

BADANIA NAD WYSTĘPOWANIEM ZWIĄZKÓW FLAWONOIDOWYCH W ODMIANOWYCH MIODACH PSZCZELICH

I. Rutyna i kwercetyna

Mieczysław Rychlik, Jacek Zborowski

Zakład Bromatologii A. M. w Krakowie

WSTĘP

W sokach, nektarach i pyłku kwiatowym roślin miododajnych występują liczne związki flawonoidowe jako typowe substancje pochodzenia roślinnego (Muszyński, Zielińska 1949, Steinegger 1948), a pierwszym z nich o układzie flawonolowym, wykrytym w pyłkach kwiatowych przez Kuhna i innych (1942) była izoramnetyna. Przechodzenie związków chemicznych o działaniu leczniczym jak i trującym z roślin, poprzez nektar kwiatowy do miodów zostało potwierdzone w licznych pracach analityczno-badawczych (Bagiński, Mowszowicz 1963, Korta 1952, Plugge 1891). Ostatnio podjęto próby produkcji odmianowych miodów, otrzymywanych z nektaru określonych roślin, zawierających substancje czynne, które nadają miodom wartość leczniczą.

O występowaniu rutyny (3-rutynozyd kwercetyny) w miodzie gryczanym, spotkaliśmy wzmianki w literaturze podręcznikowej i popularnonaukowej (Demianowicz i inni 1957, Koczwarą 1950, Lewandowska 1960). Curyło (1963) podaje, że flawony wchodziły w skład barwników miodowych. W dostępnym nam piśmiennictwie krajowym jak i zagranicznym nie znaleźliśmy żadnych doniesień na ten temat, któreby były wynikiem prac analityczno-badawczych. Wiadomości podane przez Lewandowską (1960), okazały się przypuszczeniami, opartymi na tradycjach, przypisujących miodom gryczanym własności profilaktyczno-lecznicze w schorzeniach sklerotycznych.

Fizjologicznie czynne są zarówno glikozydy jak i aglikony flawonoidowe (Borkowski, Czyszewska 1958, Borkowski i inni

1959, Chrzaszcz 1949, Clark, Geissman 1949, Herrmann 1959, 1960, Wilska-Jeszka 1959). Duża ilość tych połączeń, spotykanych w świecie roślinnym jak i różnorodność, znacznie utrudnia ich identyfikację.

Występowanie w znacznych ilościach rutyny w ziele gryki skłoniło nas do zajęcia się tym glikozydem i jego aglikonem. Podstawę analizy jakościowej i ilościowej flawonoidów stanowią ich własności fizyczne i chemiczne (Czerwiński 1951, Dmochowski i inni 1949).

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

(MATERIAŁ, METODA I WYNIKI)

Do badań użyto miodów krajowych, pochodzących głównie z południowych i wschodnich rejonów Polski z lat zbioru 1959—1960. Materiału dostarczyły Okręgowe Spółdzielnie Pszczelarskie w Krakowie i Lublinie. Kilka próbek pochodziło wprost od pszczelarzy. Materiał badawczy obejmował kilka miodów odmianowych: wrzosowe, ognichowo-rzepakowe, gryczane oraz spadziowe z drzew liściastych i szpilkowych, łącznie 50 próbek miodów.

BADANIA WSTĘPNE

Do ekstrakcji flawonoidów użyto octanu etylu. Przy wyborze rozpuszczalnika wzięto pod uwagę zarówno spostrzeżenia własne, jak też dane z literatury fachowej (Borkowski 1957, Katheren 1957). Najczęściej stosowane do ekstrakcji flawonoidów rozpuszczalniki organiczne takie, jak metanol czy etanol okazały się w naszym przypadku nieselektywne. Wynikało to w pierwszym rzędzie ze specyficznego charakteru materiału badanego. Ekstrakcję flawonoidów prowadzono eluując 58 g odważkę miodu 5—6-krotnie, ucierając każdorazowo w moździerzu porcelanowym z 10 ml octanu etylu, w ciągu $1\frac{1}{2}$ godziny. Eluaty z każdej próbki miodu zbierano razem i zagęszczano do objętości 5 ml. Tak otrzymane wyciągi miodowe służyły do bibułowej analizy chromatograficznej i odczynów redukcyjnych.

