

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ПОЗДНЯКОВА АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА

Допускається до захисту:

в.о. завідувача кафедри
біофізичної хімії, фізики і педагогіки,
канд. хім. наук, доцент

_____ Ю.О. Лесишина

« ____ » _____ 2024 р.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД І АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ
УКРАЇНСЬКОГО ПРОПОЛІСУ

Спеціальність 102 Хімія

Кваліфікаційна робота магістра

Науковий керівник:

Куш О.В., професор кафедри

біофізичної хімії,

фізики і педагогіки,

д-р хім. наук, професор

(Підпис)

Оцінка: _____ / _____ / _____
(Бали /за шкалою ЄКТС/ за національною шкалою)

Голова ЕК: _____
(Підпис)

Вінниця 2024

АНОТАЦІЯ

Позднякова А.Ю. Хімічний склад і антиоксидантна активність українського прополісу. Спеціальність 102 «Хімія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2024. – 62 с.

Прополіс – смолиста речовина, що виробляється бджолами і має широкий спектр медичних застосувань завдяки своєму фітохімічному складу. Дослідження прополісу та його біологічно активних компонентів необхідні для стандартизації даного продукту. В роботі представлено результати аналізу на вміст поліфенолів та антиоксидантну активність етанольних екстрактів зразків прополіса з різних регіонів України, з використанням методів Фоліна-Чокальтеу, $AlCl_3$ та вискоефективна рідинна хроматографія. Досліджено кореляцію між вмістом поліфенолів та здатністю інгібувати радикали, а також залежність вмісту біологічно активних сполук від сезону збору.

Ключові слова: етанольний екстракт прополісу, хімічний склад антиоксидантна активність, поліфеноли, вискоефективна рідинна хроматографія.

Табл. 5. Рис. 26. Бібліограф.: 54 найм.

ABSTRACT

Pozdniakova A.Y. Chemical composition and antioxidant activity of Ukrainian propolis. Specialty 102 "Chemistry". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2024. – 62 p.

Propolis is a resinous substance produced by bees and has a wide range of medicinal uses due to its phytochemical composition. The study of propolis and its biologically active components is sufficient for the standardization of this product. The paper presents the results of analysis of the content of polyphenols and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis samples from different regions of Ukraine, using Folin-Chocalteu, $AlCl_3$ and high performance liquid chromatography methods. The correlation between the content of polyphenols and the ability to inhibit radicals was studied, as well as the dependence of the content of biologically active compounds on the collection season.

Key words: ethanol extract of propolis, chemical composition antioxidant activity, polyphenols, high performance liquid chromatography.

Table 5. Fig. 26. Bibliography: 54 hired.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1	10
ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОПОЛІСУ ...	10
1.1 Історія прополісу	10
1.2 Хімічний склад прополісу.....	12
1.3 Біологічна активність прополісу.....	15
1.3.1 Протівірусні властивості.....	15
1.3.2 Антибактеріальні властивості	16
1.3.3 Протигрибкові властивості.....	17
1.3.4 Антиоксидантні властивості.....	17
1.4 Визначення антиоксидантної активності прополісу.....	17
1.5 Кореляції між поліфенольним складом і антиоксидантною активністю прополісу	18
Висновки з літогляду	24
РОЗДІЛ 2	25
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	25
2.1. Об'єкти дослідження	25
2. 2 Реактиви та матеріали	25
2.3 Підготовка та приготування реактивів	26
2.3.1 Приготування 80% розчину етилового спирту	26
2.3.2 Приготування спиртових екстрактів прополісу.....	27
2.3.3 Приготування реактиву Фоліна-Чокальтеу	27
2.3.4 Приготування розчину 5% алюмінію хлориду	27
2.4 Методи дослідження і обладнання.....	27
2.4.1 Спектрофотометричний метод.....	27
2.4.2 Метод ВЕРХ-УФ	29
2.5 Методика виконання експерименту.....	31
2.5.1 Загальний вміст фенольних сполук в етанольних екстрактах прополісу методом Фоліна–Чокальтеу	31

2.5.2 Загальне визначення флавоноїдів в ЕЕП з реактивом $AlCl_3$	33
2.5.3 ВЕРХ-УФ	34
2.6 Техніка безпеки	34
РОЗДІЛ 3	36
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	36
3.3 Метод ВЕРХ-УФ для ідентифікації індивідуальних сполук та класів у складі ЕЕП	36
3.2 Дослідження загального вмісту фенольних сполук в ЕЕП методом Фоліна–Чокальтеу	45
3.3 Кількісне визначення флавоноїдів в ЕЕП з реактивом $AlCl_3$	46
Висновки	55
Список літератури	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;

АОА – антиоксидантна активність;

АО – антиоксидант;

ЕЕП – етанольний екстракт прополісу;

ДФПГ – 1,1 дифеніл-2-пікрілгідразил;

ГК – галова кислота;

КВ – кверцетин;

АБТС – 2,2-азино-біс (3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота);

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота;

ВЕРХ – виисокоефективна рідинна хроматографія;

ЕС₅₀ – концентрація антиоксиданта, якої достатньо для зниження початкової концентрації вільного радикала на 50%;

ε – коефіцієнт екстинкції;

l – товщина світлопоглинаючого шару;

C – концентрація розчину;

F – загальний вміст флавоноїдів, мг-екв кверцетину/г сухої ваги;

Ph – загальний вміст фенольних сполук, мг-екв галової кислоти/г сухої ваги;

$V_{\text{екстракту}}$ – загальний об'єм екстракту, мл;

m – маса наважки, г;

λ – довжина хвилі, нм.

ВСТУП

Актуальність теми

Причинами виникнення багатьох захворювань є накопичення в організмі значної кількості вільних радикалів, що спричиняють оксидативний стрес, в процесі якого порушується окислювально–відновлювальний баланс клітини. Рівень оксидативного стресу може бути визначений за вмістом у біологічних рідинах специфічних маркерів, що виникають як наслідок впливу активних форм кисню на молекули ДНК, білки, ліпіди та вуглеводи. Антиоксиданти (АО) є найважливішою частиною клітинно-захисної системи організму, оскільки вони мають здатність нейтралізувати шкідливі для організму вільні радикали та високореактивні і нестійкі молекули.

Протягом останніх років продукти бджільництва знаходять широке застосування як у традиційній, так і в сучасній медицині. Прополіс – цінний продукт бджільництва, який в останні десятиліття привертає все більшу увагу через його широкий спектр біологічної активності та потенційного комерційного застосування. Біологічна активність прополісу тісно пов'язана з наявністю природних компонентів у його складі, таких як поліфеноли: флавоноїди, фенольні кислоти, стильбени, похідні кумарину, лігніни, фенольні полімери (проантоціанідини, конденсовані таніни), рослинні смоли, віск, квітковий пилок, ефірні олії, жирні кислоти, вітаміни, мінерали та різні мікроелементи. Ці сполуки обумовлюють антиоксидантну, протівірусну, антимікробну, протипухлинну, протизапальну та інші властивості прополісу [1].

Сьогодні Україна є важливим постачальником продуктів бджільництва у всьому світі. За даними Всесвітньої продовольчої організації (FAO) до 2022 року Україна посідала перше місце в Європі та четверте у світі за обсягами виробництва меду. У великих обсягах виробляється також прополіс як вторинний продукт бджільництва. Дослідження вітчизняного прополісу є важливим та актуальним, але в літературі недостатньо інформації щодо складу,

властивостей та терапевтичного потенціалу українського прополісу. Вивчення цього продукту бджільництва, зібраного в різних куточках України, є необхідним для порівняльного аналізу хімічного складу та біологічної активності зразків прополісу, що відкриє нові можливості його широкого використання.

Мета дослідження: провести порівняльний аналіз хімічного складу зразків прополісу з різних регіонів України та дослідити антиоксидантні властивості зразків прополісу.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні **завдання:**

– визначити загальний вміст поліфенольних сполук в етанольних екстрактах прополісу методом Фоліна–Чокальтеу, а вміст флавоноїдів – з використанням $AlCl_3$;

– визначити EC_{50} як індекси антирадикальної активності зразків прополісу методами ДФПГ (1,1 дифеніл-2-пікрилгідразил); і АБТС 2,2-азинобіс (3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота);

– встановити хімічний склад зразків прополісу методом високоефективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням (ВЕРХ-УФ);

– встановити відповідність між вмістом фенольних сполук в зразках прополісу з індексами антиоксидантної активності.

Об’єкт дослідження хімічний склад і антиоксидантна властивості екстрактів прополісу з різних регіонів України.

Предметом дослідження є бджолиний продукт – прополіс, що був зібраний в регіонах Вінниччини, Донеччини, Івано-Франківщини, Одещини, Харківщини, Чернівців та Рівного.

Методи дослідження

1. метод Фоліна–Чокальтеу задля визначення загального вмісту фенольний сполук;

2. використання $AlCl_3$ для кількісного визначення флавоноїдів;
3. використання методу ВЕРХ-УФ для встановлення класів хімічних сполук у складі прополіса.
4. методДФПГ (1,1 дифеніл-2-пікрилгідрозил) для визначення EC_{50} - індексу антирадикальної активності зразків прополісу
5. метод АБТС 2,2-азино-біс (3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота) визначення EC_{50} зразків прополісу.

Апробація результатів дослідження відображена у публікації тез доповіді на українських конференціях:

1. Позднякова А. Ю., Аніщенко В. О., Зосенко О. О., Іванніков Р. В., Куш О. В. Хімічний склад і антиоксидантна активність українського прополісу. Збірник тез доповідей VII Міжнародної (XVII Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених. Вінниця, 2024. С. 34.

2. Позднякова А. Ю., Аніщенко В. О., Зосенко О. О., Іванніков Р. В., Куш О. В. Сезонний вплив на хімічний склад і антиоксидантну активність українського прополісу. Збірник матеріалів VIII Всеукраїнської наукової конференції. Житомир, 2024. С.28.

РОЗДІЛ 1

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОПОЛІСУ

1.1 Історія прополісу

Історію бджіл та продуктів бджільництва можна простежити до близько 13 000 років до нашої ери. Існують записи, які свідчать про використання прополісу стародавніми єгиптянами, персами та римлянами. Певну кількість знань засвідчують зображення бджоли та вуличного бджільництва, знайдені під час розкопок. Стародавні єгиптяни зображували бджіл, які виготовляли прополіс, на вазах та інших прикрасах і використовували його для полегшення багатьох недуг. Слово «прополіс» походить від давньогрецького *προπολις* (передмістя, бджолиний клей) [2].

Стародавні євреї вважали цорі (прополіс) ліками. Цорі та його терапевтичні властивості описані в Старому Завіті. Бальзам з прополісу описаний як подарунок цариці Савської цареві Соломону. В Іудеї його широко використовували через специфічний приємний аромат та лікувальні властивості. Прополіс бджолами виготовляється зі смоли різних тополь, зокрема *Populus balsamifera*, *Populus nigra*, and *Populus Gileadensis* [3].

Греки використовували прополіс як основний інгредієнт духів, які поєднували прополіс, і ароматичні трави. Кажуть, що Гіппократ використовував прополіс для лікування ран і виразок, як зовнішніх, так і внутрішніх. Педаній Діоскорид, який жив близько 50 року нашої ери, описав медичне використання прополісу у своїй головній праці «De materia Medica». Крім прополісу, він часто згадує, як ліки мед, віск, різні медові вина. Діоскорид писав про прополіс: слід вибрати жовтий бджолиний клей із солодким запахом, схожий на стиракс, який є м'яким і легко наноситься на зразок мастики. Він надзвичайно теплий і привабливий і добре підходить для витягування колючок і заноз [4].

Римляни також дуже шанували бджолу і прополіс. Про це пише Пліній Старший у своїй знаменитій «Природній історії». У перських рукописах прополіс описується як засіб від екземи, ревматизму.

У середньовіччі прополіс не був дуже популярною темою і його використання в основній медицині незабаром зникло. Збереглося лише кілька рукописів, присвячених прополісу. На щастя, знання щодо лікувальних властивостей прополісу збереглися в традиційній народній медицині і, більше того, прополіс все ще широко використовувався в «траволікуванні» на теренах Східної Європи. Арабські купці згадували про велику кількість бджіл і меду на слов'янській землі в 9-10 століттях.

Зацікавленість до прополісу повернулася у Європу разом із ренесансною теорією, яка повернула інтерес до античного вчення та медицини. Завдяки медикам-гуманістам деякі старі та забуті засоби та методи лікування були заново відкриті та використані знову. Джон Джерард у своїй відомій книзі про трави «Історія рослин» (1597 р.) згадує про використання «смоли або липкої речовини бруньок чорної тополі» для цілющих мазей [5]. Встановлено, що прополіс був включений у фармакопеї Англії в сімнадцятому столітті як основний інгредієнт цілющих мазей.

Розвиток досліджень прополісу був тісно пов'язаний з розвитком хімії. Приклади включають дослідження хімії флавоноїдів, поширених сполук, що містяться в прополісі.

Український прополіс

Бджільництво – дуже розвинена й перспективна галузь в Україні. Про поширеність його свідчать збережені донині давні топоніми: Мединичі, Мединівка, Бортне, Бортники, Бортничі, Уборть тощо. Великі площі медоносних угідь, сприятливі кліматичні умови та високий порідний потенціал бджіл створюють усі умови для розвитку бджільництва в промислових масштабах [6]. Територія України розташована переважно у помірному кліматичному поясі, лише південний берег Криму – у субтропічному. Кліматичні умови та ґрунт загалом сприятливі для

сіськогосподарського виробництва. Флору України складають близько 30 тисяч рослин. Це створює хороші умови для розвитку бджільництва.

Рельєф України здебільшого рівнинний. Лише на заході височіють Карпати і на півдні – Кримські гори. Найвища точка України – гора Говерла (2061 метр) знаходиться у Карпатах. Найвища точка Кримських гір — гора Роман-Кош (1545 метрів). Найбільша річка України – Дніпро. Важливу роль, як водні артерії, мають також річки Дунай, Дністер, Сіверський Донець та інші. В Україні також багато невеликих річок, які надають неповторний колорит українській природі.

Традиції бджільництва в Україні мають багатовікову історію. Іноземні гості, мандрівники, які відвідували Україну завжди з подивом відзначали “величезну кількість бджіл та меду” у нашому краї. Цьому сприяли природні умови, працьовитість та допитливість наших предків. За часів Київської Русі мед та віск були основними продуктами торгівлі. Крім меду, високим попитом завжди користувалися такі продукти, як прополіс, пилок, віск, маточне молочко. Прополіс використовували як дезінфікуючий засіб для заживлення ран і язв, для лікування інфекційних хвороб, кашлю.

Українські дослідники зробили значний внесок у розвиток бджільництва. Один із них, Петро Прокопович є винахідником першого у світі рамкового вулика. Ним була заснована школа бджільництва, де мали змогу навчатися прості люди [7].

