

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Факультет природничих наук
Кафедра хімії

ДИПЛОМНА РОБОТА

на тему: " Методи кількісного визначення біологічно активних
компонентів прополісу для хімічної стандартизації ”

Студентки IV курсу, групи Х-41

спеціальності 102 Хімія

Гуцуляк Г. С.

Керівник _____

доц. кафедри, к.т.н. Федорченко С.В.

Національна шкала: _____

Університетська шкала: _____

Оцінка ECTS: _____

Члени комісії: _____

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

м. Івано-Франківськ – 2025

Гуцуляк Г. С. : " Методи кількісного визначення біологічно активних компонентів прополісу для хімічної стандартизації ”. – Курсова робота за спеціальністю **102 – “хімія”**. – Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника. – Івано-Франківськ, 2025. –51с.

Курсова робота є рукописом, який містить результати літературного огляду щодо вмісту флавонів і флавонолів у прополісі, їх біологічного значення та методів визначення. Розглянуто фізико-хімічні властивості флавонів і флавонолів, зокрема рутину, який використовується як еталонна сполука у спектрофотометричному аналізі. Вивчено сучасні підходи до кількісного визначення цих сполук, зосереджуючись на методі комплексоутворення з іонами алюмінію (III), як на ефективному способі аналізу загального вмісту флавоноїдів. У рамках експериментальної частини виконано екстракцію флавоноїдів з кількох зразків прополісу та проведено спектрофотометричні вимірювання з побудовою калібрувального графіка. Отримані результати дозволили оцінити вміст флавонів і флавонолів у досліджуваних зразках та порівняти їх з літературними даними.

Курсова робота складається з вступу, трьох розділів, висновків, і списку використаних джерел інформації. Вміст курсової роботи викладено на 51 сторінках, бібліографічний опис містить 20 найменувань.

Ключові слова: прополіс, біологічно активні компоненти, хімічний аналіз, стандартизація, флавоони, флавоноли.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Розділ 1. Літературний огляд	6
1.1. Прополіс: походження, хімічний склад, біологічна активність.....	6
1.2. Флавоноїди в прополісі: характеристика флавонів і флавонолів.....	11
1.3. Рутин як маркерний флавонол.....	20
1.4. Огляд спектрофотометричних досліджень зразків прополісу різного походження.....	22
Розділ 2. Експериментальна частина	40
2.1. Відбір зразків прополісу для досліджень.....	40
2.2. Характеристика зразків прополісу	41
2.3. Методика підготовки проб (екстракція).....	44
2.4. Метод визначення вмісту флавонів і флавонолів.....	44
Розділ 3. Результати дослідження та їх обговорення.....	47
Висновки.....	49
Список використаної літератури.....	50

ВСТУП

Актуальність теми.

Прополіс, відомий своєю широкою біологічною активністю, залишається об'єктом численних досліджень у сфері фармацевтики, медицини та харчової промисловості. Його основні біологічно активні компоненти — флавоноїди, фенольні кислоти, терпеноїди та інші сполуки — визначають його антиоксидантні, антимікробні та протизапальні властивості. Однак велика варіабельність хімічного складу прополісу, зумовлена його географічним походженням і рослинними джерелами, створює необхідність уніфікованого підходу до його аналізу та стандартизації.

Хімічна стандартизація прополісу базується на кількісному визначенні його ключових компонентів, що забезпечує стабільність якості та ефективності продукту. Особливо актуальним це стає у фармацевтичній промисловості, де контроль складу є необхідною умовою для реєстрації та використання препаратів на основі прополісу.

Об'єкт дослідження: фізико-хімічні властивості та біологічно активні компоненти прополісу.

Предмет дослідження: методи кількісного визначення біологічно активних компонентів прополісу з використанням фізико-хімічного аналізу, а також огляд сучасних аналітичних методів, таких як ВЕРХ, ГХ-МС і спектрофотометрія.

Мета роботи. Метою цієї роботи є аналіз сучасних методів кількісного визначення біологічно активних компонентів прополісу та обґрунтування їх застосування для хімічної стандартизації продукту.

