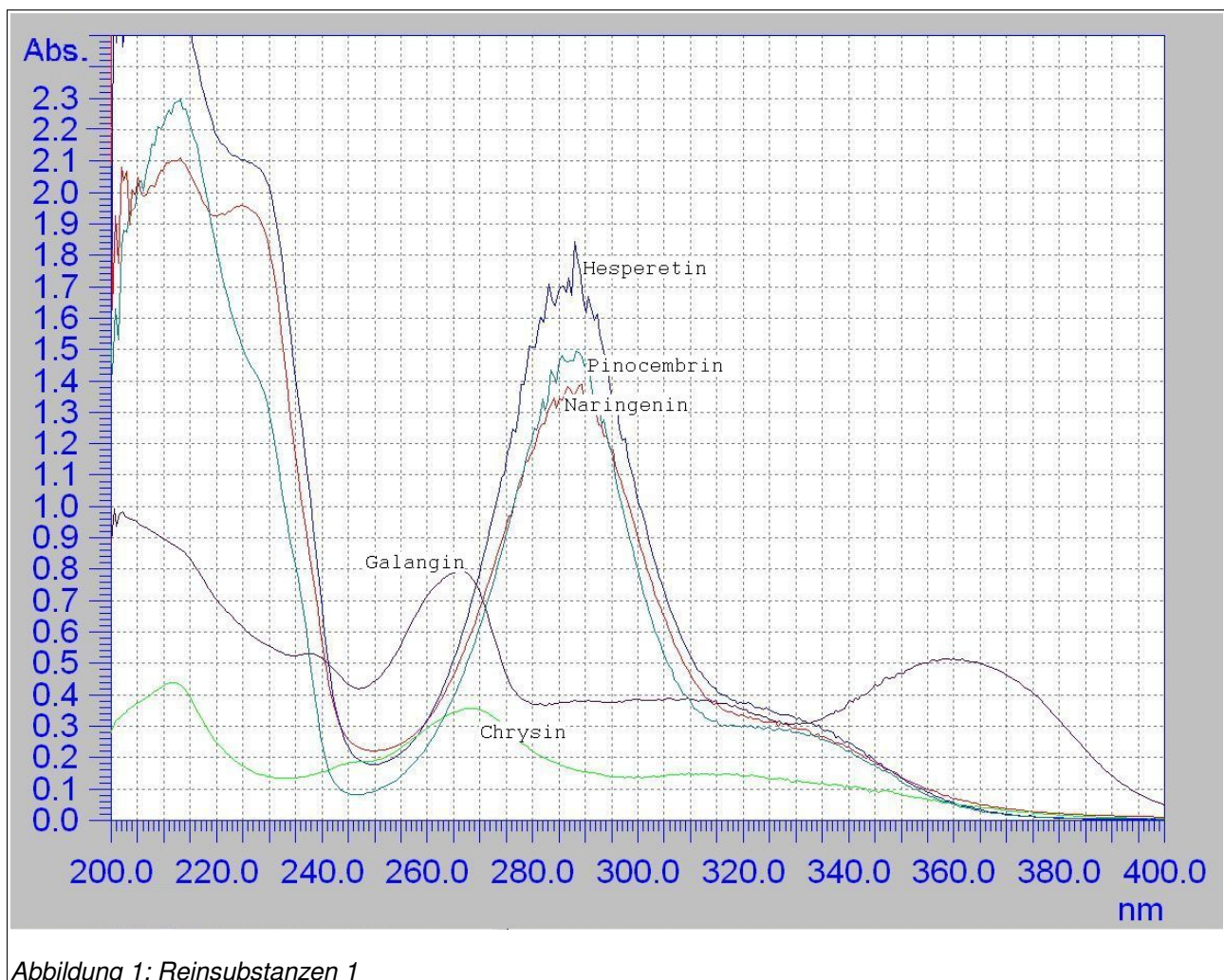


Abbildung 1: Reinsubstanzen 1

Eine weitere Gruppe stellten u.A. die Verbindungen Morin und Quercetin dar. Sie zeigten ausge-

prägte Maxima im Bereich 250 und 360nm.