1.2 Хімічний склад прополісу

Прополіс, також відомий як бджолиний клей, представляє собою смолисту речовину, Бджоли отримують прополіс шляхом змішування слини та харчових речовин, таких як пилок, амінокислоти, вітаміни та біофлаваноїди [8].

Медоносні бджоли виробляють прополіс для захисту вулика. Окрім заклеювання отворів, блокування тріщин і згладжування внутрішніх стінок, бджолиний клей діє як антисептик, щоб запобігти мікробному зараженню

личинок, запасів меду та стільників. Тонкий шар прополісу забезпечує непроникну оболонку, яка обмежує вихід води та підтримує постійну вологість у вулику.

Дослідження хімічного складу прополісу почалися на початку 20 століття. Перші спроби визначити склад прополісу стосувалися простого фракціонування. Одним із найперших звітів є Dieterich and Helfenberg [9, 10], в якому вони описують свої методи екстракції та розділення компонентів прополісу в спирті, хлороформі та ефірі. У 1911 році у своїй пізній роботі Dieterich [11] ідентифікував ванілін у прополісі, а інший німецький дослідник Кустенмахер, який працював над прополісом, ідентифікував коричню кислоту та коричний спирт як компоненти прополісу. У 1926 році Jaubert [12] виявив пігмент хризин, природний флавіон у бджолиному клеї, а також показав, що хризин надає кольору бджолиному воску. Серія досліджень, проведених у США, дозволила виявити в прополісі невелику кількість вітамінів групи В, С і Е, а також ніотинової і пантотенової кислот. У 1957 році Ushkalova and Topolova [13] знайшли в прополісі чотири типи воску різного кольору. Дослідження хімічного складу прополісу були продовжені в 1960-х роках. Вважалося, що прополіс має дуже складний, але досить постійний хімічний склад, як бджолиний віск. Однак пізніше аналіз численних зразків із різних географічних регіонів, а також застосування сучасних лабораторних методів показали, що хімічний склад бджолиного клею дуже різноманітний. У 1969 році .Popravko et al [14] виділили і ідентифікували у прополісі два флаванони та ізованілін, а також шість флавоноїдних пігментів. У 1970-х роках прогрес у хроматографічних аналітичних методах, таких як колонкова хроматографія та тонкошарова хроматографія, дозволив відокремити та виділити більше компонентів з прополісу [15].

Склад прополісу не є постійним і значно варіюється від регіону до регіону разом із рослинністю, від сезону до сезону та від вулика до вулика.

Всього в прополісі виявлено щонайменше декілька сотен різних сполук. Широкий аналіз виявив приблизно 50 компонентів у «типовому»

європейському прополісі, який зазвичай походить з дерев, таких як тополі та хвойні види. На даний час добре відомо, що до складу прополісу входять смолисті речовини (50-55%), віск (20-30%), ефірні та бальзамічні олії (8-10%), пилок (5-10%) та інші органічні та неорганічні речовини (1-5%) [16],[17],[18]. Основними компонентами прополісу з більшості джерел є флавоноїди. Було встановлено, що деякі з основних фенольних ефірів і флавоноїдів, як-от фенілетилловий ефір кавової кислоти, кверцетин, піноцембрін, нарингін, галангін і кризин, відповідають за антимікробну, антиоксидантну та протизапальну дію прополісу [19].

Для встановлення цих сполук у складі прополіса використовують метод Фоліна-Чокальтеу та використання методу $AlCl_3$ а також високоефективну рідинну хроматографію з використанням УФ-вид детектуванням.

– метод з використанням реактива Фоліна – Чокальтеу, принцип методу перенесення електронів, методика полягає у відновленні фенолів жовтим молібдат-вольфраматного реагенту, відомого як реагент Фоліна–Чокальтеу, у лужних середовищах до хромофору синього кольору. Цей спосіб дуже чутливий до антиоксидантів, які не є фенолами, і можуть передавати електрони. Серед таких антиоксидантів можуть бути редуруючі цукри, амінокислоти, аскорбінова кислота та іон міді у формі $Cu(I)$. Внаслідок реакції між редуруючими агентами та реагентом Фоліна–Чокальтеу виникає синій хромофор, що є показником наявності цих антиоксидантів.

– метод з використанням $AlCl_3$, це селективний метод для встановлення флавонів та флавонолів. Алюміній хлорид утворює стійкі до кислоти жовті комплекси з кетогрупами і гідроксильною групою флавонів і флавонолів.

– метод з ВЕРХ з УФ-вид детектуванням, при цьому хімічні речовини в зразках прополісу ідентифікували шляхом порівняння їх часів утримання та УФ-спектрів зі значеннями досліджуваних стандартів. Таким чином можна чітко встановити різноманітний склад зразків прополісу. Найважливішою перевагою ВЕРХ є висока роздільна здатність, яка дозволяє аналізувати партії декількох компонентів. Навіть якщо зразок складається з суміші, ВЕРХ

дозволить розділити, виявити та кількісно визначити цільові компоненти. Також при відповідній умові можна досягти високого рівня відтворюваності

1.3 Біологічна активність прополісу

Сучасною наукою доведено антимикробний потенціал прополісу, а крім того, продемонстровано ряд інших корисних фармакологічних властивостей бджолиного клею таких як антимикробні, антиоксидантні, протиракові, протизапальні, протигрибкові, протипаразитарні та противірусні, імуностимулюючі, гепатопротекторні, цитотоксичні та ін [20]. Ці характеристики роблять прополіс особливо цінним у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості, де він широко використовується.

1.3.1 Противірусні властивості

Доведено, що прополіс має противірусні властивості проти широкого спектру вірусів. Одне з найбільш ранніх досліджень було проведено Debiaggi et al [21], які досліджували флавоноїди, отримані з прополісу, а саме хризин, кемпферол, акацетин, галангін і кверцетин проти різних штамів герпесвірусу, аденовірусу, ротавірусу та коронавірусу. Також було показано, що прополіс має противірусну дію проти SARS-CoV-2. Harisna et al [22] продемонстрували, що прополіс, доставлений у ліпосомній капсулі, був таким же ефективним, як і ремдесивір, у нейтралізації SARS-CoV-2 *in vitro*. Багато обчислювальних і молекулярних досліджень свідчать про ефективність прополісу та його фенольних компонентів проти багатьох важливих білків SARS-CoV-2, включаючи протеази та спайковий білок. Доведено, що прополіс має анти-ВІЛ-активність. Було показано, що моронова кислота, тритерпеноїд, виділений із бразильського прополісу, пригнічує активність ВІЛ у лімфоцитах H9. Крім того, Gekker et al. [23] продемонстрували, що екстракти прополісу з різних джерел і регіонів, а саме Міннесоти (США), Бразилії та Китаю, пригнічують інфіковані ВІЛ-1 CD4+ лімфоцити та культури мікрогліальних клітин. Було

виявлено, що фенольні сполуки, отримані з прополісу — нарингенін, кверцетин і дипренілкорична кислота — сполуки, пов'язані з протівірусною дією прополісу. Поліфеноли також допомагають транспортувати катіони Zn через плазматичну мембрану незалежно від транспортних білків цинку плазматичної мембрани [24]. Показано, що катіони Zn пригнічують активність вірусної РНК-залежної РНК-полімерази.

1.3.2 Антибактеріальні властивості

Антибактеріальні властивості прополісу дуже добре описані в науковій літературі. Przybyłek і Karpiński [25] нещодавно переглянули аналіз наданих даних про вплив прополісу на близько 600 штамів бактерій, як аеробних, так і анаеробних. Загалом, у багатьох дослідженнях було показано, що прополіс виявляє більш потужну антимікробну дію проти грампозитивних, ніж грамнегативних бактерій [26]. Вважається, що різниця пов'язана з наявністю бактеріальних гідролітичних ферментів у зовнішній мембрані грамнегативних бактерій, які потенційно можуть знизити ефективність активних компонентів прополісу. Поширеною практикою є пов'язування потенційних антимікробних властивостей прополісу з вмістом фенолів і флавоноїдів. Фактично, велика кількість активних інгредієнтів у різних комбінаціях/концентраціях є властивістю прополісу, яка може запобігти виникненню резистентності бактерій. Окрім прямого антимікробного ефекту, прополіс також діє синергетично зі звичайними антибіотиками, підвищуючи їх ефективність, а також з іншими натуральними продуктами, такими як мед.

Що стосується його антибактеріального механізму дії, прополіс може перешкоджати патогенному потенціалу, збільшуючи проникність клітинної мембрани бактерій, пригнічуючи виробництво АТФ, зменшуючи мобільність бактерій, порушуючи потенціал мембрани та погіршуючи виробництво бактеріальної РНК і ДНК.

1.3.3 Протигрибкові властивості

Відомо, що прополіс має протигрибкову дію проти таких видів грибів, таких як *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. Glabrata*. Варіації у протигрибковій дії повідомляються в численних дослідженнях, що аналізують дію прополісу з різного географічного походження проти різних видів грибів. Екстракт прополісу продемонстрував чудову ефективність щодо тестів *in vitro*, проведених проти дріжджів, визначених як агенти оніхомікозу. У цих експериментах було помічено, що в низьких концентраціях прополіс діє як фунгістатичний і фунгіцидний засіб. Ota et al [27]. провели експериментальні дослідження активності бразильського прополісу проти 80 штамів дріжджів *Candida* (20 штамів *C. albicans*, 20 штамів *C. tropicalis*, 20 штамів *C. krusei* та 15 штамів *C. guilliermondii*).

1.3.4 Антиоксидантні властивості

Антиоксидантні властивості прополісу полягають в його здатності пригнічувати або знищувати вільні радикали у клітинах організму. Вільні радикали є активними частинками, які можуть спричиняти окислювальний стрес та пошкодження клітин, що в свою чергу пов'язано із захворюваннями та процесами старіння. Прополіс, який містить різноманітні флавоноїди та фенольні сполуки, виявляє антиоксидантну активність, допомагаючи боротися з вільними радикалами та підтримуючи загальне здоров'я клітин. Ці властивості роблять прополіс корисним у складі продуктів для догляду за шкірою та дієтичних добавках для підтримки антиоксидантного захисту організму [28]. Хімічна структура поліфенолів, які є у складі прополісу, дозволяє ефективно інгібувати вільні радикали. Флавоноїди в прополісі є дієвим АО, що захищають клітинну оболонку від ПОЛ [29].

1.4 Визначення антиоксидантної активності прополісу

Всі природні антиоксиданти користуються попитом на даний час. Але продуктивніше використовувати суміш декількох класів антиоксидантів.

Найкращим прикладом такої системи є екстракт рослинної сировини, отриманий відповідним розчинником.

Методи дослідження загальної АОА розрізняються по типу джерела окислення, природи окислювального субстрату і способу вимірювання [30].

- метод ДФПГ – заснований на вивченні процесу знебарвлення стабільного хромоген-радикала ДФПГ. Знебарвлення ДФПГ відбувається з фіолетового до блідо-жовтого, коли стабільний радикал ДФПГ відриває атом водню від молекули АО і перетворюється на ДФПГ-Н.

- метод FRAP–метод заснований на відновленні 2,4,6-трипіридил-S-триазинового комплексу заліза (Fe^{3+} -TPTZ) до залізної форми (Fe^{2+} -TPTZ);

- метод АБТС-додавання антиоксиданту до синьо-зеленого хромофору АБТС⁺, він відновлюється до АБТС і змінюється колір (734 або 750 нм);

- метод зниження потужності (RP) - речовини, які мають відновний потенціал, реагують з фероціанідом калію (Fe^{3+}) з утворенням фероціаніду калію (Fe^{2+}), який потім реагує з хлоридом заліза (III) з утворенням комплексу заліза;

- аналіз активності поглинання пероксиду водню, коли оптична щільність розчину пероксиду водню у фосфатному буфері визначається до і після додавання зразка (230 нм).

- метод знебарвлення β -каротин-лінолевої кислоти – реакція переносу атома Гідрогену, полягає в тому, що лінолева кислота окислюється АФК. Продукти ініціюють окислення β -каротину, сполука втрачає свій характерний оранжевий колір;

- фосфомолібденовий метод на основі відновлення Mo(VI) до Mo(V) та комплексу зеленого фосфату/Mo(V) при кислому рН (695 нм) та ін.

1.5 Кореляції між поліфенольним складом і антиоксидантною активністю прополісу

Багато вторинних метаболітів діють як захисні агенти проти патогенів і траводних тварин і забезпечують репродуктивні переваги як атрактанти

запилювачів і розсіювачів насіння. Також з'являється все більше доказів того, що вторинні метаболіти мають безліч фізіологічних функцій, пов'язаних із захистом від різних форм стресу навколишнього середовища, одна з основних груп таких сполук є поліфеноли.

Рослинні фенольні сполуки широко характеризуються як ароматичні метаболіти, які мають одну або більше «кислих» фенольних гідроксильних груп. Їх структура варіюється від відносно простих фенолів, таких як молекула саліцилової кислоти, до складних полімерів, таких як суберин і лігнін. Основними класами фенольних речовин є фенольні кислоти, флавоноїди, та дубильні речовини. Вони зустрічаються у всіх вищих рослинах, тому цих сполук багато у складі прополіса [31].

Флавоноїди рис. 1.1 — це група поліфенолів, які значно відрізняються за структурою та властивостями.

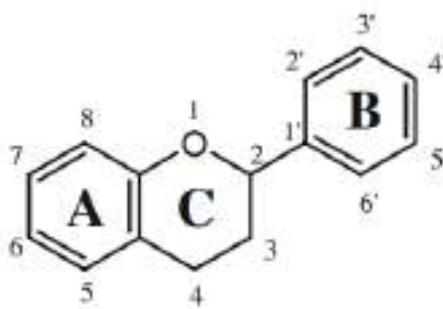


Рис.1.1 Структура флавоноїдів [34].

Основним сайтами у складі молекул флавоноїдів, які обумовлюють антиоксидантні властивості є:

- у кільці В о-дигідрокси-групи, які проявляють значну здатність захоплювати радикали і надають стабільність новоутвореного радикала.
- подвійний зв'язок С-2 і С-3 і наявність 4-оксогрупи в кільці С сприяє розподіленню електронної густини і обумовлює антиоксидантні властивості флавоноїдів.
- Групи ОН у положеннях С-3 та С-5 у присутності 4-оксо груп у кільці А та С максимально інгібують радикали.

Механізм антиоксидантної активності фенольної сполуки може бути або через механізм перенесення атома водню, або перенесення одного електрона через перенесення протона або послідовне перенесення електрона з втратою протона, хелатування перехідних металів [32]. Кожен із цих механізмів дає пояснення ролі фенольних антиоксидантів, як наведено нижче.

