

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ШЕВЧУК КАРИНА РУСЛАНІВНА

Допускається до захисту:
Завідувач кафедри
фундаментальної та прикладної хімії,
_____ Розанцев Г.М.
« _____ » _____ 20__ р.

**ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОВЛЮВАНОЇ ЗДАТНОСТІ ЕТАНОЛЬНИХ
ЕКСТРАКТІВ ПРОПОЛІСІВ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ**

Спеціальність 102 Хімія

Кваліфікаційна (Магістерська) робота

Науковий керівник:
О. В. Куш, професор кафедри
фундаментальної та прикладної хімії,
д-р хім. наук, професор

(підпис)

Оцінка: _____ / _____ / _____
(бали /за шкалою ЕКТС/ за національною шкалою)

Голова ЕК: _____
(підпис)

Вінниця 2025

АНОТАЦІЯ

Шевчук К.Р. Визначення відновлюваної здатності етанольних екстрактів прополісів різними методами. Спеціальність 102 «Хімія», освітня програма «Хімія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2025.

У кваліфікаційній магістерській роботі досліджено відновлювану здатність етанольних екстрактів прополісу, зібраного з десяти регіонів України, з метою оцінки їх антиоксидантної активності. Для цього застосовано чотири аналітичні методи: ферриціанідний, фосфомолібденовий, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) та CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity). Застосування різних підходів дозволило провести порівняльний аналіз антиоксидантних властивостей екстрактів, виявити регіональні відмінності у їх складі та активності, а також оцінити кореляцію між даними, отриманими різними методами. Представлені результати можуть бути використані для подальшого вивчення біологічного потенціалу українського прополісу, оптимізації його екстрагування та стандартизації при створенні на його основі фармакологічних і косметичних препаратів.

Ключові слова: прополіс, відновлювальна здатність

50 с., 1 табл., 22 рис., 39 джерел.

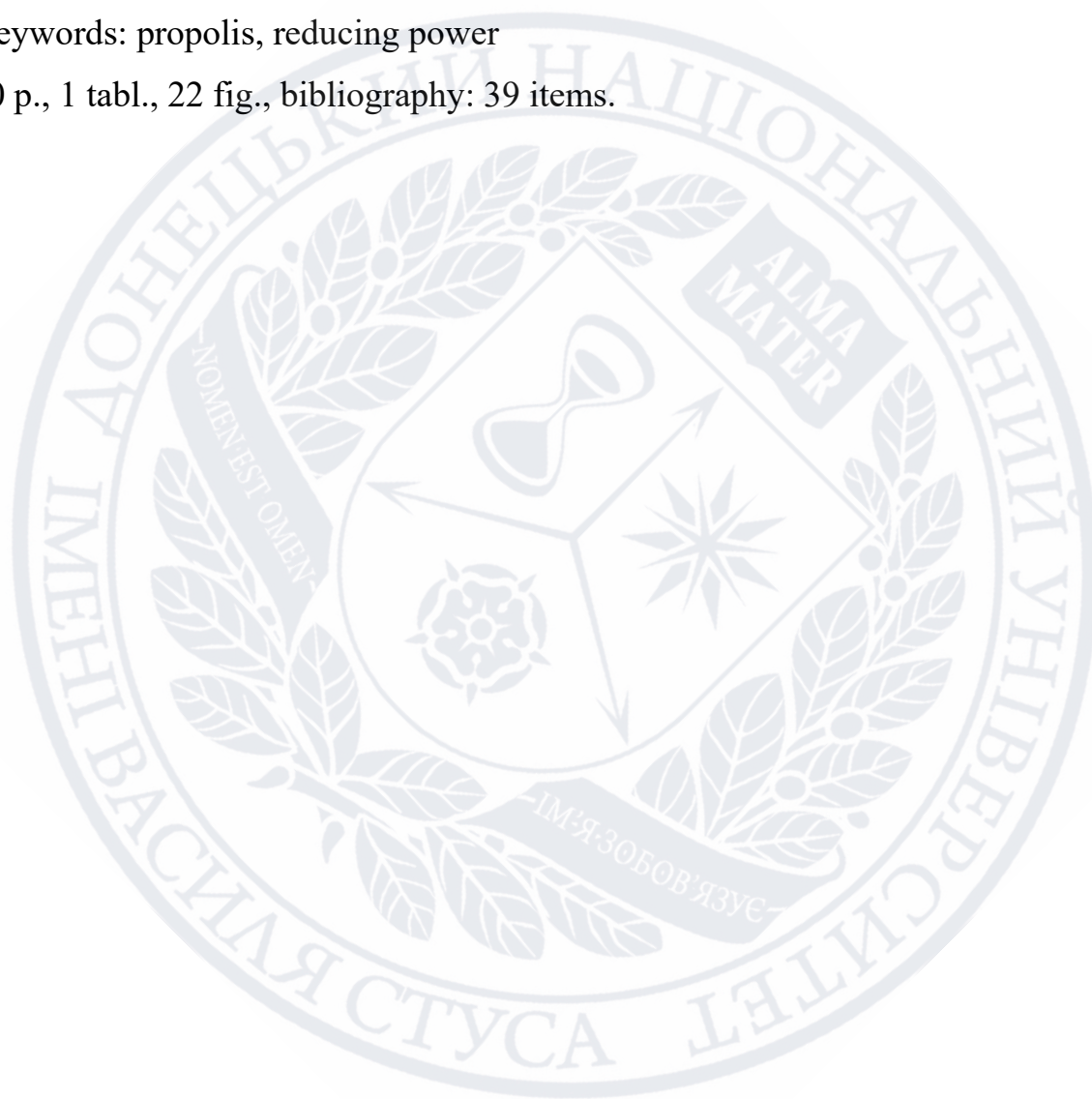
Shevchuk K. Determination of the reducing power of ethanol extracts of propolis by different methods. Specialty 102 "Chemistry", educational program "Chemistry". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2025.

A qualified master's student has investigated the quality of ethanol extracts of propolis, collected from ten regions of Ukraine, by assessing their antioxidant activity. For this purpose, four analytical methods are used: ferricyanide, phosphomolybdenum, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity). The use of different approaches made it possible to carry out a

comprehensive analysis of the antioxidant properties of extracts, to identify regional differences in their patterns of activity, and also to assess the correlation between the data obtained. using different methods. The results can be used for further development of the biological potential of Ukrainian propolis, optimization of its extraction and standardization when creating pharmacological and cosmetic preparations on its basis.

Keywords: propolis, reducing power

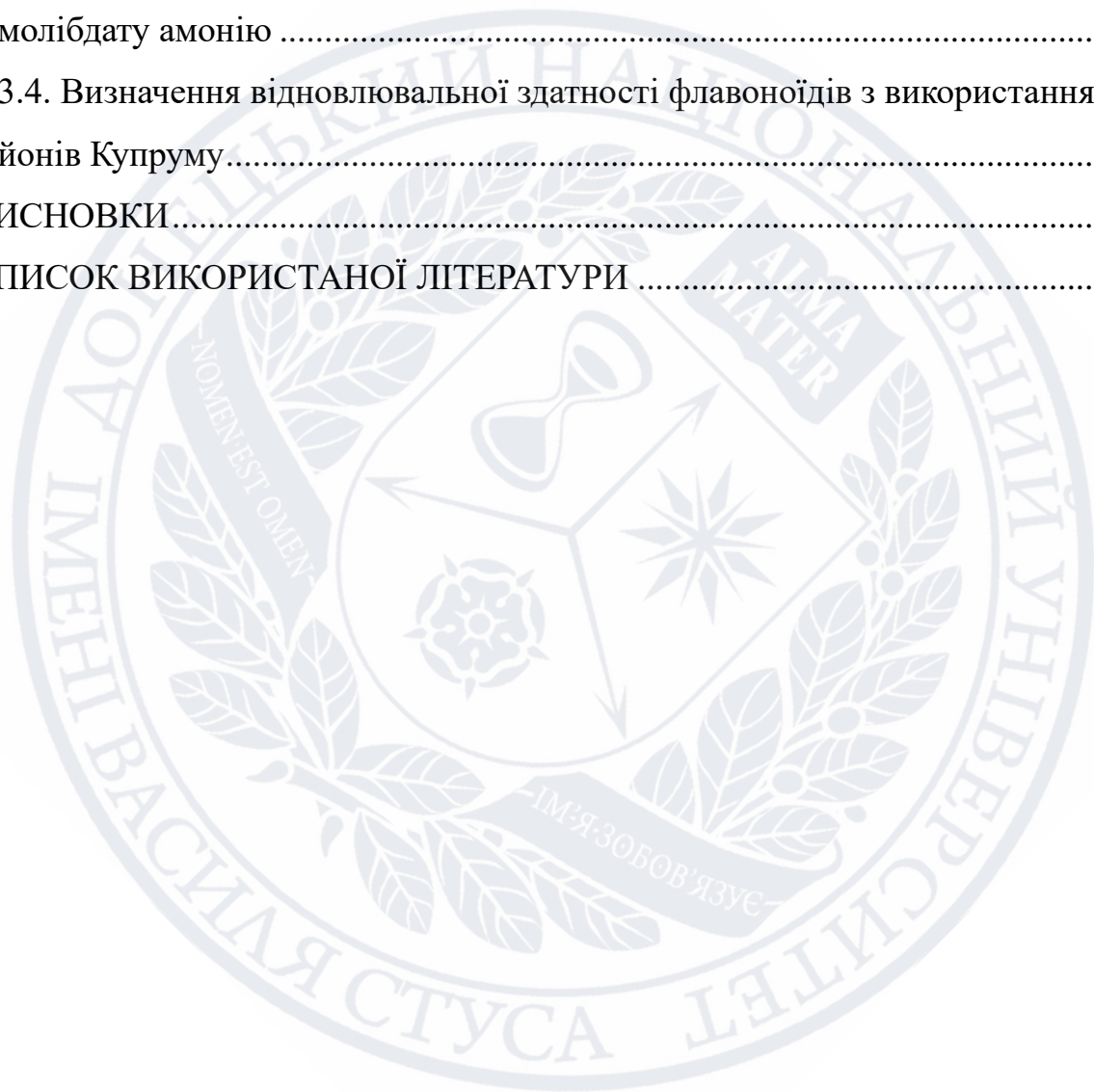
50 p., 1 tabl., 22 fig., bibliography: 39 items.



ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ПРОПОЛІС – ЦІНИЙ ПРОДУКТ БДЖІЛЬНИЦТВА З ШИРОКИМ СПЕКТРОМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ (Літературний огляд).....	10
1.1. Основні поняття про прополіс, як продукт бджільництва	10
1.2 Основні компоненти прополісу	11
1.3 Властивості прополісу	15
1.4 Форми застосування та способи екстракції.....	16
1.5. Методи визначення відновлювальної здатності екстрактів та індивідуальних речовин.....	17
1.6. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів фериціанідним методом.....	18
1.7. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з іонами Феруму (FRAP).....	20
1.8. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів фосфомолібденовим методом	21
1.9. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з йонами Купруму (CUPRAC)	22
Висновок з літогляду.....	24
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	26
2.1. Об'єкти дослідження, реактиви	26
2.2. Спектрофотометричний метод дослідження.....	26
2.3. Фериціанідний метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів екстрактів прополісів	27
2.4. Метод визначення відновлювальної здатності FRAP	28
2.5. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням молібдату амонію	29
2.6. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням іонів Купруму.....	29
2.7. Техніка безпеки	30

РОЗДІЛ 3 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	32
3.1. Визначення відновлювальної здатності йонів Феруму(III) фериціанідним методом.....	32
3.2. Визначення відновлювальної здатності етанольних екстрактів прополісу за методикою FRAP.....	35
3.3. Визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням молібдату амонію	38
3.4. Визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням йонів Купруму.....	40
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	46



ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Прополіс є складним природним продуктом бджільництва з унікальними біологічними властивостями та широким спектром застосування. Завдяки вираженій антисептичній, антибактеріальній, протизапальній та антиоксидантній дії, він активно використовується у медицині, фармакології, косметології, харчовій промисловості та ветеринарії. Особлива цінність прополісу пов'язана з його природним походженням, багатим складом біологічно активних речовин – флавоноїдів, фенольних кислот, ефірних олій, терпенів тощо.

Актуальність дослідження обумовлена тим, що хімічний склад і біологічна активність прополісу суттєво залежать від географічного походження, кліматичних умов, видового складу рослин-медоносів, сезонності збору та інших чинників. Вивчення фізико-хімічних властивостей та антиоксидантної активності зразків прополісу, зібраних у різних регіонах України, дозволяє виявити регіональні відмінності у вмісті активних компонентів, що є важливим для стандартизації сировини та підвищення ефективності її використання в лікувально-профілактичних цілях.

Результати такого дослідження можуть слугувати науковим підґрунтям для розробки високоякісних препаратів на основі прополісу з прогнозованою дією, а також сприяти раціональному використанню природних ресурсів бджільництва в різних регіонах країни.

Об'єкт дослідження. Етанольні екстракти прополісу з 10 областей України.

Предмет дослідження. Відновлювана здатність етанольних екстрактів прополісу з різних областей України.

Мета дослідження

Оцінити відновлювальну здатність етанольних екстрактів прополісу, отриманих з різних регіонів України, шляхом використання чотирьох методів: фериціанідного, фосфомолібденового, FRAP, CUPRAC.

Завдання

1. Зібрати та підготувати зразки прополісу, отримані з різних регіонів України, для подальшого аналізу.
2. Отримати етанольні екстракти прополісу шляхом екстрагування за стандартною методикою.
3. Оцінити відновлювальну (антиоксидантну) здатність екстрактів із застосуванням чотирьох аналітичних методів:– ферриціанідного методу,– фосфомолібденового методу,– FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power),– CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity).
4. Провести порівняльний аналіз результатів, отриманих різними методами, з метою виявлення узгодженості та відмінностей у визначенні антиоксидантної активності.
5. Проаналізувати регіональні відмінності у біоактивності прополісу, встановити залежність між географічним походженням зразків та рівнем їх антиоксидантної дії.
6. Сформулювати висновки щодо доцільності використання певних зразків прополісу як потенційно ефективної сировини для створення фармакологічних і косметичних препаратів.

Методи дослідження

Ферриціанідний та фосфомолібденовий метод, FRAP, CUPRAC, математична обробка результатів, спектрофотометричний метод дослідження.

Наукова новизна

Новизна дослідження полягає в комплексному вивченні відновлювальної здатності етанольних екстрактів прополісу, зібраного в різних географічних регіонах України, із застосуванням кількох комплементарних аналітичних методів (ферриціанідного, фосфомолібденового, FRAP, CUPRAC). На відміну від більшості попередніх робіт, які зосереджувалися на зразках із окремих територій або використовували обмежений спектр методик, у цьому дослідженні

вперше проведено порівняльний аналіз зразків з 10 регіонів країни з метою встановлення регіональних особливостей антиоксидантної активності.

Отримані результати дозволили виявити географічну варіабельність у вмісті біологічно активних сполук, що безпосередньо впливають на антиоксидантні властивості прополісу. Це відкриває нові перспективи для раціонального використання регіональної сировини та створення стандартизованих продуктів з прогнозованою біологічною активністю для медичних і харчових застосувань. Таким чином, дослідження робить вагомий внесок у наукове обґрунтування цільового використання прополісу як ефективного природного антиоксиданту.

