

# ODREĐIVANJE POLIFENOLA I FLAVONOLA U PROPOLISU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM

---

**Ernješ, Mirela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Polytechnic in  
Pozega / Veleučilište u Požegi**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/urn:nbn:hr:112:535876>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



**VELEUČILIŠTE U POŽEGI**  
STUDIA SUPERIORA POSEGANA

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Polytechnic in Pozega - Polytechnic in  
Pozega Graduate Thesis Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

# VELEUČILIŠTE U POŽEGI



Mirela Ernješ, 1343/14

## ODREĐIVANJE POLIFENOLA I FLAVONOLA U PROPOLISU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM

*ZAVRŠNI RAD*

Požega, 2017. godine

VELEUČILIŠTE U POŽEGI

POLJOPRIVREDNI ODJEL

PREDDIPLOMSKI STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

**ODREĐIVANJE POLIFENOLA I FLAVONOLA U  
PROPOLISU UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM**

***ZAVRŠNI RAD***

IZ KOLEGIJA KEMIJA

MENTOR: doc. dr. sc. Krunoslav Miroslavljević

STUDENT: Mirela Ernješ

Matični broj studenta: 1343/14

Požega, 2017. godine

## **Sažetak:**

Tema ovog završnog rada je propolis, smolasta smjesa koju pčele prikupljaju sa pupoljaka stabala, biljnih sokova ili drugih biljnih izvora, njegove pozitivne karakteristike i sastav. Naglasak je stavljen na polifenole i flavonole, kao i ukazivanje na povezanost suhog ostatka propolisa s ukupnom koncentracijom polifenola i flavonola u alkoholnim tinkturama propolisa. U radu su ispitivane ekstrakcije i tinkture propolisa te njihovi različiti udjeli suhe tvari. Također su ispitivane različite koncentracije ukupnih polifenola i flavonola u različitim ekstrakcijama i tinkturama propolisa, UV-VIS spektrofotometrijom. U uzorcima propolisa prvo se izradila ekstrakcija propolisa, prelijevanjem grumena propolisa 70 % alkoholom. Nakon samog postupka ekstrahiranja u trajanju od minimalno tri tjedna, uslijedio je postupak filtracije te je dobivena alkoholna tinktura propolisa kojoj je određena suha tvar u postotcima, sušenjem u sušioniku na temperaturi od 110 °C u trajanju od 3 sata. Nakon određivanja suhe tvari u postotku uslijedilo je određivanje ukupne koncentracije polifenola i ukupne koncentracije flavonola. Određivanje ukupnih koncentracija polifenola i flavonola provedeno je UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s sljedećim reagensima: Folin-Ciocalteu reagens (polifenoli) i aluminijev klorid  $AlCl_3$  (flavonoli).

Ključne riječi: tinktura, propolis, polifenoli, flavonoli, UV-VIS spektrofotometrija

## **Abstract:**

The subject of this final paper is propolis, a resinous mixture that are collected by bees from buds of trees, vegetable juices or other plant sources, its positive characteristics and composition. The emphasis was placed on polyphenols and flavonols, as well as the indication of the association of dry residue of propolis with the total concentration of polyphenols and flavonols in alcoholic tinctures of propolis. In this paper the extracts and tinctures of propolis and their different amounts of dry matter are examined. Various concentrations of total polyphenols and flavonols were also investigated in various extractions and tinctures of propolis, determined by UV-VIS spectrophotometry. Propolis samples were first made by propolis extraction, by propagating bulbous propolis with 70 % alcohol. After the extraction procedure lasting for at least three weeks, a filtration process followed by alcoholic tincture of propolis to which the dry substance was determined in percent by drying at a temperature of 110 °C for 3 hours. After determination of the dry matter in percentage, the determination of

the total concentration of polyphenols and the total concentration of flavonols is determined. Determination of the total concentrations of polyphenols and flavonols is conducted by UV-VIS spectrophotometric method with following reagents: Folin-Ciocalteu reagent (polyphenols), and AlCl<sub>3</sub> aluminum chloride (flavonols).

Keywords: tincture, propolis, polyphenols, flavonols, UV-VIS spectrophotometry

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PROPOLIS – sastav, primjena i djelovanje</b> .....	2
2.1. Općenito o propolisu .....	2
2.2. Propolis kroz povijest .....	3
2.3. Prikupljanje propolisa.....	3
2.4. Čišćenje, mljevenje i čuvanje propolisa .....	4
2.5. Kemijske karakteristike propolisa .....	4
2.6. Fizikalne karakteristike propolisa.....	6
2.7. Biološke karakteristike propolisa .....	6
2.7.1 Antibakterijska svojstva .....	7
2.7.2. Antigljivična svojstva .....	7
2.7.3. Antiupalna svojstva .....	7
2.7.4. Antitumorska svojstva .....	8
2.8. Polifenoli .....	8
2.8.1. Flavonoli.....	10
2.9. Izrada tinktura propolisa i doziranje propolisa .....	12
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	13
3.1. Osnova istraživanja rada.....	13
3.2. UV-VIS spektrofotometrija .....	14
3.3. Podrijetlo uzoraka propolisa.....	15
3.4. Određivanje ukupne suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa.....	16
3.5. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom .....	16
3.6. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijskim kloridom $AlCl_3$ reagensom .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21

4.1. Mjerenje pH vrijednosti i električne vodljivosti purificirane vode pri izradi alkoholne tinkture propolisa.....	21
4.2. Određivanje ukupne suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa.....	21
4.3. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom .....	22
4.4. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijskim kloridom $AlCl_3$ reagensom .....	24
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>27</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>28</b>

## **POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA**

### **PRILOG 1.**

### **IZJAVA O AUTORSTVU RADA**

## 1. UVOD

Predmet analize ovog završnog rada je ukazivanje na važnost i dobre karakteristike propolisa, s naglaskom na polifenole i flavonole koji su sadržani u propolisu, kao i ukazivanje na povezanost suhog ostatka s ukupnom koncentracijom polifenola i flavonola u alkoholnim tinkturama propolisa. Danas se sve više spominje njihovo djelovanje jer je znanstveno dokazano da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju hormone i imaju dobru sposobnost hvatanja slobodnih radikala te pomažu u liječenju raznih bolesti. Kroz ovaj rad identificirat će se pozitivne karakteristike propolisa, njegova primjena, kemijski sastav, fizikalne i biološke karakteristike, a sve s naglaskom na polifenole i flavonole, organske spojeve karakteristične građe koji se prirodno nalaze u propolisu. Zbog jakog antioksidativnog djelovanja koje posjeduju, polifenoli i flavonoli uvelike utječu na kvalitetu i pozitivno djelovanje propolisa na ljudsko zdravlje. Po svome podrijetlu propolis je smolasta izlučevina tkiva pupoljaka i kore drveća kojom se pčele u košnicama brane od štetnih mikroorganizama. Pčele ga skupljaju i miješaju sa sekretom čeljusnih žlijezda, enzimski ga modificiraju tako da najvažnije sastavnice, poput polifenola i flavonola, postaju farmakološki djelatne tvari.

Zadatak praktičnog dijela istraživanja je analizirati alkoholne tinkture propolisa, te mjeriti njihove suhe ostatke i koncentracije ukupnih polifenola i flavonola u navedenom vremenskom periodu, kroz analize i rezultate prezentirati razlike u količini suhe tvari te koncentracijama polifenola i flavonola ovisno o uzorku i njegovim karakteristikama.

Cilj ovog rada je detaljnije upoznati propolis kroz njegov kemijski, biološki i fizikalni sastav, te skrenuti pozornost na aktivne tvari u propolisu, a to su polifenoli i flavonoli koji značajno doprinose njegovoj kvaliteti i u konačnici pozitivno djeluju na zdravlje konzumenata propolisa. Tijekom analiziranja koncentracija ukupnih polifenola i flavonola UV-VIS spektrofotometrijom cilj je dokazati točnost analize i vjerodostojnost konačnih rezultata koji će se u konačnici moći koristiti za postavljanje standarda alkoholnih tinktura propolisa.



## 2. PROPOLIS – sastav, primjena i djelovanje

### 2.1. Općenito o propolisu

Propolis je prirodna, smolasta, aromatična tvar koju skupljaju pčele medarice sa raznih pupoljaka biljaka (topole, vrbe, bora, kestena, breza i dr.). Propolis se često naziva prirodnim antibiotikom, a zahvaljujući novim znanstvenim spoznajama smatra ga se „lijekom 21. stoljeća“.

Propolis je čvrste konzistencije i lomljiv na temperaturi ispod 15 °C, a na temperaturi 30 °C je ljepljiv, dolazi kao tvar u grumenu (slika 1.). Boja, kemijski sastav i okus ovisi o podrijetlu smola koje pčele sakupljaju i prerađuju te odlažu na određena mjesta u košnici. Boja propolisa može varirati od žutozelene (bor), crvenkaste (topola) i crne boje (breza) (Zdravlje iz košnica, 2013.). Do danas je poznato 67 vrsta biljaka s kojih pčele sakupljaju propolisni materijal.

Pčelama propolis služi kao materijal za premazivanje i oblaganje košnica, zatvaranje pukotina zbog zaštite od raznih uljeza, te mumificiranje raznih insekata (Praktikum iz pčelarstva, 2015). Samim time se postiže velika sterilnost i čistoća košnice i čuva ih od bakterijskih infekcija. Prikupljanje propolisa se obavlja krajem ljeta i u jesen, a prinosi propolisa iznose po tipičnoj pčelinjoj zajednici 100-150 g godišnje.

Propolis je najzanimljiviji pčelinji proizvod. Razne znanstvene studije pokazale su njegovo pozitivno djelovanje protiv bakterija, virusa, gljivica, upala te da ima antioksidacijski, anestetički, antiparazitski, antitumorski učinak, jača oslabljeni imunološki sustav i potiče obnovu tkiva (Zdravlje iz košnica, 2013.).