Po przeprowadzeniu licznych prób na miodzie z dodatkiem jednorodnie czystej rutyny i kwercetyny, zastosowano chromatografię bibułową wstępującą jako metodę rozdzielania chromatograficznego wyciągów miodowych. Używano bibułę „Whatman” Nr: 1 i układ solwentów: n-butanol-1, kwas octowy lodowaty, woda (4 : 1 : 5), faza organiczna. Czas rozwijania chromatogramów trwał 18 godzin, w temperaturze 20—22 °C. Na bibułę

nanoszono po 0,1 do 0,2 ml wyciągu w odległości 5 cm od siebie. Jednocześnie jako substancje wzorcowe nanoszono 0,04% alkoholowe roztwory rutyny i mieszaninę rutyny i kwercetyny (1 : 1), po 0,05 ml. Rozwinięte w tych warunkach chromatogramy analizowano w świetle ultrafioletowym, określając położenie plam na podstawie ich fluorescencji i barwę fluorescencji. Następnie wywołano chromatogramy dwuazowaną benzydyną według Rouxa i Maihsa (1960).

Odczyny redukcyjne wykonano metodą klasyczną Valentina i Wagnera (1952) i metodą zmodyfikowaną przez Borkowskiego, Czyszewską (1958).

W świetle ultrafioletowym stwierdzono, że wyciągi miodowe ulegały rozdziałowi chromatograficznemu. Na chromatogramach występowały zawsze po dwie plamy. Plamy o wyższych wartościach R_f (0,65—0,86) dawały fluorescencję o barwie żółtawej do szaro żółtawej dla miodów ogniowo-rzepakowych oraz przeważnie jasnoniebieskiej dla miodów spadziowych, wrzosowych i grykowych. Plamy o niższych wartościach R_f dawały fluorescencję o barwie lazurowej dla wszystkich badanych miodów. Chromatogramy wywołane dwuazowaną benzydyną wykazały, że dla wszystkich eluatów miodowych wystąpiła tylko jedna duża plama o barwie intensywnej ceglastoczerwonej w świetle dziennym, pokrywająca się z uprzednio stwierdzoną w ultrafiolecie plamą o wyższej wartości R_f (0,65—0,86). Średnia wartość liczbowa R_f plam otrzymanych po wywołaniu była dla wszystkich zbadanych miodów prawie jednakowa i wahała się w granicach od 0,66 dla miodów ogniowo-rzepakowych do 0,71 dla pozostałych odmian. Plamy substancji wzorcowych (rutyna i kwercetyna) uzyskane i analizowane w tych samych warunkach różniły się zdecydowanie od plam wyciągów miodowych. Różnice te zaznaczyły się zarówno we fluorescencji, w wartości liczbowej R_f , jak też w odcieniu barwy po wywołaniu dwuazowaną benzydyną. Wszystkie odczyny redukcyjne przeprowadzone na wyciągach miodowych, nie oczyszczanych chromatograficznie, wypadły ujemnie. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań z wyciągami miodowymi, otrzymanymi przy użyciu octanu etylu i ich wyników należałoby wnioskować, że rutyna i kwercetyna nie występują w miodach pszczelech.

Prowadząc dalsze badania w tym kierunku rozszerzono metodykę ekstrakcji poszukiwanych związków przez zastosowanie rozpuszczalników organicznych szeregu eluotropowego. Miało to na celu wyjaśnienie skuteczności i selektywności ekstrakcji wytypowanymi rozpuszczalnikami zarówno własnych jak i dodanych do miodu flawonów. Wprowadzono również biologiczny sposób odcukrzenia badanych miodów, opracowany przez Rychlika i Fedorowską (1962). Przeprowadzone przy tym dodatkowe oznaczenia wykazały, że fermentacja alkoholowa nie zmienia ru-

tyny jak również, że produkty pofermentacyjne nie mają wpływu na dalsze badania chromatograficzne tych związków. Badania te wykonano z nastawami kontrolnymi: roztwory miodu i cukru z dodatkiem 0,2% rutyny i bez jej dodatku. W dalszej pracy zastosowano chromatografię dwukierunkową oraz dodatkowe odczyny barwne. Poszerzone badania przeprowadzono na miodzie gryczanym. Do badań użyto mieszaniny z 20 różnych miodów gryczanych ze zbioru 1963 r., pochodzących z różnych miejscowości województwa lubelskiego.

