

Flavonoid és összpolicfenol tartalom meghatározása állatgyógyászati termékekből

Varga Erzsébet¹, Fülöp Ibolya², Croitoru Mircea Dumitru²

¹Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológia Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Farmakognózia és fitoterápia tanszék

²Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológia Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Toxikológia és biofarmácia tanszék

AUTHOR AFFILIATION

¹„George Emil Palade” University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş, Department of Pharmacognosy and Phytotherapy, Tîrgu Mureş, România

²„George Emil Palade” University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Tîrgu Mureş, Department of Toxicology and Biopharmacy, Tîrgu Mureş, România

CORRESPONDING AUTHOR

Fülöp Ibolya

38 Gheorghe Marinescu Street, Tîrgu Mureş, 540142, România
Email: ibolya.fulop@umfst.ro / fulopibolya@yahoo.com

ARTICLE HISTORY

Received: 8-Oct-2020

Accepted: 2-Nov-2020

DOI: 10.2478/orvtudert-2020-0007

Determination of flavonoids and polyphenols in veterinary products

ABSTRACT

According to the 8th Hungarian Pharmacopoeia, propylene glycol can be chosen as solvent over ethyl alcohol for use in food supplements, therefore, the concentration of flavonoids and polyphenols in medicinal plants is measured using propylene glycol extracts. Samples of seven products, used in veterinary medicine, known to be rich in polyphenols and flavonoids were chosen to verify the usefulness of propylene glycol as extraction solvent. The polyphenol measurements were carried out using the Folin-Ciocalteu method and the total flavonoid content was established using the modified method from the 10th Romanian Pharmacopoeia, *Cynarae folium* monograph. Propylene glycol/water mixture (70%/30%), used as extraction solvent for medicinal plants rich in flavonoids and polyphenols, proved to be useful for extraction of these valuable active substances and correlates with the known amounts stated previously to be present in these vegetable materials. Results were in correlation with literature data, concentrations ranged between 0.05 and 0.07 mg/ml (immediately after preparation), 0.02 and 0.08 mg/ml (within six months following preparation) in case of flavonoids and 2.44 and 3.80 mg/ml (immediately after preparation), 1.20 and 2.18 mg/ml (within six months following preparation) in case of polyphenols.

Keywords: polyphenols, flavonoids, propylene glycol

KIVONAT

Az állatgyógyászati étrend-kiegészítők összetételében az etanol helyett a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos propilénlikolt választottuk a növényi hatóanyagok kivonására, így ezen kivonatokból határoztuk meg a polifenolok és flavonoidok koncentrációját. Hét állatgyógyászati termékből, melyek összetételében polifenolokban és flavonoidokban gazdag növényi részeket használtunk, követtük a propilénlikollal készült kivonatok hatóanyagainak koncentrációját az elkészítés után és hat hónap állást követően. A polifenolokat a Folin-Ciocalteu módszerrel és a flavonoidokat a X. Román Gyógyszerkönyv, *Cynarae folium* monográfiájánál leírt módosított módszerrel határoztuk meg. A propilénlikol: víz keveréke (70 % : 30%) hatásosnak bizonyult az értékes hatóanyagok kinyerésére, a koncentrációk összefüggésben vannak a korábban ismert növényi részek hatóanyagainak a koncentrációjával. Méréseink során flavonoidoknál 0,05-0,07 mg/ml (gyártást követően), 0,02-0,08 mg/ml (hat hónap után) és a polifenoloknál 2,44-3,80 mg/ml (gyártást követően), 1,20-2,18 mg/ml (hat hónap után) koncentrációkat határoztunk meg.

Kulcsszavak: polifenolok, flavonoidok, propilénlikol

Bevezető

Az állatgyógyászatban az étrend-kiegészítők biztonságos alkalmazása érdekében a szakembernek ismernie kell a szabályozások előírása szerinti előállítási követelményeket és a felhasználhatósághoz szükséges kritériumokat az állatokra/állatgyógyászati készítményekre vonatkozóan is.