Slika 1. Propolis (Izvor: <http://telegrafi.com/wp-content/uploads/2017/03/propolisbeeglue.jpg>), (2017-09-05)

## 2.2. Propolis kroz povijest

Riječ propolis grčkog je podrijetla: „pro“ – ispred, „polis“ – grad. Prijevod riječi propolis znači „ispred grada“ savršeno opisuje samu ulogu propolisa u košnicama, a to je cementiranje otvora košnica, i ima zaštitnu ulogu pčelinjske kolonije. Propolis je otprije poznat u Egiptu gdje je korišten kao ljepilo, a spomenut je od strane grčkog filozofa Aristotela, koji je pisao o smolastoj tvari koju su pčele razmazivale na ulazu u svoje košnice, a upotrebljavao se kao lijek za modrice i čireve (Crane, 1999.). Grci su koristili propolis kao glavni sastojak u izradi parfema, dok su ga drevni Židovi smatraju prirodnim lijekom. Rimski znanstvenik Plinius (23-79 g. pr. Kr.) bio je uvjeren da propolis potječe iz raznih pupova različitih stabala poput vrba, topola, brijesta, trske i drugih biljaka (Fearney, J. 2001.). Hipokrat, otac medicine (460-377. g. pr. Kr.), prvi je upotrijebio propolis za liječenje čireva te se to do danas smatra prvom upotrebom propolisa kao lijeka koja je zabilježena (Najafi, 2007.).

## 2.3. Prikupljanje propolisa

Poznato je da propolis prikupljaju same pčele, odnosno tipična pčelinja zajednica koja godišnje prikupi 100-150 g propolisa (Erski-Biljić i Dobrić, 2003, Praktikum iz pčelarstva, 2015). Propolis je rezultat početnog vrenja cvjetnog praha prikupljenog od pčela. Pčele prikupljaju propolis na način da zahvaćaju čeljustima smolaste tvari (koje izlučuju razne biljke) i izvlače ih u obliku niti koje se kidaju. Pčele svojim nožicama skidaju grudice smolaste tvari sa čeljusti i na taj način ih stavljaju u košnice. Pri samom prikupljanju propolisa, pčele u svojim pljuvačnim žlijezdama miješaju smolaste tvari i na taj način obogaćuju kemijski sastav propolisa te ga čine jedinstvenim proizvodom. Sakupljanje propolisa je dugotrajan proces uz prekide zbog vraćanja pčela u košnice da nadopune medni rilac hranom. Pčele u svojim košnicama miješaju smolastu tvar s voskom, peludi i pljuvačkom, te na taj način prikupljaju dvije vrste propolisa:

- **tekući visokokvalitetni propolis** (70 % smole raznih pupoljaka drveća i pljuvačnih pčelinjih žlijezda);

- **ljepljivi propolis** koji je nešto slabije kvalitete (sastavljen je od nektara i voska). To je smolasta tvar (koju izlučuju različite vrste biljaka) aromatične komponente poput terpena koji direktno djeluju na hemo receptore pčelinjih brčića, i na taj način stvaraju podražaj kod pčela i omogućuju pčelama lakši pronalazak istog. Propolis se prikuplja krajem ljeta i u jesen.

Najčišći propolis je onaj jesenski, jer se pčele tada pripremaju za zimu i unose ga u obliku grudica na zadnjim nožicama te njime oblažu zidove košnica. U današnjoj praksi, radi povećanja prinosa propolisa, koriste se razne drvene ili plastične rešetke, koje se mogu ohladiti, a njihovim savijanjem propolis puca te se na lakši i brži način propolis odvaja od rešetki. Na ovaj način godišnji prinos propolisa se povećava i može iznositi od 250 g do 400 g propolisa po košnici (Lečenje pčelinjim proizvodima, Beograd, 2004.).

## **2.4. Čišćenje, mljevenje i čuvanje propolisa**

Prije same upotrebe, propolis je potrebno očistiti, samljeti ili usitniti i prirediti za daljnju upotrebu. Prirodno je propolis u toploj košnici, pomiješan s voskom i raznim drugima mehaničkim primjesama te je jako ljepljiv. Na sobnoj temperaturi isti propolis postaje lomljiv. Čišćenje propolisa od mehaničkih primjesa obavlja se na način da se sam propolis položi u posudu s hladnom vodom, pri čemu vosak i druge mehaničke primjese (boje, kamenje i dr.) isplivaju na površinu, a sami čisti propolis ostaje na dnu posude. Nakon ovakvog načina čišćenja, propolis se čuva na maksimalnoj temperaturi od 25 °C u suhoj i čistoj kutiji. Pri izradi određenih tinktura, otopina i melema, propolis se obično sitno nariba ili čak samelje prije daljnje obrade (Lečenje pčelinjim proizvodima, Beograd, 2004.).

## **2.5. Kemijske karakteristike propolisa**

Kemijski sastav, aroma i boja propolisa ovise o različitim čimbenicima: geografskim zonama sakupljanja, vremenu kada se skupljao te vrsti biljaka s kojih je sakupljen. Boja propolisa može biti od tamno zelene do smeđe boje, a okus može biti od slatkastog poput meda do skroz gorkog okusa (Ghisalberti, 1979.). Kemijski sastav propolisa je vrlo kompleksan i može varirati ovisno o mnogim čimbenicima, kao što je prethodno navedeno. Dosadašnjim istraživanjem je dokazano da propolis sadrži više od 300 različitih supstanci. Detaljnijom analizom dokazano je da prirodni propolis sadrži 55 % biljnih smola i balzama, 30 % pčelinjeg voska, 10 % eteričnih i aromatičnih ulja, 5 % cvjetnog praha te razne mehaničke primjese (Erski-Bbiljić, Dobrić, 2003; Bankova, 2003). Eterična ulja i organske komponente propolisa sadrže fenole vrlo male molekulske mase za koje se smatra da imaju biološki aktivna svojstva, a to su flavonoidi, fenolne kiseline, esteri, aromatski aldehidi i terpenoidi. U jednom istraživanju je dokazano da sam propolis sadrži čak dvanaest različitih

flavonoida i to pinocembrin, acacetin, krizin, rutin, katehin, naringenin, galangin, luteolin, kampferol, apigenin, miricetin, kvercetin i dvije fenolske kiseline; kafeinsku kiselinu i cimetnu kiselinu te stilbenski derivat resveratrol (Sobočanec, 2006.).

U raznim medicinskim pripravcima upotrebljavaju se različite otopine propolisa kao što su alkoholna (etanolna) otopina, vodeno-alkoholna otopina i vodeno-glikolna otopina. Vodeno-etanolna otopina propolisa u vrlo velikom postotku sadrži kavenu kiselinu, galangin, kvercetin i krizinin. Etanolna otopina propolisa većim dijelom je sastavljena od resveratrola, krizina i kavene kiseline (Volpi, 2004). U propolisu se mogu naći i brojni vitamini: A < 10 µg/100 g propolisa, B1 = 1,45 mg/100 g propolisa, B2 = 0,062 mg/100 g propolisa, B6 = 2,25 mg/100 g propolisa, C < 1 mg/100 g propolisa, E, nikotinska, pantotenska kiselina i dr. (Sobočanec, 2006). Osim toga, propolis je bogat provitaminom A i karotenoidom. Mineralne tvari koje se nalaze u propolisu su: magnezij (Mg), kalcij (Ca), jod (I), kalij (K), natrij (Na), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), i željezo (Fe). Cink (Zn), mangan (Mg) i bakar (Cu), vrlo su bitni za naš organizam jer aktiviraju biološke centre organizma: aktiviraju proces rasta, razmnožavanja i razvoja te sudjeluju u procesu stvaranja krvi, a pozitivno utječu i na funkcije žlijezda. Primjerice, cink (Zn) produžava djelovanje hormona gušterače – inzulina koji izoštrava vid. Propolis također posjeduje razne aromatične kiseline kao što su: benzojeva kiselina, kafeinska kiselina, fenolkarboksilna i dr. (Lečenje pčelinjim proizvodima, Beograd, 2004). Također sadrži i neke enzime kao što su sukcinatna dehidrogenaza, glukoza-6-fosfataza, adenozin trifosfataza i fosfatna kiselina (Tikhonov i Mamontova, 1987).

Prema Japanskom društvu za propolis (Propolis Society of Japan) na Svjetskoj poljoprivrednoj konferenciji propolis u postotcima sadrži (XXXII World Agriculture Conference):

- proteina 1,5 %,
- smole 47,5 %,
- vlakana 3,3 %,
- šećera 19,0 %,
- pepela 26,4 %,
- vode 2,8 %,
- vitamina B1 0,01 mg/100 g,
- vitamina B2 0,12 mg/100 g,
- vitamina B6 0,10 mg/100 g,

- vitamina E 3,80 mg/100 g,
- folne kiseline 7,00 g/100 g,
- pantotenske kiseline 0,08 mg/100 g,
- nikotinske kiseline 0,21 mg/100 g,
- mangana 18,2 ppm,
- fosfora 37,1 mg/100 g,
- srebra 172 mg/100 g,
- kalcijuma 3,360 mg/100 g,
- sode 114 mg/100 g,
- magnezijuma 2,470 mg/100 g,
- bakra 9,39 ppm,
- vitamina P 75 mg/100 g.

## **2.6. Fizikalne karakteristike propolisa**

Boja propolisa ovisi o različitim vrstama smola koje pčele skupljaju, a ista, kao što je već ranije spomenuto, može biti od žutozelene, crvenkaste do crne boje. Specifična težina propolisa na temperaturi od 20 °C iznosi 1,113 g/cm<sup>3</sup>. Propolis pri različitim temperaturama ima različitu konzistenciju. Pri temperaturi od 15 °C propolis je krut i lomljiv, iznad 30 °C propolis je mekan i vrlo ljepljiv. Talište propolisa ovisi o njegovom sastavu, i iznosi između 80 °C i 105 °C. Niti jedno otapalo ga ne otapa u cijelosti. Propolis se prelijevanjem s etilnim alkoholom otapa 50 – 75 %, a u acetonu samo 20 – 40 %, prelijevanjem s vrućom vodom se otapa od 7 – 10 %, a prelijevanjem s hladnom vodom se jako slabo otapa (Erski-Biljić, Dobrić, 2003; Bankova, 2003.).