Результати цього дослідження сприятимуть вдосконаленню підходів до контролю якості прополісу, що має значення для його промислового та фармацевтичного використання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Тема роботи затверджена на засіданні кафедри хімії (протокол № 1 від 19.01.2024).

Обґрунтованість та ступінь достовірності

Обґрунтованість та ступінь достовірності результатів досліджень та висновків роботи підтверджується використанням сучасних літературних джерел та достатнім об'ємом експериментальних даних, отриманих з використанням комплексу сучасних методів досліджень.

Особистий внесок здобувача: написання та оформлення тексту рукопису, лабораторні дослідження зразків, аналіз та обговорення результатів досліджень, формулювання висновків.

Структура та обсяг роботи.

Курсова робота складається із вступу, трьох розділів, висновків та списку використаної літератури. Повний обсяг роботи складає 38 сторінки та 20 джерел використаної літератури.

РОЗДІЛ 1.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Прополіс: походження, хімічний склад, біологічна активність.

Прополіс — складний багатокомпонентний органічно-мінеральний продукт рослинно-бджолиного походження, який виробляють медоносні бджоли (*Apis mellifera*) шляхом збору смол і бальзамів із бруньок, кори, листя та інших частин рослин, головним чином деревних порід (тополі, берези, верби, каштана, ялини тощо), з подальшим збагаченням цих речовин власними ферментами та секретами. У результаті складних біохімічних перетворень формується кінцевий продукт — прополіс, який використовується бджолами в гігієнічних та конструктивних цілях у межах вулика.

З функціонального погляду, прополіс відіграє надзвичайно важливу роль у життєдіяльності бджолиної сім'ї. Він використовується для замазування щілин і тріщин у вулику, регулювання ширини льотка, склеювання рухомих частин, а також для дезінфекції комірок стільників перед відкладанням яєць маткою. Прополіс також слугує засобом ізоляції сторонніх предметів, які бджоли не в змозі винести з вулика, обмежуючи розвиток патогенних мікроорганізмів і запобігаючи зараженню.

У свіжому стані прополіс має м'яку, пластичну консистенцію, смолисту текстуру, характерний гіркуватий смак і приємний, бальзамічний запах, який нагадує аромат березових бруньок. Його колір може варіювати від жовтуватого-зеленого до темно-коричневого або навіть чорного, залежно від його ботанічного походження, географічного розташування пасіки та часу збору. З часом прополіс ущільнюється, стає крихким при низьких температурах.

Прополіс — це складний за своїм походженням і вмістом природний продукт, до складу якого входить безліч компонентів, кожен з яких виконує свою роль. Основу прополісу становлять рослинні смоли і бальзами, які

займають приблизно 50–55% його маси. Ці речовини бджоли збирають із бруньок дерев, кори та інших рослинних частин, після чого змішують їх зі своїми секретами. Важливою частиною прополісу є віск — його частка може сягати від 22 до 30%. Саме завдяки йому прополіс набуває характерної пластичної структури.

Окрім того, у складі прополісу присутні квітковий пилок і перга — продукти, які потрапляють до нього разом із рослинною сировиною, і їхній вміст коливається в межах 5–11%. Значну роль відіграють ефірні олії — ароматні леткі сполуки, що надають прополісу характерного запаху й впливають на його лікувальні властивості. Їх у складі може бути від 5 до 10%. Важливими є також дубильні речовини (8–10%), які мають в'язучу дію й беруть участь у захисних процесах.

Особливу цінність прополісу надають флавоноїди — понад 19 біологічно активних сполук, які забезпечують його протизапальні, антиоксидантні та протимікробні властивості. В складі також є виділення верхньощелепних залоз бджіл, серед яких особливу увагу привертає 10-окси-D2-деценова кислота. Саме вона відповідає за антиокиснювальні властивості прополісу, і її вміст коливається від 2 до 8%.

Прополіс не є абсолютно чистим — у ньому можуть міститися механічні домішки: частинки ґрунту, пилу, деревини, що становлять близько 5–13% загальної маси. Окрім органічних речовин, у його складі присутні макро- і мікроелементи: серед них кальцій, калій, натрій, фосфор, залізо, магній, сірка, хлор, а також мікроелементи, такі як фтор, кремній, селен, марганець, цинк, алюміній, барій, титан, нікель, мідь, свинець, кобальт, стронцій, ванадій, хром, олово, берилій, срібло, цирконій.