Перенесення атома водню (НАТ)

У НАТ антиоксидант, що містить Н-атом, представлений АН, реагує з вільними радикалами. Вільний радикал стабілізується з утворенням нейтрального виду, тоді як антиоксидант перетворюється на антиоксидантний вільний радикал (A^{*}). Фенольний антиоксидант (АН) може забезпечити атом Н для субстрату вільних радикалів і створити нерадикальний субстрат (RH, ROH або ROOH) і антиоксидантний вільний радикал (A^{*}), як показано на Рис. 1.2



Рис 1.2. Реакції антиоксиданту (АХ) з вільними радикалами [32]

Здатність або потужність фенольних сполук виконувати антиоксидантну функцію визначається їхньою структурою, особливо кількістю та положенням групи ОН. Наприклад, галова кислота - це фенольна кислота, що містить три гідроксильні групи та карбоксильну групу. Саме гідроксильні групи відповідають за антиоксидантну функцію, утворюючи вільний радикал галової кислоти Рис 1.3. [33]. Флавонол, такий як кверцетин, що містить п'ять гідроксильних груп, має порівняно більший антиоксидантний потенціал.

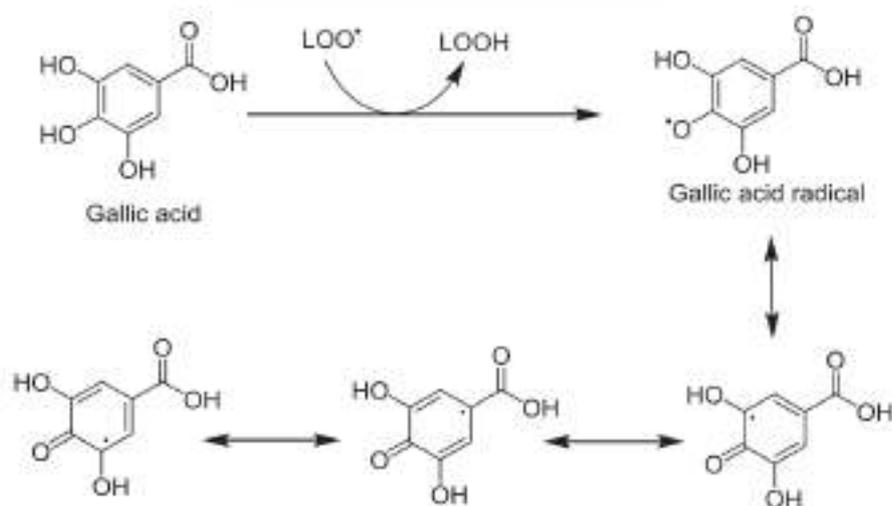


Рис 1.3 Реакція галлової кислоти з вільними радикалами та її стабілізація безрадикальної галлової кислоти [32]

Перенесення одного електрона

У цьому механізмі потенціал іонізації (ІП) антиоксиданту є найбільш важливим енергетичним фактором в оцінці антиоксидантної дії. Чим нижчий потенціал іонізації, тим легше відбувається відрив електрона. Антиоксидант передає електрон на вільний радикал і тоді стає радикальним катіоном. Це призводить до радикальної стабілізації молекули антиоксиданту, як показано на Рис 1.4.

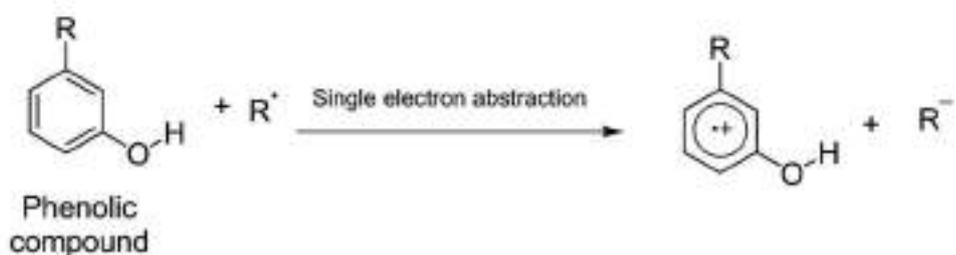


Рис 1.4. Механізм одноелектронного переносу [32]

Передача одного електрона з подальшим перенесенням протону

У механізмі послідовного переносу електронів із втратою протонів фенольна сполука віддає протон вільному радикалу та утворює аніон, який далі віддає електрон, утворюючи стабільну молекулу, як показано на Рис 1.5.

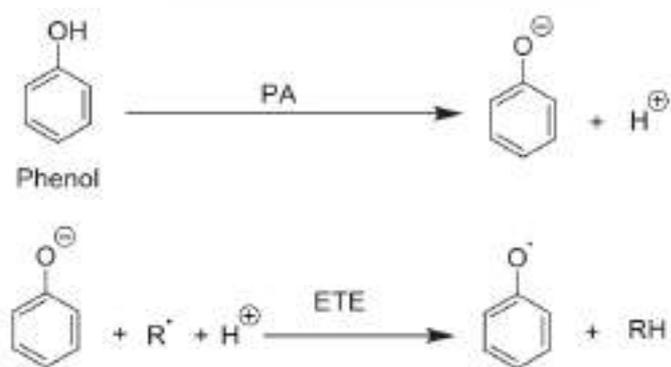


Рис. 1.5. Механізм послідовного переносу електронів із втратою протонів. Протонна здатність (РА) та ентальпія переносу електронів (ЕТЕ) [32].

Хелатування перехідних металів

Хелатування перехідних металів є однією з антиоксидантних ролей, яку може відігравати фенольна сполука. Експерименти показали, що перехідні метали хелатуються поліфенолами з утворенням стабільних комплексів. Перехідні метали, такі як мідь (Cu), марганець (Mg), кобальт (Co), можуть каталізувати такі реакції. Однак хелатоутворення залежить від певних умов, наприклад іони металів не приєднуються до білків або інших молекул хелаторів.

Хелатування металів може безпосередньо пригнічувати відновлення Fe⁺³ Рис. 1.6 отже, зменшуючи утворення реакційноздатних вільних радикалів •ОН у реакції Фентона. Хелатування металів залежить від потенціалу відновлення фенольних сполук. Фенольні кислоти та флавоноїди мають потужний потенціал поглинання вільних радикалів. Тим не менш, хелатний потенціал з металами та відновна здатність можуть відрізнятися залежно від їхніх структурних характеристик. Наприклад, у флавоноїдах властивості поглинання радикалів і хелатування вищих металів залежать від катехолового фрагмента (кілець В), 2,3-подвійно зв'язаної та кон'югованої 4-карбокисильної групи в С-кілецьці та 3- та 5-гідроксильних фрагментів:

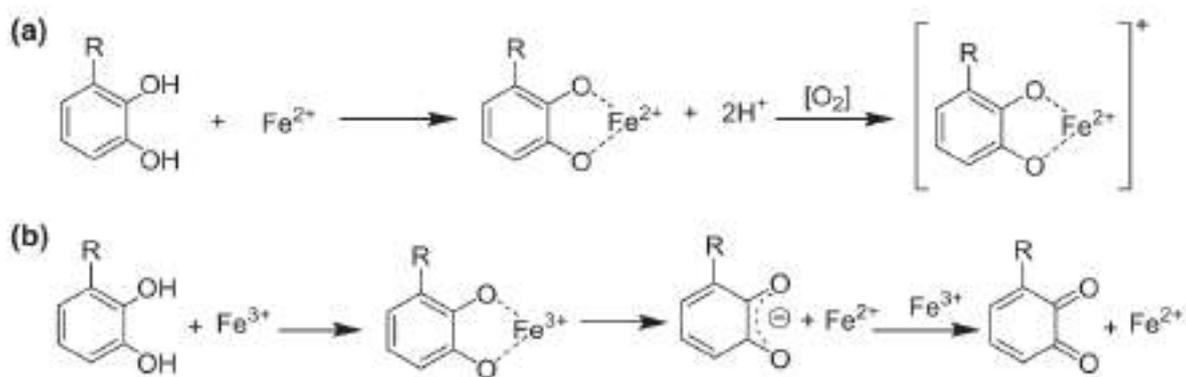


Рис. 1.6. Механізм хелатування металів фенольних антиоксидантів. (а) Координація Fe^{2+} поліфенолами та подальша реакція переносу електронів у присутності поліфенольного комплексу Fe^{2+} , що генерує кисень; (б) Координація Fe^{3+} поліфенолами, подальше відновлення заліза та утворення семіхінону, а також відновлення Fe^{3+} з утворенням різновиду хінону та Fe^{2+} . R = H, OH [34].

Висновки з літогляду

Прополіс з давніх часів використовувався людством для різних сфер застосування, як в харчових, медичних так і в косметологічних цілях. Його біологічна активність: протівірусна, антиоксидантна, протиракова, протигрибкова, протизапальна, імунна привертають увагу і зараз, адже перспективи його використання важко переоцінити.

На сьогодні існує і застосовуються багато методів що забезпечують оцінку біологічної активності прополісу по всьому світі, зокрема багато статей присвячено антиоксидантній активності.

Прополіс зібраний на території України та його властивості, ще мало описані в науковій літературі, тож дослідження саме українських зразків допоможе в подальшому сприяти стандартизації складу та вмісту ключових речовин прополісу, що забезпечують його потужну біологічну дію, що в свою чергу розширить потенціал комерційного застосування.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти дослідження

Прополіс– бджолиний продукт з регіонів (Рис. 2.1): Вінниччини (сmt. Стрижавка), Київщини (м. Чабани), Донеччини (м. Авдіївка), Харківщини (м. Південне), Рівненщини (с. Обарів), Одещини (с. Нарубайське), Чернівецької області (м. Новодністровськ) та Івано-Франківська область (с. Курпів).



Рис. 2.1. Прополіс

2.2 Реактиви та матеріали

Етиловий спирт - (фарм.) (96.9%) фірми ТОВ ВФК «Біо-Фарма ЛТД» без додаткової очистки.

Реактив Фоліна–Чокальтеу є суміш фосфорномолібденової $H_3PMo_{12}O_{40}$ і фосфорновольфрамової $H_2PW_{12}O_{40}$ кислот, має солом'яно-жовтий колір. В ході окислювально-відновних реакціях, відновлюється фосфорномолібденова кислота, поліфеноли окиснюються до утворення комплексного з'єднання синього кольору.

Галова кислота Рис. 2.2 (3,4,5-триоксibenзойна кислота) — $C_7H_6O_5$ органічна фенольна молярна маса 170,12 г/моль та температура плавлення $240^\circ C$.

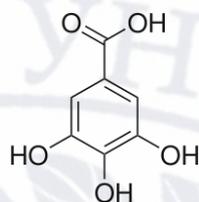


Рис. 2.2. Структурна формула галової кислоти.

Карбонат натрію (Na_2CO_3), молярна маса 105,99 г/моль та температура плавлення $852^\circ C$.

Кверцетин Рис. 2.3. (3,5,7,3'4'-пентаоксифлавоон) – флавоноїд з хімічною формулою $C_{15}H_{10}O_7$ молярна маса 302,24 г/моль та температура плавлення $316^\circ C$.



Рис. 2.3. Кверцетин

Хлорид алюмінію неорганічна сіль. Хімічна формула — $AlCl_3$ молярна маса 133,34 г/моль та температура плавлення $192,6^\circ C$.

Метанол - CH_3OH молярна маса 32,04 г/моль та температура плавлення $-97^\circ C$.

2.3 Підготовка та приготування реактивів

2.3.1 Приготування 80% розчину етилового спирту

Приготування розчину етилового спирту з масовою часткою 80%: у колбу ємністю 100 мл наливаливається 83,3 мл 96% етилового спирту та доводиться до мітки дистильованою водою.

2.3.2 Приготування спиртових екстрактів прополісу

Для приготування екстракту прополісу подрібнено в ступці до утворення максимально дрібнодисперсного порошку. Порошок прополісу ретельно перемішували 5 хв. Екстракти готували за методикою [35] з незначними змінами.

Об'єкти дослідження 8 зразків прополісу з різних областей України. Етилові розчини прополісу готували як настоянки у співвідношенні 1:10. У пеніцилінові флакони вносили наважку прополісу масою $(1,0 \pm 0,1)$ г і додавали 10,0 мл 80% етилового спирту. За кімнатної температури витримували розчини протягом 24 г, періодично струшуючи. Профільтрували розчин через складчастий паперовий фільтр і працювали з фільтратом. Водно-спиртовий екстракт прополісу зберігали в темному місці при кімнатній температурі, не вище 25 °С.

2.3.3 Приготування реактиву Фоліна-Чокальтеу

Реактив Фоліна-Чокальтеу $V=5,0$ мл було розміщено в мірну колбу на 50,0 мл та доведено до мітки бідистилятом. Розчин зберігався у холодильнику в ємності з темного щільного скла.

2.3.4 Приготування розчину 5% алюмінію хлориду

Для приготування розчину алюміній хлориду з концентрацією 5% наважку масою 0,5 г $AlCl_3$ розчиняли в 10,0 мл 96 % етилового спирту при нетривалому нагріванні на водяній бані.

2.4 Методи дослідження і обладнання

У роботі було використано спектрофотометричний метод та метод високоефективної рідинної хроматографії з використанням УФ

2.4.1 Спектрофотометричний метод

Оптичні методи аналізу засновані на вимірюванні ефектів взаємодії речовини з електромагнітними хвилями оптичного діапазону. Оптичний діапазон підрозділяють на ультрафіолетову - УФ(100-380 нм), видиму - (380-760 нм) і інфрачервону - (> 760 нм) області.

Спектрофотометрія — це аналітичний метод, що використовується для кількісного визначення концентрації речовин у розчинах шляхом вимірювання інтенсивності світла, яке проходить через зразок. Принцип дії спектрофотометра полягає у вимірюванні інтенсивності світла як функції довжини хвилі. Світловий промінь проходить через зразок, і інтенсивність світла, що пройшло через зразок, вимірюється детектором, який реєструє інтенсивність світла для кожної довжини хвилі, що дозволяє створити спектр поглинання. Спектри поглинання — це графічні представлення залежності поглинання світла речовиною від довжини хвилі. Для кожної довжини хвилі визначається ступінь поглинання світла, що залежить від концентрації речовини в розчині та її молекулярних властивостей. Метод дозволяє досліджувати спектральні властивості молекул, що може бути використано для ідентифікації сполук, а також дозволяє точно вимірювати концентрації різних речовин у розчинах, використовуючи закон Бера-Ламберта [36].

Закон Бугера-Ламберта-Бера є основним законом світлопоглинання і лежить в основі більшості фотометричних методів аналізу. Математично він виражається таким чином [37]:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.1)$$

де ε — молярний коефіцієнт екстинції або молярний коефіцієнт світлопоглинання;

l — товщина світлопоглинаючого шару;

C — концентрація розчину.

Оскільки спектрофотометрично можна визначати вміст індивідуальних представників, вміст груп поліфенолів та суму фенольних сполук у рослинних об'єктах. Тож за допомогою цих методів можна оцінити антиоксидантну активність [38].

Для вимірювання використовували спектрофотометр Analytik Jena SPECORD 50 та Analytik Jena SPECORD 2000 з термостатуванням ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) та програмним забезпеченням «WinASPECT» Version:2.5.0.0 з розміром кювети

$l=1,0$ см. Проміжні та кінцеві розрахунки, а також створення графічних залежностей було здійснено у програмі Microsoft Excel.