## **2.7. Biološke karakteristike propolisa**

Biološka svojstva propolisa pripisuju se prisutnosti značajnih količina raznih spojeva kao što su flavonoidi koji posjeduju jaka antioksidacijska svojstva, fenolne kiseline koja djeluje ljepljivo što omogućuje brže zarastanje rana i čireva, flavonola, terpena, itd. (Ito J., Chang F – R, 2001.). Propolis posjeduje i mnoge druge biološki aktivne supstance koje djeluju antiulcerno, kao lokalni anestetik, hepatoprotektivno, antitumorno, imunostimulirajuće (Burdock, 1998.), anti-HIV.

### **2.7.1 Antibakterijska svojstva**

Suvremeni istraživači imaju dovoljno razloga da tvrde da propolis ima antibakterijsko djelovanje odnosno da usporava rast bakterija. Najjače antibakterijsko djelovanje ima na sljedeće bakterije *Enerococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* i dr. (Park et al., 2005). Propolis posjeduje jako baktericidno djelovanje, uništava određene bakterije i najjači je prirodni dezinficijens. Anestetičko djelovanje propolisa znači da je učinak propolisa protiv boli 5,2 puta jači od 2 %-tnog novokaina. Propolis djeluje kao lokalna anestezija zbog sadržaja eteričnih ulja koje sadrži.

### **2.7.2. Antigljivična svojstva**

Propolisu se također pripisuju i razna antigljivična svojstva koja su Ota i sur. (2001) pokazali na osamdeset vrsta kvasaca zaraženih različitim sojevima gljivica roda *Candida*. Antigljivična učinkovitost propolisa rezultirala je sljedećim redoslijedom: *Candida albicans* > *Candida tropicalis* > *Candida krusei* > *Candida guilliermondii*. Fungicidno djelovanje propolisa pogubno je za raznolike vrsta površinskih gljivica i izazivača kožnih bolesti nogu kao što su psorijaza, alopecija, neurodermatitis i dr. što znači da propolis uvelike može pomoći liječenju ovih oboljenja.

### **2.7.3. Antiupalna svojstva**

Protuupalno djelovanje propolisa omogućuje epitelizaciju rana te pozitivno utječe na zaštitu imuniteta organizma. Propolis je nezamjenjiv kod akutnih i kroničnih upala kao što su: rihitis, sinusitis, bronhitis, laringitis i dr. Park i Kahng (1999) su istraživanjem pokazali protuupalne učinke propolisa kod štakora oboljelih od artritisa, gdje je alkoholna tinktura propolisa imala antiupalno djelovanje i pri akutnim i pri kroničnim upalama. Marquez i sur. (2004) su istraživali antiupalna svojstva CAPE-a prethodno ekstrahiranog iz propolisa, na razinu aktivacije T-stanica, budući da je poznato da je T-stranica ključna za razvoj upalnog procesa. Ta polifenolna komponenta propolisa je zaustavila aktivaciju T-stanica u ranoj i kasnoj fazi. Shimazawa i sur. (2005) dokazali su dobre učinke zelenog brazilskog propolisa protiv protoka krvi u mozgu na neuronima PC12.

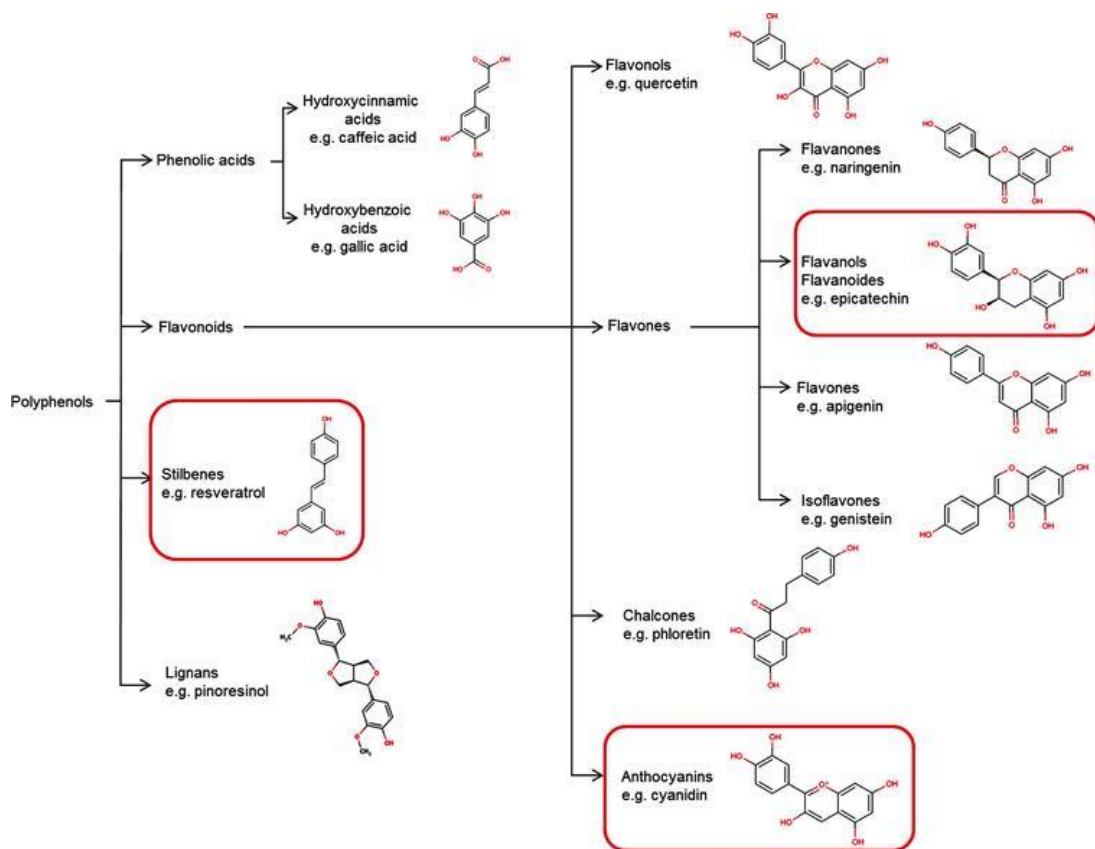
#### **2.7.4. Antitumorska svojstva**

Novija istraživanja sve više dokazuju pozitivan učinak propolisa u liječenju tumora. Neka istraživanja su pokazala kako konzumacija propolisa ne samo da sprječava nastajanje tumora nego zaustavlja rast tumorskih stanica i metastaziranja (raka dojke, debelo crijevo, bubrega, jetre, maternice, želudca, pluća, kože, krvi).

Zbog svih bioloških karakteristika, propolis se smatra jako funkcionalnim sastojkom koji je bitan za zdravlje, te se dodaje u hranu i kozmetiku, a koristi se i u medicinske svrhe s ciljem poboljšanja zdravlja i sprečavanje raznih bolesti (IFIC, 2009.).

#### **2.8. Polifenoli**

Današnja ljudska ishrana sastavljena je dijelom od biljaka što podrazumijeva konzumaciju voća i povrća, koje sadrži brojne spojeve zajedničkog naziva polifenoli. Polifenoli dolaze u različitim oblicima i koncentracijama, ovisno o namirnici, a preporučeni dnevni unos je od 3-70 mg (Roussio i dr. 2000.). Najveći izvor polifenola su biljke, otkriveno je više od 8000 polifenolnih sastavnica u raznim biljnim vrstama. Biljkama primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, pigmentaciju, rast i razmnožavanje (Manach i dr., 2004). Polifenoli, kao sekundarni metaboliti raznih biljnih vrsta, čine veliku skupinu kemijskih spojeva koje možemo svrstati u nekoliko grupa obzirom na strukturu i kemijska svojstva (slika 2.) (Pandey i dr. 2009). Na sastav polifenola utječu mnogi čimbenici kao što su: izloženost sunčevoj svjetlosti, sastav tla kod uzgoja biljaka, skladištenje biljaka, reakcije oksidacije, termička obrada namirnica koja utječe na gubitak polifenola (Manach i sur., 2004.). Najveće skupine polifenola su: flavonoidi, lignani, fenolne kiseline, stilbeni i drugi fenoli, koje se dijele u manje podskupine. Znanstvenim istraživanjima dokazana su pozitivna biološka djelovanja polifenola: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).



Slika 2. Klasifikacija i kemijska struktura glavnih grupa polifenola (modifikacija originalnog prikaza Spencer i dr., 2008), <https://content.iospress.com/articles/nutrition-and-aging/nua0051>

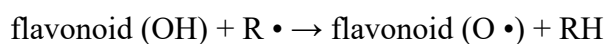
Polifenoli iz prehrane imaju brojna svojstva koja su iznimno korisna za ljudsko zdravlje. Vjerojatno najpoznatije djelovanje koje izaziva najviše interesa javnosti, ali i znanstvenih krugova, je utjecanje na razne unutar stanične i međustanične puteve. Svojstva polifenola i mehanizmi kojima će pomoći stanici na više razina ovisi o njihovoj strukturi te stupnju supstitucije i zasićenosti (Irina i dr., 2012). Polifenoli pozitivno djeluju kod liječenja kardiovaskularnih bolesti, raka, osteoporoze, dijabetesa.