Az étrend-kiegészítők az európai uniós szabályozás szerint olyan **élelmiszereknek** tekinthetők, amelyek az étrend kiegészítését szolgálják, és koncentrált formában tartalmaznak tápanyagokat vagy egyéb táplálkozási vagy élettani hatással rendelkező anyagokat. Az étrend-kiegészítők összetételében vitaminok, ásványi anyagok, tónikumok és más anyagok szerepelhetnek. Más anyagok közé sorolják a gyógynövényeket, tehát a gyógynövényektől gyűjtött növényi részek is bekerülhetnek ezen termékek összetételébe, és így született meg a növényi eredetű termékek fogalomköre [1]. A növényi termékek és készítmények nemcsak a humán fitoterápiában, hanem az állatgyógyászatban is hatásosnak bizonyultak, a termékek összetételében a különböző növényi hatóanyagok harmonikusan kiegészítik egymást. A gyógynövényeknek szerepük van az egészség fenntartásában, a kórfolyamatok megelőzésében és kedvező befolyásolásában [2]. Az állat- és humán gyógyászatban az enyhe és közepesen súlyos betegségek kezelésére gyakran/néha első lépésben gyógynövényeket próbálnak ki, ismervén a gyógynövények tapasztalaton alapuló hatásosságát. Hatékony, standardizált készítmények előállítása céljából, a növényekben található hatóanyagok kivonására olyan oldószer vagy oldószerkelet használata javasolt, amely toxikológiai szempontból megfelelő és hatékonyan kivonja a növényi hatóanyagokat.

Köztudott, hogy az etanol az egyik leggyakrabban alkalmazott kivonószer a növényi hatóanyagoknál, de javasolt egy olyan oldószer használata, amely engedélyezett az étrend-kiegészítőknél és képes kivonni a növényi hatóanyagokat [1]. Az uniós harmonizációs kötelezettség alapján étrend-kiegészítők osztályába tartozó termékek-nél alkohol (40%) és víz keverékét írja elő, ami az eltarthatóság szempontjából nem a legelőnyösebb [1,3].

A növényi hatóanyagok kivonására a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos propilénglikol is alkalmas (propylenglycolum, propán-1,2 diol). A propilénglikol sűrűn folyó, tiszta, színtelen folyadék. Vízzel és alkohollal elegyedik [4]. Az alkoholok csoportjába tartozó szénhidrogén vegyület, veszélytelennek számít, használható oldószerként és nedvesítőszerként [5]. A propiléngli-

kolt Európában és az Amerikai Egyesült Államokban is használják helyi, perorális és néhány intravénás készítmény előállításánál, az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) és az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicine Agency, EMA) által engedélyezett, és étrend-kiegészítők összetételében szerepelhet [3,6]. Az FDA a propilénglikolt általában biztonságosnak tekinti, engedélyezi a használatát, de az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation, WHO) a 25 mg/kg/nap maximális dózisa hívja fel a figyelmet, ami fölött már toxicitást mutat [3,6-8].

Galeotti és munkatársai a propoliszos termékek-nél használtak propilénglikolt, mint oldószert étrend-kiegészítők összetételében [9]. Egy barcelonai 2019-es tanulmány szintén a propoliszos kivonatok kapcsán állapította meg, hogy stabilabbak azok a kivonatok, amelyek propilénglikollal készültek, mint az etanolos kivonatok [10]. A propilénglikolt, mint oldószert jó eredményekkel alkalmazták a polifenolok kivonására, amit egy thai-földi kutatócsoport is igazolt a mangosztán perikarpium vizsgálatakor. Az általuk alkalmazott oldószerek közül a propilénglikol és a kókuszolaj (40-70%) keveréke hatásosnak bizonyult a polifenolok és flavonoidok kinyerésére. Növelve a propilénglikol koncentrációját a kivonó-oldószer elegynek magasabb polifenol és flavonoid koncentrációkat határoztak meg, tehát a propilénglikol jelenléte pozitívan befolyásolta a hatóanyagok kinyerését [11].

Korábbi publikációkban voltak előzetes vizsgálatok a propilénglikollal készült kivonatokból [12]. Ebben a munkánkban összpolicenol és összflavonoid tartalom meghatározásokat végeztünk propilénglikolos kivonatokból.

A propilénglikollal történő fitokémiai mennyiségi meghatározások munkamenete nem változhat és nem befolyásolja az eredeti kísérletes munka menetét [13,14].

Anyag és módszer

A termékekből a gyártást követően és hat hónap tárolás után is meghatároztuk az összpolicenol és flavonoid tartalmat, követve az említett hatóanyagcsoportok koncentrációját.

Növényi kivonatok

Hét állatgyógyászati készítmény állt a rendelkezésünkre, amelyeket direkt hidraulikus préseléssel állítottak elő propilénglikol (70%) és víz (30%) keverékkel. Az egyes termékek mennyiségi összetételére nincs információnk, mert a termékek bejegyzés alatt állnak.