2.4.2 Метод ВЕРХ-УФ

Високоєфективна рідинна хроматографія - це техніка в аналітичній хімії, яка використовується для поділу компонентів у суміші, а також для ідентифікації та кількісної оцінки кожного компонента Рис.2.4.

Молекулярні види, що піддаються поділу, існують у зразку, який складається з *аналітів* та *матриці*. *Аналіти* - це молекулярні види, що цікавлять, а *матриця* - решта компонентів у зразку. Для хроматографічного поділу зразок вводиться в проточну *рухливу фазу*, яка проходить *стаціонарну фазу*. *Рухлива фаза* є рухомою рідиною і характеризується своїм складом, розчинністю, ультрафіолетовою прозорістю, в'язкістю та змішуваністю з іншими розчинниками. *Стаціонарна фаза* - це стаціонарне середовище, яке може бути застоюною насипною рідиною, рідким шаром на твердій фазі або міжфазним шаром між рідиною і твердим. У ВЕРХ стаціонарна фаза, як правило, у вигляді колони, упакованої дуже дрібними пористими частинками, а рідка рухома фаза переміщується через колону насосом.

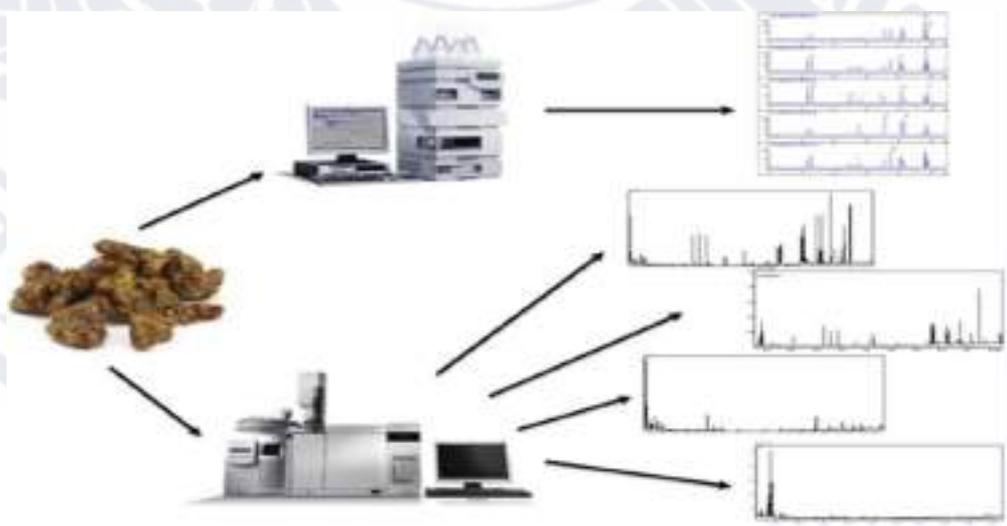


Рис 2.4 Оцінка прополісу методом ВЕРХ-УФ [39]

Основні компоненти ВЕРХ показані на Рис.2.5. Роль насоса полягає в тому, щоб змусити рідину (рухливу фазу) через певну швидкість потоку (мілілітри в хвилину). Інжектор служить для введення проби рідини в проточний потік рухомої фази. Колонка є найбільш центральним і важливим компонентом ВЕРХ, а стаціонарна фаза колони розділяє цікаві компоненти зразка, використовуючи різні фізичні та хімічні параметри. Детектор призначений для виявлення окремих молекул, які виділяються з колони. Комп'ютер зазвичай функціонує як система даних, і комп'ютер не тільки контролює всі модулі приладу ВЕРХ, але він приймає сигнал від детектора і використовує його для визначення часу утримання, компонентів зразка та кількісного аналізу.

При зворотньо-фазовій хроматографії стаціонарна фаза має гідрофобний характер, у той час як рухлива фаза має полярний характер. Взаємодії у зворотньо-фазовій ВЕРХ вважаються гідрофобними силами, і ці сили викликані енергіями, що виникають внаслідок порушення дипольної структури розчинника. Поділ, як правило, базується на поділі аналіту між стаціонарною фазою та рухомою фазою. Молекули розчинених речовин знаходяться в рівновазі між гідрофобною стаціонарною фазою і частково полярною рухомою фазою. Більш гідрофобна молекула має більш тривалий час утримання, тоді як іонізовані органічні сполуки, неорганічні іони та молекули полярних металів показують мало або зовсім не затримують час.

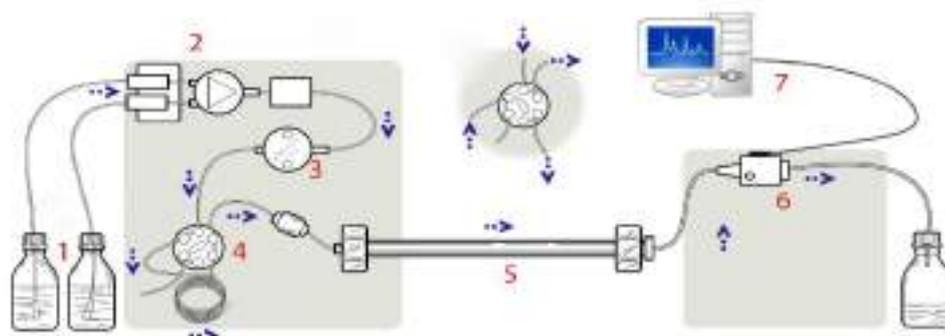


Рис. 2.5. Схематичне зображення системи ВЕРХ: (1) розчинник, (2) градієнтний клапан, (3) насос високого тиску, (4) контур впорскування зразка, (5) аналітична колонка, (6) детектор та (7) комп'ютер.

При зворотно-фазовій хроматографії стаціонарна фаза має гідрофобний характер, у той час як рухлива фаза має полярний характер. Взаємодії у зворотно-фазовій ВЕРХ вважаються гідрофобними силами, і ці сили викликані енергіями, що виникають внаслідок порушення дипольної структури розчинника. Поділ, як правило, базується на поділі аналіту між стаціонарною фазою та рухомою фазою. Молекули розчинених речовин знаходяться в рівновазі між гідрофобною стаціонарною фазою і частково полярною рухомою фазою. Більш гідрофобна молекула має більш тривалий час утримання, тоді як іонізовані органічні сполуки, неорганічні іони та молекули полярних металів показують мало або зовсім не затримують час.

Детектори, які зазвичай використовуються для рідинної хроматографії, включають ультрафіолетово-видимі детектори поглинання, детектори показника заломлення, детектори флуоресценції та мас-спектрометрію. Серед цих детекторів найбільш економічними і популярними методом є детектор УФ. Метод має досить широку селективність, економічно доступні і прості в експлуатації. УФ-детектори реагують тільки на ті речовини, які поглинають ультрафіолетове світло на довжині хвилі вихідного світла. Дуже багато сполук поглинають світло в УФ-діапазоні (100-380 нм), включаючи речовини, що мають одну або кілька подвійних зв'язків, і речовини, що мають нерозділені електрони [40].

2.5 Методика виконання експерименту

2.5.1 Загальний вміст фенольних сполук в етанольних екстрактах прополісу методом Фоліна–Чокальтеу

Метод заснований на окислювально-відновних реакціях, в ході яких відновлюється фосфорномолфбденова кислота, поліфеноли окиснюються до

утворення комплексного з'єднання синього кольору при додаванні карбонату натрію. Як речовина-стандарт використовується галова кислота і подальші результати виражено в міліграмах галової кислоти на грам прополісу, з використанням калібрувального графіку із зазначеним стандартом. Абсорбція розчину при 765 нм пропорційна вмісту фенольних сполук.

Для приготування розчину ГК наважку 0,005 г розчиняли в 10,0 мл 80% етилового спирту. Послідовним розведенням готували по 0,25 мл розчину ГК з концентраціями $0,2 \times 10^{-5} \div 1,0 \times 10^{-5}$ г/мл. Після додавання 1,25 мл реактиву Фоліна–Чокальтеу (1:10) з перемішуванням і відстоюванням на декілька хвилин, після чого 1,0 мл 7,5% розчину карбонату натрію влило до суміші, перемішано і відставлено на 1 год.

Визначення загального вмісту фенольних сполук в етанольному екстракті прополісу (ЕЕП) визначено шляхом додавання 0,25 мл ЕЕП до 1,25 мл реактиву Фоліна–Чокальтеу (1:10) перемішували і відставляли на 3 хв, далі додавали 1,0 мл 7,5% розчину натрію карбонату ретельно перемішано і відставлено на 1 годину для стабілізації утвореного розчину синього кольору. Поглинання розчинів вимірювали при тій самій довжині хвилі $\lambda = 765$ нм.

Розрахунок загального вмісту фенольних сполук в ЕЕП застосовувалась формула 2.2, значення що продемонстровано в результатах отримані як середньоарифметичне трьох паралельних вимірів:

$$F = \frac{C_f \times 10 \times V_{\text{екстракту}}}{m \times 1000} \quad (2.2)$$

де F – загальний вміст фенольних сполук, мг-екв галової кислоти/г сухої ваги;

C_f – концентрація фенольних сполук, мг-екв галової кислоти/л;

$V_{\text{екстракту}}$ – загальний об'єм екстракту, мл;

m – маса наважки, г;

1000 мл – коефіцієнт переведення л у мл [41].

Метод аналізу ФЧ є найпростішим методом, доступним для вимірювання вмісту фенолу в продуктах.

Метод має досить високу чутливість, надійність, відтворюваність отриманих результатів. Однак реактив ФЧ здатний вступати в реакцію взаємодії, як з більш сильними, ніж поліфеноли, відновниками (аскорбінова кислота, сірководень, іони заліза (II)), так і з менш реакційноздатними речовинами (прості феноли, амінокислоти, аміни, протеїни, оксикислоти). Це призводить до спотвореної оцінки антиоксидантної активності, харчової корисності та інших комплексних показників.

2.5.2 Загальне визначення флавоноїдів в ЕЕП з реактивом $AlCl_3$

Метод ґрунтується на взаємодії флавоноїдів зі спиртовим розчином алюміній хлориду і подальшому спектрофотометричному визначенні абсорбції отриманого розчину. Загальний вміст флавоноїдів в екстрактах виражали в перерахунку на вміст кверцетину, при $\lambda = 430$ нм [42].

У пробірці з 1 мл ЕЕП додавали 1,0 мл 5 % спиртового розчину алюміній хлориду, перемішували і відставляли на 10 хв за кімнатної температури. Надалі проводили вимірювання при довжина хвилі $\lambda = 430$ нм. Розрахунки вмісту флавоноїдів в ЕЕП проводили за рівнянням 2.3.

$$F = \frac{C_f \times 10 \times V_{\text{екстракту}}}{m \times 1000} \quad (2.3)$$

де F – загальний вміст фенольних сполук, мг-екв /г сухої ваги;

C_f – концентрація фенольних сполук, мг-екв кверцетину /л;

$V_{\text{екстракту}}$ – загальний об'єм екстракту, мл;

m – маса наважки, г;

1000 мл – коефіцієнт переведення л у мл

Цей метод високочутливий і відносно недорогий, що робить його кращим для використання в контрольно-аналітичних лабораторіях. Окрім

цього він дозволяє визначити суму флавоноїдів в присутності інших поліфенольних сполук, що не утворюють комплексу з алюмінієм хлориду.

2.5.3 ВЕРХ-УФ

Готові зразки розчинів прополісів додатково розводили шляхом додавання 50 мкл вихідного розчину прополісу до 5 мл метанолу. Точні концентрації розраховували ваговим методом. Отриманий розчини фільтрували крізь RC фільтр 0,2 мкм та зберігали при температурі -20 °С.

Аналіз розчинів прополісів проводили методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії. Розділення зразків проводили на хроматографічній системі Agilent 1100 з 4-канальним насосом, вакуумним дегазатором, автосамплером, термостатом колонок та діодно-матричним детектором. Використовували двох-елюентну схему (елюент А=0,05 М водний розчин ортофосфорної кислоти H_3PO_4 ; В=ацетонітрил/всі елюенти й добавки були придбані в Sigma-Aldrich, градація чистоти HPLC) на колонці Poroshell 120 EC-C18, 2,7мкм, 2,1×150 мм. Об'єм зразка 2 мкл. Детектування відбувалося на довжинах хвиль 206, 254, 300, 350 та 450 нм Для всіх речовин реєстрували спектри поглинання в ультрафіолетовому та видимому діапазонах з метою встановлення природи вторинних метаболітів і віднесення хроматографічних піків до певних груп речовин.

2.6 Техніка безпеки

Техніка безпеки— система технічних умов, засобів, вимог, правил та способів роботи, що гарантує на виробництві безпечні й сприятливі умови праці, усуває небезпеку, запобігає небезпеці. Перебуваючи в хімічній лабораторії, слід дотримуватися низку правил:

1. Переконатись що робоче місце чисте і немає нічого зайвого на столі.
2. При роботі в хімічній лабораторії необхідно надягати халат з бавовняної тканини.

3. Для захисту рук від дії кислот, лугів, солей, розчинників застосовують гумові рукавички. На рукавичках не повинно бути порізів, проколів та інших пошкоджень.

4. Всі гріючі прилади встановлені на термоізолюючих підставках.

5. Забороняється експлуатація несправних лабораторних і нагрівальних приладів.

6. При зважуванні твердих речовин необхідно користуватися тарою, неприпустимо насипати речовини безпосередньо на вагову чашку.

7. Роботу з порошкоподібними речовинами для запобігання їх розпилення потрібно проводити в таких місцях, де немає протягів або сильного руху повітря.

8. Утилізація речовин відбувається в спеціально відведені місця.

9. Сухі речовини необхідно брати спеціальним шпателем. Луги, кислоти та інші речовини набирати в піпетки гумовою грушею.

10. Переконайтесь що реактив що використовується той що необхідний і співпадає з назвою на етикетці.

11. При змішуванні речовин слід використовувати спеціальні корки, забороняється затискати долонею і перемішувати.

12. Після закінчення роботи переконайтесь що робоче місце чисте всі реактиви знаходяться на своїх місцях та всі електричні прилади вимкнені.