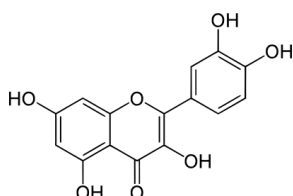
### 2.8.1. Flavonoli

Flavonoli su polifenolni spojevi žute boje i predstavljaju najrasprostranjenije flavonoide u hrani. Prisutni su u glikozidnoj formi, povezani sa šećernom jedinicom, obično glukozom i ramnozom, ali mogu biti zastupljeni i drugi šećeri (kao galaktoza, arabinoza, ksiloza). Budući da se brojnim istraživanjima pokazalo da flavonoidi posjeduju antibakterijska, protuupalna, antialergijska, antimutagena, antiviralna i protutumorska svojstva oni predstavljaju važan dio ljudske prehrane u borbi protiv raznih bolesti. Ta svojstva su rezultat sposobnosti flavonoida da hvataju slobodne radikale, inhibiraju specifične enzime i stimuliraju neke hormone i neurotransmitere. Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje flavonoidi su izuzetno važan dio ljudske prehrane. Ljudi normalnom dnevnom prehranom, osobito voćem i povrćem, unose 1-2 g flavonoida. Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih grupa unutar njihove nuklearne strukture (Kumar i Pandey, 2013). U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori, regulatori rasta te kao agensi za privlačenje pozornosti (Kazazić, 2004). Regulirajući katabolizam i količinu biljnog hormona auksina, flavonoidi imaju važnu ulogu u interakciji između biljke i njenog okoliša.

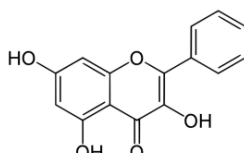
Flavonoidi obuhvaćaju veliku grupu sekundarnih metabolita koji su prisutni u svim biljkama. Njihovi pigmenti su odgovorni za obojenost cvjetova i listova, te su jako važni za rast, razvoj i obranu biljaka. U ljudskoj ishrani se nalaze u voću, povrću, orašastim plodovima, vinu i čaju te se zbog svoje farmakološke učinkovitosti nazivaju „bojom zdravlja“ (Havsteen, 1983.). Zbog toga se danas koriste sve više u liječenju različitih bolesti jer imaju sposobnost da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju hormone, te hvataju slobodne radikale (Havsteen, 2002.). Ovisno o vrsti i dozi flavonoida, posjeduju protuoksidativna svojstva (Cao i sur., 1997.). Flavonoidi su reaktivne tvari, koje lako oksidiraju i imaju ulogu zaštite različitih tvari u stanicama (zaštita askorbinske kiseline od oksidacije, zaštita polinezasićenih masnih kiselina od oksidacije). Flavonoidi sprječavaju štete nastale slobodnim radikalima, između ostalog, direktnim hvatanjem samih radikala. Jednostavno rečeno, flavonoidi se oksidiraju radikalima ( $R\bullet$ ) dovodeći do stabilnijeg i manje reaktivnog oblika prema sljedećem mehanizmu (Irina i dr., 2012):



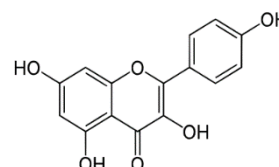
Flavonoidi imaju različitu kemijsku strukturu i svojstva te pripadaju u vrstu polifenolnih spojeva. Više od 6000 različitih vrsta flavonoida prepoznato je unutar glavnih flavonoidnih klasa koji uključuju flavonole, flavone, flavanone, katehine, antocijane, izoflavone, dihidroflavonole i kalkone. Flavonoidi uključuju kvercetin (slika 3.), galangin (slika 4.), kemferol (slika 5.), luteolin (slika 6.), pinocembrin (slika 7.), pinostrobin i pinobanksin (slika 8.).



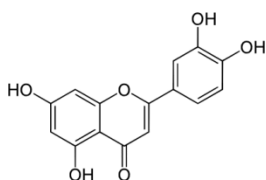
Slika 3. Kvercetin (Izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Quercetin.svg>. (2017-09-11))



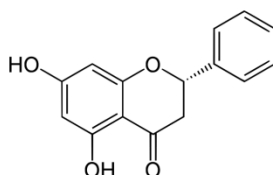
Slika 4. Galangin (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Galangin#/media/File:Galangin.svg>. (2017-09-11))



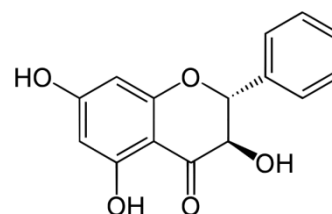
Slika 5. Kempferol (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Kaempferol#/media/File:Kaempferol.svg>. (2017-09-11))



Slika 6. Luteolin (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Luteolin#/media/File:Luteolin.svg>. (2017-09-11))



Slika 7. Pinocembrin (Izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin_structure.svg). (2017-09-11))



Slika 8. Pinobanksin (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pinobanksin#/media/File:Pinobanksin.svg>. (2017-09-11))

Osnovna kemijska struktura flavonoida je kostur od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličnim piranskim prstenom (C prsten). Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezanja neorganskog sulfata i glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidne jezgre (C-glikozidi). Flavonoidi se pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Oko 90 % flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida (Swain i sur., 1979). Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3, a manje u položaju 7. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).

## 2.9. Izrada tinktura propolisa i doziranje propolisa

Propolis se najčešće konzumira u obliku tinkture, tableta, sirupa, vodenih ekstrakata i masti. Priprema različitih tinktura propolisa uključuje alkoholne i bezalkoholne otopine. Najčešće su alkoholne tinkture propolisa koje se izrađuju na način da se propolis prelije 96 % alkoholom i vodom, te se zatvori u tamnu bocu i ostavi da odstoji uz povremeno mućkanje nakon čega se profiltrira kroz gustu gazu ili filter papir i kao konačni rezultat dobije se alkoholni ekstrakt propolisa (Pascual i sur., 1994). Osim alkoholne ekstrakcije propolisa, koja je najčešća, postoji i vodena ekstrakcija propolisa koja je također pokazala pozitivne značajke propolisa (Oršolić i sur., 2004). Gotovi alkoholni ekstrakt propolisa (slika 9.) može se koristiti za vanjsku i unutarnju upotrebu, za premazivanje rana, oštećenja kože, upale grla i u dentalne svrhe. Konzumiranje alkoholnog ekstrakta propolisa preporučuje se za djecu od dvanaest godina nadalje i odrasle osobe u količini od 12 do 20 kapi na dan. Propolis, bilo da se radi o alkoholnom ekstraktu, mješavini propolisa s medom ili bilo kojem drugom obliku, preporučuje se za konzumaciju djeci od druge godine života, jer je za većinu ljudi netoksičan, no kod nekih ljudi ipak izaziva alergijske reakcije. Također se ne preporuča osobama koje boluju od astme jer bi kemijski spojevi koje sadrži propolis mogli izazvati astmatični napad. (Zdravlje iz košnice, 2013.).



Slika 9. Alkoholni ekstrakt propolisa (Izvor:<https://medjimurje.hr/magazin/zivotinje/tinktura-propolisa-sto-je-propolis-10252/>),

(2017-09-05)

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Osnova istraživanja rada

Istraživanja su rađena s alkoholnom tinkturom propolisa, koja je prethodno napravljena od grumena propolisa koji je otopljen u 96 % rafiniranom etilnom alkoholu i purificiranoj vodi. Purificirana (pročišćena) voda je vodovodna voda koja je prerađena u sustavu za preradu vode postupkom reverzne osmoze kako bi se iz vode mogli ukloniti tvari koje uzrokuju mutnoću (mikroorganizmi, planktoni), koloidne otopine (koloidni i visokomolekularni spojevi koji utječu na kapacitet oksidacije i boju vode), molekularne otopine (plinovi topivi u vodi i organske tvari koje utječu na miris i okus vode) te ionske otopine (soli, kiseline i lužine koje utječu na tvrdoću i alkalnost vode). Pri izradi alkoholnih tinktura propolisa mjerene su pH vrijednosti purificirane vode, pomoću uređaja koji se naziva pH-metar i električna vodljivost vode pomoću uređaja koji se naziva konduktometar, jedinica mjere elektrovodljivosti je mikrosimens po centimetru (mS/cm), što je obrnuta vrijednost jedinici električnog otpora, mikroomu po centimetru, tj.  $1 \text{ S/cm} = 1/(1 \text{ om/cm})$ . Izmjerenom vrijednošću električne vodljivosti može se procijeniti stupanj mineralizacije vode i tako ocijeniti o kojoj je vrsti vode riječ (tablica 1.). Nakon prelijevanja propolisa s rafiniranim etilnim alkoholom i vodom, propolis se pusti da miruje u tamnoj boci, uz povremeno potresanje, minimalno tri tjedna. Nakon završenog vremena mirovanja, propolis se profiltrira kroz filter papir te se u konačnici dobije alkoholna tinktura propolisa koja je spremna za daljnju upotrebu.

Vrsta vode	Električna vodljivost (mS/cm)
Jako čista voda (demineralizirana voda)	< 0,05
Pitka voda	< 1 000
Mineralna voda	1 000 – 3 000
Bočata voda	> 1 000
Morska voda	> 50 000

Tablica 1. Različite vrste vode i rasponi električne vodljivosti. (Pregled kvalitete pitke vode u Hrvatskoj", Literatura: "Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj", dr. sc. Željko Dadić [www.um-ng.hr](http://www.um-ng.hr), [www.waterline.hr](http://www.waterline.hr), 2012.)