PRZYGOTOWANIE WYCIĄGÓW MIODOWYCH I ICH CHROMATOGRAFIA

Miód zagęszczony w aparacie próżniowym do 90% suchej masy, oznaczonej refraktometrycznie, dzielono na porcje 100 gramowe i eluowano przez ucieranie w moździerzu porcelanowym następującymi rozpuszczalnikami organicznymi: 1) alkohol metylowy + pirydyna (20 : 1), 2) etanol bezwodny, 3) glikol etylenowy, 4) kwas octowy lodowaty, 5) pirydyna, 6) eter etylowy (osuszony), 7) aceton (osuszony), 8) chloroform (osuszony), 9) octan etylu, 10) dioksan, 11) n-butanol-1, 12) alkohol izo-propylowy, 13) alkohol izo-amylowy, 14) eter naftowy (osuszony). Pierwszych pięć rozpuszczalników nie spełniło roli rozpuszczalników selektywnych, ponieważ miód w nich się rozpuszczał. Do eluowania 100 g porcji miodu użyto po około 1000 ml rozpuszczalników: 6, 7, 8, 9, 14 i po około 300 ml rozpuszczalników: 10—13. Stwierdzono przy tym, że rozpuszczalniki 10—13 częściowo rozpuszczają ekstrahowany miód, na co wskazywało silniejsze zabarwienie otrzymanych wyciągów. Analogicznie postępowano z miodem gryczanym, do którego dodano przed zagęszczeniem po 0,2% rutyny i kwercetyny. Do eluowania pobierano po 40 g miodu, używając rozpuszczalników od 6—14 włącznie. Wszystkie uzyskane z miodu wyciągi zagęszczone w próżni do objętości 50 ml i przechowywane w ciemnych butelkach, służyły do analizy chromatograficznej.

BIOLOGICZNY SPOSÓB ODCUKRZANIA MIODU ORAZ BADANIA ROZTWORÓW I OSADÓW POFERMENTACYJNYCH

Cukry zawarte w miodzie usuwano stosując fermentację alkoholową za pomocą drożdży piekarskich. W tym celu sporządzono około 20% wodny roztwór miodu. Roztwór ten po ogrzaniu do 90 °C chłodzono, poczym dodano do niego: pożywkę mineralną oraz drożdże piekarskie. Płyn o temperaturze 25—30 °C napowietrzano filtrowanym powietrzem, za pomocą pompy wodnej próżniowej. W trakcie fermentacji kontrolowano w nim zawartość cukrów metodą Luffa-Schoorla (Metody Badania Żywności we-

dług Norm, Warszawa 1962). Po siedmiu dniach stwierdzono odfermentowanie cukrów, których końcowe stężenie wahało się w granicach 0,05—0,02%. Po zakończeniu fermentacji płyn zlano i pozostawiono w lodówce do wyklarowania. Zdekantowany płyn odwirowywano dodatkowo na wirówce elektrycznej, oddzielając osad.

Podobnie postąpiono z nastawami kontrolnymi zawierającymi miód i cukier z dodatkiem 0,2% rutyny i bez jej dodatku.

Osady i płyny pofermentacyjne eluowano oddzielnie n-butanolem-1 i octanem etylu. W przypadku płynów eluowano je zarówno wprost jak i po uprzednim zagęszczeniu w próżni. Wyciągi oraz płyny pofermentacyjne dokładnie zarejestrowano i wykorzystano do badań chromatograficznych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Spośród 14 wytypowanych i użytych do ekstrakcji rozpuszczalników: alkohol metylowy + pirydyna (20 : 1), etanol bezwodny, glikol etylenowy, kwas octowy lodowaty, pirydyna nie spełniły roli rozpuszczalników selektywnych. Miód rozpuszczał się w nich prawie całkowicie. Poza tym stwierdzono, że eter naftowy nie jest również przydatny, gdyż nie eluuje ani rutyny ani kwercetyny. Eter etylowy eluuje tylko kwercetynę. Pozostałe rozpuszczalniki użyte w doświadczeniach ekstrahują zarówno rutynę jak i kwercetynę. W eluatach otrzymanych z miodu przy użyciu acetonu, chloroformu, octanu etylu, dioksanu, n-butanolu-1, alkoholu izo-propylowego, alkoholu izo-amyłowego, nie stwierdzono obecności rutyny i kwercetyny. Natomiast wyciągi z miodu z dodatkiem rutyny i kwercetyny otrzymane przy użyciu tych samych rozpuszczalników zawierały oba te związki, a ich wartości R_{f1} i R_{f2} są bliskie wartościom podawanym przez literaturę (Michaluk 1960) w tych samych układach solwentów. Ponadto na chromatogramach z wyciągów z miodu, jak też z wyciągów z miodu z dodatkiem rutyny i kwercetyny, stwierdzono w świetle ultrafioletowym plamy o fluorescencji zielonkawożółtawej. Wartości liczbowe tych plam wahają się w granicach $R_{f1} = 0,55$ do $0,75$, $R_{f2} = 0,00$. W wyciągach z osadu i płynów pofermentacyjnych miodu, otrzymanych przy użyciu octanu etylu oraz n-butanolu-1, jak też w płynach pofermentacyjnych, nie stwierdzono na drodze analizy chromatograficznej obecności rutyny i kwercetyny.