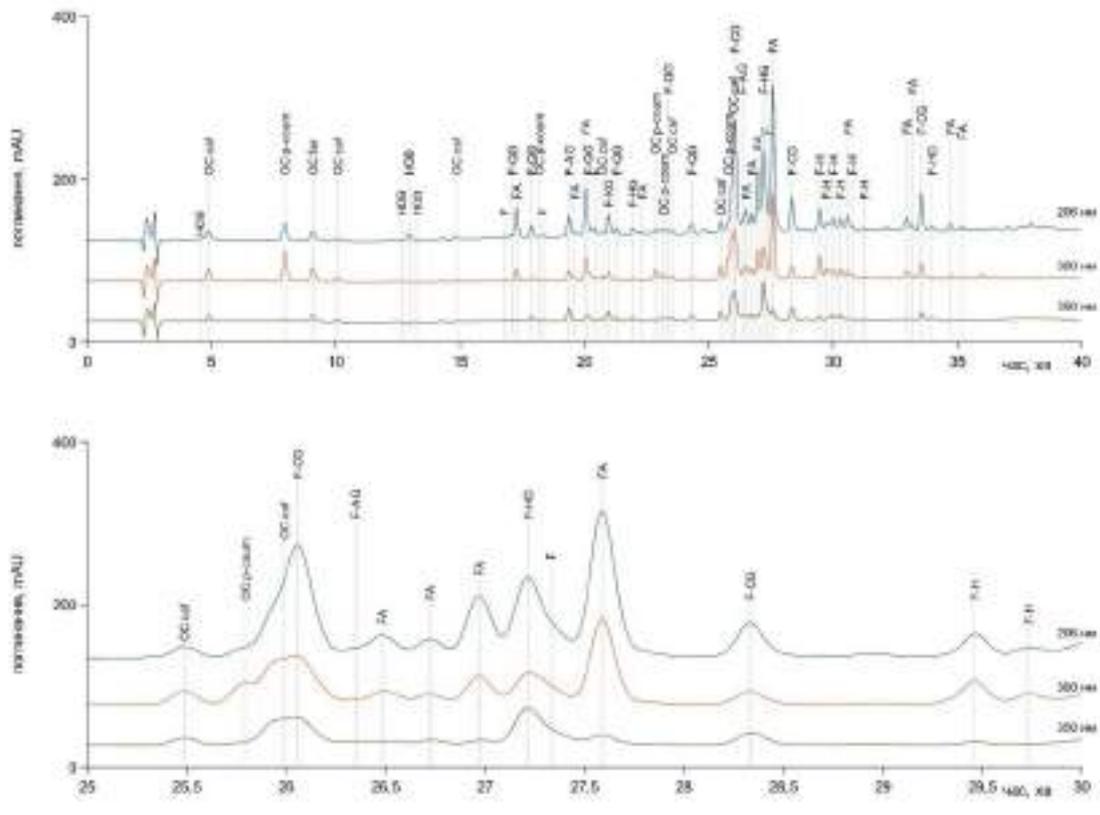


Рис. 3.2 Хроматограма ЕЕП Вінницької області при λ 206, 300, 350 нм

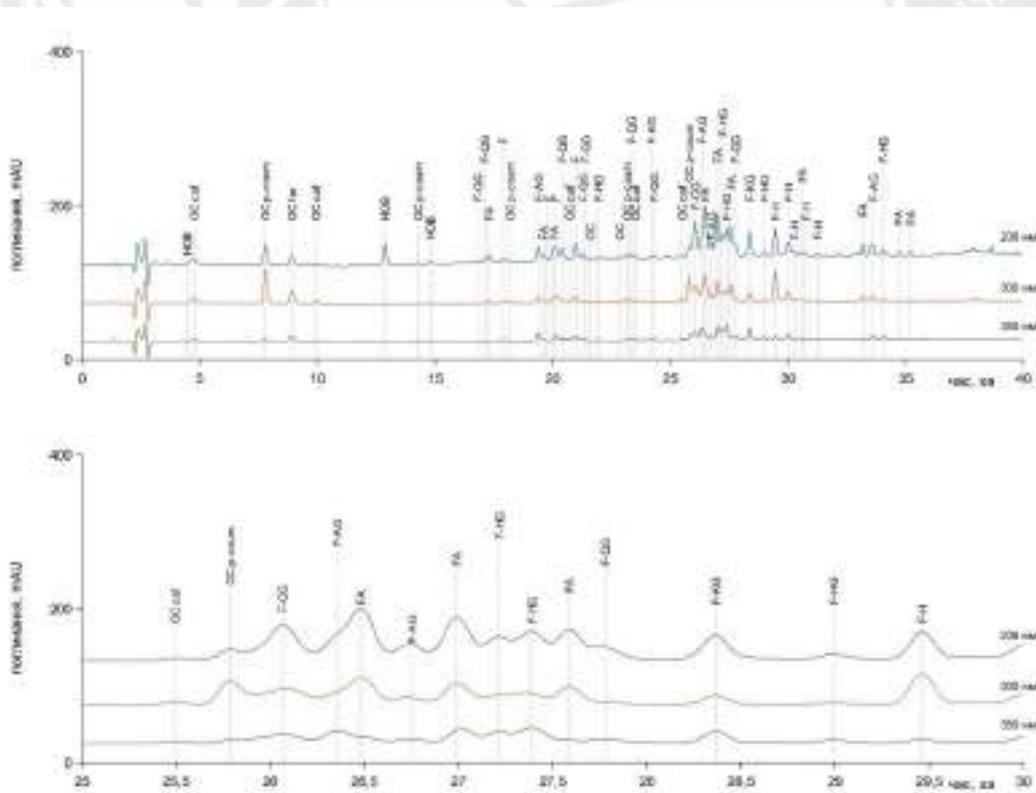


Рис. 3.3 Хроматограма ЕЕП Київської області при λ 206, 300, 350 нм

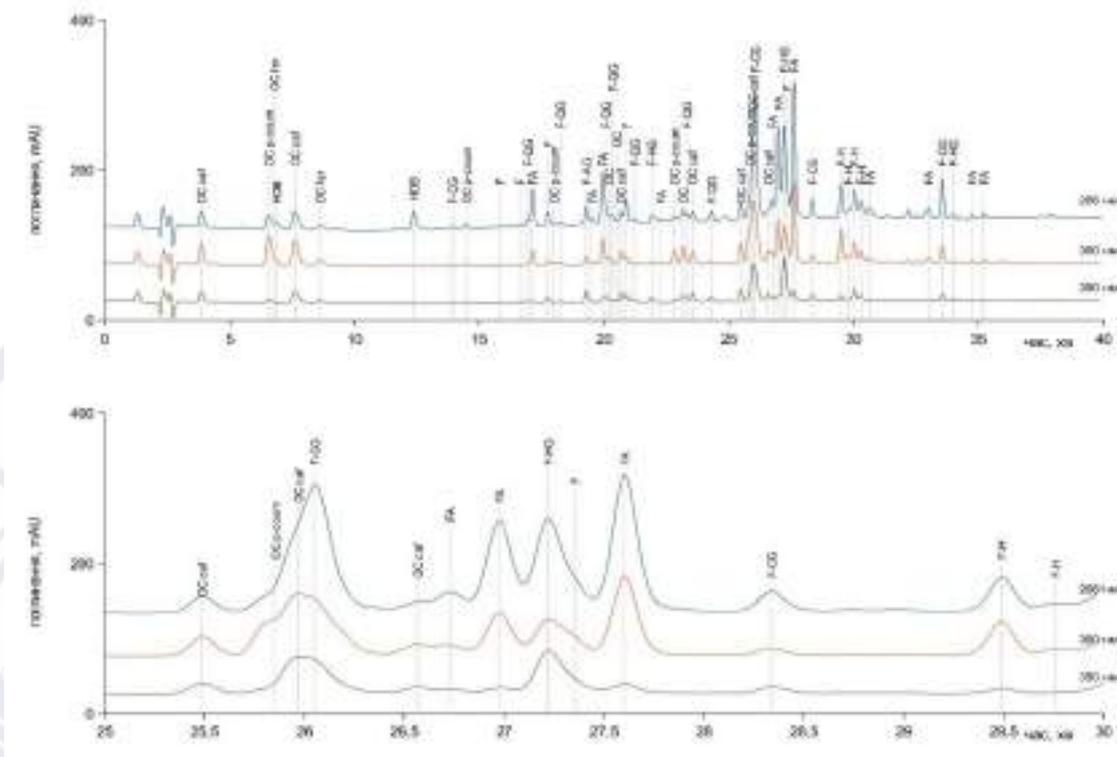


Рис. 3.6 Хроматограма ЕЕП Чернівецької області при λ 206, 300, 350 нм

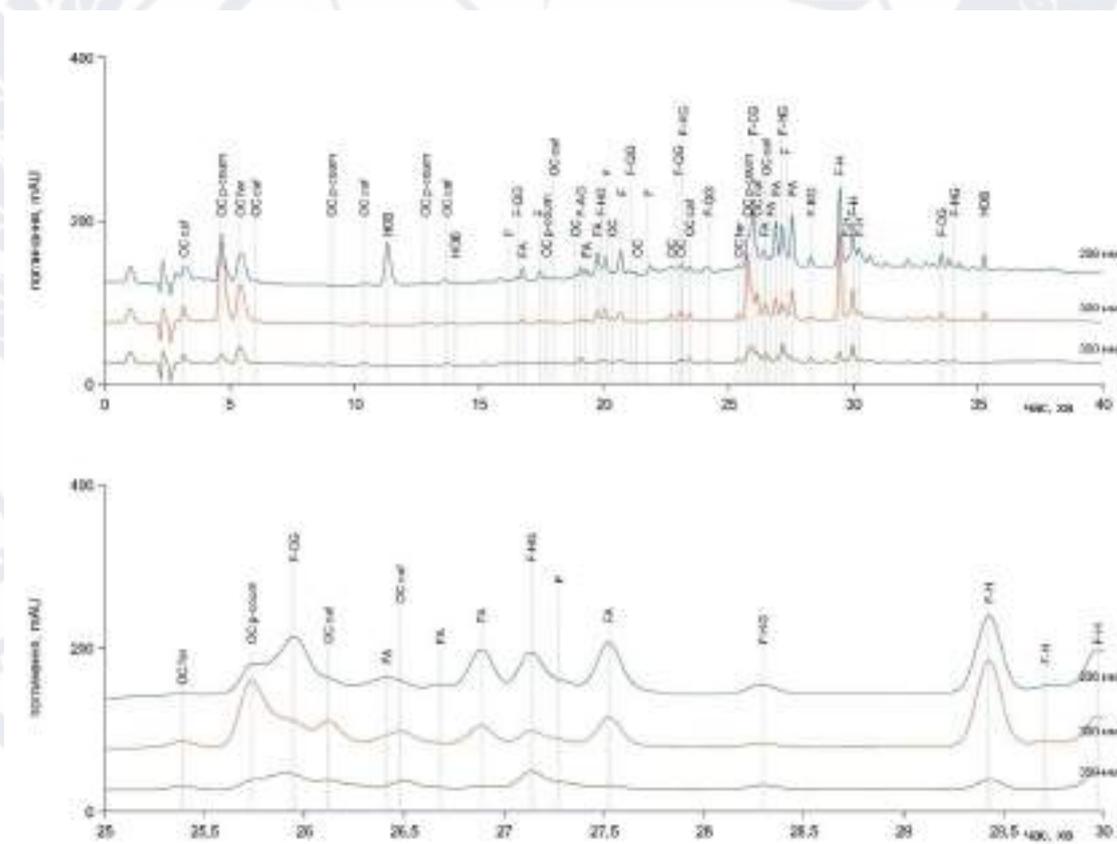


Рис. 3.7 Хроматограма ЕЕП Івано-Франківської області при λ 206, 300, 350 нм

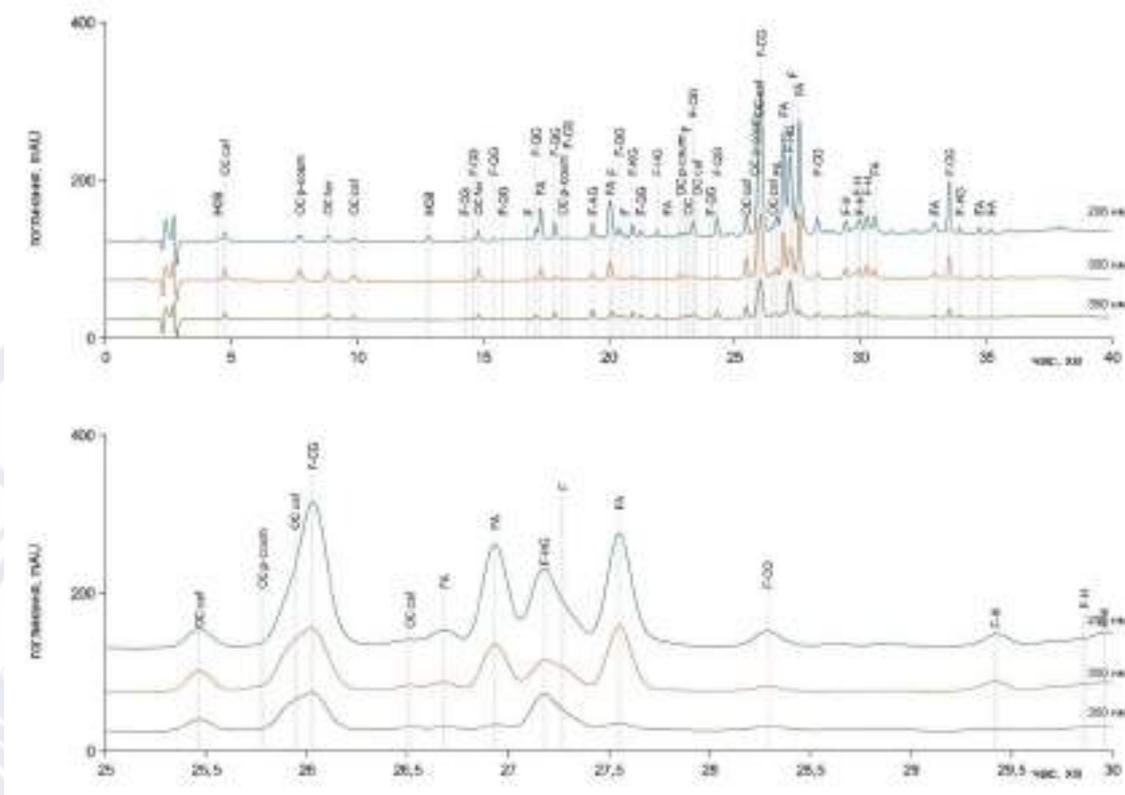


Рис. 3.8 Хроматограма ЕЕП Харківської області при λ 206, 300, 350 нм

Результати експериментальних досліджень вмісту фенольних сполук в екстрактах методом ВЕРХ подано в табл. 3.1, відповідні позначення класів сполук, що були виявленні та стандарти наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.1 Вміст у 8 зразках ЕЕП різних класів речовин в мг/г

Зразки ЕЕП з області	Ідентифіковані класи сполук та їх вміст (г/мг)												
	НОВ	ОС	ОС р-сонт	ОС саf	ОС fer	F	FA	F-CG	F-AG	F-H	F-KG	F-QG	F-HG
Донецької	5,5	0	4,61	36,7	0,7	26,8	31,0	19,5	24,6	12,9	13,2	11,5	23,6
Вінницької	7,3	0	47,07	115,1	18,9	12,5	73,8	71,6	9,8	53,0	0	14,0	77,8
Київської	8,3	1,5	62,71	15,9	15,5	17,6	29,7	11,6	35,2	41,7	15,0	22,1	40,6
Харківської	3,4	3,0	13,44	90,9	28,6	30,4	70,8	98,4	12,6	50,7	9,3	48,0	60,5
Одеської	8,8	0	50,52	97,9	16,3	40,1	59,8	56,4	10,5	59,3	7,9	14,5	49,8
Івано-Франківської	25,5	19,0	190,77	72,2	79,5	15,2	31,8	28,9	6,7	105,8	7,0	6,2	29,2
Чернівецької	10,4	23,4	80,69	160,8	13,5	23,2	66,5	62,3	12,0	71,3	0	23,8	63,7
Рівенської	48,8	13,4	124,47	53,2	47,1	12,3	18,5	16,4	8,0	61,8	4,9	4,7	11,6

Таблиця 3.2 Список використаних позначень та стандарти

№	Позначення	Клас речовин	Стандарти
1	НОВ	Прості феноли, бензойні кис-ти	Галлова кис-та
2	ОС	Оксикоричні кис-ти (виходячи зі спектру немає можливості визначити точну структуру оксикоричного фрагменту)	Хлорогенова кис-та
3	ОС p-coum	Естери п-кумарової кис-ти	Хлорогенова кис-та
4	ОС caf	Естери кавової кис-ти	Хлорогенова кис-та
5	ОС fer	Естери ферулової кис-ти	Хлорогенова кис-та
6	F	Флавоноїди	рутин
7	FA	Флаванони	нарингенін
8	F-CG	Глікозиди хризину	хризин
9	F-AG	Глікозиди апігеніну	вітексин
10	F-H	Флаволи чи флавоноли	Хлорогенова кис-та
11	F-KG	Глікозиди кемпферолу та його метилових етерів	Кемпферолу-3- арабінозид
12	F-QG	Глікозиди кварцетину та його метилових етерів	рутин
13	F-HG	Глікозиди хербацетину та його метилових етерів	рутин

ВЕРХ-УФ-аналіз показав, що у всіх зразках були ідентифіковані естери п-кумарової, ферулової, кавової кислот, оксикоричні кислоти, глікозиди хризину, апігеніну, кампферолу, кварцетину, хербацетину. Хімічний склад зразків прополісу, визначений методом ВЕРХ-УФ вказано на Рис. 3.9.