### 3.2. UV-VIS spektrofotometrija

Spektroskopija je grana znanosti koja proučava efekte vezane uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja i njegovog djelovanja, kemijski sastav i strukturu tvari. Tako nastali emisijski (ili apsorpcijski) spektri karakteristični su za određenu tvar. UV-VIS – spektrofotometrija ili ultravioletna i vidljiva spektrofotometrija je tehnika koja je bazirana na apsorpcijskoj spektroskopiji u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Spektrofotometrijom se može izvoditi i kvalitativna i kvantitativna analiza. Kvalitativna analiza se zasniva na apsorpcijskom spektru uzorka, a ovisi o njegovom sastavu i strukturi. Kvantitativna analiza se zasniva na Lambert-Beerovom zakonu. Do apsorpcije dolazi uslijed elektronskih prijelaza u molekulama. Koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini. Otopine s ionima različitih prijelaznih metala mogu biti obojene (tj. apsorbirati vidljivi dio spektra) kako je poznato da elektroni iz d-orbitale mogu biti pobuđeni iz jednog energijskog stanja u drugo. Boje raznih otopina ovise o prisutnosti raznih drugih vrsta kao što su određeni anioni ili ligandi. Organske komponente također apsorbiraju svjetlost u ultravioletnom i vidljivom dijelu spektra. Koncentracija analizirane vrste određuje se preko Lambert-Beerovog zakona koji glasi:

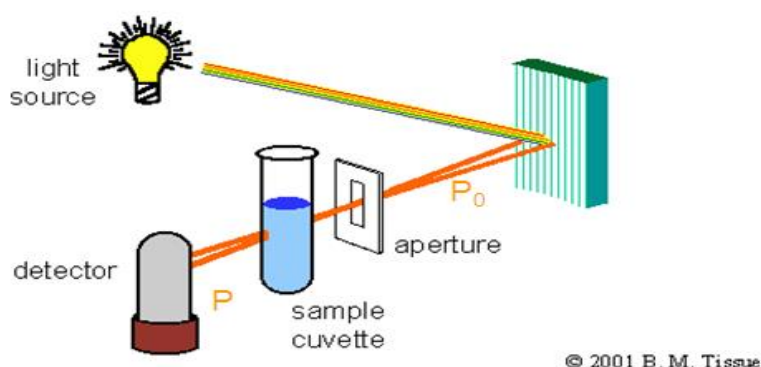
$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon c L$$

Pojašnjenje simbola iz izraza:

$A$ -apsorbancija	$\epsilon$ -konstanta (molarna apsorptivnost)
$I_0$ -intenzitet upadnog svjetla	$I$ -intenzitet propuštenog svjetla
$c$ -tražena koncentracija	$L$ -promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak

Uređaj kojim se provodi analiza naziva se spektrofotometar (slika 10.). Komponente koje sadržava svaki spektrofotometar su slijedeće: izvor zračenja, selektor valnih duljina (filteri, monokromatori), držač uzoraka, detektor, sustav za obradu i prikaz podataka. Spektrofotometri se dijele na jednozračne i dvozračne spektrofotometre. Konstrukcija jednozračnih spektrofotometara je predviđena za samo jedan put svjetlosti, i istovremeno mogu primiti samo jedan uzorak. Referentni uzorak (npr. otapalo) se mora snimiti posebno, a dobiveni spektri naknadno obraditi. Dvozračni spektrofotometri imaju dva puta svjetlosti i istovremeno mogu primiti dva uzorka: mjereni uzorak i referentni uzorak. Spektri se automatski oduzimaju jedan od drugoga, pa naknadna obrada spektra nije potrebna. Dvozračni spektrofotometri se dijele na dvozračne spektrofotometre u prostornoj domeni i

dvoznačne spektrofotometre u vremenskoj domeni. Dvoznačni spektrofotometri u prostornoj domeni koriste dva odvojena detektora zračenja, za dva svjetlosna puta. Dvoznačni spektrofotometar u vremenskoj domeni koristi jedan detektor zračenja, koji naizmjenice detektira intenzitet zračenja dva svjetlosna puta. Na taj način se eliminiraju eventualne sporadične greške koje se mogu javiti uslijed promjene napona u mreži, promjene temperature lampe. Dvoznačni spektrofotometri se mogu koristiti i kao jednoznačni (Instrumentalne metode analitičke kemije, Allegretti Živčić šk.g. 2012/13.).



Slika 10. Shema spektrofotometra (Izvor: Instrumentalne metode analitičke kemije, Allegretti Živčić, 2012/13.)

### 3.3. Podrijetlo uzoraka propolisa

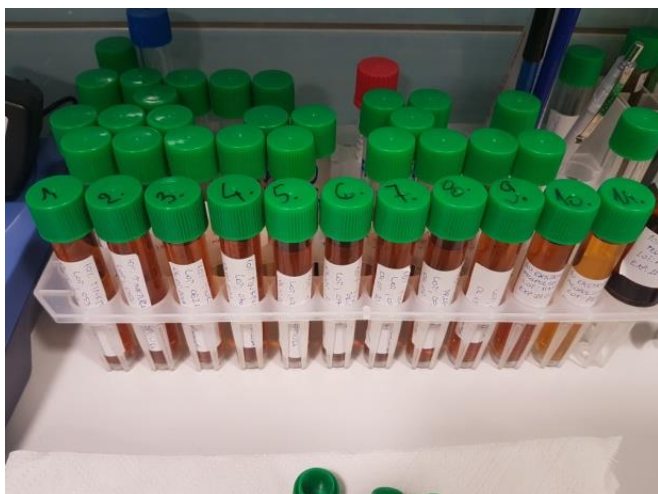
S obzirom da na kemijski sastav i udio aktivnih komponenti u propolisu utječe zemljopisno područje i biljke s kojih je propolis prikupljen te vremenski period u kojem su pčele prikupljale propolis, potrebno je skrenuti pozornost na podrijetlo grumena propolisa. Navedeni analizirani uzorci propolisa su prikupljeni sa sljedećih zemljopisnih područja: Nova Bukovica, Slatina, Mošćenica i s područja Mađarske. Uzorci propolisa su prikupljeni 2013. godine, 2014. godine i 2015. godine. Prilikom izrade alkoholnih tinktura propolisa, uzorci su pripremljeni na način da se odvoje zasebno po zemljopisnim područjima. Uzorci LOT: 118161, 119161, 127161, 354161, 355161, 039161, 356161, 357161, 360161 i 361161 su prikupljeni 2014. godine s područja Mađarske. Uzorci LOT: 120161, 122161, 126161 i 146161 su prikupljeni 2013. godine s područja Nove Bukovice. Uzorci LOT: 121161 i 136161 su prikupljeni 2015. godine s područja Mošćenice.

### 3.4. Određivanje ukupne suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa

Određivanje ukupne suhe tvari provedeno je tijekom sušenja ispitivanih uzoraka alkoholnih tinktura propolisa u uređaju koji se naziva sušionik. Ispitivani uzorci alkoholnih tinktura propolisa stavljeni su u malu staklenu laboratorijsku čašu, koja je direktno postavljena na analitičku vagu i tarirana je masa laboratorijske čaše. Nakon toga odvažuje se 3 g alkoholne tinkture propolisa te se stavi na sušenje u sušionik. Ekstrakt se potom upari do suhoće na vodenoj kupelji te se isuši u sušioniku pri temperaturi 100 – 105 °C kroz 3 sata, a potom ohladi u eksikatoru preko difosfor pentoksida R ili bezvodnog silikagela te se izvaže. Rezultati su izraženi kao maseni postotak ili u g/l. Određivanje suhe tvari provedeno je na dvadeset uzoraka alkoholnih tinktura propolisa.

### 3.5. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola UV-VIS spektrofotometrijom se radi pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Sam postupak analiziranja započinje s pripremom poredbenih otopina, odnosno razrjeđenjem uzoraka (DIL:1:30). Ako koncentracija prelazi 700 mg/l (tinkture ili ekstrakcije sa suhim ostatkom većim od 7 %) potrebno je napraviti veću diluciju tinktura (DIL:1:50 ili DIL:1:100) (slika 11. i slika 12.).



Slika 11. Uzorci propolisa (Izvor: autor)



Slika 12. Priprema poredbenih otopina (Izvor: autor)

Nakon pripreme poredbenih otopina slijedi priprema uzoraka, standarda (100 mg/l matičnice galangina, 300 mg/l galangina, 700 mg/l galangina i priprema slijepe probe.

Standardne otopine su bazirane na matičnici galangina (1 mg/ml), koji se koristi kao analitički marker flavonola, i 80%-tnog etilnog alkohola. Uzorci se pripremaju na način da se u 0,1 ml ispitivane ili poredbene otopine pipetira 3,9 ml purificirane vode, 0,6 ml 20 % - tne otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), smjesa se dobro izmiješa na Vortex miješalici (slika 13.), te se nakon miješanja pipetira u smjesu još 0,4 ml Folin-Ciocalteuovog reagensa (slika 14.).



Slika 13. Miješanje pripremljenih smjesa na Vortex miješalici (Izvor: autor)



Slika 14. Dodavanja Folin-Ciocalteuovog reagensa (Izvor: autor)

Slijepa proba se priprema na isti način koristeći umjesto ispitivane ili poredbene otopine 0,1 ml 80 %-tnog etanola. Smjesa se ostavi na inkubaciji da odstoji dva sata na tamnom mjestu.



Slika 15. Reakcijska smjesa obojena u plavo (Izvor: autor)



Metoda je bazirana na reakciji oksidacije (iona fenolata) – redukcije (FC reagens) u lužnatom području, pri čemu reakcijska smjesa oboji ispitivanu tekućinu u plavo (slika 15.). Mnoge aktivne komponente propolisa, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi, imaju fenolnu skupinu i mogu biti evaluirane ovom metodom. Mjerenje ukupne koncentracije radi se pomoću uređaja koji se naziva UV-1800 Schimatzu dvoznačni spektrofotometar (slika 16.). Apsorbancija supernatanta izmjerena je pri  $\lambda = 760 \text{ nm}$ .