Практичне застосування

Отримані результати можуть бути використані для розробки ефективних засобів із вираженою антиоксидантною та регенеративною дією, зокрема у сфері медицини, фармації та косметології. Встановлені регіональні особливості хімічного складу прополісу дозволяють обґрунтовано підбирати сировину з найбільшою біологічною активністю для створення цільових препаратів природного походження. Крім того, виявлені антиоксидантні властивості прополісу відкривають перспективи його застосування як натурального консерванта та функціональної харчової добавки, здатної підвищувати якість, стабільність і безпеку харчової продукції. Це сприяє розширенню можливостей використання українського прополісу в індустрії здорового харчування та натуральної продукції.

Апробація результатів дослідження

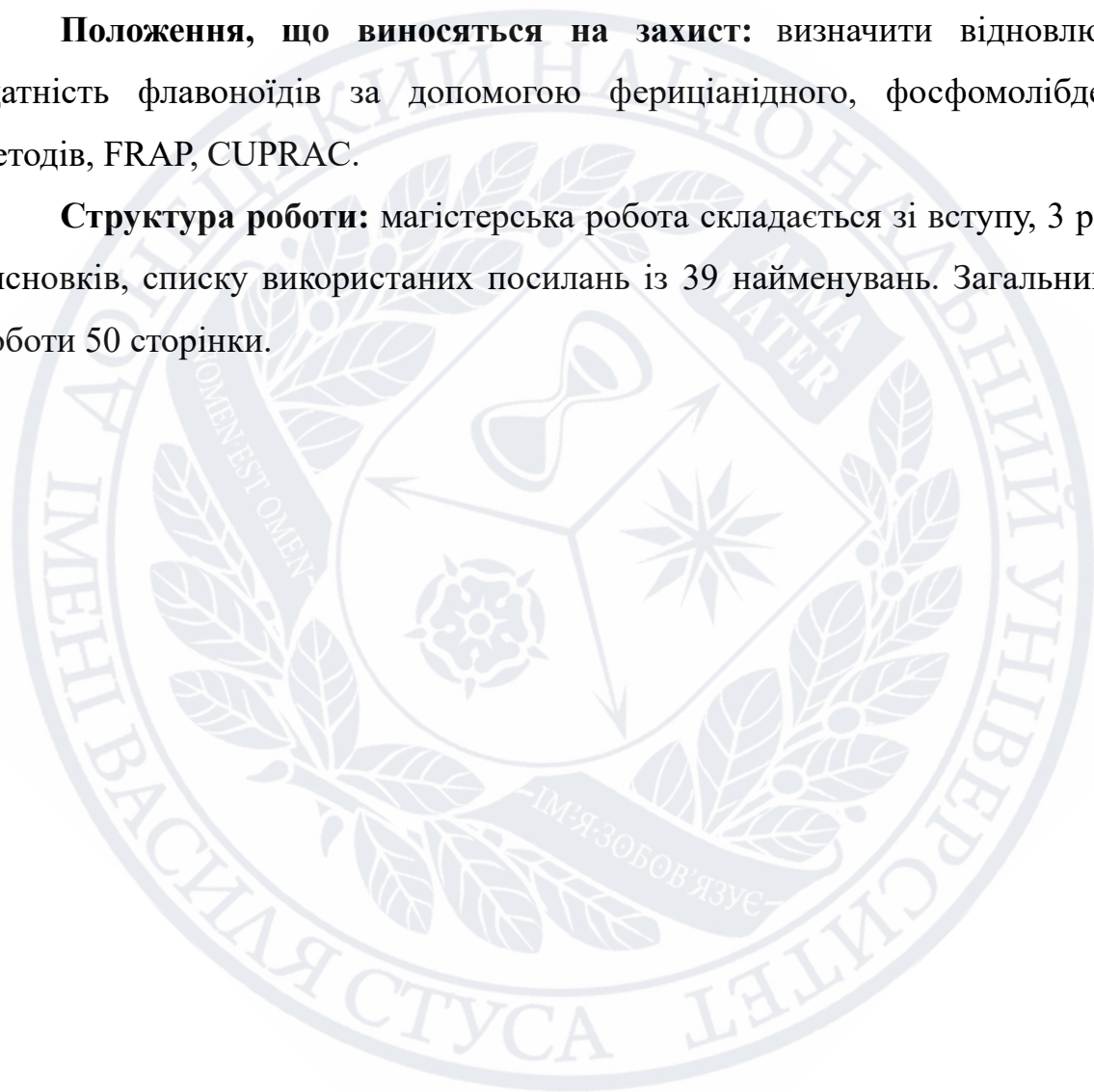
Шевчук К.Р., Гордєєва І.О., Куц О.В., Шендрік О.М. Визначення відновлюваної здатності етанольних екстрактів прополісів різними методами. Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2025): збірник тез доповідей VIII Міжнародної (XVIII Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених, 25–27 березня 2025 р., м. Вінниця / Донецький національний

університет імені Василя Стуса; редколегія: О. М. Шендрик (відп. ред.) [та ін.].
Вінниця, 2025. С.33.

Шевчук К.Р., Гордеева І.О., Куц О.В., Шендрик О.М. Визначення відновлювальної здатності екстрактів прополісу з використанням іонів феруму // Тези доповідей Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи. Житомир, 9 квітня 2025 р. Житомир, 2025. 236-237.

Положення, що виносяться на захист: визначити відновлювальну здатність флавоноїдів за допомогою фериціанідного, фосфомолібденового методів, FRAP, CUPRAC.

Структура роботи: магістерська робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних посилань із 39 найменувань. Загальний обсяг роботи 50 сторінки.



РОЗДІЛ 1

ПРОПОЛІС – ЦІНИЙ ПРОДУКТ БДЖІЛЬНИЦТВА З ШИРОКИМ СПЕКТРОМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

(Літературний огляд)

1.1. Основні поняття про прополіс, як продукт бджільництва

Термін «прополіс» складається з поєднання двох грецьких слів, які в дослівному перекладі звучать як «захист міста». Саме така основна функція бджолиного клею. Речовина застосовується для зміцнення стільників і якісного захисту внутрішнього простору «будиночка» від мікробів.

Прополіс – це природний продукт, створений бджолами з суміші рослинних смол, зібраних із різних дерев і рослин. Бджоли виробляють прополіс, змішуючи смолисті речовини з рослин зі своєю слиною. Цю клейку субстанцію вони використовують для будівництва вуликів та захисту від хижаків і патогенів [1]. Прополіс має антиоксидантну, антибактеріальну та протипухлинну дію, причому його біологічна активність залежить від хімічного складу, який варіюється залежно від географічного розташування, клімату, джерел рослин та видів бджіл, особливо безжальних [2].

Бджоли збагачують цю суміш своїми ферментами та слиною, використовуючи прополіс для укріплення та захисту вуликів. Бджоли використовують прополіс для закладення щілин і нерівностей у вулику, кріплення рамок, зменшення розміру льоткового отвору та обробки комірок. Таким чином, вони усувають конструктивні недоліки та відновлюють пошкоджені частини вулика.

З давніх часів прополіс широко застосовувався для підтримки здоров'я та лікування численних захворювань завдяки його унікальним фармакологічним властивостям, зокрема антиоксидантним [3]. Завдяки високому вмісту фенольних сполук (Рис 1.1) і флавоноїдів (Рис 1.2) прополіс ефективно нейтралізує вільні радикали, зменшуючи окислювальний стрес і захищаючи клітини від пошкоджень. Його антимікробні властивості обумовлені наявністю біологічно

активних сполук, що здатні пригнічувати ріст бактерій, грибків і вірусів, забезпечуючи природний захист від інфекцій [4].

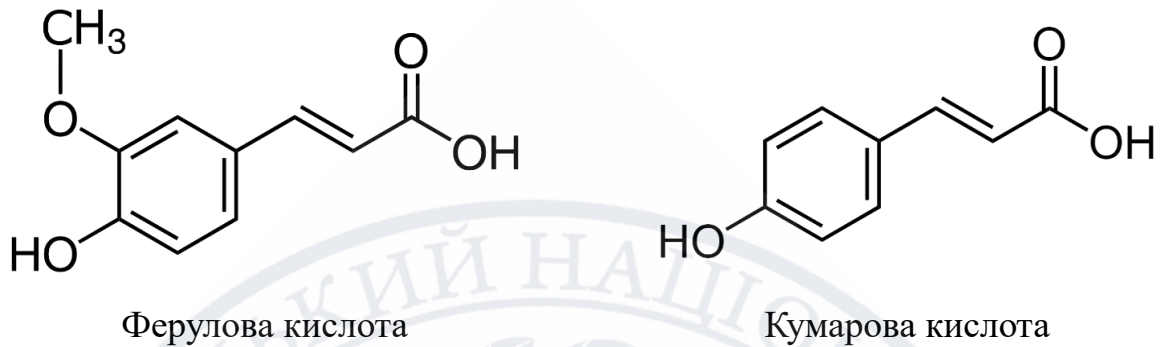


Рис. 1.1. Структури найбільш поширених фенольних кислот у прополісі

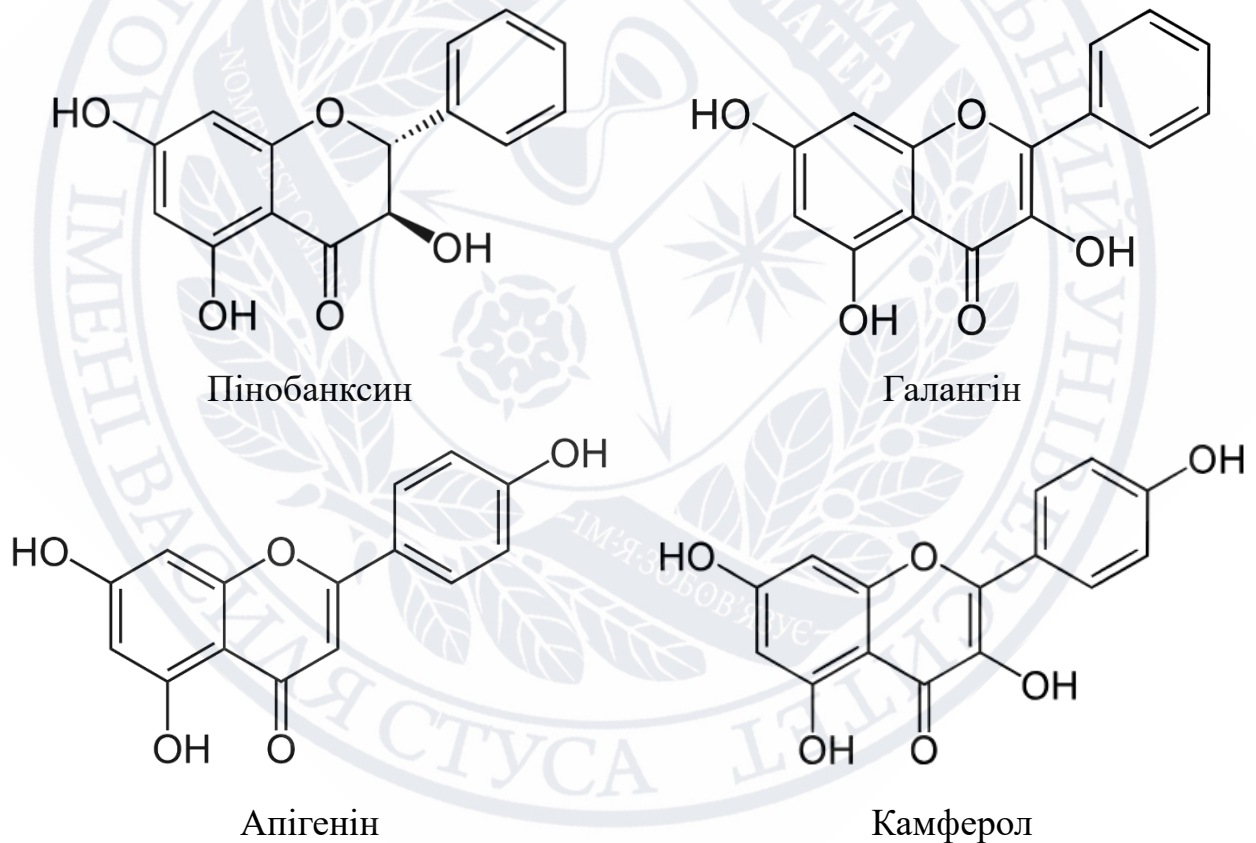


Рис. 1.2. Зображення найбільш поширених груп поліфенолів у прополісі

1.2 Основні компоненти прополісу

Бджолиний прополіс має складний і багатий склад, до якого входять природні сполуки, такі як флавоноїди, поліфеноли, ефірні олії, вітаміни та мінерали. Фізико-хімічні властивості прополісу свідчать про його стійкість до

зовнішніх факторів — він має високу щільність, добре зберігає вологу та стійкий до високих температур. Його функціональні властивості, наприклад здатність утримувати воду або жир, роблять його корисним для застосування у харчовій промисловості.

Компонентний склад прополісного екстракту було представлено за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). На рисунку 1.3 представлено хроматографічний профіль екстракту PS. По осі абсцис відкладено час утримування (хв), що вказує на час проходження компонентів через колонку, а по осі ординат – відносну абсорбцію (%), яка демонструє кількість виявленої речовини.

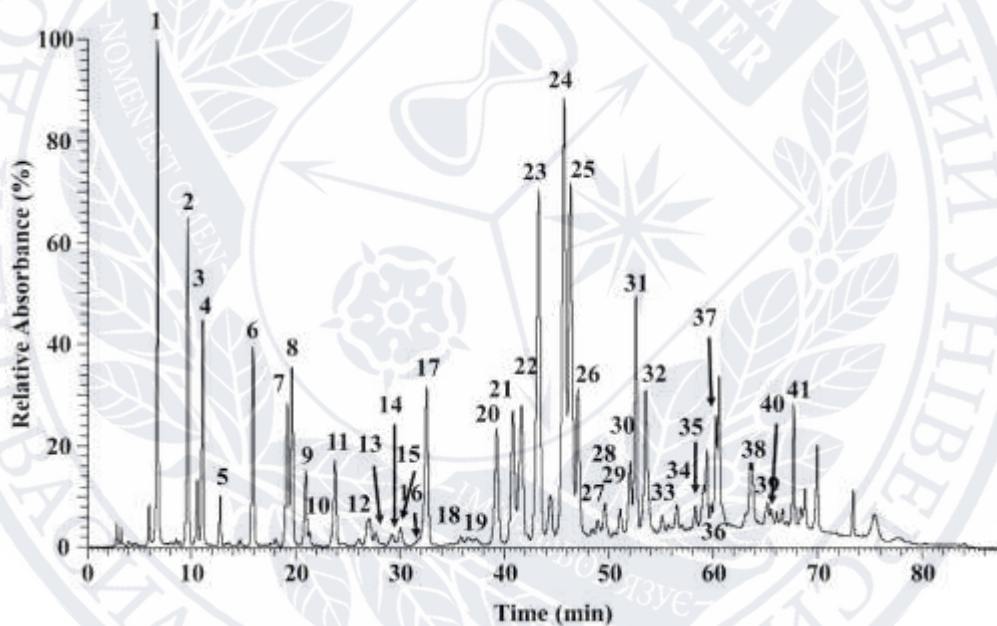


Рис. 1.3. Хроматографічний профіль екстракту прополісу [5]

Хроматограма свідчить про високу складність зразка, адже на ній зафіксовано понад 40 піків, що вказує на присутність численних біологічно активних речовин. Найбільш інтенсивні піки спостерігаються приблизно на 24, 25, 31 та 35 хвилині, що свідчить про високу концентрацію відповідних компонентів. Ці результати підтверджують багатий склад прополісу та є основою для подальшої ідентифікації його активних сполук.