Plamy stwierdzone w ultrafioletecie o fluorescencji zielonkawożółtawej dają reakcję barwną z dwuazowaną benzydynam (barwa ceglasczerwona w świetle widzialnym), nie dają natomiast typowych reakcji barwnych dla flawonoidów z tlenochlorkiem cyrkonu oraz z chlorkiem glinu. W ana-

logicznych wyciągach i płynach pofermentacyjnych z miodu z dodatkiem rutyny stwierdzono chromatograficznie jej obecność. Analiza chromatograficzna wyciągów z osadu i płynów pofermentacyjnych roztworu cukru z dodatkiem 0,2% rutyny, jak też płynów pofermentacyjnych zagęszczonych i niezagęszczonych wykazała we wszystkich przypadkach z wyjątkiem frakcji poelucyjnej obecność dodanej rutyny. Nie stwierdzono natomiast w żadnym przypadku kwercetyny. W płynach pofermentacyjnych roztworu cukru, jak i w wyciągach z nich sporządzonych nie stwierdzono na drodze prowadzonej analizy, na chromatogramach, żadnych plam zarówno typowych dla związków flawonoidowych, jak i innych plam, mogących w jakiś sposób utrudnić wykrywanie tych ostatnich.

STRESZCZENIE

1. Spośród wielu rozpuszczalników organicznych zalecanych przez literaturę do ekstrakcji związków flawonoidowych, w przypadku miodów należy stosować przede wszystkim octan etylu, n-butanol, chloroform, alkohol izo-propylowy i izo-amyłowy, a nawet eter etylowy. Rozpuszczalniki te są wystarczająco selektywne, przy czym jako najlepsze pod tym względem z wymienionych są octan etylu i n-butanol-1.

2. Octan etylu i n-butanol-1 można również stosować do ekstrakcji flawonoidów z płynów pofermentacyjnych.

3. W chromatograficznej analizie flawonoidów miodów korzystnym okazał się biologiczny sposób odcukrzania miodu według Rychlika i Fedorowskiej ze względu na możliwość łatwego usunięcia cukrów.

4. Opracowany i opisany sposób otrzymywania eluatów miodowych oraz stosowana w pracy chromatograficzna analiza bibułowa pozwalają na wykrycie nawet śladowych ilości dodawanej do miodów rutyny i kwercetyny.

5. Na podstawie uzyskanych wyników należy przypuszczać, że rutyna i kwercetyna nie występują w miodach dojrzałych. Wyjaśnienia należy dopatrywać się w składzie chemicznym nektaru kwiatowego albo w biochemizmie dojrzewania miodu. Zagadnienie to będzie tematem drugiej części niniejszej pracy.

LITERATURA

- Bagiński S., Mowszowicz J. (1963) — Krajowe rośliny trujące. Łódź. 176—179.
- Borkowski B. (1957) — Farmakognozja z uwzględnieniem fitochemii i farmakodynamiki. Wydanie I. Część IV. Warszawa. 179.