Im Bereich um 275 bis 320nm zeigen sie ausgeprägte, plateauförmige Minima, deren Absorption jedoch zur Analyse noch ausreichend ist. (Abbildung 2)

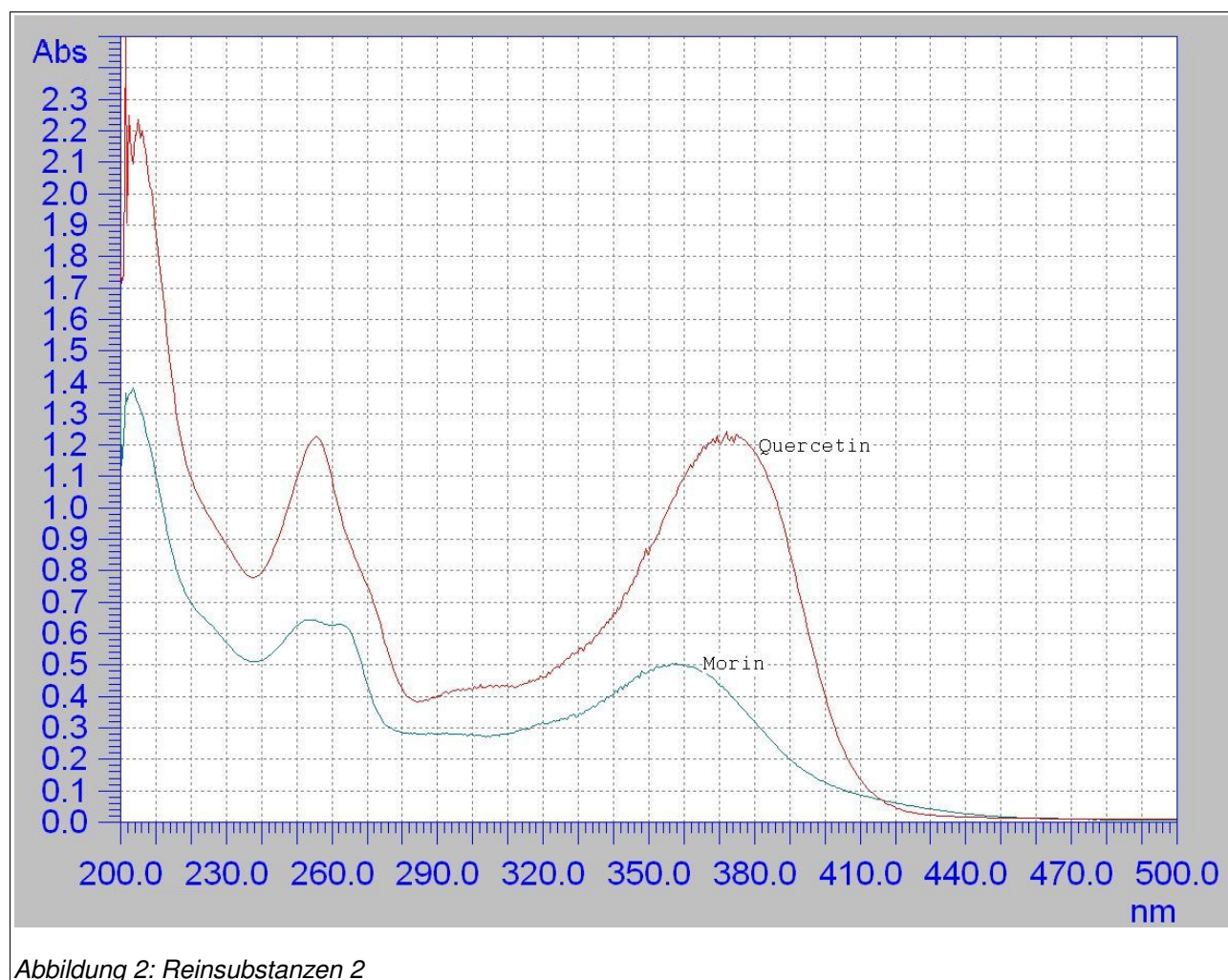


Abbildung 2: Reinsubstanzen 2

Die in den Abbildungen 1 und 2 gezeigten Spektren stellen keine quantitativen Werte dar. Es werden immer die Phenolcarbonsäuren Kaffeesäure und Chlorogensäure nachgewiesen.

Aufarbeitung von Labor- und Handelsproben

Es wurden zur Ermittlung der Trennfähigkeit verschiedene Propolisextraktmuster herangezogen. Dabei handelte es sich um diverse neue sowie ca. 15 Jahre alte Asservatenmuster verschiedener Lieferanten, stammend aus dem mittleren Südamerika. Die Proben wurden in Methanol gelöst, klar filtriert und mit verschiedenen Mischeluenten bei der Wellenlänge 275nm auf verschiedenen RP18-Phasen chromatographiert.

Als am besten trennend erwies sich die Merck-Phase "Multispher 100 RP 18 EC-5,um-FBS".

Weitere verwendete RP18-Phasen, auch in der ec-Modifikation, zeigten mangelndes Trennverhalten.