У прополісі виявлено широкий набір амінокислот, включаючи ті, які потрібні людині для нормального функціонування організму. Також він містить корисні жири – переважно ненасичені жирні кислоти, наприклад лінолеву та олеїнову, які підтримують здоров'я серця та судин.

Прополіс має добрі антиоксидантні властивості — він допомагає боротися зі шкідливими вільними радикалами, що можуть викликати старіння клітин та хвороби. Крім того, він здатний знижувати активність ферментів, які розщеплюють крохмаль і жири, а це означає, що його можна використовувати для створення продуктів, корисних при діабеті та надмірній вазі [6].

Зазвичай сирий прополіс складається з 50% смол і рослинних бальзамів, 30% воску, 10% ефірних та ароматичних олій, 5% пилку і 5% інших біоактивних сполук, проте цей склад змінюється залежно від типу прополісу та місця його походження [7]. Також містить дубильні речовини, макро- та мікроелементи, і певні ферменти [8]. Кількісний склад його компонентів може значно варіюватися. Зокрема, вміст смол, за даними різних досліджень, становить від 50 до 85%, ефірних олій та інших летких сполук – від 4,5 до 15%, воску – від 12 до 40%. Дубильні речовини складають від 4 до 10,5%, нерозчинні в спирті домішки (механічні частинки) – від 5–10 до 15%, а частка пилку в цих домішках сягає 5–11%.

Вміст воску у прополісі може варіюватися від 5 до 40% залежно від умов і способу збору. Якщо прополіс збирають у літній період, коли він має м'яку і клейку консистенцію, то кількість воску та механічних домішок буде мінімальною. У випадку, коли прополіс збирають під час очищення вуликів у вигляді твердих і крихких частинок, до нього можуть потрапляти шматочки вощини, стружки та інші домішки, що збільшує вміст воску. Прополіс також багатий на біологічно активні речовини, такі як флавоноїди (флаволи, флавоноли, флавонони та флавононоли) і фенольні сполуки, зокрема фенольні кислоти та їх ефіри [9].

Після спалювання прополісу залишається зола, що становить 18-20% його маси. Це свідчить про те, що прополіс включає не лише органічні речовини, а й

неорганічні сполуки. Спектральний аналіз підтверджує наявність широкого спектра макро- та мікроелементів у його складі. Серед основних елементів виділяються залізо, кальцій, алюміній, магній і кремній. Крім того, прополіс містить мікроелементи, такі як мідь, марганець і цинк, а в окремих зразках виявляється кобальт. Також варто зазначити, що до складу прополісу входить секрет слинних залоз бджіл [10].

Для оцінки морфологічних характеристик частинок висушеного екстракту прополісу на рисунку 1.4 зображено мікрофотографії частинок, отримані за допомогою SEM при збільшенні $\times 500$ (праворуч) та $\times 2000$ (ліворуч).

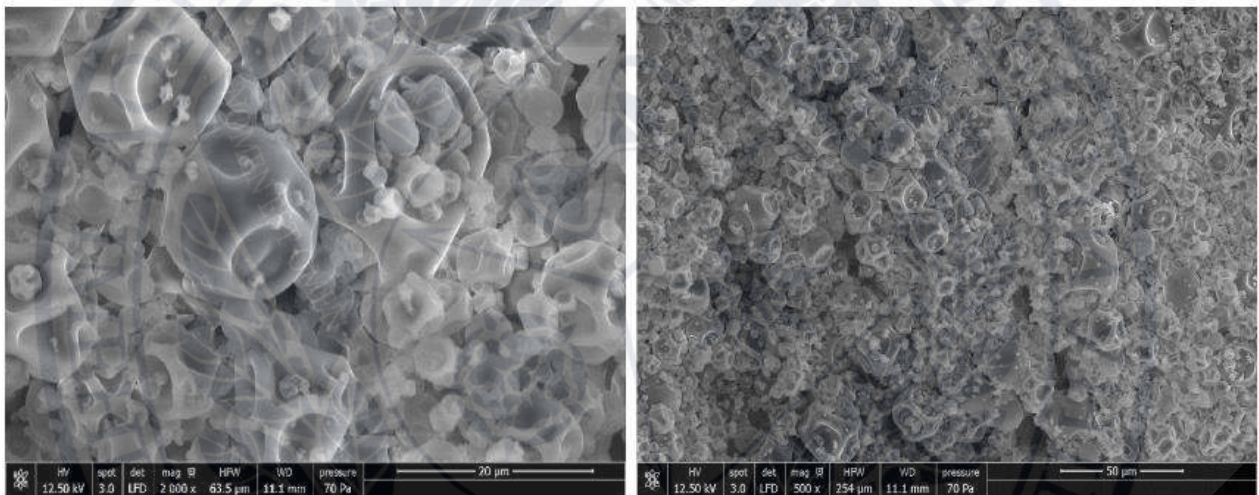


Рис. 1.4. Електронні мікрофотографії мікрочастинок висушеного прополісу при збільшенні $\times 500$ та $\times 2000$ [11]

На рисунках добре помітна сферична форма мікрочастинок, що є типовою для матеріалів, висушених методом розпилення. Поверхня частинок нерівномірна, з наявністю численних пор, борозен та заглиблень, що свідчить про складну структуру та можливе високе співвідношення поверхні до об'єму. Це, в свою чергу, може позитивно впливати на розчинність, біодоступність та стабільність активних сполук, інкапсульованих у мікрочастинки.

SEM-аналіз підтверджує, що процес розпилювального сушіння є ефективним методом для отримання однорідних за формою мікрочастинок

прополісу, придатних для подальшого використання у фармацевтичній або харчовій промисловості.

1.3 Властивості прополісу

Прополіс, природний продукт медоносних бджіл і безжальних бджіл, отримав велику увагу завдяки своїм фармакологічним властивостям, таким як імуностимулюючий, ранозагоювальний, антипроліферативний і противірусний ефекти [12].

Антиоксидантна активність прополісу обумовлена його здатністю нейтралізувати вільні радикали, знижуючи таким чином рівень окислювального стресу в клітинах. Це особливо важливо у запобіганні хронічним запальним процесам і підтримці клітинного гомеостазу. Результати численних досліджень демонструють, що екстракти прополісу, отримані різними методами екстракції (етанольні, водні, метанольні тощо), можуть суттєво відрізнитись за своєю біологічною активністю, що підкреслює важливість стандартизації умов при їх одержанні [13].

Завдяки вмісту флавоноїдів, фенольних кислот та їх похідних, екстракти прополісу здатні ефективно пригнічувати ріст патогенних грибів, таких як *Candida albicans*, *Aspergillus spp.* та інші [14]. Проявляють здатність поглинати УФ-випромінювання і мають антиоксидантні властивості, що робить прополіс перспективним кандидатом для фотозахисту. Дослідження показують, що екстракти прополісу здатні нейтралізувати вільні радикали, що утворюються під дією УФ-променів, знижуючи окислювальний стрес і захищаючи шкіру від пошкоджень. Ці антиоксидантні та протизапальні властивості сприяють збереженню здоров'я шкіри та запобіганню фотостарінню, що проявляється зморшками, зниженням еластичності та іншими ознаками старіння внаслідок тривалого впливу УФ-променів [15].

Зокрема, прополіс виявляє виражену біоіндуктивну дію, яка полягає у стимуляції процесів регенерації та відновлення тканин. Дослідження показали, що компоненти прополісу активують проліферацію клітин, зокрема фібробластів,

сприяють синтезу колагену, покращують мікроциркуляцію і, таким чином, забезпечують умови для ефективного загоєння ушкоджених тканин.

Окрім цього, прополіс має потужні протизапальні властивості. Його дія проявляється в інгібуванні продукції запальних цитокінів, таких як TNF- α та IL-1 β , а також у зменшенні оксидативного стресу завдяки антиоксидантній активності. Завдяки здатності знижувати набряк, біль та бактеріальне навантаження, прополіс ефективно використовується як допоміжний засіб у лікуванні запальних захворювань ротової порожнини [16].

1.4 Форми застосування та способи екстракції

Прополіс, як природний бджолиний продукт, набуває все більшого значення у медицині, фармакології та косметології завдяки своїм численним біологічним властивостям – антибактеріальним, протизапальним, імуномодулюючим та регенеративним [17, 18].

У сучасній фармацевтичній практиці прополіс застосовується в різноманітних формах, що обумовлено його багатокomпонентною природою та цільовим призначенням препаратів. Найпоширенішою формою є спиртові настоянки, що містять від 10% до 30% екстракту прополісу, які використовуються як місцево (антисептик, протизапальний засіб), так і внутрішньо [19].

Вибір методу екстракції прополісу суттєво впливає на якісний і кількісний склад кінцевого екстракту, а отже – і на його фармакологічні властивості.

1. Спиртова екстракція є класичним і найпоширенішим методом вилучення біологічно активних речовин, особливо флавоноїдів, фенольних кислот і ефірних олій. Оптимальним вважається використання 70% етилового спирту.

2. Водна екстракція менш ефективна в плані вилучення жиророзчинних компонентів, проте є безпечною для осіб із алергією на спирт або дітей.

3. Гліцеринова та водно-гліцеринова екстракція забезпечує м'яке вилучення діючих речовин, зберігаючи їхню стабільність, що особливо важливо для косметичних та дитячих засобів.

4. Олійна екстракція застосовується переважно для зовнішнього використання. Олії (оливкова, соняшникова) слугують розчинниками для жиророзчинних компонентів прополісу.

5. Суперкритична екстракція (CO₂-екстракція) – сучасний високотехнологічний метод, що забезпечує високу концентрацію та чистоту екстракту, проте потребує дорогого обладнання.

1.5. Методи визначення відновлювальної здатності екстрактів та індивідуальних речовин

Відновлювана здатність антиоксидантів є одним із ключових параметрів, що визначає їхню загальну антиоксидантну ефективність, тобто здатність перешкоджати окислювальним процесам, які супроводжуються утворенням вільних радикалів, перекисних сполук та реактивних форм кисню (ROS, Reactive Oxygen Species). Ці активні молекули, що утворюються під впливом ультрафіолетового випромінювання, забруднень, метаболічного стресу або запальних процесів, здатні ініціювати ланцюгові реакції, які ведуть до пошкодження ліпідів, білків, ДНК, а також до порушення клітинних функцій. Антиоксиданти, в тому числі природні фенольні сполуки, здатні перервати ці реакції, передаючи електрон або атом водню радикалам і тим самим нейтралізуючи їхню активність.

Відновлювана активність антиоксидантів характеризує саме їхню здатність бути донорами електронів або водню у відповідних окисно-відновних реакціях. У біохімічному контексті це означає, що молекула антиоксиданту виступає як відновник, віддаючи електрон або гідроген до окисника (наприклад, пероксиду водню, супероксид-аніону або катіонів металів). Завдяки цьому властивості, антиоксиданти здатні зменшувати ступінь окиснення різних компонентів середовища і підтримувати редокс-гомеостаз клітини [20].

Для кількісної оцінки відновного потенціалу антиоксидантів застосовуються різноманітні методики, зокрема спектрофотометричні, електрохімічні та хемілюмінесцентні. Одним з поширених підходів є оцінювання

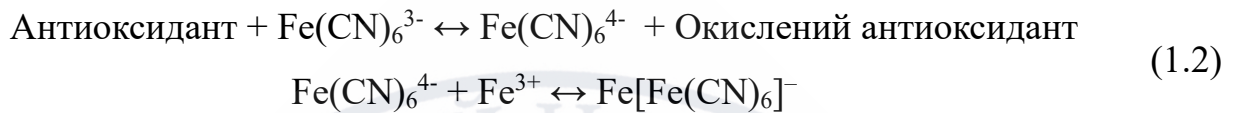
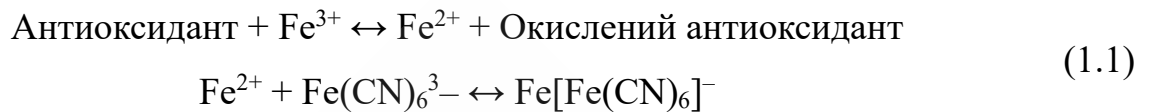
редукційної здатності за участю іонів перехідних металів, таких як $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, $\text{Cr}^{6+}/\text{Cr}^{3+}$ або $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$. У цих реакціях молекули антиоксидантів відновлюють катіони металів до нижчих ступенів окиснення, що супроводжується зміною спектральних характеристик або електричного потенціалу системи [21]. Наприклад, тест FRAP базується на відновленні Fe^{3+} у присутності трипіридилтріазину (TPTZ) до Fe^{2+} з утворенням кольорового комплексу, який поглинає світло при довжині хвилі 593 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості відновленого заліза і, відповідно, відновлюваної здатності досліджуваної сполуки.

Крім FRAP, широко використовуються методи CUPRAC, де мідь (II) відновлюється до міді (I), та ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), що вимірює здатність антиоксиданта гальмувати окиснення флуоресцентного зонда за участю радикальних форм кисню. Усі ці підходи мають певні специфічні переваги і дозволяють комплексно оцінити здатність антиоксиданта до відновлення та пригнічення окисного стресу. Важливо зазначити, що структурні особливості антиоксидантів – зокрема наявність гідроксильних груп, кон'югованих подвійних зв'язків і карбонільних функцій – значно впливають на їхню редукційну активність. Саме тому флавоноїди з *орто*-гідроксильованими або метоксильованими структурами демонструють вищу активність порівняно з простішими фенольними похідними.

1.6. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів фериціанідним методом

Загальну антиоксидантну здатність неферментативних і нехелатних антиоксидантів можна виміряти за допомогою їх відновлення Fe(III) за наявності стехіометричних кількостей хромогенних лігандів, що утворюють комплекси з Fe(II) , наприклад фериціанід калію. У ході реакції утворюється берлінська лазурь, кількість якої визначається спектрофотометрично та вказує на відновну здатність досліджуваних антиоксидантів. Утворення берлінської лазури може відбуватися двома різними шляхами з однаковим результатом. Антиоксиданти

можуть або відновити Fe^{3+} у розчині до Fe^{2+} , який зв'язує фериціанід з утворенням берлінської лазури (1.1), або відновити фериціанід до фероціаніду, який зв'язує вільні йони Fe^{3+} у розчині та утворює берлінський лазурь (1.2).



Одним із недоліків цього фериціанідного аналізу є схильність берлінської лазури випадати в осад, утворюючи суспензію та забарвлюючи вимірювальну кювету. Тому час для додавання Fe^{3+} (FeCl_3) є суттєвим і може внести помилку в інтерпретацію результату. Для стабілізації берлінської блакиті задля запобігання утворення осаду запропонували додати поверхнево-активну речовину додецилсульфат натрію, одночасно підтримуючи оптимальний рН 1,7, щоб перешкодити перебігу гідролізу у системі. Ця модифікація також дозволяє оцінити антиоксиданти, чий окислювально-відновний потенціал не перевищує потенціал $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ у звичайному аналізі, таких як фізіологічні неферментативні антиоксиданти тіолового типу.

Тролокс (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) є водорозчинним аналогом вітаміну Е. Це антиоксидант, який використовується у біологічних або біохімічних цілях для зменшення окисного стресу або пошкодження [22].

Еквівалентна антиоксидантна здатність тролокса (ТЕАС) – це вимірювання антиоксидантної сили на основі тролокса, виміряного в одиницях, які називаються еквівалентами тролокса (ТЕ), наприклад мікромоль ТЕ/100 г. Через труднощі вимірювання окремих антиоксидантних компонентів складної суміші (наприклад в екстрактах) еквівалентність Тролох використовується як еталон антиоксидантної здатності такої суміші.