A gyógynövények ezekben a készítményekben az *Agrimonia eupatoria* L. (herba), *Allium sativum* L. (bulbus) (termesztett), *Arctium lappa* L. (radix), *Betula pendula* Roth (folium), *Calendula officinalis* L. (flos) (termesztett), *Coriandrum sativum* L. (herba) (termesztett), *Chelidonium majus* L. (herba), *Equisetum arvense* L. (herba), *Foeniculum vulgare* L. (fructus) (termesztett), *Juglans regia* L. (folium) (termesztett), *Juniperus communis* L. (fructus), *Humulus lupulus* L. (flos), *Hypericum perforatum* L. (herba), *Melissa officinalis* L. (folium) (termesztett), *Ononis spinosa* L. (radix), *Primula officinalis* L. (radix) (termesztett), *Rosmarinus officinalis* L. (folium) (termesztett), *Salvia officinalis* L. (folium) (termesztett), *Tanacetum vulgare* L. (flos), *Taraxacum officinale* F.H.Wigg (radix), *Thymus serpyllum* L. (herba), *Urtica dioica* L. (herba, radix), *Valeriana officinalis* L. (radix) (termesztett), *Viola tricoloris* L. (herba), melyet a spontán flórából vagy kultúrából gyűjtöttek, Maros megye területéről. A növényi részek szárítása természetes körülmények között és raktározásuk a felhasználásig az előírásoknak megfelelően száraz helyen, fénytől védve történt [15].

Oldószerek, reagensek

Az összpolicenol meghatározáshoz Folin-Ciocalteu reagenst (Scharlau, Spanyolország), nátrium-karbonátot (Lach-ner, Csehország), galluszsavat (Sigma-Aldrich, Németország) és az összflavonoidhoz alumínium klorid hexahidrátot (Chimopar, Románia), nátrium acetátot (Carl Roth GmbH, Németország) és kvercetin (Sigma-Aldrich, Németország) használtunk. Az ultratiszta víz előállításához Direct-Q10 típusú (Millipore, USA) víz-tisztító rendszert használtunk. A növényi kivonatok elkészítésénél oldószerként propilénlikolt (Brenntag, Románia) használtunk. A spektrofotometriás méréseiket a Specord 210 (Analytic Jena, Németország) készüléken mértük.

Mennyiségi meghatározások

Összpolicenolok kimutatása: A Folin- Ciocalteu módszerrel dolgoztunk. 40 µl elkészített mintához 3,16 ml desztillált vizet és 200 µl Folin-Ciocalteu reagenst adtunk. Elegyítést követően 5 perc után 600 µl nátrium karbonátot (20% w/v) adtunk hozzá. Az így összekevert oldatok 2 órát szobahőmérsékleten (20 °C) álltak és vakpróbával (víz és reagensek) szemben 765 nm-en leolvastuk az abszorbanciát. Az eredményeket µg/ml galluszsav ekvivalensben határoztuk meg [16]. A minták koncentrációjának meghatározásakor három párhuzamos mérést végeztünk.

A használt galluszsav standardot a következőképpen készítettük el: 0,500 g galluszsavat 10 ml etanolban oldotunk és 100 ml-es mérőlombikban vízzel töltöttük jelig. Az így elkészített törzsoldatból további vízzel való hígítással elkészítettük a kalibrációs egyeneshez szükséges hígítási sort (50-500 µg/ml).

Összflavonoid tartalom meghatározása: A kivonatok összflavonoid tartalmát kolorimetriás módszerrel határoztuk meg. 1500 µl mintához 1 ml nátrium acetátot (10% w/v), 600 µl AlCl₃ oldatot (2,5%, w/v), 1400 µl metanolt és 1500 µl vizet adtunk. Az oldatokat jól összekevertük és 15 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten (20 °C), majd 430 nm-en leolvastuk az abszorbanciát vakpróbával szemben (reagensek, metanol és víz). Az eredményeket kvercetinben fejeztük ki [4,17-19]. A minták összflavonoid-koncentráció meghatározásához három párhuzamos mérés történt.