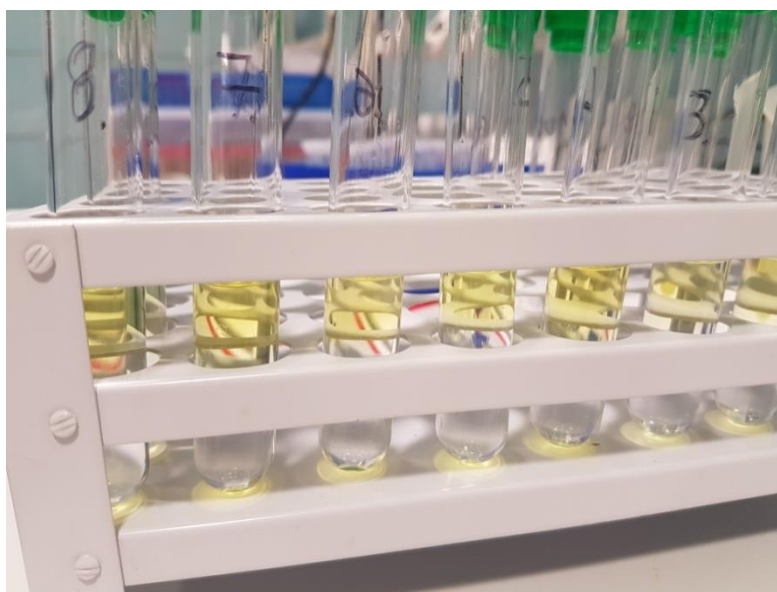


Slika 16. Uređaj za UV-VIS spektroskopiju, UV-1800 Schimatzu spektrofotometar (Izvor: autor)

### **3.6. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijevim kloridom $\text{AlCl}_3$ reagensom**

Određivanje koncentracije ukupnih flavonola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom određuje se pomoću aluminijevog klorida,  $\text{AlCl}_3$ . Kako postoje pripremljene poredbene otopine iz prijašnje analize, ova analiza započinje se odmah s pripremom uzoraka. Potrebno je pripremiti i odgovarajuće standarde; 50 mg/l galangina, 100 mg/l galangina i 300 mg/l galangina. Standardne otopine su bazirane na matičnici galangina (1 mg/ml), koji se koristi kao analitički marker flavonola, i 80 % - tnog etilnog alkohola. U sve označene epruvete dodaje se pipetom 2,8 ml purificirane vode, 0,1 ml kalijevog acetata, 1,5 ml 96 % etilnog alkohola, 0,5 ml poredbenih otopina u svaku odgovarajuću epruvetu, vrijedi i za standarde (poredbene otopine u uzorke u epruvetama). U sve epruvete, osim slijepe probe dodaje se pipetom 0,1 ml 10%  $\text{AlCl}_3$ . U slijepu probu umjesto 10 %  $\text{AlCl}_3$  treba se dodati 0,1

ml purificirane vode, a umjesto poredbenih otopina u slijepu probu dodaje se 0,5 ml 80 % etilnog alkohola. Nakon dodavanja svih potrebnih kemikalija, potrebno je svaki pripremljeni uzorak dobro promiješati na Vortex mješalici, te ostaviti smjese na inkubaciji 30 minuta na tamnom mjestu. Nakon inkubacije od 30 minuta, uzorci su promijenili boju te su svijetlo žute boje (slika 17.).



Slika 17. Reakcijska smjesa obojena u žuto (Izvor: autor)

Kada je inkubacija gotova, uzorci s standardima i slijepom probom se analiziraju na uređaju koji se naziva spektrofotometar. Prilikom rada s uređajem potrebno je znati kojim redoslijedom će se analiza vršiti. Prije same analize potrebno je nulirati mjernu metodu pomoću „slijepa probe“ tj. nule. Slijepa proba se uliju u obje kivete i stave u označeno mjesto u spektrofotometru, označeno A i B (slika 18.)



Slika 18. Označena mjesta za kivete u unutrašnjosti spektrofotometra (Izvor: autor)

Nakon nuliranja potrebno je svaki uzorak uliti u kivetu i izmjeriti rezultat koncentracije ukupnih flavonola. Treba obratiti pozornost da početak analize treba provjeriti sa standardima. Na početku analiziranja (standard 50 mg/l galangina), u sredini analiziranja (standard 100 mg/l galangina) i na kraju analiziranja (standard 300 mg/l galangina).

Temelj kolorimetrijske metode s  $\text{AlCl}_3$  je u tome da on stvara kisele stabilne komplekse s C-4 keto grupom ili C-3 ili C-5 karboksilnom grupom flavonola i flavona.  $\text{AlCl}_3$  stvara kisele nestabilne komplekse s O-dihidroksilnom grupom u A ili B prstenu flavonoida. Kompleksi s  $\text{AlCl}_3$  koje stvaraju flavonoli s C-3 i C-5 hidroksilnom skupinom, kao što su galangin, kvercetin, miricetin imaju maksimum apsorbanije  $\lambda = 415$  do 440 nm.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Mjerenje pH vrijednosti i električne vodljivosti purificirane vode pri izradi alkoholne tinkture propolisa

Tijekom pripreme alkoholne tinkture propolisa mjerene su pH vrijednosti i električna vodljivost purificirane vode, čiji su rezultati zabilježeni u tablici 2.

Redni broj	Uzorak	pH vrijednost		Električna vodljivost ( $\sigma$ ) / (mS/cm)	
		pH	T (°C)	( $\sigma$ ) / (mS/cm)	T (°C)
1.	Purificirana voda	5,72	22,4	0,98	22
2.	Purificirana voda	5,28	21,9	0,96	20,8
3.	Purificirana voda	5,77	22,4	0,83	20,7
4.	Purificirana voda	6,06	22,3	0,91	20,6
5.	Purificirana voda	5,65	22,4	0,87	20,5
6.	Purificirana voda	5,78	22,4	0,94	18,4

Tablica 2. Rezultati mjerenja pH vrijednosti i električne vodljivosti purificirane vode tijekom pripreme alkoholne tinkture propolisa. (izvor: autor)

Iz vidljivih rezultata se da zaključiti da su izmjerene vrijednosti zadovoljavajuće, jer su u rasponu propisanih i dozvoljenih vrijednosti za purificiranu vodu (tablica 1.).

### 4.2. Određivanje ukupne suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa

Nakon provedenog procesa sušenja različitih uzoraka alkoholnih tinktura propolisa, uzorcima je ponovno izmjerena masa, te su računski dobiveni rezultati tj. postotci suhe tvari svakog od navedenih uzoraka vidljivih u tablici 3.

Redni broj	Naziv i serija (LOT) uzorka	Suha tvar u %
1.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 118161	3,75 %
2.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 119161	3,75 %
3.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 120161	3,75 %
4.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 121161	3,75 %

5.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 122161	3,75 %
6.	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 039161	8 %
7.	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 080161	7,33 %
8.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 126161	3,75 %
9.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 127161	3,75 %
10.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 354161	3,8 %
11.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 355161	3,8 %
12.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 356161	3,8 %
13.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 357161	3,8 %
14.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 145161	3,73 %
15.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 146161	3,7 %
16.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 147161	3,75 %
17.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 144161	3,76 %
18.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 136161	3,75 %
19.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 360161	3,8 %
20.	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 361161	3,8 %

Tablica 3. Određivanje suhe tvari u 10 % alkoholnim ekstrakcijama i tinkturama propolisa (Izvor: autor)

#### **4.3.Određivanje koncentracije ukupnih polifenola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom**

Tablica 4. Prikazuje rezultate koncentracija ukupnih polifenola određenih UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. Koncentracije ukupnih polifenola su prikazane u mjernim jedinicama  $\mu\text{g/l}$  za svih dvadeset uzoraka 10 % alkoholnih ekstrakcija ili tinktura propolisa. U tablici 3. navedeni su uzorci po broju (Sample ID), datumu uzorkovanja, ukupna koncentracija (Conc.), valna duljina mjerenja ukupne koncentracije (WL760,0), te nazivi uzoraka (Comments) sa serijom (LOT) uzoraka, suhom tvari uzoraka (s.o. – suhi ostatak), te navedenim razrjeđenjem uzoraka (DIL.). Pri samom početku analiziranja, mjerene su ukupne koncentracije slijedećih standarda: 100 mg/l , 300 mg/l i 700 mg/l galangina, označenih u tablici kao ST.

DATUM	SAMPL E ID	CONC. µg/L	WI760,0	COMMENTS (naziv, serija - LOT)	S.O.	DIL.
24.03.2017.	ST.	77,59	0,11	ST. 100 mg/l galangina	/	/
	UZ.1	941,40	1,38	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 039161	8 %	1:30
	UZ.2	767,89	1,12	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 080161	7,33 %	1:30
	UZ.3	499,34	0,73	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 118161	3,75 %	1:30
12.04.2017.	UZ.4	531,54	0,78	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 119161	3,75 %	1:30
	UZ.5	488,10	0,71	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 120161	3,75 %	1:30
	UZ.6	510,07	0,75	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 121161	3,75 %	1:30
22.05.2017.	UZ.7	464,13	0,68	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 122161	3,75 %	1:30
	UZ.8	538,43	0,79	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 126161	3,75 %	1:30
	UZ.9	518,21	0,76	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 127161	3,75 %	1:30
	UZ.10	517,13	0,76	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 136161	3,75 %	1:30
08.06.2017.	ST.	298,96	0,44	ST. 300 mg/l galangina	/	/
	UZ.11	590,20	0,86	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 144161	3,76 %	1:30
	UZ.12	544,94	0,80	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 145161	3,73 %	1:30
29.06.2017.	UZ.13	539,89	0,79	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 146161	3,7 %	1:30
	UZ.14	583,64	0,85	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 147161	3,75 %	1:30
	UZ.15	619,49	0,91	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 354161	3,8 %	1:30
	UZ.16	483,51	0,71	10 % alkoholna tinktura	3,8 %	1:30

				propolisa ;LOT: 355161		
19.07.2017.	UZ.17	551,09	0,81	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 356161	3,8 %	1:30
	UZ.18	577,99	0,85	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 357161	3,8 %	1:30
	UZ.19	626,42	0,92	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 360161	3,8 %	1:30
	UZ.20	606,24	0,89	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 361161	3,8 %	1:30
	ST.	693,82	1,02	ST. 700 mg/l galangina	/	/

Tablica 4. Rezultate koncentracija ukupnih polifenola određenih UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom (Izvor: autor)

#### 4.4. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijevim kloridom $AlCl_3$ reagensom

Tablica 5. Prikazuje rezultate koncentracija ukupnih flavonola određenih UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijevim kloridom  $AlCl_3$ . Koncentracije ukupnih flavonola su prikazane u mjernim jedinicama  $\mu g/l$  za svih dvadeset uzoraka 10 % alkoholnih ekstrakcija ili tinktura propolisa. U tablici 4. navedeni su uzorci po broju (Sample ID), datumu uzorkovanja, ukupna koncentracija (Conc.), valna duljina mjerenja ukupne koncentracije (WL415,0), te nazivi uzoraka (Comments) sa serijom (LOT) uzoraka, suhom tvari uzoraka (s.o. – suhi ostatak), te navedenim razrjeđenjem uzoraka (DIL.). Pri samom početku analiziranja, mjerene su ukupne koncentracije slijedećih standarda: 50 mg/l, 100 mg/l i 300 mg/l galangina, označenih u tablici kao ST.