1.7. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з іонами Феруму (FRAP)

Метод FRAP – це один із основних аналізів для визначення антиоксидантної здатності біологічних зразків. Він ґрунтується на відновленні іонів Fe^{3+} до Fe^{2+} у присутності антиоксидантів, що містяться у зразку [23]. У цьому методі аналізу антиоксидантної здатності використовується Trolox як стандарт [24].

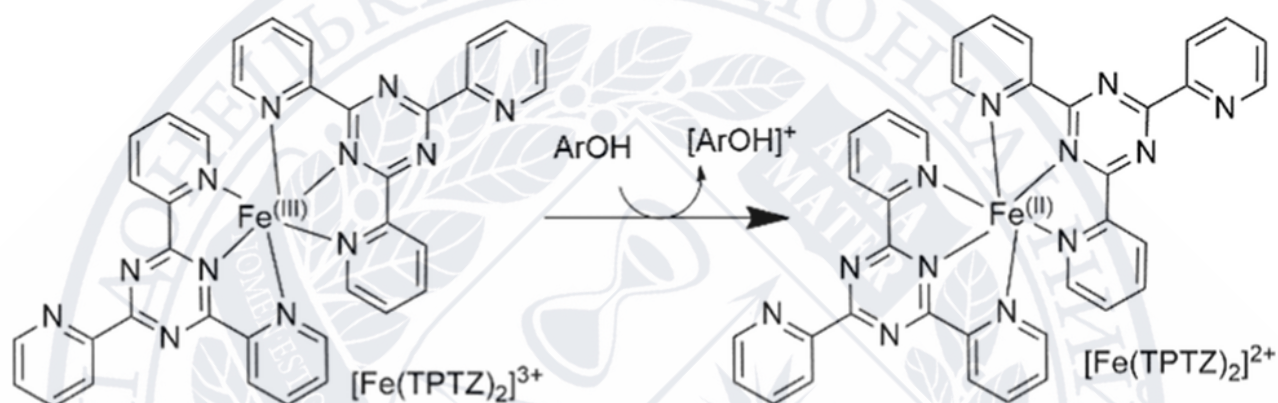


Рис. 1.5. Механізм реакції FRAP з антиоксидантами (ArOH) [25]

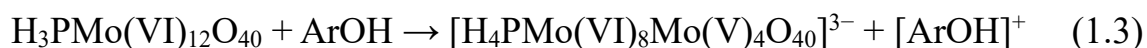
Аналіз FRAP був розроблений для визначення здатності біологічних рідин та водних розчинів чистих сполук відновлювати іони Феруму. Реагент FRAP був підготовлений так, щоб містити дві молекули TPTZ ліганду на іон $\text{Fe}(\text{III})$, оскільки TPTZ утворює хелат 2:1 з іонами заліза через стеричні причини. Стехіометричний надлишок $\text{Fe}(\text{III})$ в реагенті FRAP змістить основну окислювально-відновну реакцію (викликану $\text{Fe}(\text{III})$ –TPTZ) вправо коли великі кількості хелаторів заліза є у складних зразках [26]. Таким чином, окисно-відновний потенціал реагенту FRAP становить близько 0,7 В [27], що близько до значень ABTS (0,68 В) [23] і CUPRAC (0,6 В) [28], як того вимагає більшість антиоксидантних аналізів для окислення фізіологічно важливих неферментативних антиоксидантів. Усі аналізи на основі заліза (за винятком вихідного аналізу фериціаніду) проводилися у чітко кислому розчині через гідроліз іона заліза при слабкисло-нейтральному рН. Оскільки $\text{Fe}(\text{III})$

стабілізуватиметься гідроксильними лігандами шляхом утворення гідролізних комплексів, умовний потенціал окисно-відновної пари Fe(III)–Fe(II) зміститься до нижчих значень у слабокисло-нейтральному розчині, що інактивує реагент для окислення тестованих антиоксидантів [29].

Еквівалентна тролоксу антиоксидантна ємність (TEAC) визначається як мілімолярна концентрація розчину тролоксу, що має антиоксидантну ємність, еквівалентну 1,0 мМ розчину досліджуваної речовини. Оскільки значення FRAP було визначено як еквівалентна Fe(II) відновна ємність зразка, а тролокс, 2e-відновник, має стехіометричний коефіцієнт 2 (що означає, що 1 молекула тролоксу еквівалентна 2 іонів Fe(II) по відновлювальній здатності), можна зробити коефіцієнти TEAC простим розподілом відносної активності FRAP на 2, наприклад, аскорбінова кислота, що має відносну активність FRAP 2 [22], має показувати коефіцієнт TEAC 1 в аналізі FRAP. Методи аналізу антиоксидантної активності (TAC) на основі іонів Феруму коректно оцінюють антиоксидантну активність для 3, 4 -дигідроксизаміщених флавоноїдів з сполученою структурою, таких як кверцетин, і полігідроксифенольних кислот. Оскільки і аскорбінова кислота, і тролокс діють як двохелектронні відновники у методах на основі перенесення електронів, коефіцієнт TEAC аскорбінової кислоти був близьким до 1 у кожному випадку [22].

1.8. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів фосфомолібденовим методом

Реакція утворення комплексу фосфат іону з Mo(V), який має зелене забарвлення, була запропонована Fiske та Subbarow [30] як основа спектрофотометричного методу визначення неорганічного фосфату. Цей метод був пізніше модифікований Ченом [31]. Необхідність наявності відновника у реакційній суміші для отримання Mo(V) з Mo(VI) (рівняння (1.3)), зробила можливим застосувати цей метод для визначення антиоксидантної активності індивідуальних сполук та їх сумішей.



УФ/видимий спектр фосфомолібденового комплексу має характерний максимум за 695 нм, що дозволяє використовувати спектрофотометричний метод визначення відновлюваної здатності [32].

1.9. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з йонами Купруму (CUPRAC)

Загальну антиоксидантну здатність неферментативних і нехелатних антиоксидантів можна виміряти за допомогою їх відновлення Cu (II) за наявності стехіометричних кількостей хромогенних лігандів, що утворюють комплекси з йонами Cu (I), наприклад неокупраїн. Цей метод скорочено називають CUPRAC. У ході реакції утворюється комплекс, кількість якої визначається спектрофотометрично та вказує на відновну здатність досліджуваних антиоксидантів.

Аналізи на основі переносу електрону включають загальний вміст фенолів за Фолін-Чокальтеу, ферриціанідний метод (гексаціаноферрат(III)/берлінська лазурь), FRAP, CUPRAC та методи ABTS та DPPH. На відміну від перших чотирьох методів, що використовують збільшення поглинання, останні два методи вимірюють знебарвлення радикальних реагентів у результаті відновлення антиоксидантами протягом фіксованого періоду.

Метод CUPRAC – це простий та універсальний аналіз антиоксидантної здатності, який можна використовувати для широкого спектру поліфенолів, включаючи фенольні кислоти, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, каротиноїди, антоціани, а також для тіолів, синтетичних антиоксидантів та вітамінів С та Е. Хромогенним окисником, що використовується для аналізу CUPRAC, є біс(неокупроїн)катион купруму(II) (Cu(II)-Nc), що діє як зовнішньосферний агент перенесення електронів, а хромофор CUPRAC, утворений шляхом відновлення цього реагенту антиоксидантами, є біс(неокупроїн)катион купруму(I) (Cu(I)-Nc). Цей реагент використовується при

pH 7, а поглинання Cu(I)-хелату, утвореного в результаті окисно-відновної реакції з відновлювальними поліфенолами, вітамінами С та Е, вимірюється за 450 нм. Помаранчево-жовтий колір обумовлений утвореним хелатом Cu(I)-Nc. Реакції CUPRAC завершуються протягом 30 хв. Реагент CUPRAC, хлорид біс(неокупроїн)меди(II) (Cu(II)-Nc), реагує з p-електронними антиоксидантами-відновниками наступним чином:

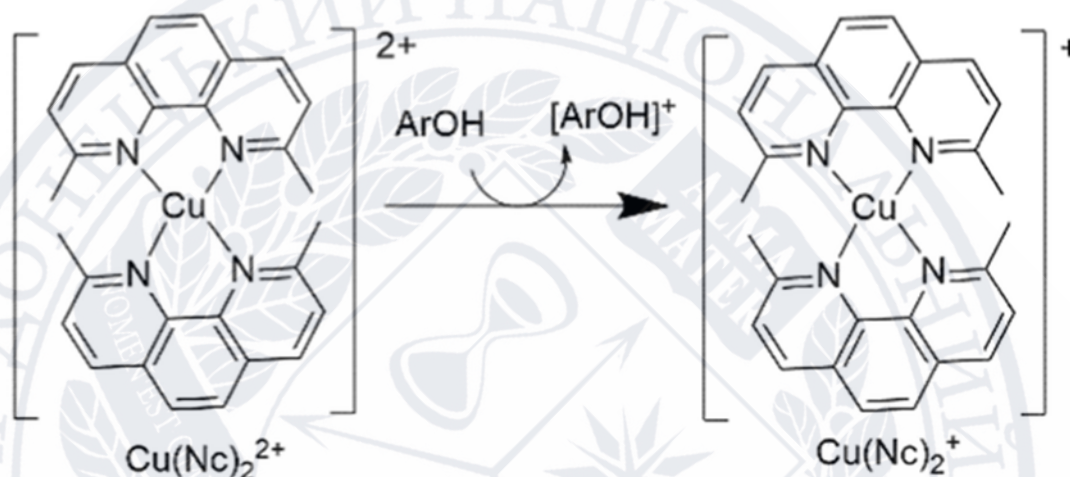


Рис. 1.6. Механізм реакції CUPRAC з антиоксидантами (ArOH) [21]

У цій реакції реакційноздатні групи Ar-OH поліфенольних антиоксидантів по суті окислюються до відповідних хінонів (Ar=O), а Cu(II)-Nc відновлюється до помаранчево-жовтого хелата Cu(Nc)_2^+ . Хоча концентрація іонів Cu^{2+} знаходиться у стехіометричному надлишку порівняно з неокупроїном (Nc) (реагентом CUPRAC) для управління окислювально-відновною рівноважною реакцією, фактичним окислювачем є вид Cu(Nc)_2^{2+} , а не вільний Cu^{2+} . Це пов'язано з тим, що стандартний окисно-відновний потенціал пари $\text{Cu(Nc)}_2^{2+}/\text{Cu(Nc)}_2^+$ становить 0,6 В, що набагато вище, ніж у пари $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (0,17 В), оскільки Cu (I) набагато більш стабілізована неокупроїном порівняно з Cu (II). У результаті поліфеноли окислюються набагато швидше і ефективніше з Cu(II)-Nc, ніж з Cu^{2+} , а кількість забарвленого продукту (тобто хелату Cu(I)-Nc), що з'являється після окислювально-відновної реакції, еквівалентно кількості

Cu(II)-Nc, що прореагував. Вільні протони буферизуються у серидовищі ацетату амонію за pH 7.

У стандартному методі CUPRAC реакції окислення в основному завершуються за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Антиоксидантам, що повільно реагують, може знадобитися підвищена температура інкубації, щоб завершити їх окислення реагентом CUPRAC. Антиоксидантна здатність CUPRAC для широкого спектру поліфенолів та флавоноїдів були експериментально визначені як еквівалентні антиоксидантній здатності тролокса, що визначаються як відновна здатність (еквівалентах тролоксу у мМ) 1 мМ розчину досліджуваного антиоксиданта. У випадку багатокomпонентних сумішей екстрактів перераховуємо в мМ тролоксового еквіваленту на 1 грам сухої речовини [33].

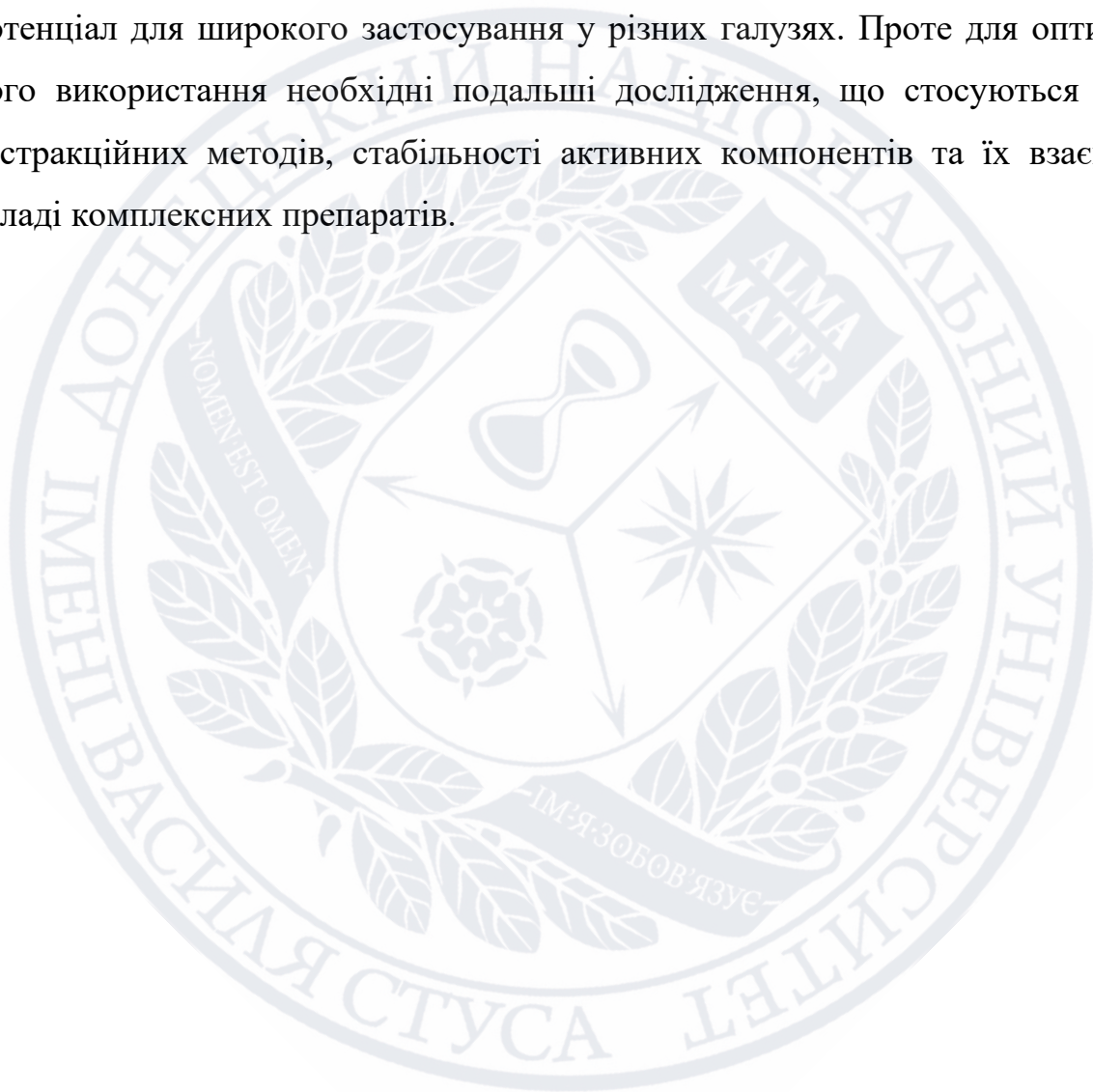
Висновок з літогляду

Аналіз відновлювальних властивостей прополісу, представлений у науковій літературі, показує, що цей природний продукт володіє значним антиоксидантним потенціалом, який обумовлений його складом, що включає флавоноїди, фенольні кислоти, ефірні масла та інші біоактивні сполуки. Прополіс здатний ефективно нейтралізувати вільні радикали та інші активні форми кисню, що підтверджується численними дослідженнями, які використовували різні методи вимірювання відновлювальної здатності, зокрема методи з використанням ферриціанідного, молібдатного та купрумowego реагентів.