A flavonoid koncentráció meghatározásához kvercetin standardot használtunk. 100 ml-es mérőlombikban 0,019 g kvercint mértünk és a jelig metanollal töltöttük fel. Az elkészített oldatból 25-375 µl közötti mennyiségeket vettünk ki, 1500 µl-ig kiegészítettük metanollal és rendre 1000 µl nátrium-acetátot (10% w/v), 600 µl alumínium-klorid oldatot (2,5%, w/v), 1400 µl metanolt és 1500 µl vizet adtunk hozzá.

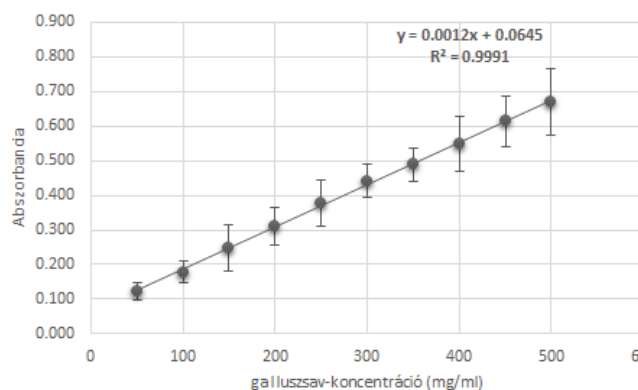
A minták leolvasása metanollal való ötszörös hígítás után történt.

Eredmények és megbeszélés

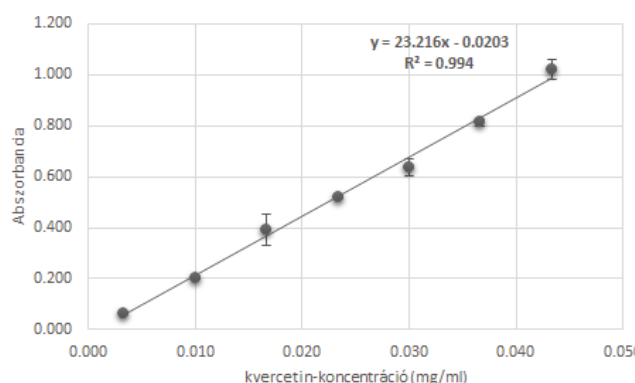
A Folin- Ciocalteu módszert a különböző Gyógyszerkönyvek növényi kivonatok összpolicenol mennyiségi meghatározására írják le. Eredményeinket az alábbi ábrákon és táblázatban foglaltuk össze (**1. ábra, 2. ábra és 1. táblázat**).

A készítmények polifenol és flavonoid tartalmát az 1. számú táblázatban foglaltuk össze.

A termékek polifenol tartalma közeli értékeket mutat. A gyártást követően a legkisebb érték a 2,44 mg/ml míg a legnagyobb érték 3,80 mg/ml, hat hónap tárolás után legkisebb érték a 1,20 mg/ml míg a legnagyobb érték 2,18 mg/ml polifenol tartalom galluszsavban kifejezve. A flavonoid koncentrációknál a gyártást követően a legkisebb érték a 0,05 mg/ml és a legnagyobb a 0,07 mg/ml és hat hónap tárolás után a legkisebb érték 0,02 mg/ml és a legnagyobb érték 0,08 mg/ml kvercetinben kifejezve, ami azt jelenti, hogy a flavonoidok nem bomlottak el a



1. ábra. A kvercetin kalibrációs egyenese a flavonoidtartalom meghatározáshoz



1. ábra. A galluszsav kalibrációs egyenese az összpolicenol meghatározáshoz

1. táblázat: A vizsgált állatgyógyászati termékek polifenol és flavonoid tartalma

Termékek sorszáma	Termékek javallata	Polifenol tartalom $\pm$ SD galluszsavban kifejezve (mg/ml)		Flavonoid tartalom $\pm$ SD kvercetinben kifejezve (mg/ml)	
		Január	Július	Január	Július
1	Parazita ellen	$2,52 \pm 0,7$	$1,20 \pm 0,1$	$0,05 \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$	$0,05 \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$
2	Kokcidiózis ellen	$2,65 \pm 0,4$	$1,58 \pm 0,3$	$0,04 \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$	$0,05 \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$
3	Trichomonas ellen	$2,44 \pm 0,6$	$1,32 \pm 0,2$	$0,04 \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$0,02 \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$
4	Szőrhullás ellen	$3,78 \pm 0,2$	$2,05 \pm 0,2$	$0,07 \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$	$0,02 \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$
5	Allergia ellen	$3,14 \pm 0,4$	$1,23 \pm 0,7$	$0,07 \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$	$0,07 \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$
6	Stresszoldó	$3,80 \pm 0,4$	$2,01 \pm 0,3$	$0,06 \pm 0,8 \cdot 10^{-2}$	$0,07 \pm 2,1 \cdot 10^{-2}$
7	Vizeletürítés zavaraira	$3,52 \pm 0,3$	$2,18 \pm 0,2$	$0,06 \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$0,08 \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$

tárolás alatt. Az összpolicenol tekintetében a készítmények hat hónapos tárolás után veszítettek hatóanyag-tartalmukból. Ez a veszteség 60,83 és 38,06% közé tehető a vizsgált mintáknál.