Найбільше в зразках прополісу ідентифіковано естери кавової кислоти, сумарний вміст якої 886,6 мг/г, *n*-кумарової 749,2 мг/г, флавоноїди 626,2 мг/г, флавоноїди 589,6 мг/г, глікозиди хризину 555,8 мг/г, , глікозиди хербацетину 538,7 мг/г. Прополіс з Івано-Франківщини має суттєво вищий вміст естерів *n*-кумарової кислоти 190,8 мг/г, ферулової кислоти 79,5 мг/г, та флавоноїдів 105,8 мг/г, порівняно з іншими зразками, але невисокий вміст флавоноїдів у вигляді агліконів у складі глікозидів. Найменший вміст майже по всіх класах мають зразки ЕЕП з Донеччини та Рівного, до прикладу *n*-кумарової кислоти в зразку Донеччини 4,6 мг/г, Рівного вміст флавоноїдів 18,5 мг/г, кавової кислоти відповідно 36,7 мг/г та 53,3 мг/г, відповідно.

Результати дослідження ЕЕП методом високоефективної рідинної хроматографії свідчать, що ці компоненти походили з ексудату бруньок роду *Populus*, головним чином *Populus nigra*. Такий вид прополісу виявляють в країнах з помірним кліматом, де зростає тополя чорна (*Populus nigra*), або осокір [43]. Смолясті виділення, присутні в бруньках, є рослинним джерелом, що містять велику кількість біологічно активних сполук і використовується бджолами для утворення прополісу. Тополинний вид прополісу має у своєму складі близько 300 компонентів і відрізняється високим вмістом фенольних кислот, таких як кавова, кумарова та їх естери та флавоноїдних агліконів [44],[45],[46],[47] що співпадає із нашими результатами. Тополя чорна зустрічається по всій території України і є економічно і екологічно важливою породою дерев.

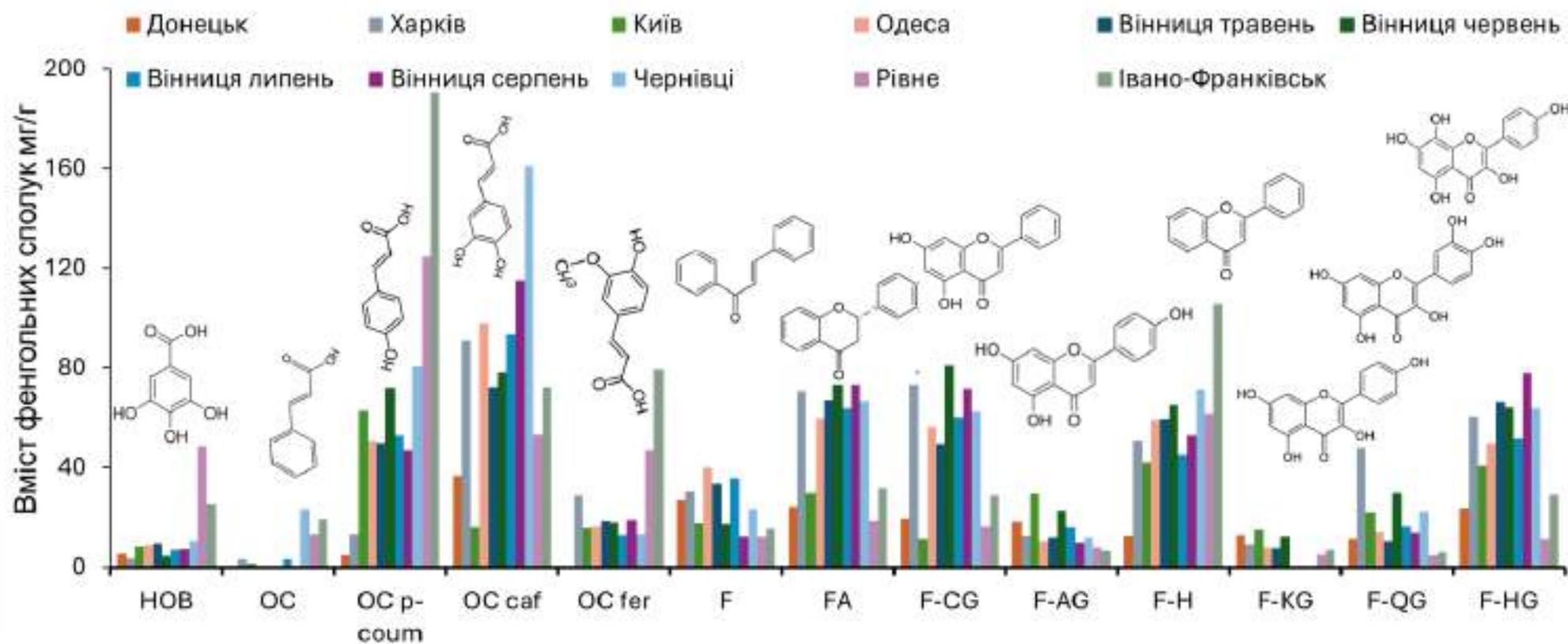


Рис. 3.9 Хімічний склад зразків прополісу

3.2 Дослідження загального вмісту фенольних сполук в ЕЕП методом Фоліна–Чокальтеу

Сумарний вміст сполук фенольної природи визначали спектрофотометрично зі застосуванням реактиву Фоліна–Чокальтеу, що складається із суміші фосфорно-вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот, які відновлюються при окисненні фенолів до суміші оксидів. При цьому спостерігається утворення блакитного кольору, інтенсивність якого пропорційна кількості фенольних речовин у розчині, вимірювання проводилось за довжини хвилі 765 нм [48].

Для розрахунку сумарного вмісту фенольних сполук у рослинному матеріалі необхідно було провести побудову калібрувальних графіків, що відображають залежність оптичної щільності розчину від концентрації речовини в ньому. Для цієї мети ми використовували галову кислоту, яка прийнята як стандарт для розрахунків у більшості наукових праць. Робочі розчини стандарту різної концентрації ($0,2 \div 1,0 \times 10^{-5}$ г/мл) використано для побудови калібрувального графіка рис. 3.10.

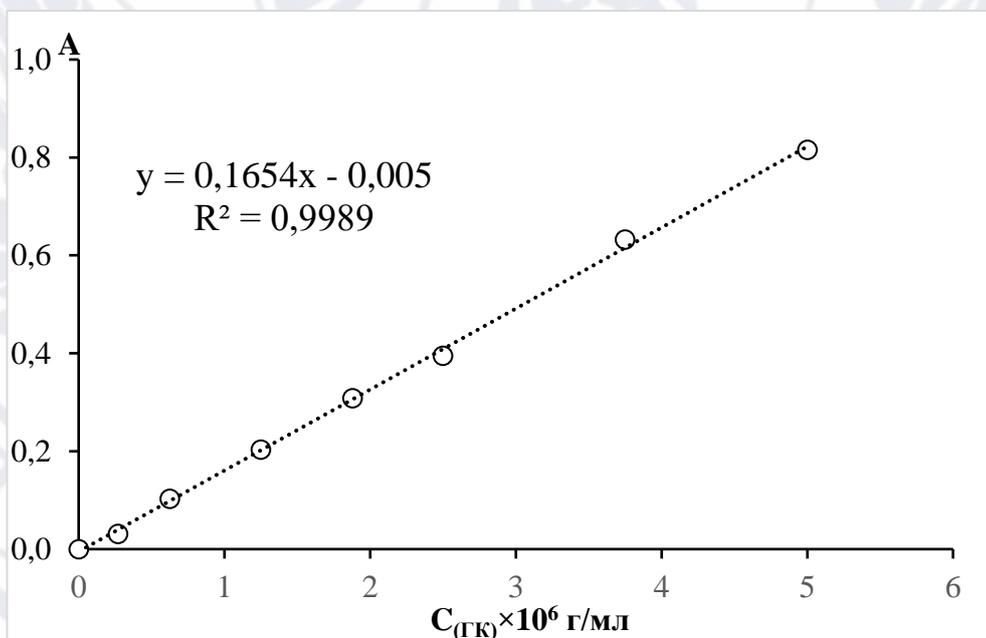


Рис. 3.10. Залежність оптичної густини розчину комплексу ГК з реагентом Фоліна–Чокальтеу від концентрації ГК ($0,2 \div 1,0 \times 10^{-5}$ г/мл) в етанолі.

Розрахунок вмісту фенолів в ЕЕП здійснювався з використанням формули (2.2) і виражали в мг-еквівалентів ГК на г прополісу, як наведено на рис. 3.11.

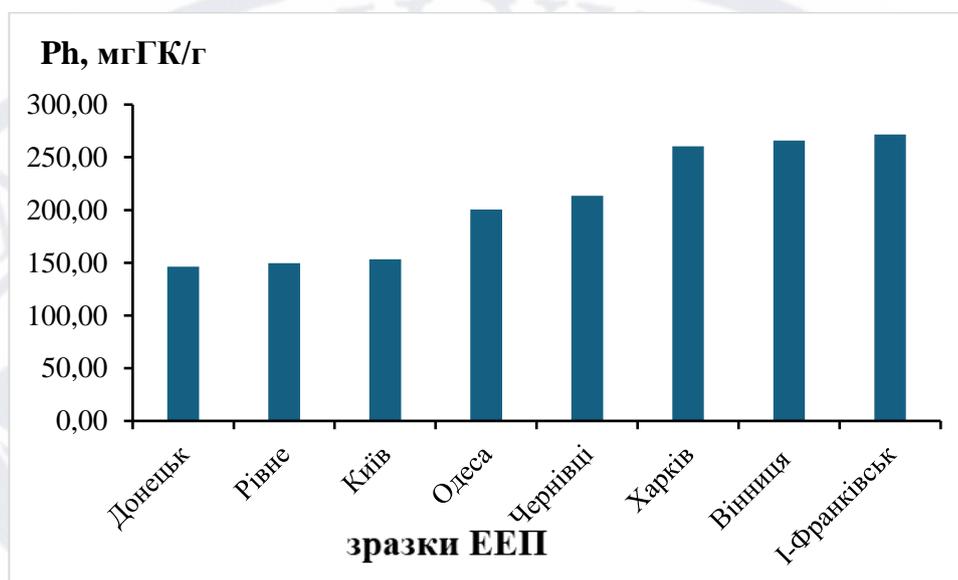


Рис. 3.11. Загальний вміст фенольних сполук (Ph, мг ГК/г) у зразках ЕЕП

Як видно з отриманих результатів, найвищі рівні фенольних сполук спостерігається у зразках ЕЕП Івано-Франківщини зі значенням (271,6 мгГК/г), Вінничини (265,9 мгГК/г), Харківщини (260,4 мгГК/г). Найменший вміст фенолів у зразках з Донеччини та Рівного (146,2 мгГК/г, 149,6 мгГК/г), відповідно.

3.3 Кількісне визначення флавоноїдів в ЕЕП з реактивом $AlCl_3$

Визначення флавоноїдів ґрунтується на здатності флавоноїдів утворювати комплекси $AlCl_3$. Як стандарт використовувався кверцетин, коефіцієнт екстинкції якого вимірювали при 430 нм. З отриманих результатів було побудовано калібрувальний графік, представлений на Рис.3.12. Вміст флавоноїдів в зразках ЕЕП (Рис.3.13) визначено при 430 нм, та розраховано в мг-еквівалента кверцетину на г прополісу.