- Borkowski B., Czyszewska S. (1958) — Fotokolorymetryczne oznaczanie flawonoidów. Porównanie metod na przykładzie rutyny i robininy. *Biul. Inst. Rośl. Leczn. Rocznik* IV. 340—357.
- Borkowski B., Duchnowska A., Wrociński T. (1959) — Działanie diuretyczne kwiatów Robinii Akacjowej (*Robinia Pseudacacia* L.) oraz robininy i niektórych przetworów surowca. *Biul. Inst. Rośl. Leczn.* 117—126.
- Borkowski B., Duchnowska A., Wrociński T. (1959) — Zawartość flawonów w ziele dziurawca i jego przetworach oraz ich działanie moczopędne. *Biul. Inst. Rośl. Leczn.* 227—239.
- Chmielewska I. i inni (1957) — Chromatografia. Praca Zbiorowa. P.W.N. Warszawa. 938—946.
- Chrzęszcz J. (1949) — Witaminy i ich otrzymywanie. *Farmacja Polska.* 173—177.
- Clark W. G., Geissman T. A. (1949) — Potentation of effect of adrenaline by flavonoid ("vitamin P" — like) compounds. Relation of structure to activity. *J. Pharmacol. Expt. Therap.* 95 : 363 według *Chem. Abs.* (1949) — 43 : 5116.
- Curyło J. (1963) — „Hodowla Pszczół”. Praca Zbiorowa. Wydanie II. Warszawa. 771.
- Czerwiński B. (1951) — Witaminy. P.W.L. Warszawa. 219.
- Demianowicz A. (1957) — „Hodowla Pszczół”. Praca Zbiorowa. Wydanie I. PWRiL. Warszawa. 627.
- Dmochowski A. (1949) — Witaminy. Praca Zbiorowa. Łódź. 315—317.
- Guderska J. (1963) — „Hodowla Pszczół”. Praca Zbiorowa. Wydanie II.
- Herrmann K. (1959) — Vorkommen und Bedeutung der Phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Mitt aus dem Geb. der Lebensmittelunters. u. Hygiene.* 50 : 121—136.
- Herrmann K. (1960) — Über Leukoanthocyanine und Leukoanthocyanin Gerbstoffe und ihre Bedeutung in Lebensmitteln. *Z. Lebensmitt. Unters. u. Forsch.* 112 : 105—118.
- Kathen H. (1957) — Quercetin-Galaktosid und Chlorogensäure in Ontarioäpfeln. *Z. Lebensmitt. Unters. u. Forsch.* 105 : 22—24.
- Koczwarą H. (1950) — Farmakognozja. Część IV. Kraków 140.
- Korta J. (1952) — Azalia pontyjska jako roślina olejkodajna i jej właściwości trujące. *Prace Komisji Nauk Farmac.* Tom IV.
- Kuhn R., Löw J. (1944) — B 77, 196, 202. (za Steinegger E. (1948)) — Biologische und medizinische Bedeutung der Flavone. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 70—81.
- Lewandowska C. (1960) — Pszczoły a Medycyna. Wiedza Powszechna. Warszawa. 25.
- Michałuk A. (1960) — Badania nad flawonoidami w rodzaju *Hypericum* L. Część I. Analiza chromatograficzna flawonów. *Dissertationes Pharm.* 311—323.
- Muszyński J., Zielińska R. (1949) — Pyłki roślinne i ich rola w życiu człowieka. *Farmacja Polska.* 376—381.
- Plugge P. C. (1891) — Ericaceae enthaltend Andromedotoxin. *Archiv der Pharmacie.*
- Polska Norma 53-A-74855. Cukier. Metody Badania. (Metody Badania Żywności Według Norm ustanowionych do dnia 1 stycznia 1962 r. Warszawa. 1962. 32—33).
- Roux D. G., Maihs A. E. (1960) — Selective spray reagents for the identification and estimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins. *J. Chromatog.* 4: 65—74.

- Rychlik M., Fedorowska Z. (1962) — O biochemicznej metodzie oznaczania dekstryn miodowych, *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 3: 135—140.
- Steinegger E. (1948) — Biologische und medizinische Bedeutung der Flavone. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 70—81.
- Valentin J., Wagner G. (1952) — Nachweis und Bestimmungsmethoden der Flavonole und Flavonolglykoside in Polygonium Hydropiper L. *Pharmazeutische Zentralhalle Deutschl.* 91: 291—310.
- Wilska-Jeszka J. (1959) — Chemia i własności fizjologiczne flawonoidów. *Wiadomości Chemiczne.* 6., 289—327.

ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОВЫХ СОЕДИНЕНИИ В ОДНОСОРТНЫХ ПЧЕЛИНЫХ МЕДАХ

Мечислав Рыхлик и Яцек Зборовски

Резюме

Для экстрагирования из меда флавоно-образных соединений можно применять: уксусно-этиловый эфир, н-бутанол, хлороформ, изо-пропиловый и изо-амиловый спирт, этиловый эфир. Из них два первые лучше остальных. Хроматографическому анализу должно предшествовать удаление из меда сахаров, лучше всего биологическим методом.

Пробные анализы доказали большую чувствительность метода. В 50 медах ни рутин, ни кверцетин не обнаружено.

INVESTIGATIONS ON THE APPEARANCE OF FLAVONE COMPOUNDS IN THE HONEYES FROM DIFFERENT PLANTS. I. RUTIN AND QUERCETIN

M. Rychlik, J. Zaborowski

Summary

For extraction from honey the flavone compounds can be used: ethyl acetate, butyl alcohol secondary (Butanol₂), chloroform, iso-Propyl alcohol, iso-Amyl alcohol, ethyl ether. The best for this purpose are the first two. Before the chromatographic analysis of honey sugars should be removed from the honey by the biological method. In the control analysis this method was very sensitive.

In the 50 samples of honeys did not find neither rutin nor quercetin.