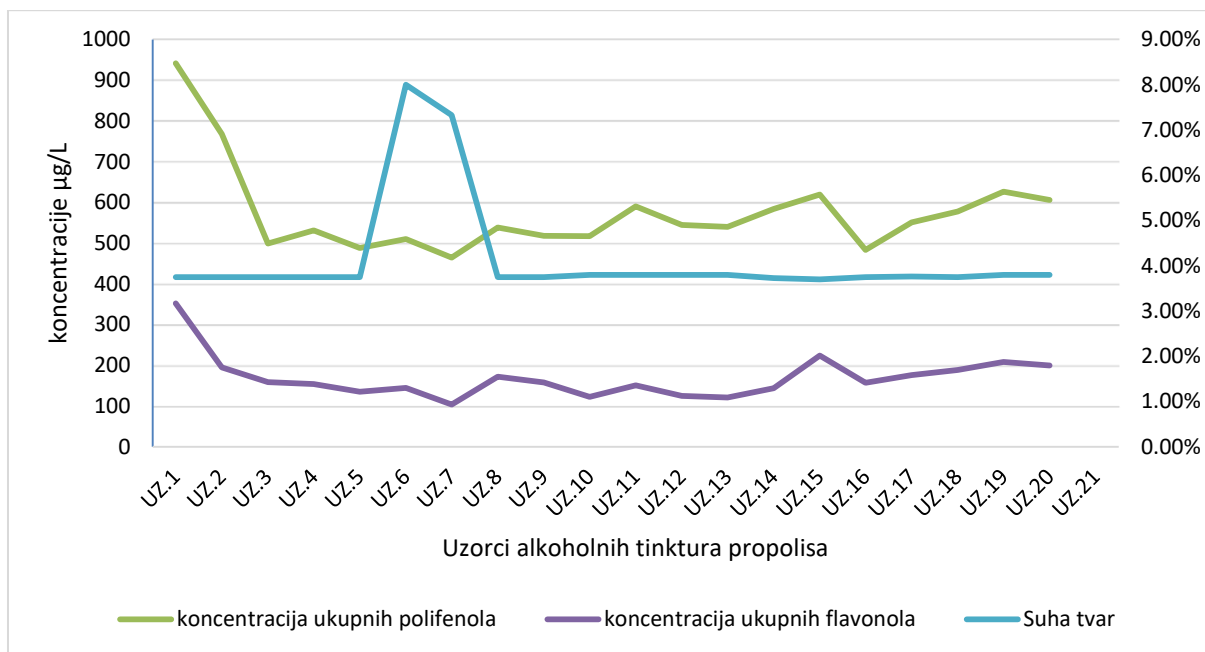
DATUM	SAMPLE ID	CONC. $\mu g/L$	WL415,0	COMMENTS (naziv, serija - LOT)	S.O.	DIL.
24.03.2017.	ST.	53,646	0,239	ST. 50 mg/l galangina	/	/
	UZ.1	351,901	1,566	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 039161	8 %	1:30
	UZ.2	194,457	0,865	10 % alkoholna ekstrakcija propolisa ; LOT: 080161	7,33 %	1:30
	UZ.3	158,796	0,706	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 118161	3,75 %	1:30
12.04.2017.	UZ.4	153,480	0,683	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 119161	3,75 %	1:30

	UZ.5	134,960	0,600	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 120161	3,75 %	1:30
	UZ.6	144,528	0,643	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 121161	3,75 %	1:30
22.05.2017.	UZ.7	103,428	0,460	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 122161	3,75 %	1:30
	UZ.8	172,013	0,765	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 126161	3,75 %	1:30
	UZ.9	158,096	0,703	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 127161	3,75 %	1:30
	UZ.10	122,572	0,545	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 136161	3,75 %	1:30
08.06.2017.	ST.	93,962	0,418	ST. 100 mg/l galangina	/	/
	UZ.11	150,698	0,670	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 144161	3,76 %	1:30
	UZ.12	124,979	0,556	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 145161	3,73 %	1:30
29.06.2017.	UZ.13	120,703	0,537	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 146161	3,7 %	1:30
	UZ.14	143,911	0,640	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 147161	3,75 %	1:30
	UZ.15	223,780	0,996	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 354161	3,8 %	1:30
	UZ.16	156,611	0,697	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 355161	3,8 %	1:30
19.07.2017.	UZ.17	176,112	0,784	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 356161	3,8 %	1:30
	UZ.18	188,445	0,838	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 357161	3,8 %	1:30
	UZ.19	208,241	0,926	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 360161	3,8 %	1:30
	UZ.20	199,090	0,886	10 % alkoholna tinktura propolisa ; LOT: 361161	3,8 %	1:30
	ST.	292,130	1,300	ST. 300 mg/l galangina	/	/

Tablica5. Rezultati koncentracije ukupnih flavonola određenih UV-VIS spektrofotometrijskom metodom s aluminijevim kloridom  $AlCl_3$  reagensom



Pri dobivenim rezultatima ukupnih koncentracija polifenola i flavonola i rezultatima suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa, može se grafički prikazati da su rezultati ukupnih koncentracija polifenola i flavonola proporcionalni. Rezultati suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa su različiti, te se može vidjeti da ne postoji uvijek proporcionalnost s koncentracijom ukupnih polifenola i flavonola (sliku 19.).



Slika 19. Grafički prikaz koncentracije ukupnih polifenola i flavonola, te usporedba sa suhom tvari u alkoholnim tinkturama propolisa (Izvor: autor)

## 5. ZAKLJUČAK

Kemijski sastav grumena propolisa varira ovisno o vremenu prikupljanja, o biljkama s kojih je propolis prikupljen, samom načinu čišćenja propolisa, prerade i izrade tinkture, vremenu ekstrahiranja i filtriranja tinktura. U ovom radu praćen je kemijski sastav alkoholne tinkture propolisa kroz tri parametra: suha tvar, ukupna koncentracija polifenola i flavonola. Suha tvar određena je sušenjem tinkture propolisa u sušioniku na temperaturi od 110 °C u vremenskom periodu od 2 sata. Praćenje koncentracije ukupnih polifenola analizirano je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. Praćenje koncentracije ukupnih flavonola analizirano je spektrofotometrijskom metodom s  $\text{AlCl}_3$  reagensom.

Analizirano je dvadeset uzoraka alkoholnih tinktura propolisa. Rezultati analize pokazali su različite koncentracije ukupnih polifenola za svaku seriju. Analize koncentracija ukupnih flavonola također su pokazali različite rezultate po analiziranim serijama. Rezultati su proporcionalni uz minimalna odstupanja, što se može gledati kao odstupanja prilikom pipetiranja uzorka, ili mjerna odstupanja uređaja na kojemu su rađene analize. Budući da su flavonoli sastavni dio polifenola ove dvije metode se mogu koristiti kao poredbene metode za analizu alkoholne tinkture propolisa.

Rezultati suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa su različiti, ali ne postoji uvijek proporcionalnost s koncentracijom ukupnih polifenola i flavonola. Suha tvar sadrži udio smole koja nije aktivna tvar i varira od grumena do grumena propolisa. Udio suhe tvari u alkoholnim tinkturama propolisa se može koristiti kao kemijski parametar karakterizacije propolisa, ali ne može biti pokazatelj za udio aktivnih komponenti u propolisu.

Prema navedenim rezultatima ukupnih koncentracija polifenola i flavonola, može se pratiti kemijski sastav propolisa i njegove aktivne komponente, koji se mogu koristiti kao glavni kriterij za postavljanje standarda alkoholne tinkture propolisa.

## 6. LITERATURA

1. Allegretti Živčić, V. (2012/13) *Instrumentalne metode analitičke kemije, spektrofotometrija*
2. Burdock, G. A. (1998) *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. Food and Chemical Toxicology, str. 36, 347–363.
3. Cao G.; Sofic, E.; Prior, R. L. (1997) *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radical Bio Med, str. 22:749-760.
4. Crane, E. (1999) *History of other products from bees The world history of bee keeping and honey hunting*. London:Gerald Duckworth & Co Ltd, str. 545-553.
5. Crane, E. (1999) *The world history of bee keeping and honey hunting*. London: Gerald Duckworth & Co Ltd
6. Dadić, Ž. (2012) *Pregled kvalitete pitke vode u Hrvatskoj, Literatura: "Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj"*
7. Erski - Biljić, Dobrić, Bankova, (2003) *Praktikum iz pčelarstva*, Novi Sad
8. Fearnley, J. (2001) *Bee propolis: natural healing from the hive*. Souvenir Press London; 172
9. Ghisalberti, El. (1979), *Propolis: A review*. Bee World
10. Havsteen, B. H. (1983) *Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency*. Biochem Pharmacol, 32, str. 1141-1148.
11. Havsteen, B. H. (2002) *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Pharmacol Therapeut, 96, str. 67-202.
12. IFIC – International Food Information Council Foundation. (2009) *Functional Foods*. <http://www.ific.org/nutrition/funtional/index.cfm>. (28.11.2017.)
13. Irina, I.; Mohamed, G. (2012) *Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidans*. Advances Biotechnology, str. 978-953-307-820-5.
14. Ito, J. et. al. (2001) *Anti HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis*. Journal of Natural Products, 64, str. 1278-1281.
15. Kazazić, S. P. (2004) *Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida*. Arh Hig Rada Toksikol 55, str. 279-290.
16. Kumar, S.; Pandey, A. K. (2013) *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. The scientific World Journal, str. 1-16.