gyászati termékek, étrend-kiegészítők állíthatók elő. Az azonnali és a hat hónap távlatából mért eredmények azt bizonyítják, hogy a polifenolok jelentős bomlást szenvedtek viszont a flavonoidok stabilak voltak.

Következtetések

Az összpolicenol és flavonoid tartalmat határoztuk meg a propilénglikollal készült állatgyógyászati termékekből. A termékek magas polifenol és flavonoid tartalma a nyersanyagként használt gyógynövények magas polifenol és flavonoid tartalmára vezethető vissza. Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált aktív fitokémiai anyagok propilénglikollal jól kivonhatók a növényekből, így állatgyó-

Köszönetnyilvánítás

Jelen munkát támogatta a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara és az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztálya a 97/2019 iktatószámú „Contract de cesiune drepturi de autor” pályázaton keresztül. Köszönetünket fejezzük ki a szovátai Promedivet KFT-nek a rendelkezésünkre bocsátott termékekért.

Irodalom

1. ***Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale: Ghidul suplimentelor alimentare pe bază de plante medicinale, aromatice și produse ale stupului, București, 2018.
2. Rácz G, Rácz-Kotilla E, Szabó László Gy. Gyógynövények ismerete, A fitoterápia és az alternatív medicina alapjai. Galenus kiadó, Budapest, 2012.
3. *** Propylene glycol used as an excipient - report, elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/propylene-glycol-used-excipient-report-published-support-questions-answers-propylene-glycol-used_en.pdf, megtekintés dátuma: 2020.03.02.
4. *** Magyar Gyógyszerkönyv/Pharmacopoea Hungarica VIII. kiadás, III. kötet, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2007, 1634-1636, 2225-2226.
5. *** Propylene glycol - Pubchem database, elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-glycol>, megtekintés dátuma: 2020.05.15.
6. *** FDA - Code of Federal Regulations - Direct food substances affirmed as generally recognized as safe, elérhető: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1666&SearchTerm=propylene%20glycol>, megtekintés dátuma: 2019.09.02.
7. *** Re-evaluation of propane-1,2-diol (E 1520) as a food additive, elérhető: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5235>, megtekintés dátuma: 2020.09.06.
8. Lim TY, Poole RL, Pageler NM. Propylene Glycol Toxicity in Children. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2014;19(4):277-282.
9. Galeotti F, Maccari F, Fachini A, Volpi N. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods.* 2018;7(4):1-10.
10. Gemma SB. Propolis for Herpes simplex lesions: Review of the evidence and design of a lipstick for its application, Universitat de Barcelona, Final degree project, 2019.
11. Chatchai S, Worawan P, Attawadee Sae Y, Chaijan M. Tuning of virgin coconut oil and propylene glycol ratios for maximizing the polyphenol recovery and in vitro bioactivities of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp. *Process Biochem.* 2019;87:179-186.
12. Varga E, Schmidt I, Szövérfi B, Pop M D, Kelemen H, Tóth A. Phenolic content from medicinal plants and their products used in veterinary medicine. *Acta Medica Marisensis.* 2018;64(2):77-82.
13. Lans Ch. Validation of ethnoveterinary medicinal treatments. *Veterinary parasitology.* 2011;178:389-390.
14. ***Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Public Health Statement, Propylene glycol, 1997.
15. Varga E. Farmakognózia. MOGYE University Press, Marosvásárhely, 2009.
16. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999;299:152-179.
17. Pinacho R, Caverio RY, Astiasaran I, Ansorena D, Calvo MI. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal Funct Foods.* 2015;19:49-62.
18. da Silva Layzon AL, Pezzini BR, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves, *Pharmacogn Mag.* 2015;11(41):96-101.
19. *** Farmacopeea Română X. Medicală Könyvkiadó, București, 1993, 325, 334-335.