Багато робіт вказують на те, що географічне походження прополісу суттєво впливає на рівень його антиоксидантної активності, оскільки склад активних компонентів може змінюватися залежно від місцевої флори, кліматичних умов та сезону збору. Зокрема, прополіс з регіонів з багатою різноманітною рослинністю, що включає медоноси з високим вмістом флавоноїдів та фенольних кислот, демонструє найвищі відновлювальні властивості.

Окрім прямої антиоксидантної активності, прополіс також виявляє потенціал у боротьбі з окислювальним стресом в організмі, що робить його перспективним для використання в медичних, фармацевтичних і косметичних продуктах, а також у харчовій промисловості як натуральний консервант.

Загалом, на основі літературного огляду можна зробити висновок, що прополіс є перспективним природним антиоксидантом, що має значний потенціал для широкого застосування у різних галузях. Проте для оптимізації його використання необхідні подальші дослідження, що стосуються впливу екстракційних методів, стабільності активних компонентів та їх взаємодії в складі комплексних препаратів.



РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти дослідження, реактиви

Об'єктами дослідження були етанольні екстракти прополісу з різних областей України:

1. Вінницька область, смт. Стрижавка.
2. Донецька область, м. Авдіївка.
3. Київська область, м. Чабани.
4. Харківська область, м. Південне.
5. Рівненська область, с. Обарів.
6. Чернівецька область, м. Новодністровськ.
7. Одеська область, с. Нарубайське.
8. Івано-Франківська область, с. Курилів.
9. Тернопільська область, м. Бережани.
10. Львівська область, с. Лаврів.

У дослідженнях використовували ацетатний буфер, гептамолібдат амонію, додецилсульфат натрію, екстракти прополісів, етиловий спирт, калій дигідрофосфат, купрум (II) хлорид, неокупраїн, сульфатну кислоту, тролокс, ТРТЗ, ферум(III) нітрат, фериціанід калію, хлоридну кислоту, хлорид феруму (III).

2.2. Спектрофотометричний метод дослідження

Спектрофотометрія є одним із найпоширеніших та найбільш універсальних методів аналітичної хімії, що базується на вимірюванні поглинання світла речовинами у видимому та ультрафіолетовому діапазоні довжин хвиль. Її простота, доступність і висока чутливість роблять спектрофотометрію незамінним інструментом у фармацевтичних, біохімічних та харчових дослідженнях.

Однією з важливих сфер застосування цього методу є визначення антиоксидантної (відновлювальної) активності природних речовин, зокрема таких біологічно активних продуктів, як прополіс. У таких дослідженнях широко застосовуються калориметричні реакції, де антиоксиданти відновлюють радикальні або окиснені форми певних реагентів, що супроводжується зміною забарвлення, яке фіксується спектрофотометром.

Спектрофотометричне визначення полягає у вимірюванні здатності речовини поглинати світло певної довжини хвилі. Цей метод заснований на законі Бугера-Ламберта-Бера (рівняння 2.1), згідно з яким поглинання світла пропорційне концентрації речовини та довжині оптичного шляху:

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

де A – абсорбція розчину;

ε – молярний коефіцієнт поглинання речовини, л/(моль·см);

l – товщина поглинаючого шару, см;

C – концентрація речовини, моль/л.

2.3. Ферриціанідний метод визначення відновлювальної здатності флаваноїдів екстрактів прополісів

Методика спрямована на визначення відновлювальної здатності зразків у еквівалентах тролокса за допомогою спектрофотометрії.

Дослідження проводиться шляхом підготовки стандартних розчинів. Наважку 0,5 г ферриціаніду калію помістити у мірну колбу на 50 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованої води з додаванням 1 мл 1 М НСІ і довести водою до мітки. Наважку 0,2 г хлориду феруму (ІІІ) помістити у мірну колбу на 100 мл, розчинити у невеликій кількості дистильованої води з додаванням 1 мл 1 М НСІ і довести водою до мітки. Приготувати 50 мл 1 % розчин додецилсульфат натрію у воді, та 1 мМ розчин тролоксу у етиловому спирті.

До 1 мл етанольного екстракту прополісу додати 5 мл дистильованої води, 1,5 мл 1 М НСІ, 1,5 мл ферриціаніду калію, 0,5 мл додецилсульфата натрію та 0,5

мл хлориду феруму (III). Сумарний об'єм реакційної суміші складав 10 мл. Проби інкубувати 20 хвилин за 50 °С. Охолодити до кімнатної температури та виміряти оптичну густина за 750 нм. Розчин порівняння приготувати аналогічним способом, проте замість екстракту прополісу додати 1 мл етилового спирту.

Для побудови калібрувального графіку замість етанольних зразків прополісу використовували тролокс з різними концентраціями (0.125–1 мМ).

Методика базується на хімічних реакціях окисно-відновного характеру та дозволяє точно оцінити відновлювальну здатність зразків прополісу [34].

2.4. Метод визначення відновлювальної здатності FRAP

Визначення антиоксидантної активності зразків шляхом оцінки їхньої відновлювальної здатності у порівнянні з $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, із використанням спектрофотометричного аналізу.

Дослідження проводиться шляхом підготовки реагенту (5 мл 10 мМ розчину ТРТЗ у 40 мМ HCl , 5 мл 20 мМ розчину $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ і 50 мл 0,3 М ацетатного буферу (рН 3,6)). Після цього змішують 0,1 мл зразка з 3 мл приготованого реагента та інкубують 10 хв за 37 °С $\lambda_{\text{max}} = 593$ нм. Для калібрувального графіка, замість досліджуваних зразків прополісу додавати 0,1 мл FeSO_4 з концентраціями 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 мМ.

Метод ґрунтується на реакції окисно-відновного характеру, де Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+} за участі антиоксидантів. Утворений Fe^{2+} зв'язується у комплекс з ТРТЗ, утворюючи інтенсивно забарвлений комплекс із максимумом поглинання за 593 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації відновленого Fe^{2+} , що дозволяє оцінити відновлювану здатність зразка [35].

2.5. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням молібдату амонію

Методика базується на реакції окисно-відновного характеру, у якій антиоксиданти відновлюють окиснені форми металів, що дозволяє оцінити їхню здатність до антиоксидантного захисту [36].

Дослідження проводиться шляхом приготування реактивів для дослідження (25 мл 0.1 М розчину $\text{KН}_2\text{PО}_4$ розчинений у воді; 25 мл 1 М розчину сульфатної кислоти; 25 мл 0.1 М гептамолібдату амонію розчинений у воді; 5 мл розчину тролоксу в етиловому спирті з концентрацією 1 мМ).

Для калібрувального графіка приготувати серію розчинів тролоксу об'ємом 1 мл з концентраціями 0.2, 0.24, 0.6, 0.8, 1.0 мМ.

У колбу внести 1 мл розчину тролоксу. Додати 2.8 мл $\text{KН}_2\text{PО}_4$, 6 мл сульфатної кислоти, 0.4 мл гептамолібдату амонію і 0.8 мл дистильованої води. Ретельно розчинити та перемішати. Готову суміш об'ємом 0,8 мл інкубувати при 90 °С протягом 120 хв, потім швидко охолодити до кімнатної температури і записати оглядовий спектр ($\lambda_{\text{max}} = 700$ нм). Попередні дії повторювати з досліджуваними екстрактами прополісу.

Для того, щоб записати опорне необхідно також приготувати холосту пробу, в яку замість зразка додати 1 мл етилового спирту і повторити попередні дії [37].

2.6. Метод визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням іонів Купруму

Методика ґрунтується на реакції окисно-відновного типу, в якій антиоксиданти відновлюють окислені форми металів, що дає змогу оцінити їх здатність до захисту від окислення [38].

Дослідження проводили шляхом використання реактивів купрум (II) хлориду та неокупраїну. Було приготовано 50 мл 0,01 М розчину $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ у воді, 50 мл 0,0075 М розчину неокупраїну в етиловому спирті та 50 мл 1 М

ацетатного буферу (ТЕАА) з рН 7. Крім того, було приготовлено 5 мл розчину тролоксу в етиловому спирті з концентрацією 1 мМ.

Для калібрувального графіка приготувати серію розчинів тролоксу об'ємом 1 мл з концентраціями 0.2, 0.24, 0.6, 0.8, 1.0 мМ.

Для проведення аналізу у пробірку вносили 1 мл розчину купрум (II) хлориду, 1 мл неокупраїну, 1 мл буферу, 0,5 мл спиртового розчину екстракта або тролокса та 0,6 мл дистильованої води. Суміш ретельно перемішували та інкубували при 50°C протягом 20 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури записували оглядовий спектр при $\lambda_{\max} = 450$ нм.

Для визначення опорного значення проводили аналогічну процедуру, але замість зразка додавали 0,5 мл етилового спирту, після чого повторювали всі попередні дії.

На основі отриманих даних будували калібрувальний графік та визначали відновлювальну здатність зразків у еквіваленті тролокса [39].

2.7. Техніка безпеки

При виконанні магістерської роботи необхідно суворо дотримуватися правил безпеки, щоб уникнути ризиків для здоров'я та забезпечити точність експериментальних результатів. Основні вимоги включають:

1. Робоче місце повинно бути чистим, впорядкованим і звільненим від сторонніх предметів, які можуть перешкоджати виконанню експериментів або порушувати правила безпеки.

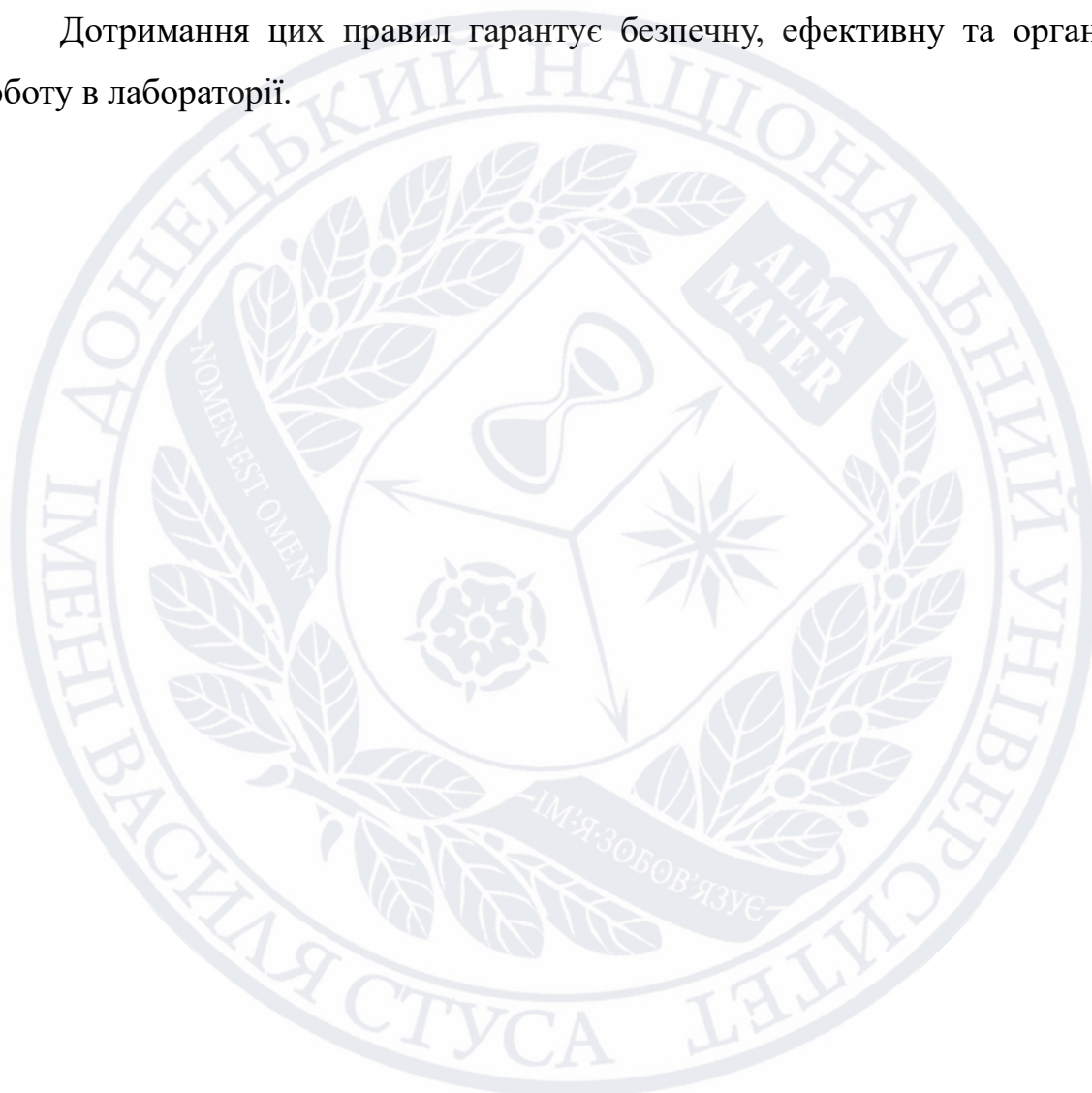
2. Виконання будь-яких експериментів має здійснюватися лише у відповідному захисному одязі, включаючи: лабораторний халат, захисні рукавички.

3. Лабораторний посуд перед початком роботи повинен бути чистим і сухим, щоб забезпечити точність експериментальних результатів та уникнути небажаних хімічних реакцій. Для якісного очищення можна використовувати «хромову суміш», суворо дотримуючись заходів безпеки при роботі з нею.

4. Під час проведення досліду необхідно уважно дотримуватись підписів на посуді та реактивах, щоб уникнути плутанини та випадкового використання неправильних речовин.

5. По закінченню експерименту необхідно: очистити робоче місце від залишків реактивів та обладнання; ретельно вимити лабораторний посуд, вимкнути всю використану техніку та прилади.

Дотримання цих правил гарантує безпечну, ефективну та організовану роботу в лабораторії.



РОЗДІЛ 3

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Визначення відновлювальної здатності йонів Феруму(III) фериціанідним методом

За методикою описаною у розділі 2.3 було визначено відновлювальну здатність зразків прополісу. Як стандарт використовували тролокс. Під дією антиоксиданту іони Fe^{3+} у кислому середовищі відновлюються до Fe^{2+} , який утворює з фериціанід калію берлінську лазур. Отримана сполука має характеристичну смугу поглинання у діапазоні 500 – 1100 нм з максимумом 750 нм. При додаванні різних концентрацій антиоксиданту тролоксу у систему відновлюється відповідна кількість іонів феруму і відповідно берлінської лазури, що наведено на рисунку 3.1.