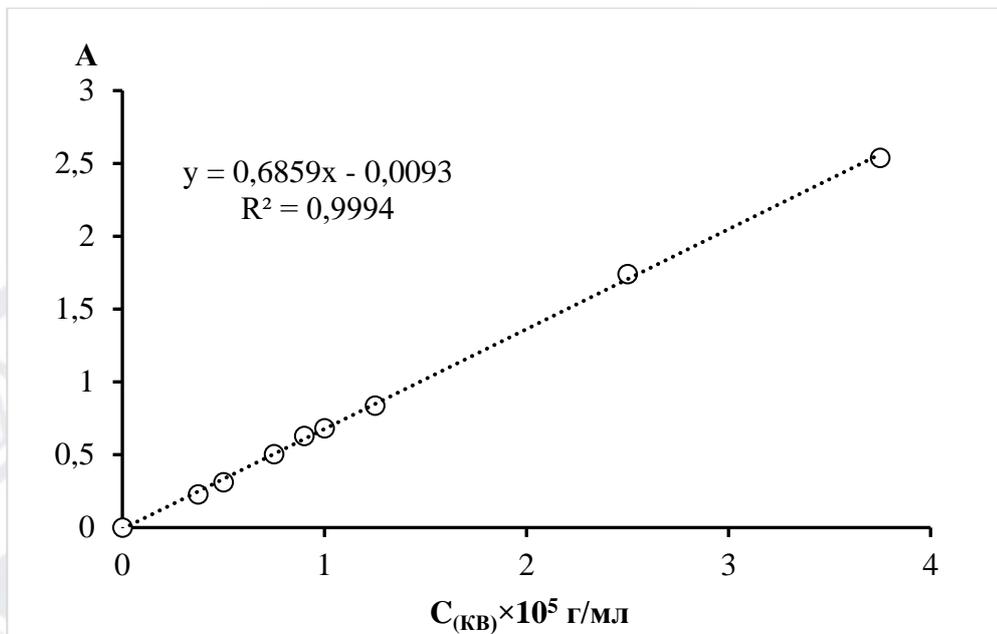


Рис 3.5. Залежність оптичної густини розчину комплексу кверцетин-АІ(ІІІ) від концентрації кверцетину

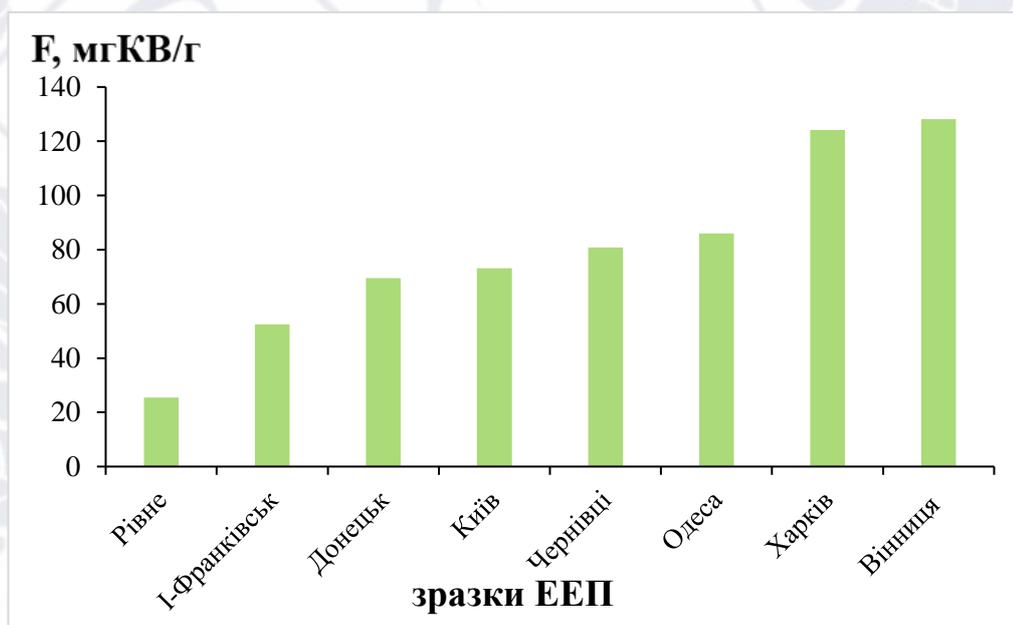


Рис. 3.13. Вміст флавоноїдів (F, мг КВr/г) у зразках ЕЕП

Найбільший вміст флавоноїдів у зразках ЕЕП Вінницької та Харківської областей та 124,2 мг КВ/г відповідно, та найменший вміст в Рівенському 25,5 мг КВ/г, Івано-Франківщини 52,4 мг КВ/г та Донеччини 69,5 мг КВ/г, що суттєво менше ніж показники лідерів.

Використання методу з $AlCl_3$ демонструє менші кількісні показники ніж із використанням метода Фоліна–Чокальтеу Рис.3.14, причиною такого результату є те, що окрім флавоноїдів у прополісі містяться багато інших фенолів та поліфенолів. Наглядним прикладом слугує зразок з Івано-Франківщини, що має високий вміст фенольних кислот, меншу кількість інших фенолів дані яких продемонстровано методом ВЕРХ та за допомогою реактиву Фоліна-Чокальтеу, та суттєво меншу кількість флавоноїдів, що демонструє ВЕРХ та метод з $AlCl_3$.

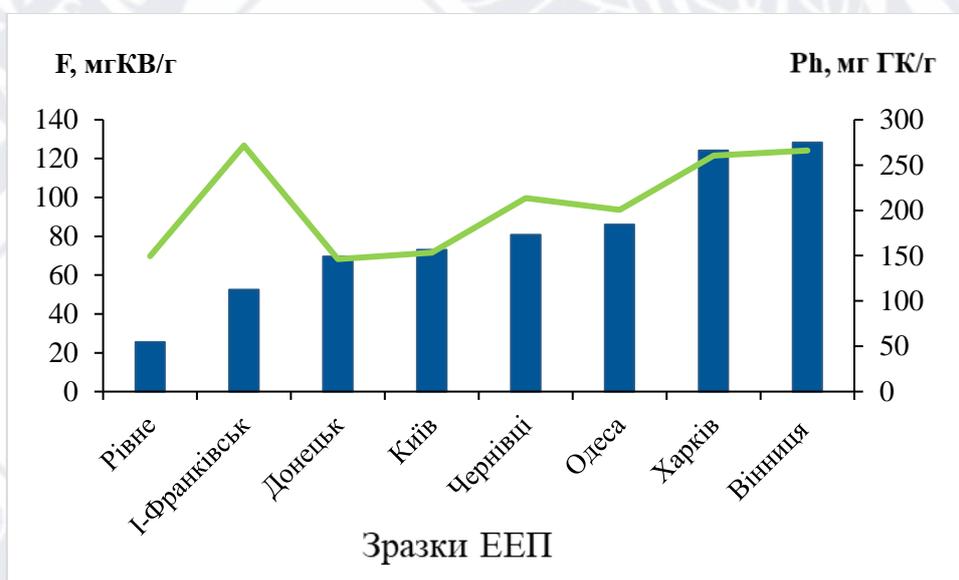


Рис. 3.13.Порівння вмісту флавоноїдів (F, мгКВr/г) і фенолів (Ph, мгГК/г)

Біоактивні сполуки, що ідентифіковані у складі прополісу, здатні ефективно інгібувати вільні радикали. Антиоксидантну активність зразків прополісу визначали методами ДФПГ і АБТС [49],[50],[51],[52]. Як кількісні показники використовували EC_{50} – концентрації антиоксидантів, при яких спостерігається зменшення концентрацій радикалів удвічі. Значення EC_{50} та вміст поліфенолів наведені в таблиці 3.3. EC_{50} визначали через кінетику реакцій між радикалом та різними концентраціями АО [53].

Таблиця 3.3. Вміст поліфенолів та EC_{50} для зразків прополісу

Зразок	Вміст фенолів за методом ВЕРХ-УФ (мг/г)	Вміст фенолів за методом Фоліна-Чокальтеу (мгГК/г)	EC_{50} для АБТС, (мг/мл)	EC_{50} для ДФПГ, (мг/мл)
Донецьк	197	146	9,6	21,4
Київ	311	153	8,6	20,3
Вінниця	356	206	7,8	20,4
Рівне	425	149	6,0	19,2
Одеса	471	200	5,0	18,0
Харків	516	260	6,0	14,0
Чернівці	610	213	4,0	16,3
Івано-Франківськ	617	271	2,3	12,1

Найкращий результат значень EC_{50} показав зразок з Івано-Франківської області, найгірший – зразок з Донецької області. Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом поліфенолів демонструє рис. 3.14, де представлено залежності EC_{50} від концентрації визначених фенольних сполук.

Очікувано не спостерігається чіткої лінійної кореляції для таких залежностей, оскільки склад прополісу дуже різноманітний, між компонентами прополісу можуть відбуватись взаємодії, які проявляються в синергічній, або навпаки, антагоністичній дії. Тим не менш, ми бачимо чіткій тренд – чим більше фенольних сполук, тим вище прояви антиоксидантної активності. Найкраща кореляція спостерігається при використанні концентрацій, визначених методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

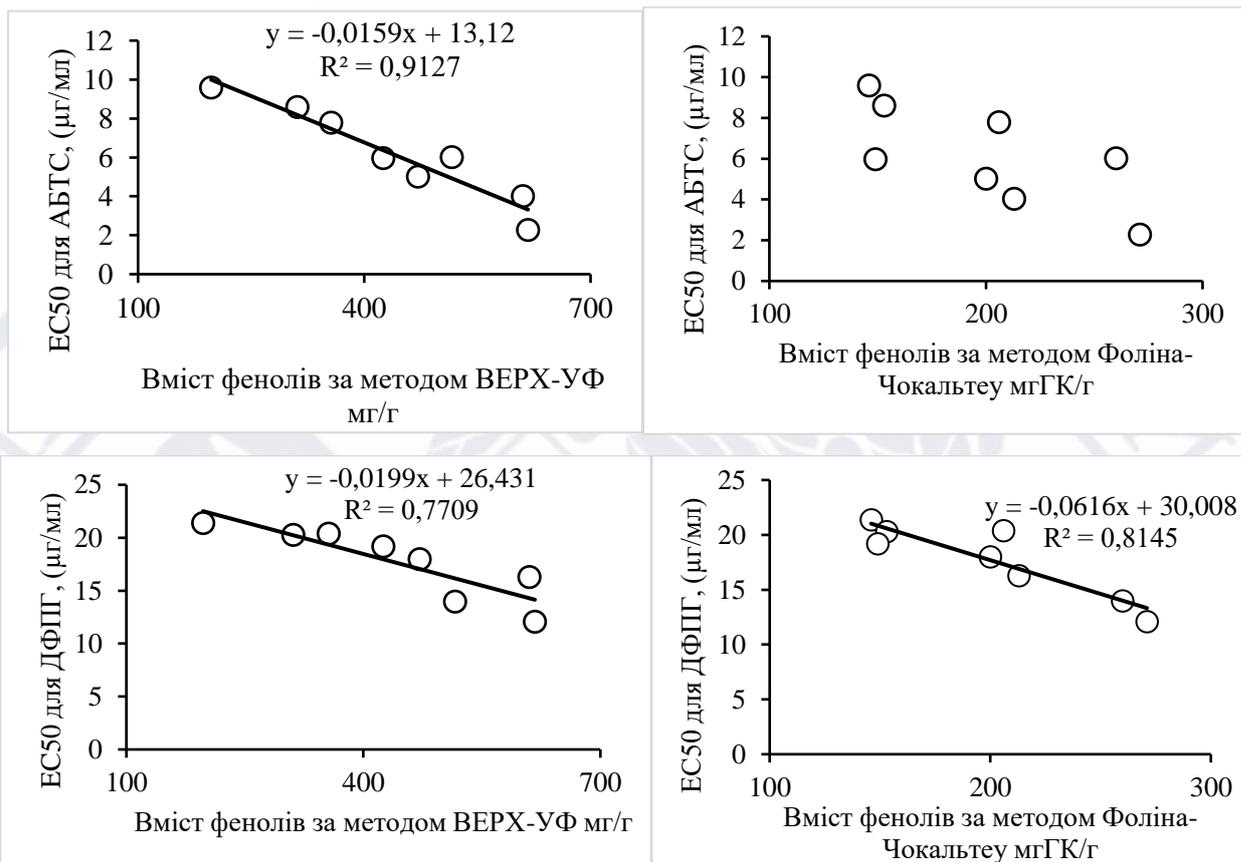


Рис.3.14 Кореляційні залежності значень EC_{50} для ДФПГ та АБТС від вмісту фенольних сполук визначених методом ВЕРХ з УФ та Фоліна-Чокальтеу

Вміст поліфенолів, фенолів, що визначено методами Фоліна- Чокальтеу, $AlCl_3$, ВЕРХ та метод що виражає АОА кожного зразка відповідає міжнародному стандарту бджолиного прополісу що наведені в таблиці 3.4 [54]. Що свідчить про високу якість Українського прополісу, а отже і можливість комерційного застосування в різних галузях та виведення на український та міжнародний ринок цього продукту.

Таблиця. 3.4 вимоги до бджолиного прополісу та методи випробувань для кожної характеристики за міжнародним стандартом

Характеристика	Min/max	Прополіс тополиного типу
Загальна кількість фенольних сполук (Фоліна-Чокальтеу), у % масової частки	Min	10
Загальна кількість флавоноїдів (AlCl ₃), у % масової частки	Min	3
Загальна кількість поліфенолів за високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)	-	Наявність: апігенін, кавова кислота, оксикорична кислота, п-кумарова кислота, хризин, ферулова кислота, галангін, пінобанксін і піноцембрін
Загальна антиоксидантна здатність (DPPH) – EC ₅₀ , μг/мл	Max	25

Основним фактором, що може вплинути на хімічний склад і біологічну властивість прополісу, є географічне розташування пасіки, від чого залежить різноманітність рослин, особливості клімату, ґрунту. Однак сезонність також може визначати склад прополісу за рахунок впливу фенологічних факторів на біосинтез рослинних метаболітів.

Ми отримали проби прополісу з однієї і тієї ж пасіки (Вінницька обл., с. Стрижавка), які були зібрані протягом чотирьох місяців (травень, червень, липень, серпень) і оцінили сезонний вплив на фенольний профіль екстрактів прополісу та їх антиоксидантну активність що наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 Вміст фенолів у зразках прополісу м. Вінниця залежно від місяців збору та АОА

Зразок	Вміст фенолів за методом Фоліна-Чокальтеу (мгГК/г)	Вміст фенолів за методом ВЕРХ-УФ (мг/г)	Флавоноїди (мгКв/г)	EC ₅₀ АБТС, μг/мл
травень	190 ± 5	456 ± 12	150 ± 4	6.3 ± 0.4
червень	197 ± 7	541 ± 10	172 ± 9	6,22 ± 0.09
липень	165 ± 4	457 ± 9	169 ± 5	6,4 ± 0.1
серпень	206 ± 7	500 ± 9	188 ± 4	6,78 ± 0.08

Аналіз хімічного складу екстрактів прополісу, зібраних у різні місяці, показав, що сума визначених флавоноїдів та фенольних кислот була найбільшою у зразку, заготовленого у червні, а найменшою – в екстракті матеріалу, зібраного у липні. Методом ВЕРХ-УФ встановлено, що всі зразки містили найбільше кавової кислоти та її естерів серед фенольних сполук, причому їх вміст поступово збільшувався з червня по серпень рис.3.15. Концентрації фенолів у пробах прополісу, зібраних у різні місяці, були подібними і лише вміст семи з тринадцяти визначених класів сполук достовірно відрізнялося в екстрактах за даними статистичного аналізу. Так, прополіс, зібраний у червні, містив найбільшу кількість кумарової кислоти, флаванонів, флаванолів і флавонів, а також глікозидів апігенину і кверцетину. У серпневому прополісі визначено найбільше кавової кислоти та її естерів і глікозиду хербецетину. Екстракти прополісу мають високий антиоксидантний потенціал за результатами АБТС аналізу, який практично не залежить від часу відбору проби.