Unter diesen Bedingungen wurden die vorhandene Reinsubstanzen chromatographiert.

Die Reinheiten der Referenzsubstanzen wurden vorher photometrisch vermessen.

Es ergaben sich bei mindestens 99,5%-reinen Referenzmustern die in Tabelle 3 gezeigten Responswerte für eine Konzentration von 100 ng/mL:

Da Quercetin einen deutlich über den Mittelwert der anderen Substanzen herausragenden Responswert hat, wird zur Erzielung einer genaueren Quantifizierung unter Einbeziehung der verbleibenden Substanzen ein Durchschnittsrespons von $7,098e-5$ angenommen.

Tabelle 3: Responswerte

Name	Responswerte
Naringinin	7,26E-005
Hesperitin	6,51E-005
Chrysin	5,89E-005
Galangin	9,72E-005
Pinostrobin	6,11E-005
Quercetin	1,45E-004

Die o.g.fünf Hauptflavone werden mit ihrem individuellen Responswert berechnet, alle weiteren, meist auch geringeren Anteile weiterer Flavone, werden mit einem Durchschnittsresponsfaktor von $7,098e-5$ (bei 100 ng/mL) angesetzt, da sie in vielen Fällen nicht als Reinsubstanzen erhältlich sind und somit diese empirische Annahme gerechtfertigt erscheint.

Dieses gilt auch für die mittlere, angenommene Meßwellenlänge von 275nm.

Das stets vorhandene Chrysin wird bei der Retentionszeitnormalisierung als Zeitreferenzsubstanz gewertet. Hieraus resultiert die in Tabelle 4 angegebene Kalibration.

Tabelle 4: Kalibration

Name	RetTime [min]	Amount [ng / mL]	Area	Amt/Area	Ref	Mittlere Zusammensetzung [%]
Kaffeesäure	1,520	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Ferulasäure	2,240	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Quercetin	2,550	100,00	6,92E+005	1,44E-4		5
Naringenin	2,712	100,00	1,38E+006	7,26E-5		7
Hesperetin	2,870	100,00	1,54E+006	6,51E-5		2
Hesperetinflavonol	3,830	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Kaempferol	4,345	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Isosakuranetin	5,227	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Pinocembrin	6,143	1,00	1,41E+041	7,10E-5		30
Sakuranetin	7,040	1,00	1,41E+004	7,10E-5		3
Chrysin	9,905	100,00	1,70E+006	5,89E-5	✓	23
Galangin	10,884	100,00	1,03E+006	9,72E-5		9
Acacetin	13,152	1,00	1,41E+004	7,10E-5		2
Tectochrysin	16,509	1,00	1,41E+004	7,10E-5		1
Pinostrobin	18,286	100,00	1,64E+006	6,11E-5		5

Methode

Die Propolisextraktproben werden in einer Konzentration von 100ng/mL in analysenreinem Methanol gelöst, filtriert und direkt der HPLC zugeführt.

Parameter(HPLC) :

- Pumpe: Knauer HPLC 64
- Probengeber: Rheodyne RH 7010 mit Dosierschleife
- Säule: Multispher 100, RP 18 EC-- 5µm - FBS ; 250 x 4,6mm mit Vorsäule 10mm
- Säulen-Temp.: ambient
- Eluent: 45,5% MeOH + 15,0% AcCN +36,5% aq +3,0% AcOH
- Fluss: 1,5mL /min
- Detektor: UV-VIS-Photometer (190 - 700 nm) var.Wave-Det. Messwellenlänge: 275 nm
- Auswertung: Elektronische Integration Hewlett Packard ChemStation Ver. 8, Multichannel System
- Standardsubst.: siehe oben

Aufgrund der Herstellungsweise kann man davon ausgehen, daß ein alkoholischer Extrakt aus

Rohpropolis nur noch Flavone und sonstige alkohollösliche pflanzeneigene Phenolcarbonsäuren enthält. Weitere Inhaltsstoffe in einer Größenordnung von über 1% sind nicht zu erwarten und lassen sich in Propolisextrakt nicht nachweisen.

Zur Berechnung des Gehaltes an Inhaltsstoffen ("Amount%") ist die Summe aller bei 275nm absorbierenden Inhaltsstoffe gleich 100% zu setzen.

Aus fünf südamerikanischen Proben ergaben sich die in der letzten Spalte der Kalibrationstabelle aufgeführten Werte.

Eine beispielhafte Übersicht zeigt das Chromatogramm in Abbildung 3.