17. Manach, C.; Scalbert, A. (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, str. 727-47.
18. Manach, C. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, str. 727-747
19. Marquez, N. , et. al. (2004) *Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cells activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcription factors*. *J. Pharmacol. Exp. Ther. (JPET)*, str. 308: 993-1001.
20. Milojević, O. (2015) *Prirodno liječenje pčelinjim proizvodima*, Urednik: Enes Begulić, Zagreb: Begen d.o.o., Id broj: 30
21. Najfi, M.F. et. al. (2007) *Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells*. *Cytotechnology, Journal of Api Product and Api Medical Science, Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds*
22. Oršolić, N. et. al. (2004) Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Ethnopharmacol*, 94, str. 307-315.
23. Ota, C. , et. al. (2001) *Antifungal activity of propolis on different species of Candida Mycocos*. *Str.* 44: 375-8.
24. Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, str. 270-278.
25. Park, E. H.; Kahng, J. H. (1999) *Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis*. *Arch Pharm. Res. Str.* 22: 554-8.
26. Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. (2005) Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50, str. 2502-2506.
27. Pascual, C.; Gonzalez R.; Torricella RG. (1994), *Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals*. *J. Ethnopharmacol* 41:9-13.
28. Petrik, J. (2008) *Polifenoli antioksidansi*, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
29. Plavša, N.; Nedić, N. (2015) *Praktikum iz pčelarstva*, Novi Sad
30. Russo A.; Acquaviva A.(2000) *Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DN, cleavage protectors*
31. Shimazawa, M. , et. al. (2005) *Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage*. *Evid Based Complement Alt Med.* 2 : 201-207

32. Slika ; alkoholna tintura propolisa: <https://medimurje.hr/magazin/zivotinje/tinktura-propolisa-sto-je-propolis-10252/>(2017-09-05)
33. Strukturna formula pinocembrina;  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin_structure.svg)  
(2017-09-11)
34. Strukturna formula Luteolina;  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Luteolin#/media/File:Luteolin.svg>  
(2017-09-11)
35. Strukturna formula Kaempferola;  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Kaempferol#/media/File:Kaempferol.svg>  
(2017-09-11)
36. Strukturna formula Galangina;  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Galangin#/media/File:Galangin.svg>  
(2017-09-11)
37. Strukturna formula Pinobanksina;  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Pinobanksin#/media/File:Pinobanksin.svg>  
(2017-09-11)
38. Strukturna formula Quercetina;  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Quercetin.svg>  
(2017-09-11)
39. Slika grumena propolisa;  
<http://telegrafi.com/wp-content/uploads/2017/03/propolisbeeglue.jpg> (2017-09-05)
40. Sobočanec, S. (2006) *Učinak propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u cba miša*
41. Spencer, J. P., et. al. (2008) *Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research*. The British Journal of Nutrition, str. 99, 1, 12–22, slika podjele polifenola: <https://content.iospress.com/articles/nutrition-and-aging/nua0051>
42. Swain, T.; Harborne, J. B.; Sumere, C. F. (1979) *Biochemistry of plant phenolics, recente advances in phytochemistry*. Plenum Press: New York, SAD
43. Tikhonov, A.; Mamontova, I. N. S. (1987) *Production and Study of a lyophilized phenolic polysaccharide preparation from propolis*. Farmatsevtichnii Zhurnal, str. 3, 67-68.
44. Volpi, N. (2004) Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 25, str. 1872-1878.
45. *Zdravlje iz košnice* (2013) Rijeka: Paradox d.o.o.

## POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA

Slika 1. Propolis, (2017-09-05), (Izvor:<http://telegrafi.com/wp-content/uploads/2017/03/propolisbeeglue.jpg> )

Slika 2. Podjela polifenola prema njihovim kemijskim strukturama (Izvor: Spencer, 2004), <https://content.iospress.com/articles/nutrition-and-aging/nua0051>

Slika 3. Kvercetin, (2017-09-11), (Izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Quercetin.svg>)

Slika 4. Galangin, (2017-09-11), (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Galangin#/media/File:Galangin.svg>)

Slika 5. Kempferol, (2017-09-11), (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Kaempferol#/media/File:Kaempferol.svg>)

Slika 6. Luteolin, (2017-09-11), (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Luteolin#/media/File:Luteolin.svg>)

Slika 7. Pinocembrin, (2017-09-11), (Izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Pinocembrin#/media/File:Pinocembrin_structure.svg))

Slika 8. Pinobanksin, (2017-09-11), (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pinobanksin#/media/File:Pinobanksin.svg>)

Slika 9. Alkoholna tinktura propolisa, (2017-09-05), (Izvor: <https://medjimurje.hr/magazin/zivotinje/tinktura-propolisa-sto-je-propolis-10252/> )

Slika 10. Shema spektrofotometra (Izvor: Instrumentalne metode analitičke kemije, dr.sc. V. Allegretti Živčić šk.g. 2012/13.)

Slika 11. Uzorci propolisa (Izvor: autor)

Slika 12. Priprema poredbenih otopina (Izvor: autor)

Slika 13. Miješanje pripremljenih smjesa na Vortex mješalici (Izvor: autor)

Slika 14. Dodavanje Folin-Ciocalteu reagensa (Izvor: autor)

Slika 15. Reakcijska smjesa obojena u plavo (Izvor: autor)

Slika 16. Uređaj za UV-VIS spektrofotometriju UV 1800 Schimatzu (Izvor: autor)

Slika 17. Reakcijska smjesa obojena u žuto (Izvor: autor)

Slika 18. Označena mjesta za kivete u unutrašnjosti spektrofotometra (Izvor: autor)

Slika 19. Grafički prikaz koncentracije ukupnih polifenola i flavonola, te usporedba sa suhom tvari u alkoholnim tinkturama propolisa (Izvor: autor)

Tablica 1. Vrste vode s stupnjevima mineralizacije (Izvor: autor)

Tablica 2. pH vrijednosti i električne provodljivosti purificirane vode tijekom pripreme alkoholnih tinktura propolisa (Izvor: autor)

Tablica 3. Određivanje suhog ostatka 10% alkoholne tincture propolisa (Izvor: autor)

Tablica 4. Rezultati koncentracije ukupnih polifenola određenih UV-VIS spektrofotometrijom s Folin-Ciocalteu reagensom (Izvor: autor)

Tablica 5. Rezultati koncentracije ukupnih flavonola određenih UV-VIS spektrofotometrijom aluminijevim kloridom  $\text{AlCl}_3$  reagensom (Izvor: autor)

UV-VIS – ultravioletna vidljiva spektrofotometrija

$\text{AlCl}_3$  – kemijska formula za aluminijev klorid

$^{\circ}\text{C}$  - stupanj Celzius ( oznaka za temperaturu)

g – gram (jedinica mase)

$\text{g}/\text{cm}^3$  - gram po centimetru kubnom ( jedinica mase)

$\text{mg}/\text{l}$  – miligram po litri ( jedinica mase)

ml – mililitri (jedinica volumena)

$\sigma$  – simbol za električnu vodljivost, mjerna jedinica  $\text{mS}/\text{cm}$  – mikro Simens po centimetru

% - postotak

DIL. – dilucija (razrijeđenje)

Conc. – koncentracija

WL – valna duljina mjerenja

s.o. – suhi ostatak neke tvari

LOT – oznaka za numeriranje neke serije proizvoda

dr. – kratica koja označava riječ “drugo”

A- apsorbancija

$I_0$  - intenzitet upadnog svjetla

$c$  - tražena koncentracija

$e$  - konstanta (molarna apsorbivnost)

$I$  - intenzitet propuštenog svjetla

$L$  - promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak



## PRILOG 1.

Priprema standarda 50 mg/ml galangina:

$$C_1 * V_1 + 0 * V_2 = C_3 * V_3$$

$$C_1 = 1000 \quad C_2 = 0 \quad C_3 = 50$$

$$V_1 = ? \quad V_2 = ? \quad V_3 = 600$$

$$1000 * V_1 + 0 * V_2 = 50 * 600$$

$$V_2 = 600 - 30$$

$$1000 V_1 = 30000 / 1000$$

$$V_2 = 570 \text{ ml } 80\% \text{ alkohola}$$

$$V_1 = 30 \text{ ml matičnice galangina}$$

Priprema standarda 100 mg/ml galangina:

$$C_1 * V_1 + 0 * V_2 = C_3 * V_3$$

$$C_1 = 1000 \quad C_2 = 0 \quad C_3 = 100$$

$$V_1 = ? \quad V_2 = ? \quad V_3 = 700$$

$$1000 * V_1 + 0 * V_2 = 100 * 700$$

$$V_2 = 700 - 70$$

$$1000 V_1 = 70000 / 1000$$

$$V_2 = 630 \text{ ml } 80\% \text{ alkohola}$$

$$V_1 = 70 \text{ ml matičnice galangina}$$

Priprema standarda 300 mg/ml galangina:

$$C_1 * V_1 + 0 * V_2 = C_3 * V_3$$

$$C_1 = 1000 \quad C_2 = 0 \quad C_3 = 300$$

$$V_1 = ? \quad V_2 = ? \quad V_3 = 700$$

$$1000 * V_1 + 0 * V_2 = 300 * 700$$

$$V_2 = 700 - 210$$

$$1000 V_1 = 21000 / 1000$$

$$V_2 = 490 \text{ ml } 80\% \text{ alkohola}$$

$$V_1 = 210 \text{ ml matičnice galangina}$$

Priprema standarda 700 mg/ml galangina:

$$C_1 * V_1 + 0 * V_2 = C_3 * V_3$$

$$C_1 = 1000 \quad C_2 = 0 \quad C_3 = 700$$

$$V_1 = ? \quad V_2 = ? \quad V_3 = 200$$

$$1000 * V_1 + 0 * V_2 = 700 * 200$$

$$V_2 = 200 - 140$$

$$1000 V_1 = 14000 / 1000$$

$$V_2 = 60 \text{ ml } 80\% \text{ alkohola}$$

$$V_1 = 140 \text{ ml matičnice galangina}$$

## IZJAVA O AUTORSTVU RADA

Ja, Mirela Ernješ, pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor završnog/diplomskog rada pod naslovom: Određivanja polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom, te da u navedenom radu nisu na nedozvoljen način korišteni dijelovi tuđih radova.

U Požegi, \_\_\_\_\_

Ime i prezime studenta:

**Mirela Ernješ** \_\_\_\_\_