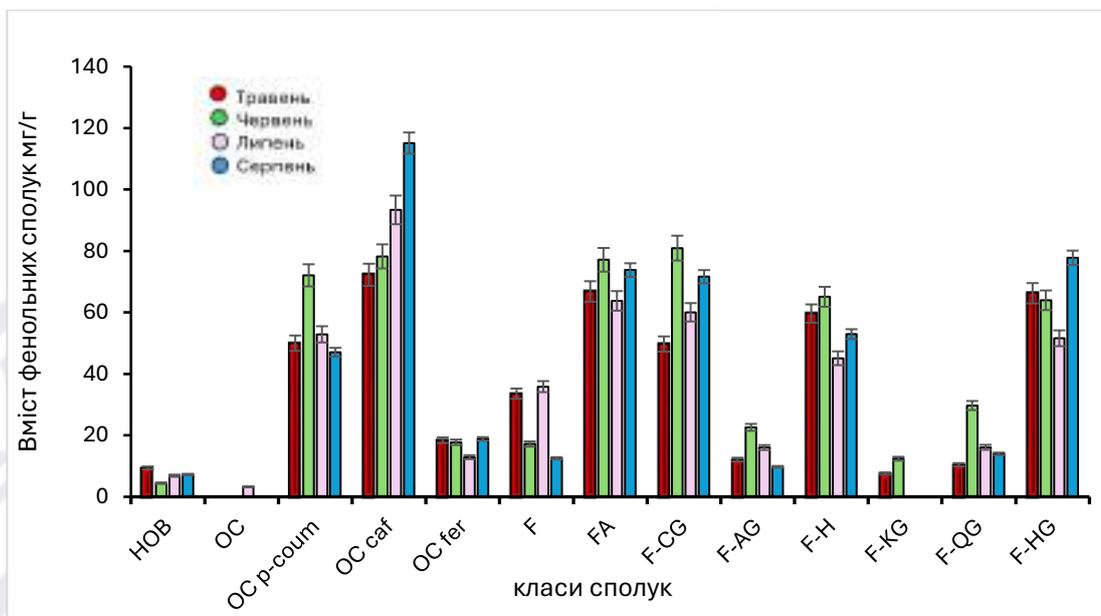


Рис.3.15 Вміст фенолів мг/г, визначених методом ВЕРХ, у пробах прополісу, зібраних у різні місяці

Хімічні властивості прополісу багато в чому визначаються його рослинним джерелом, оскільки різні рослини виробляють унікальні біологічно активні сполуки, які визначаються у складі прополісу. Прополіс тополиного типу містить різноманітні біологічні активні сполуки, такі як фенольні кислоти, флавоноїди, та інші поліфеноли. Ці компоненти надають прополісу антимікробні, протизапальні та антиоксидантні властивості. Склад прополісу у всьому світі неоднорідний і може змінюватися в залежності від таких факторів, як географічний регіон, джерело рослин і час року. Ці фактори впливають на хімічні властивості прополісу і в кінцевому підсумку визначають його потенційну користь для здоров'я. Важливу роль відіграє екологічний чинник та клімат зони, де зібрано зразки прополісу. Ми не визначали вміст токсичних речовин в українському прополісі, проте результати досліджень чітко показують, що зразок з Івано-Франківської області є якіснішим за хімічним складом та антиоксидантною активністю порівняно з іншими зразками. Цей прополіс отримано з пасіки у Галицькому районі, розташованій поблизу змішаного природного лісу в національному природному парку в передгір'ях Карпат, екологічному регіоні Західної України, де немає

інтенсивного високотехнологічного землеробства. Клімат у цьому регіоні помірний, з м'якою зимою та теплим вологим літом, що сприяє рослинному біорізноманіттю. Хороші показники також отримані для зразка із пасіки у Чернівецькій області (Деснянський район), який характеризується гарною екологією, вологим літом. Разом з тим, прополіс із Донецької області (м.Авдіївка) показав один із найгірших результатів (прополіс збирали влітку 2021 р.). Відносно невисокий вміст фенолів і флавоноїдів в екстракті обумовлює його низьку антиоксидантну ефективність. Цей регіон завжди відрізнявся несприятливою екологією (до 2022 року тут працював один із найбільших коксохімічних заводів у Європі) та посушливим спекотним літом, що зменшує різноманітність медоносних рослин та знижує фармацевтичну цінність прополісу.

Висновки

1. Відібрано і досліджено 11 зразків прополісу із восьми різних географічних і екологічних регіонів України (4 зразки з Вінниці збирали у різні місяці). Визначено загальний вміст фенольних сполук (метод Фоліна-Чокальтеу) у складі прополісу. Встановлено, що екстракт прополісу з Івано-Франківської області є багатим джерелом фенольних сполук.

2. Антиоксидантну активність екстрактів прополісу оцінювали за допомогою метода поглинання вільного радикала ДФПГ та катіон-радикала АБТС. Встановлено, що антиоксидантна активність суттєво залежить від концентрації поліфенолів у складі прополісу.

3. Методом ВЕРХ-УФ у зразках прополісу ідентифіковано 13 класів фенольних сполук. Аналіз складу проводили за допомогою ВЕРХ. Детектування відбувалося на довжинах хвиль 206, 254, 300, 350 нм. Для всіх речовин реєстрували спектри поглинання в ультрафіолетовому та видимому діапазонах.

4. Аналіз хімічного складу зразків прополісу свідчить про належність українського прополісу до тополиного виду. Такий вид прополісу виявляють в країнах з помірним кліматом, де зростає тополя чорна (*Populus nigra* L.) або осокір. Тополіний вид прополісу відрізняється високим вмістом фенольних кислот, таких як кавова, *n*-кумарова, їх естери та флавоноїдних агліконів, що обумовлюють високу антиоксидантну активність досліджуваних зразків.

5. Отримані результати свідчать про те, що український прополіс є багатим джерелом поліфенолів і потужним антиоксидантним агентом.

Список літератури

- 1 Stojanović, S. T., Najman, S. J., Popov, B. B., & Najman, S. S. (2020). Propolis: chemical composition, biological and pharmacological activity—a review. *Acta Medica Medianae*, 59(2). <https://doi.org/10.5633/amm.2020.0215>
- 2 Houghton, P. J. (1998). Propolis as a medicine. Are there scientific reasons for its reputation. *Beeswax and Propolis for Pleasure and Profit*, 10.
- 3 Broadhurst, C. L. (1996). Benefits of bee propolis. *Health Supplement Retailer*, 46-48. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- 4 Popravko S. A., Gurevich, A. I., & Kolosov, M. N. (1969). Flavonoid components of propolis. *Chemistry of Natural Compounds*, 5(6), 397–401. <https://doi.org/10.1007/bf00568574>
5. Gerard J. (1597). *The Herball or Generall Historie of Plants*, J. Norton, London, UK,
- 6 Аверчев О. В. (2021). Сучасний стан та перспективи розвитку ринку продукції бджільництва. <http://hdl.handle.net/123456789/7084>
- 7 Гонтаржевський О. В. (2023). Вплив типу вулика та життєздатність і продуктивність бджолиних сімей в умовах Полісся України. <http://ir.polissiauniver.edu.ua/handle/123456789/13884>
- 8 Bankova V., Popova, M, Trusheva B, (2018). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, 155, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.007>
- 9 Dieterich, K. (1908). The analysis of beeswax in its several stages of formation and concerning the bee resin (propolis). *Pharmazeutische Post*, 40, 369. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- 10 Helfenberg, K. D. (1908). The analysis of beeswax and propolis. *Chemiker Zeitungm*, 31, 987-998. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>
- 11 Dietrich, K. (1911). Further contributions to the knowledge of bee resin (propolis). *Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland*, 52, 1019-1027. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.255>

- 12 Ярних Т. Г., Юр'єва Г. Б., Рухмакова О. А., Буряк М. В., Герасимова І. В., Ярних Т. Г. (2020). Еволюція методів стандартизації прополісу. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.255>
- 13 Ushkalova, V. N., & Topalova, O. V. (1973). Examination of waxes of propolis. . <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1973.11099729>
- 14 Forma, E., & Bryś, M. (2021). Anticancer activity of propolis and its compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594. <https://doi.org/10.3390/nu13082594>
- 15 Berretta, A. A., Silveira M. A. D., Córdor Capcha, J. M., & De Jong, D. (2020). Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110622. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110622>
- 16 Cardoso, S. M., & Silva, A. M. (Eds.). (2016). Chemistry, biology and potential applications of honeybee plant-derived products. <https://doi.org/10.2174/97816810823701160101>
- 17 Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G., & Hu, F.-L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- 18 Giampieri, F., Quiles, J. L., Cianciosi D., Forbes-Hernández, T. Y., Orantes-Bermejo, F. J., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2022). Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05822>
- 19 Cirasino, L., Pisati, A., & Fasani, F. (1987). Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 16(2), 110–111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1987.tb01394.x>
- 20 Rivero-Cruz, J. F., Granados-Pineda, J., Pedraza-Chaverri, J., Pérez-Rojas, J. M., Kumar-Passari, A., Diaz-Ruiz, G., & Rivero-Cruz, B. E. (2020). Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of Mexican brown propolis. *Antioxidants*, 9(1), 70. <https://doi.org/10.3390/antiox9010070>

- 21 Pagani, L. (1990). Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*, 13, 207-13.
<https://www.researchgate.net/publication/21029715>
- 22 Harisna A. H., Nurdiansyah R., Syaifie, P. H., Nugroho, D. W., Saputro, K. E., Prakoso, C. D., ... & Mardliyati, E. (2021). In silico investigation of potential inhibitors to main protease and spike protein of SARS-CoV-2 in propolis. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100969.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100969>
- 23 Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., & Peterson P. K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.045>
- 24 Clergeaud, G., Quesada, I. M., Ortiz, M., O'Sullivan, C. K., & Fernandez-Larrea, J. B. (2014). Zinc Ionophore Activity of Quercetin and Epigallocatechin-gallate: From Hepa 1-6 Cells to a Liposome Model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(32). <https://doi.org/10.1021/jf5014633>
- 25 Adamczak, A., Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 109. <https://doi.org/10.3390/jcm9010109>
- 26 Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences*, 27(11), 3079-3086.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>
- 27 Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x>
- 28 Nainu F., Masyita A., Bahar M. A., Raihan M., Prova S. R., Mitra S., Simal-Gandara J. (2021). Pharmaceutical prospects of bee products: Special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. *Antibiotics*, 10(7), 822. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070822>

- 29 Durazzo A., Lucarini, M., Plutino M., Lucini L., Aromolo R., Martinelli E., Pignatti G. (2021). Bee products: A representation of biodiversity, sustainability, and health. *Life*, 11(9), 970. <https://doi.org/10.3390/life11090970>
- 30 Tamfu A. N., Ceylan O., Cârâc G., Talla E., & Dinica R. M. (2022). Antibiofilm and anti-quorum sensing potential of cycloartane-type triterpene acids from Cameroonian grassland propolis: phenolic profile and antioxidant activity of crude extract. *Molecules*, 27(15), 4872. <https://doi.org/10.3390/molecules27154872>
- 31 Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 141-168. <https://doi.org/10.1002/9780470988565>
- 32 Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
- 33 Rajan, V. K., & Muraleedharan, K. (2017). A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. *Food Chemistry*, 220, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.178>
- 34 Rahim, M. A., Kristufek, S. L., Pan, S., Richardson, J. J., & Caruso, F. (2019). Phenolic building blocks for the assembly of functional materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(7), 1904–1927. <https://doi.org/10.1002/anie.201807804>
35. Zampini, I. C., Salas, A. L., Maldonado, L. M., Simirgiotis, M. J., & Isla, M. I. (2021). Propolis from the Monte region in Argentina: A potential phytotherapeutic and food functional ingredient. *Metabolites*, 11(2), 76. <https://doi.org/10.3390/metabo11020076>
- 36 Christodoulou M. C., Palacios O J., Hesami G., Jafarzadeh S., Lorenzo J. M., Domínguez R., ... & Hadidi M. (2022). Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>
- 37 Poh J. J., Wu W. L., Goh N. W. J., Tan S. M. X., & Gan S. K. E. (2021). Spectrophotometer on-the-go: The development of a 2-in-1 UV–Vis portable

Arduino-based spectrophotometer. *Sensors and Actuators A: Physical*, 325, 112698.

<https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112698>

38. Garbiec E., Rosiak N., Tykarska E., Zalewski P., & Cielecka-Piontek J. (2023). Sinapic acid co-amorphous systems with amino acids for improved solubility and antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5533.

<https://doi.org/10.3390/ijms24065533>.

39 Bozkuş, T. N., Değer, O., & Yaşar, A. (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 44(1-2), 77-86.

<https://doi.org/10.1080/10826076.2021.1883648>

40 Георгіївський В. П., Гризодуб О. І. (1996) Стандартизація та контроль якості лікарських засобів // *Технологія та стандартизація ліків*,

41. Rumpf J., Burger R., & Schulze M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123470.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.

42 Asem N., Abdul Gapar N. A., Abd Hapit N. H., & Omar, E. A. (2020). Correlation between total phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity of Malaysian stingless bee propolis extract. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 437-442.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1684050>

43 Kis B., Avram S., Pavel I. Z., Lombrea A., Buda V., Dehelean C. A., Soica, C., Yerer, M. B., Bojin F., Folescu R., & Danciu C. (2020). Recent Advances Regarding the Phytochemical and Therapeutic Uses of *Populus nigra* L. *Buds. Plants*, 9(11), 1464.

<https://doi.org/10.3390/plants9111464>

44 Tebbi S. O., & Debbache-Benaida N. (2022). Phytochemistry, chemical composition and therapeutic uses of *Populus nigra* L. aerial parts from 1991-2021 onwards: An overview. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30, 100880.

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100880>

- 45 Stanciauskaite M., Marksa M., Liaudanskas M., Ivanauskas L., Ivaskiene M., & Ramanauskiene K. (2021). Extracts of Poplar Buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of Their Composition and Biological Activities. *Plants*, 10(5), 828. <https://doi.org/10.3390/plants10050828>
- 46 Greenaway W., May J., Scaysbrook T., & Whatley F. R. (1991). Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46(1-2), 111–121. <https://doi.org/10.1515/znc-1991-1-218>
- 47 Jerković I., & Mastelić J. (2003). Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*, 63(1), 109–113. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00706-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00706-9)
- 48 Nikolaeva T. N., Lapshin, P. V., & Zagoskina N. V. (2022). Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin–Denis reagent and Folin–Ciocalteu reagent: Modification and comparison. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(7), 1519-1525. <https://doi.org/10.1134/s1068162022070214>
49. Parcheta M., Świsłocka R., Orzechowska S., Akimowicz M., Choińska R., & Lewandowski W. (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, 14(8), <https://doi.org/10.3390/ma14081984>
50. Charlton N. C., Mastuygin M., Török B., & Török M. (2023). Structural features of small molecule antioxidants and strategic modifications to improve potential bioactivity. *Molecules*, 28(3), 1057. <https://doi.org/10.3390/molecules28031057>
51. Gulcin İ., Alwasel S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- 52 Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Acosta M., & Arnao M. B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and*

Biochemical Techniques, 9(4), 196-202. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1565\(199807/08\)9:4%3C196::aid-pca395%3E3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1565(199807/08)9:4%3C196::aid-pca395%3E3.0.co;2-w)

53. Flieger J., Flieger W., Baj J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>

54 ISO 24381:2023 «Bee propolis — Specifications»