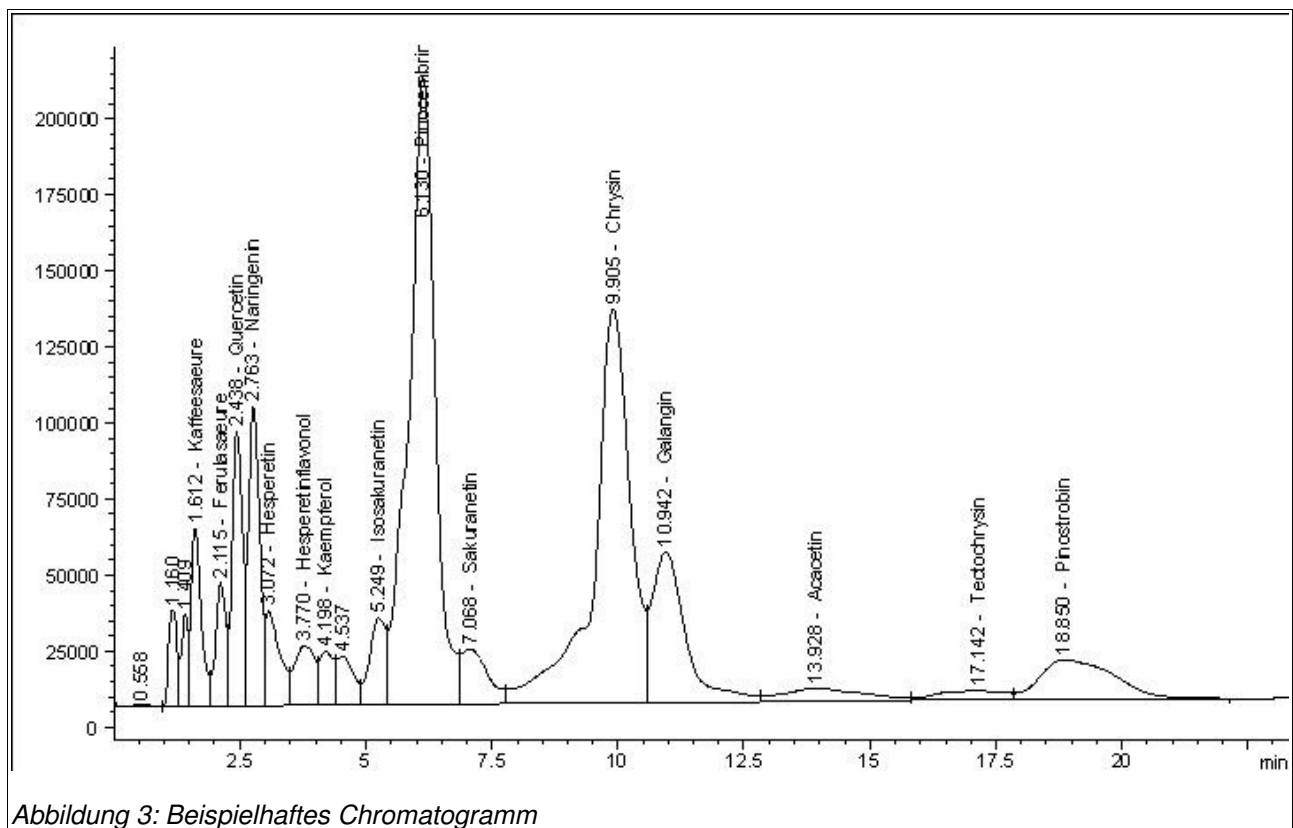


Abbildung 3: Beispielhaftes Chromatogramm

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der einzelnen Flavone in Propolis und Propolisextrakten aufgezeigt. Der Methanolextrakt wird unter isokratischen Bedingungen der HPLC zugeführt. Die Quantifizierung der Propoliskomponenten ist damit möglich.

Summary

A simple method for quantification and qualification of the flavone components from propolis and its extract is shown here. The extraction is made by methanol and is passed to HPLC under isocratic conditions.

Literatur

1. Roempp-Lexikon-Naturstoffe, Hrsg: Burkhard Fugmann, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997
2. H. Wagner et al., Deut.Apo.Z. 123 (1983) 515/20
3. V.S.Bankova et al, J.Chromatogr. 242 (1982) 135/43

Weitere hinzugezogene Literatur

4. Z. Lalic et al, Eigenveröffentlichung
5. A. Rechner et al, DLR 94 (1998) 363ff
6. H. Ohta et al, Eigenveröffentlichung
7. Y.K. Park et M. Ikegaki, Eigenveröffentlichung

Anschrift des Verfassers:

H.-J. Mierendorff
Chemisches Laboratorium Dr. Hermann Ulex
Glasmoorstr. 23
D - 22851 Norderstedt
Tel. +49 (+)40 - 52 95 87 0
Email: service@ulexlab.de

Datenblätter zur Bewertung der Wirksamkeit von Wirkstoffen in kosmetischen Mitteln

Propolis

In kosmetischen Mitteln eingesetzte Rohstoffe

Rohstoff	CAS Nr.	INCI-Name [1]
Propolis, Propoliswachs, Propolisextrakt	85665-41-4	Propolis

Die INCI-Bezeichnung ist noch nicht im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft veröffentlicht.