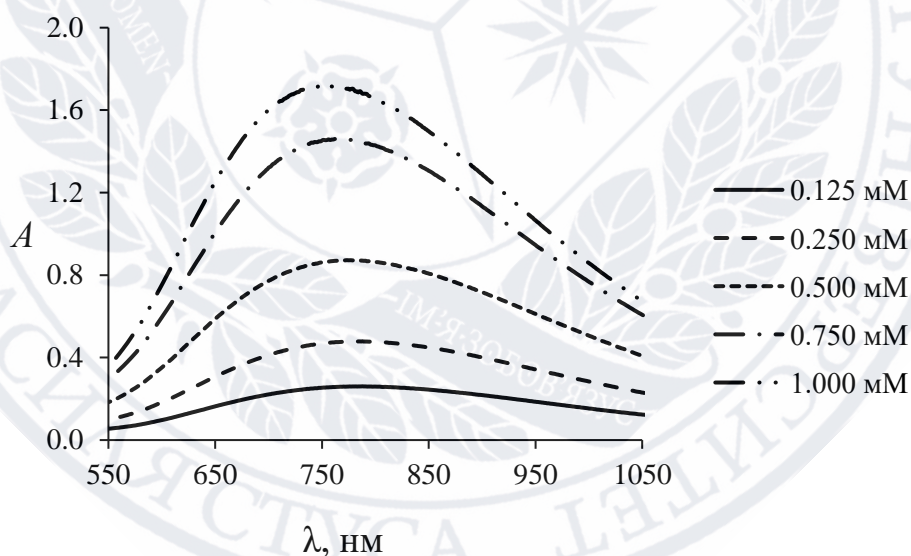


Рис. 3.1. Оглядові спектри берлінської лазури, яка утворилася при додаванні у систему різних концентрацій тролоксу у діапазоні концентрацій 0,125 – 1,000 мМ

Величини оптичної густини смуги поглинання розчину берлінської лазури зростають лінійно з підвищенням антиоксиданту у системі, що дає можливість побудувати калібрувальний графік, який наведено на рисунку 3.2.

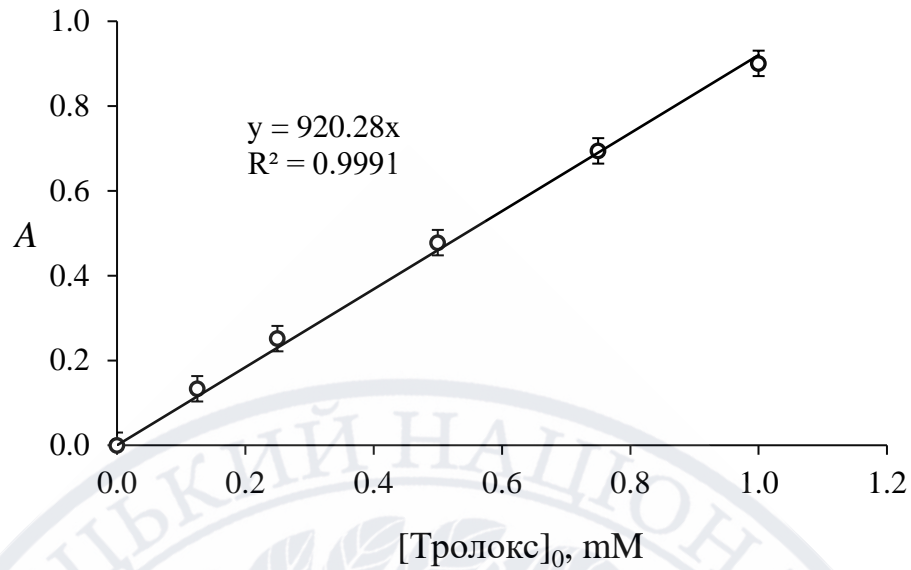


Рис. 3.2. Залежність оптичної густини берлінської лазурі від концентрації тролоксу

Аналогічним чином провели експеримент по визначенню відновлюваної здатності етанольних зразків прополісу та отримали відповідні спектри поглинання берлінської лазурі, що наведено на рисунку 3.3.

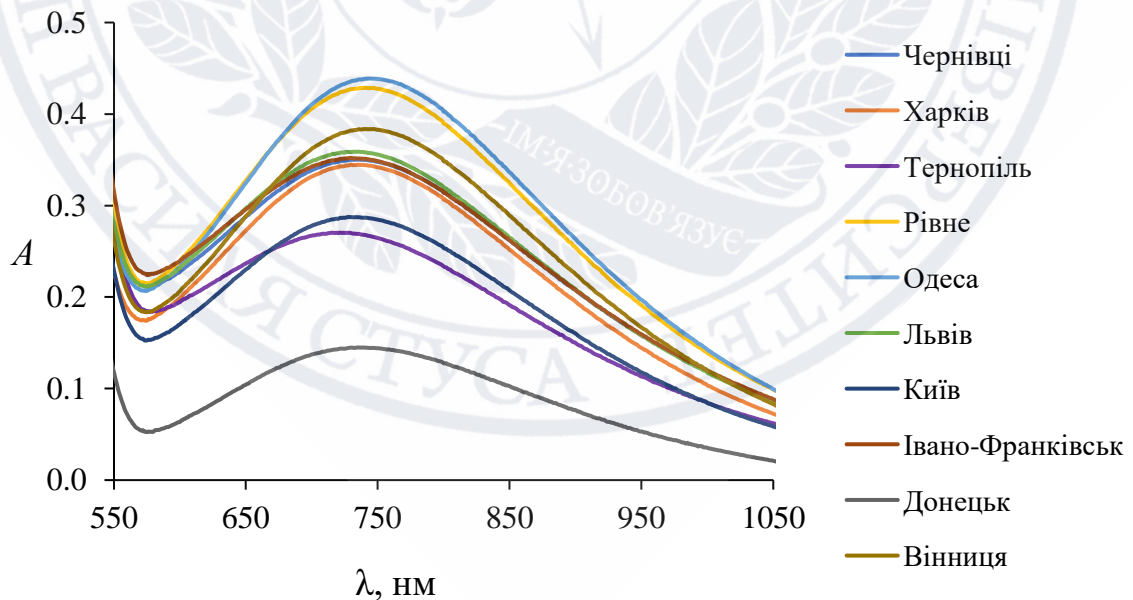


Рис. 3.3. Спектри поглинання берлінської лазурі, яка утворилася при додаванні у систему 0.5 мг/мл прополісів з різних областей України

Для приготування реакційної суміші використовуються вищі концентрації ферум (III) нітрату і феріціаніду калію ніж потенційно можуть відновити антиоксиданти досліджуваного зразка, що дає можливість коректно оцінити відновлювану здатність.

Відновлювана здатність зразків була перерахована в одиниці тролоксового еквіваленту на грам сухого прополісу і отримані результати наведено на рисунку 3.4.

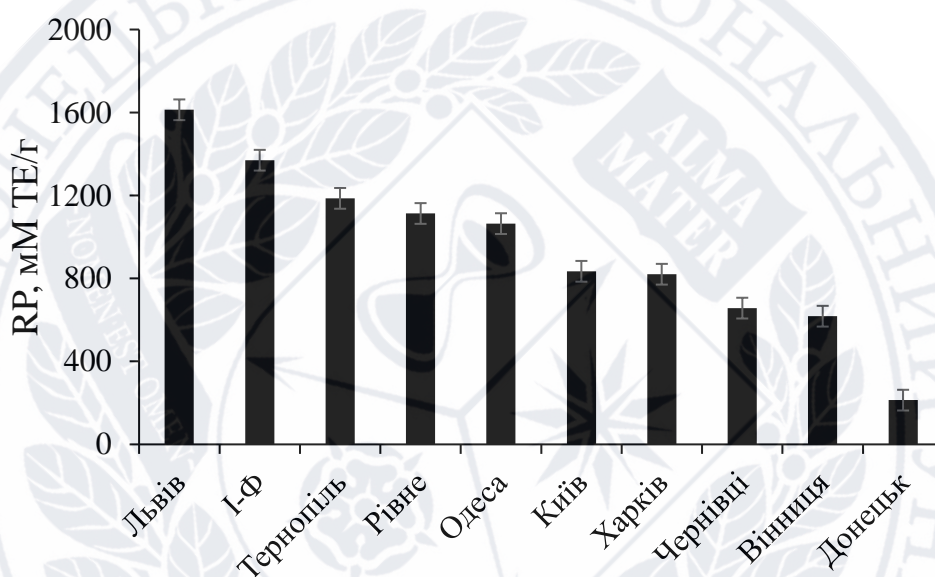


Рис. 3.4. Відновлювальна здатність етанольних екстрактів прополісів з різних регіонів України визначена феріціанідним методом

Найвищі показники відновлювальної здатності показали зразки з Львівщини, Івано-Франківщини та Тернопільщини, у той час як найнижче значення спостерігається у зразка з Донеччини, що свідчить про нижчу антиоксидантну здатність. Висока антиоксидантна активність зразків західних регіонів може бути пов'язана із специфічними природними умовами, які впливають на склад зразків прополісу.

3.2. Визначення відновлювальної здатності етанольних екстрактів прополісу за методикою FRAP

Визначення відновлювальної здатності зразків проводили за методикою описаною у пункті 2.4. Як стандарт використовувався розчин ферум (II) сульфату. Іони Fe^{2+} зв'язуються у забарвлений комплекс з TPTZ утворюючи забарвлений комплекс. У оглядовому спектрі комплексу наявна інтенсивна смуга поглинання у діапазоні 450 – 750 нм з максимумом 593 нм. Кількість хелатору у системі значно вища за концентрацію ферум (II) сульфату і при збільшенні концентрації іонів Fe^{2+} у системі, спостерігається збільшення інтенсивності смуги поглинання комплексу, що зображено на рисунку 3.5.

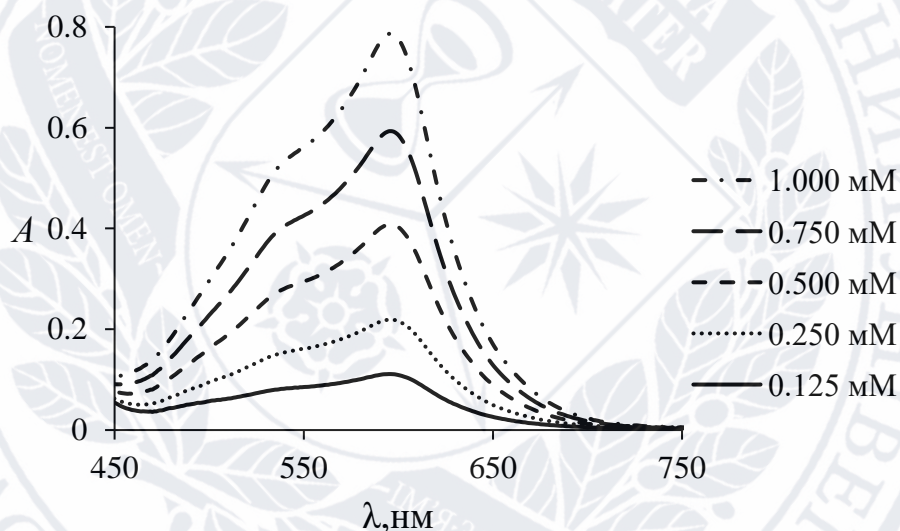


Рис. 3.5. Оглядові спектри комплексу TPTZ з Fe^{2+} в діапазоні концентрацій 0,125 – 1,0 мМ

Побудувавши залежність величини оптичної густини від концентрації іонів Fe^{2+} у системі, отримали калібрувальний графік, який наведено на рисунку 3.6.

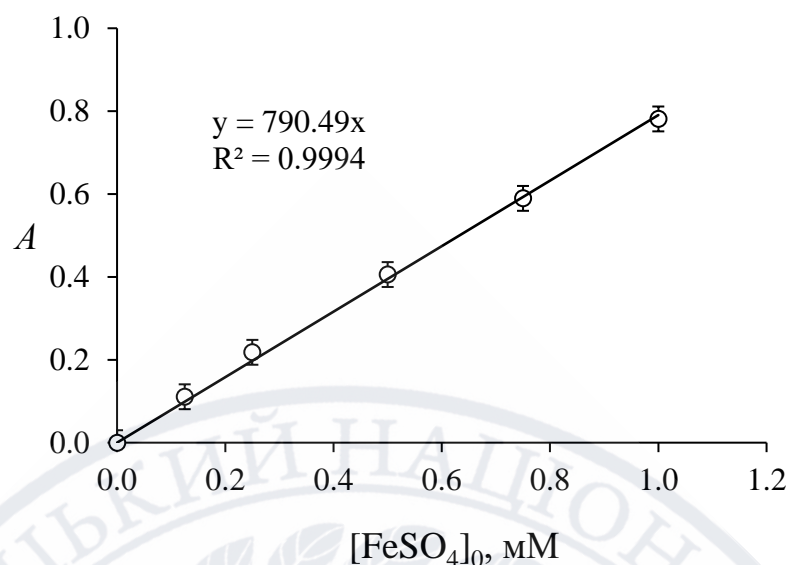


Рис. 3.6. Калібрувальний графік комплексу TPTZ з Fe²⁺ в діапазоні концентрацій 0,125 – 1,0 мМ

Аналогічним чином провели дослідження відновлюваної здатності етанольних екстрактів прополісу. Аліквоту екстракту з концентрацією 0,5 мг/мл змішали з приготованим згідно пункту 2.4 реагентом та інкубували 10 хв за 37 °С. Поліфеноли у зразку відновлюють іони Fe³⁺ до Fe²⁺, який у свою чергу зв'язується у забарвлений комплекс. Спектри поглинання комплексу отриманого після додавання однакових кількостей різних етанольних екстрактів, наведено на рисунку 3.7. Видно, що інтенсивність смуг поглинання для різних зразків достатньо сильно розрізняється, що вказує на різний склад екстрактів зібраних у різних регіонах України.

Для порівняння відновлюваної здатності зразків сухого прополісу, перерахували отримані значення на 1 грам. Отриманні результати наведено на рисунку 3.8.

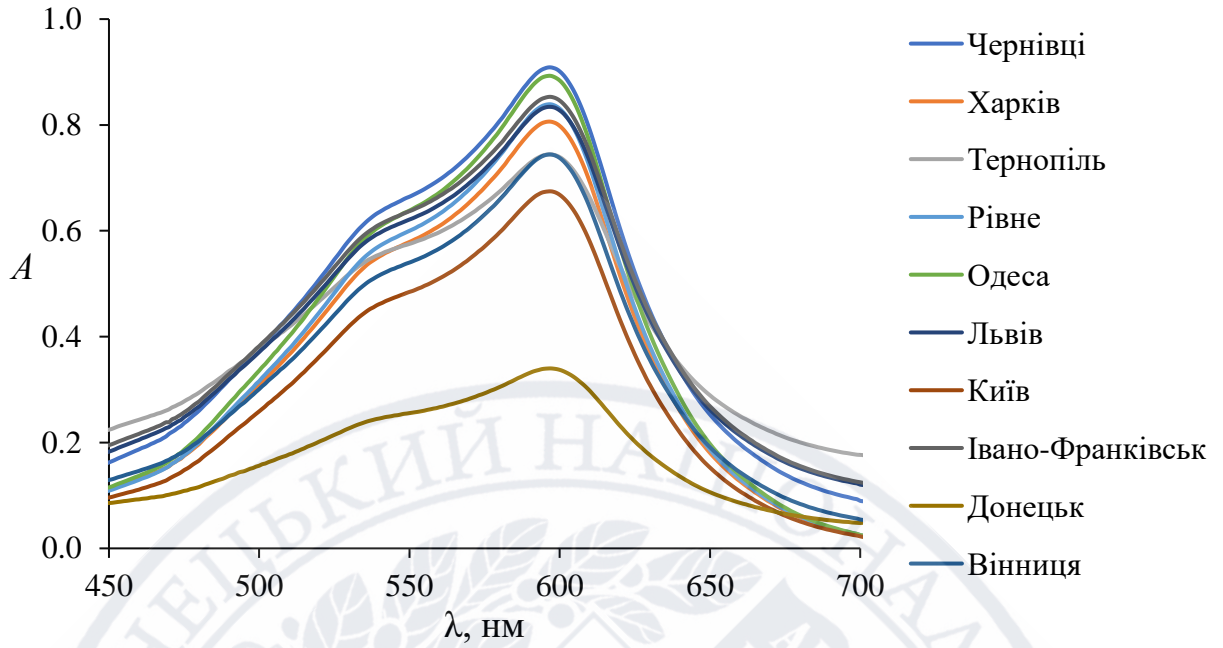


Рис. 3.7. Відновлювальна здатність досліджуваних зразків з різних областей України

Найвищу відновлювану здатність показали зразки з Львівщини, Івано-Франківщини та Чернівеччини, у той час як найнижчу – з Вінниччини і Донеччини.

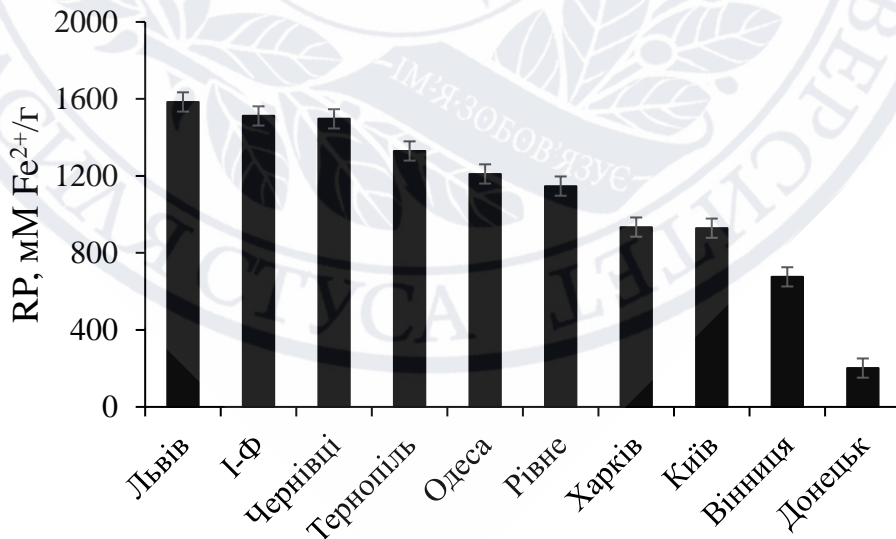


Рис. 3.8. Відновлювальна здатність етанольних екстрактів прополісів з різних регіонів України визначена методом FRAP

3.3. Визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням молібдату амонію

Для визначення відновлювальної здатності фосфомолібденовим методом використовували методику описану у розділі 2.5. Як стандарт у цьому випадку використовувався антиоксидант тролокс. Він відновлював Mo(VI) до Mo(V) у кислому середовищі, який при наявності надлишку фосфат іонів утворював комплекс, забарвлений у зелений колір. У спектрі поглинання комплексу спостерігається інтенсивна смуга поглинання у діапазоні 500 – 800 нм з максимумом 700 нм, що наведено на рисунку 3.9. При збільшенні концентрації тролоксу у системі інтенсивність смуги поглинання відповідно зростає.

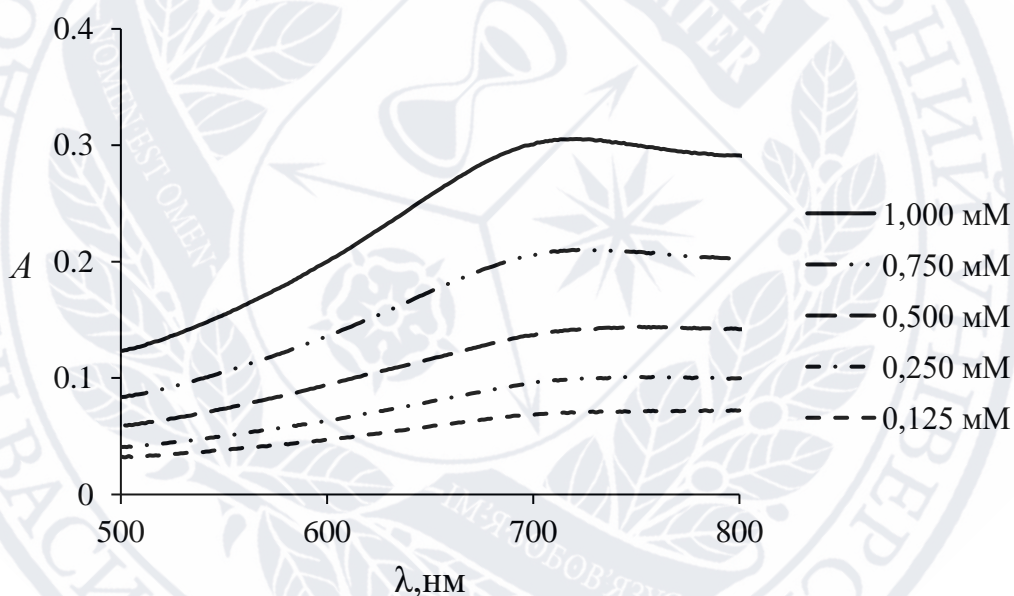


Рис. 3.9. Оглядові спектри комплексу при додаванні тролоксу в діапазоні концентрацій 0,125 – 1,0 мМ

Побудувавши графік залежності оптичної густини комплексу від концентрації тролоксу у системі, побачили, що він описується рівнянням прямої з коефіцієнтом детермінації 0,9972, що наведено на рисунку 3.10.

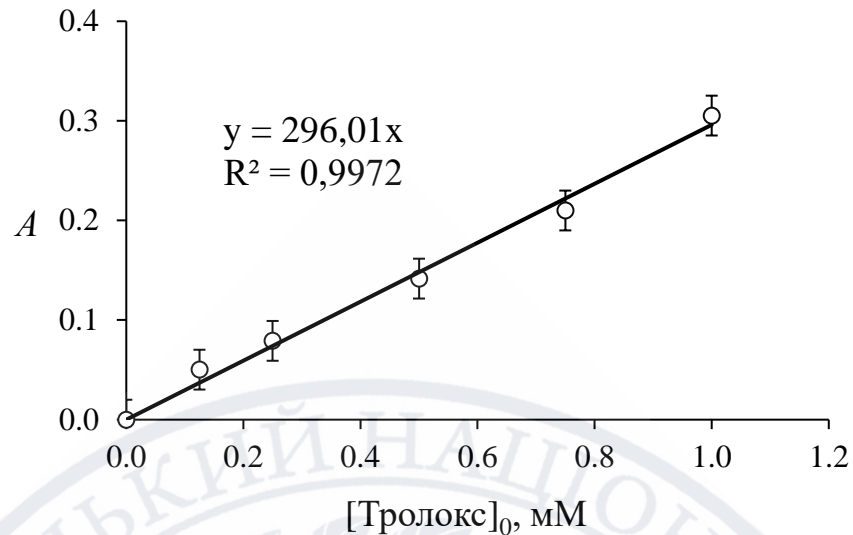


Рис. 3.10. Калібрувальний графік комплексу при додаванні тролоксу в діапазоні концентрацій 0,125 – 1,0 мМ

Для визначення відновлюваної здатності етанольних зразків прополісів, відбирали аліквоти, які мали концентрацію 1 мг/мл і проводили досліди, як описано у пункті 2.5. Отримані спектри поглинання мають аналогічну смугу поглинання у видимій частині спектру з максимумом 700 нм, що наведено на рисунку 3.11.

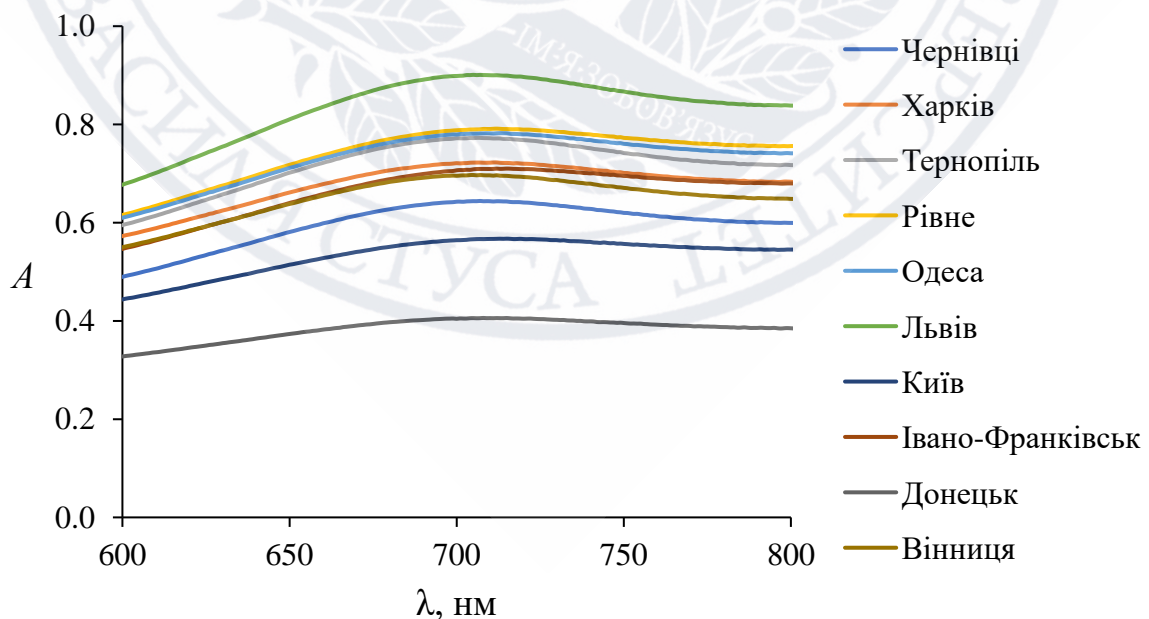


Рис. 3.11. Відновлювальна здатність досліджуваних зразків з різних областей України

Для всіх досліджуваних екстрактів оптична густина розчинів має різне значення, що обумовлено різним якісним складом зразків (рис. 3.11), тому для порівняння відновлюваної здатності перерахували отримані результати у тролоксових еквівалентах на 1 грам сухого прополісу, що наведено на рисунку 3.12.

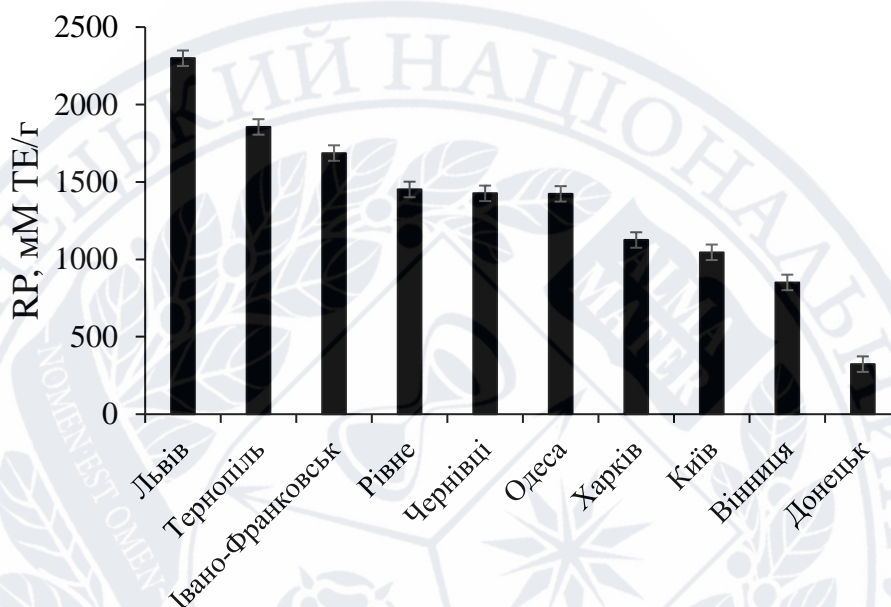


Рис. 3.12. Відновлювальна здатність етанольних екстрактів прополісів з різних регіонів України визначена фосфомолібденовим методом

Як видно на рисунку 3.12, найвищу відновлювану здатність проявляє зразок з Львівщини, а найнижчу – з Донеччини, що обумовлено відмінністю у кліматичних факторах та флори регіонів.

3.4. Визначення відновлювальної здатності флавоноїдів з використанням іонів Купруму

Визначення відновлюваної здатності методом CUPRAC проводили згідно методики, яка описана у розділі 2.7. Як стандарт використовували антиоксидант тролокс, який відновлював іони Cu^{2+} до Cu^{+} , які зв'язувалися у забарвлений комплекс з неокупраїном. У видимій частині спектру комплексу спостерігається інтенсивна смуга поглинання у діапазоні 350 – 600 нм з максимумом 450 нм, що

наведено на рисунку 3.13. При збільшенні концентрації тролоксу в реакційній суміші він відновлює пропорційно більше іонів Cu^{2+} до Cu^+ і, відповідно, утворюється більша кількість комплексу.

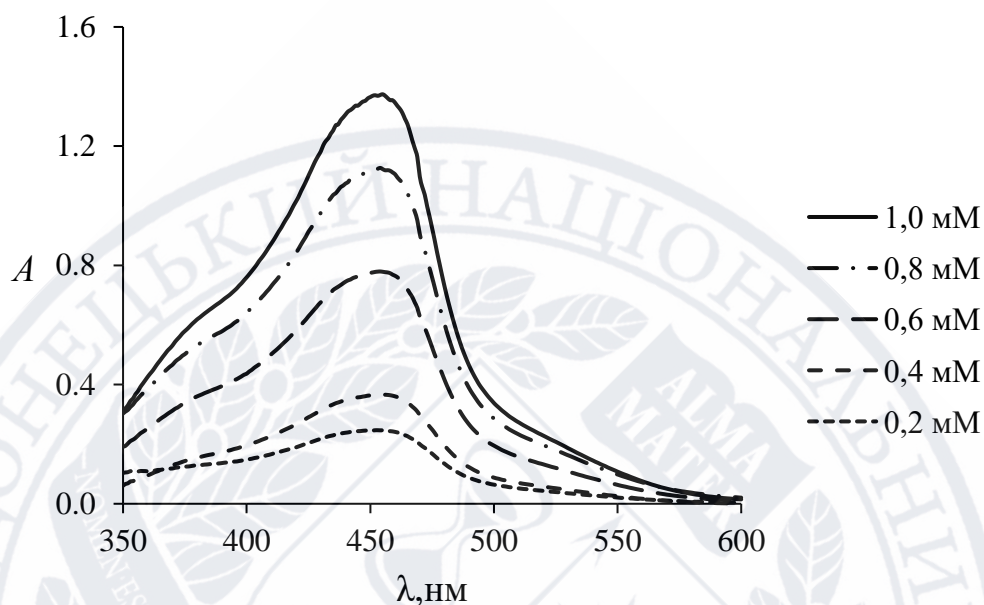


Рис. 3.13. Оглядові спектри комплексу $\text{Cu}(\text{I})$ з неocupраїном при додаванні тролоксу в діапазоні концентрацій 0,2 – 1,0 мМ

З отриманих даних було побудовано калібрувальний графік залежності оптичної густини комплексу Cu^+ з неocupраїном від початкової концентрації тролоксу у реакційній суміші, що наведено на рисунку 3.14.

Аналогічним чином провели дослідження відновлювальної здатності етанольних зразків прополісу. Для цього аліквоти зразків з однаковою концентрацією додавали у реакційну суміш і записували спектри поглинання комплексу, який утворився у ході процесу. Як видно з рисунку 3.15, зразки прополісу з різних областей України мають у своєму складі різну кількість сполук, які здатні відновлювати іони Cu^{2+} , що обумовлює різницю інтенсивностей смуг поглинання комплексу.