Propolis, das Kittharz der Honigbiene, stammt hauptsächlich aus den harzigen Sekreten von Bäumen und Sträuchern (Knospenschuppen) und wird von der Biene mit körpereigenen Drüsensekreten vermischt. Es besteht hauptsächlich aus Wachsen und Harzstoffen (ca. 80 %). Daneben sind in geringeren Anteilen etherische Öle, phenolische Substanzen, Phenylpropensäuren, Pollen, anorganische Stoffe (jeweils bis ca. 5 %) vorhanden. Die Zusammensetzung von Propolis ist in Abhängigkeit von Vegetation, Jahreszeit, Klima und örtlichen Gegebenheiten starken Schwankungen unterworfen [4, 10].

Wirksame Bestandteile

Nachweisbar für Propolis ist die antibakterielle (vorwiegend gegen grampositive Bakterien) und die antimykotische Wirkung [2 - 6, 10]. Das anästhesierende Potential ist deutlich höher als bei Novocain [2]. Die antibiotische Wirkung korreliert mit den Gehalten an phenylsubstituierten Carbonsäuren (Kaffeensäure, Ferulasäure, Benzoessäure) [10]. Hohe Gehalte an Flavonoiden (Galangin, Pinocembrin, Pinostrobin, Quercetin und Kämpferol) verstärken diese Wirkung [6, 10]. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass die verschiedenen Flavonoide unterschiedliche Wirksamkeit besitzen.

Empfehlungen zum Einsatz in kosmetischen Mitteln

Propolis-haltige Zubereitungen finden sich insbesondere wegen der antimikrobiellen Wirkung in Erzeugnissen zur Pflege von Haut und Mundhöhle, wobei Konzentrationen unter 1 eingesetzt werden [9]. Daneben spielt der Einsatz in Zahnpasten eine gewisse Rolle [7]. Aufgrund des hohen Anteiles an Harzen und Wachsen ist Propolis zur Verwendung in Produkten zur Haarkonditionierung mit Gehalten von ca. 0,5 % geeignet [9]. Bei Wirkungsauslobungen wird in Folge der stark schwankenden Zusammensetzung und der damit verbundenen variierenden Wirksamkeit die Verwendung von standardisierten Erzeugnissen empfohlen [10].

Bei topischer Anwendung kann es zu einer allergischen Reaktion kommen (Typ IV-Allergie, Kontaktdermatitis). Als Allergene in Propolis identifiziert sind Zimtsäurederivate, Benzylsalizylat und Zimtaldehyd [7,8,10]. In der Sicherheitsbewertung ist diesem Aspekt besondere Beachtung zu schenken. Gegebenenfalls ergibt sich hieraus die Notwendigkeit eines Verbraucherrhinweises.

Hinweis: Die allgemeinen Hinweise und Empfehlungen dieser Datenblattreihe sind ebenso zu berücksichtigen wie die geltenden Rechtsnormen.

Literatur:

- [1] Opinion on the 1st update of the inventory of ingredients employed in cosmetic products adopted by the SCCNFP (Stand 28.06.2000);
- [2] Serra, J. u. Escola: Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 91, 242-246 (1995)
- [3] Dweck, C.: SÖFW-Journal 121, 490-495 (1995)
- [4] Exner, J.: Bienenwelt 36, 141-146 (1994)
- [5] König, B. u. Dustmann, J.H.: Naturwissenschaftl. Rdsch. 41, 43-53 (1988)
- [6] Marcuri, M.C.: Apidologie 26, 83-99 (1995)
- [7] Schumann, R. u. Grunow, W.: Bundesgesundhbl. 34, 11-12 (1991)
- [8] Hausen, B.M., Wollenweber, E. u. Post, B.: Contact Dermatitis 67, 45-47 (1987)
- [9] Onions, A.: Soap, Perfumery, Cosmetics 67, 45-47 (1994)
- [10] Langner, E. u. Schilcher, H.: DAZ 139(37), 3447-3458 (1999)