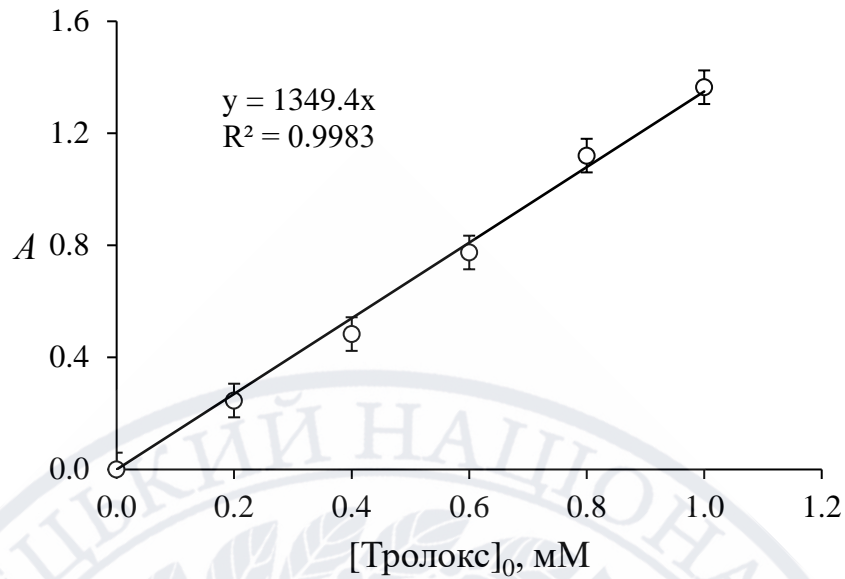


Рис. 3.14. Калібрувальний графік комплексу Cu(I) з неocupраїном при додаванні тролоксу в діапазоні концентрацій 0,2 – 1,0 мМ

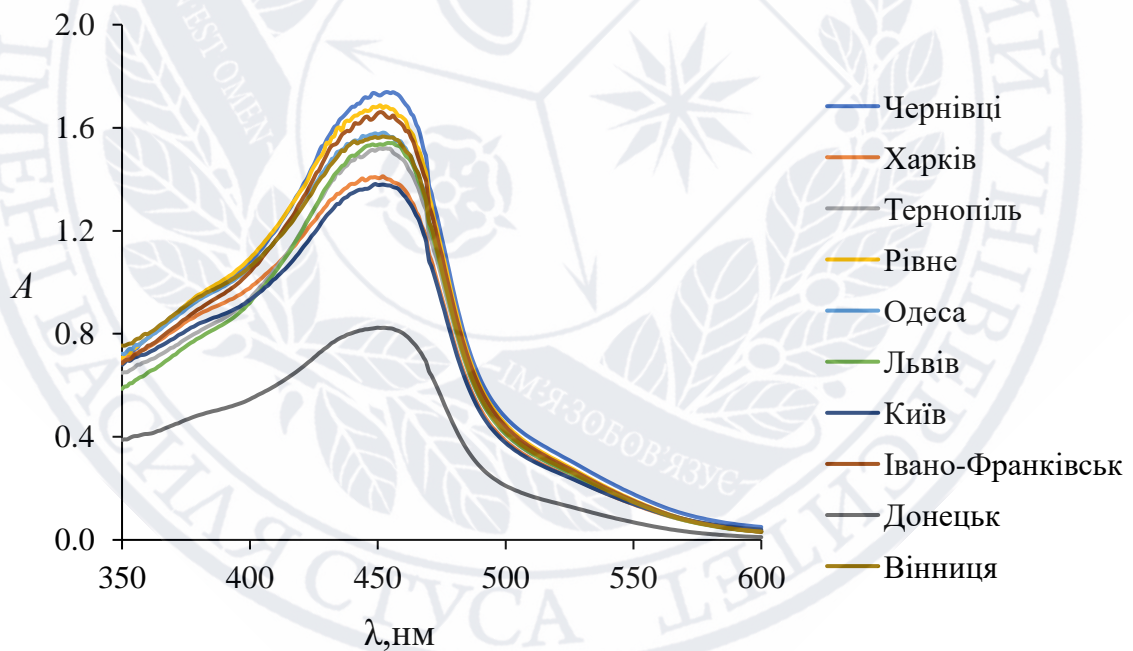


Рис. 3.15. Відновлювальна здатність досліджуваних зразків з різних областей України

Для коректного порівняння відновлювальної здатності між собою зразків сухого прополісу, перерахували отримані значення у мМ тролоксових еквівалентів на 1 грам прополісу, що наведено на рисунку 3.16.

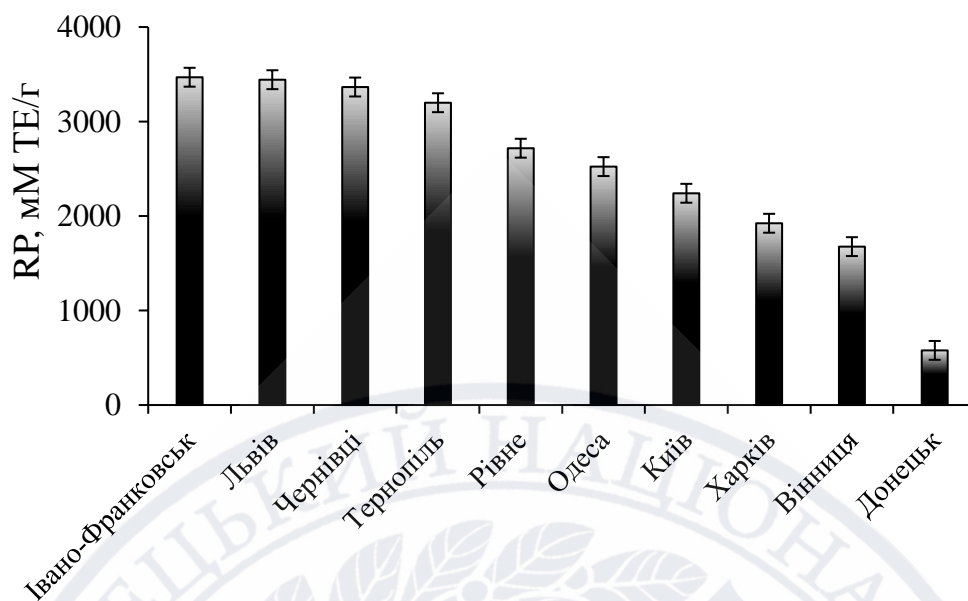


Рис. 3.16. Відновлювальна здатність етанольних екстрактів прополісів з різних регіонів України визначена методом CUPRAC

З отриманих результатів видно, що найвищі значення відновлювальної здатності мають зразки з Івано-Франківщини, Львівщини та Чернівецьщини у той час, як найнижчі – з Вінниччини і Донеччини.

Хоча абсолютні значення відновлюваної здатності досліджуваних етанольних екстрактів прополісів значно відрізняються при використанні різних методів дослідження, тренд залишається однаковим, що видно з таблиці 3.1. Найвищі показники притаманні зразкам із західних регіонів, у той час як найнижчі – зібраних у центральних і східних. Це обумовлено значними кліматичними відмінностями, різним рівнем опадів та вологості повітря. Вища вологість у західних регіонах приводить до збільшення поліфенолів у смолистій речовині, яка захищає бруньки гілок від плісняви. Бджоли також використовують її як антигрибковий та антимікробний засіб у своїх вуликах. Натомість центральним і східним регіонам України притаманний більш сухий клімат, що зменшує необхідність продукувати як високу концентрацію поліфенолів у смолистій речовині, так і таку велику її кількість. Тому у зразках із степового регіону України у складі прополісу менша кількість поліфенолів і вища – воску, що також впливає на властивості.

Таблиця 3.1 – Відновлювальна здатність (RP) етанольних екстрактів прополісів з різних регіонів України

Регіон	CUPRAC	Фосфомоліб деновий метод	Феріціанідн ий метод	FRAP
	RP, мМ TE/г			RP, мМ-екв Fe ²⁺ /г
Івано- Франківщина	3469	1687	1370	1512
Львівщина	3443	2299	1613	1584
Чернівеччина	3365	1426	657	1497
Тернопільщина	3199	1855	1186	1330
Рівненщина	2718	1452	1113	1147
Одещина	2523	1423	1064	1210
Київщина	2241	1046	834	929
Харківщина	1924	1125	820	934
Вінниччина	1676	851	618	676
Донеччина	578	323	213	202

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що географічне походження прополісу істотно впливає на його фізико-хімічні характеристики та рівень біологічної активності, зокрема на антиоксидантні властивості. Це підтверджує доцільність вивчення регіональних особливостей сировини для подальшого цільового використання.

2. У рамках дослідження проведено аналіз етанольних екстрактів прополісу, зібраного в різних регіонах України, з використанням чотирьох методів оцінки відновлювальної здатності: ферриціанідного методу, FRAP, фосфомолібденового методу та CUPRAC. Застосування комплексу методів забезпечило достовірну порівняльну оцінку антиоксидантної активності зразків.

3. Найвищі показники відновлювальної здатності спостерігаються у зразках прополісу з Івано-Франківської, Львівської та Чернівецької областей, що свідчить про високий вміст антиоксидантних сполук у сировині з цих регіонів. Найнижчий рівень антиоксидантної активності виявлено у зразку з Донецької області, що може бути пов'язано з відмінностями у флористичному складі місцевої рослинності або екологічними умовами.

4. Отримані результати відкривають нові можливості для стандартизації прополісу, зібраного в різних регіонах України, для подальшого використання в медичних і косметичних продуктах. Використання прополісу з регіонів з високим вмістом антиоксидантних компонентів дозволить підвищити ефективність лікувальних засобів на його основі та оптимізувати виробництво біологічно активних добавок та фармацевтичних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- 1 Abduh M. Y., Shafitri T. R., Elfahmi E. Chemical profiling, bioactive compounds, antioxidant, and anti-inflammatory activities of Indonesian propolis extract produced by *Tetragonula laeviceps* // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10, No. 19. – P. e38736. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38736>.
- 2 Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins // *Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 84, No. 3. – P. 329–339. – URL: [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00216-4).
- 3 Pratami D. K., Hartanti D., Irnawati, Herawati I. E. A systematic review of metabolomics studies on metabolite profiling and phytogeographical discrimination of propolis // *Journal of Functional Foods*. – 2024. – Vol. 123. – P. 106602. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106602>.
- 4 Silici S., Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2005. – Vol. 99, No. 1. – P. 69–73. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>.
- 5 De Carli C. et al. Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.155>.
- 6 Hashemirad F.-S., Behfar M., Kavooosi G. Proximate composition, physico-chemical, techno-functional, amino acid profile, fatty acid profile, nutritional quality, antioxidant, anti-amylase and anti-lipase properties of bee bread, royal jelly, and bee propolis // *LWT*. – 2024. – P. 116190. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116190>.
- 7 Aliakbarian M. et al. Effects of propolis consumption on liver enzymes and obesity indices in adults: a systematic review and dose-response meta-analysis // *Current Developments in Nutrition*. – 2024. – P. 104438. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2024.104438>.

8 Bankova V. S., de Castro S. L., Marcucci M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin // *Apidologie*. – 2000. – Vol. 31, No. 1. – P. 3–15. – URL: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>.

9 Popova M. et al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition // *Phytomedicine*. – 2005. – Vol. 12, No. 3. – P. 221–228. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007>.

10 Almeida E. C. d., Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review // *Journal of Venomous Animals and Toxins*. – 2002. – Vol. 8, No. 2. – P. 191–212. – URL: <https://doi.org/10.1590/s0104-79302002000200002>.

11 Gargouri W. et al. Microencapsulated propolis powder: a promising ingredient of chewing gum // *Powder Technology*. – 2024. – Vol. 440. – P. 119777. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2024.119777>.

12 Sforcin J. M. Propolis and the immune system: a review // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2007. – Vol. 113, No. 1. – P. 1–14. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>.

13 Ibrahim M. E. E.-D., Alqurashi R. M. Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts // *International Journal of Food Microbiology*. – 2022. – Vol. 361. – P. 109463. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109463>.

14 Kujumgiev A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1999. – Vol. 64, No. 3. – P. 235–240. – URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00131-7).

15 Mohan S. et al. Photoprotective properties of four structure propolis from *Heterotrigona itama* stingless beehive: fractionation, bioactivity analysis, and chemical profiling // *Heliyon*. – 2024. – P. e39164. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39164>.

16 Kale Y. et al. Bioinductive and anti-inflammatory properties of Propolis and Biodentine on SHED // *The Saudi Dental Journal*. – 2022. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2022.08.009>.

17 Bankova V. S., de Castro S. L., Marcucci M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin // *Apidologie*. – 2000. – Vol. 31, No. 1. – P. 3–15. – URL: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>.

18 Przybyłek I., Karpiński T. M. Antibacterial properties of propolis // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No. 11. – P. 2047. – URL: <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>.

19 Ghisalberti E. L. Propolis: a review // *Bee World*. – 1979. – Vol. 60, No. 2. – P. 59–84. – URL: <https://doi.org/10.1080/0005772x.1979.11097738>.

20 Prior R. L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, No. 10. – P. 4290–4302. – URL: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.

21 Pisoschi A. M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 97. – P. 55–74. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

22 Yushkova Y. V. et al. Synthesis, structure, antioxidant activity, and water solubility of trolox ion conjugates // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2018. – Vol. 26, No. 1. – P. 84–92. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.008>.

23 Huang D., Ou B., Prior R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, No. 6. – P. 1841–1856.

24 Hajimahmoodi M. et al. Determination of total antioxidant capacity of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay // *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. – 2008. – Vol. 5, No. 3. – P. 167–172.

25 Gogoi N. G. et al. Enhanced biological activity of Curcumin Cinnamates: an experimental and computational analysis // *Medicinal Chemistry Research*. – 2022. – Vol. 31, No. 12. – P. 2195–2208.

26 Benzie I. F., Strain J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for

simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration // *Methods in Enzymology*. – 1999. – Vol. 299. – P. 15–27.

27 Huang D., Ou B., Prior R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, No. 6. – P. 1841–1856.

28 Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E. N., Altun M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method // *Free Radical Research*. – 2005. – Vol. 39, No. 9. – P. 949–961.

29 Berker K. I., Güçlü K., Tor İ., Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents // *Talanta*. – 2007. – Vol. 72, No. 3. – P. 1157–1165. – DOI: 10.1016/j.talanta.2007.01.019.

30 Fiske C. H., Subbarow I. P. The colorimetric determination of phosphorus // *Journal of Biological Chemistry*. – 1925. – Vol. 66. – P. 375–379.

31 Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. Microdetermination of Phosphorus // *Analytical Chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – P. 1756–1763.

32 Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 269, No. 2. – P. 337–341.

33 Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay // *Microchimica Acta*. – 2008. – Vol. 160. – P. 413–419.

34 Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents / K. I. Berker et al. *Talanta*. 2007. Vol. 72, no. 3. P. 1157–1165. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>.

35 Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48, No. 8. – P. 3396–3402. – URL: <https://doi.org/10.1021/jf9913458>.

36 Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 269, No. 2. – P. 337–341. – URL: <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.

37 Ivanišová E., Kačániová M., Terentjeva M., Tokár M., Kluz M. Polyphenol content, mineral compounds composition, antimicrobial and antioxidant activities of selected medicinal herbs from Slovak Republic // *Applied Sciences*. – 2023. – Vol. 13, No. 3. – P. 1918. – URL: <https://doi.org/10.3390/app13031918>.

38 Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay // *Microchimica Acta*. – 2007. – Vol. 160, No. 4. – P. 413–419. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>.

39 Özyürek M., Güçlü K., Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 30, No. 4. – P. 652–664. – DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.016.