Науковці також ідентифікували в прополісі сполуки терпеноїдної природи, зокрема представників групи каріофілену, а також ароматичний альдегід ізованілін. Значне місце займають органічні кислоти: серед них — ароматичні ненасичені кислоти, такі як кавова і бензойна, а також

ефірозв'язані кислоти — як ненасичені (олеїнова), так і насичені, серед яких пальмітинова, стеаринова, арахінова, бегенова, лігноцеринова. Не менш важливими є каротини й вітаміни — С, В1, В2, В3, В5, Е, які доповнюють лікувальний потенціал прополісу.

Якість цього продукту безпосередньо залежить від співвідношення його складників. Високоякісний прополіс характеризується високим вмістом рослинних смол і секретів бджолиних залоз — до 70%. Натомість продукт низької якості може містити до 70% воску та пилку, що знижує його біологічну активність і лікувальні властивості.

Фармакологічні властивості прополісу вражають своєю широтою та універсальністю. Цей природний продукт демонструє надзвичайно багатогранну біологічну активність, що зумовлює його високу цінність у лікувальній практиці. Насамперед, прополіс виявляє потужну антисептичну дію: він здатний ефективно боротися з бактеріями, вірусами та грибами, пригнічуючи розвиток інфекцій та запобігаючи їх поширенню.

Завдяки своїм ранозагоювальним і протизапальним властивостям, прополіс прискорює відновлення пошкоджених тканин, зменшує набряки, почервоніння й біль. Його в'яжуча дія корисна при запаленнях слизових оболонок, а протисвербіжний ефект допомагає при шкірних ураженнях. Унікальним є і протирадіаційний вплив прополісу, що проявляється у здатності зменшувати негативні наслідки радіаційного опромінення. Він також виступає як дезодоруючий і знеболювальний засіб, знімаючи неприємні відчуття та забезпечуючи комфорт.

Прополіс відомий своєю гепатозахисною дією — він підтримує здоров'я печінки та допомагає їй у боротьбі з токсинами. Він чинить десенсибілізувальний ефект, знижуючи алергічні реакції, проявляє антитоксичні властивості, а також стимулює сечо- та жовчовиділення, сприяючи очищенню організму від шкідливих речовин. Його антиоксидантна

дія дозволяє нейтралізувати вільні радикали та запобігати передчасному старінню клітин.

Прополіс зміцнює організм загалом — підвищує імунітет, підтримує обмін речовин, активізує регенераційні процеси, сприяє кровотворенню, а також покращує стан судин, зменшуючи їхню ламкість та спазми. Він позитивно впливає на травлення, гармонізує роботу ендокринної системи, підвищує життєвий тонус, витривалість і працездатність.

Цілюща сила прополісу проявляється також у його здатності знижувати згортання крові, перешкоджати тромбоутворенню, виводити надлишковий холестерин, очищувати організм і навіть пригнічувати розвиток патологічно змінених клітин. Він не лише підтримує здоров'я, а й сприяє його активному відновленню.

Окремо варто відзначити взаємодію прополісу з антибіотиками. Цей природний засіб здатен посилювати і подовжувати їхню дію, а також запобігати виникненню стійких до ліків мікроорганізмів. При цьому, на відміну від синтетичних антибіотиків, прополіс не порушує природну мікрофлору кишечника і не призводить до дисбактеріозу. У деяких випадках його лікувальна ефективність та протимікробна дія навіть перевершують можливості традиційних антибіотиків, що лише підкреслює його унікальність і цінність у сучасній фітотерапії.

Прополіс легко впізнати серед інших речовин, особливо воску, завдяки своїм унікальним органолептичним властивостям. Свіжий і якісний прополіс має характерну клейку, смолисту текстуру з блискучою поверхнею, яка ніби світиться зсередини. Його колір може варіюватися в широкому спектрі відтінків, залежно від рослинних компонентів, що увійшли до складу: це можуть бути глибокі коричневі, насичені бурі, зеленуваті або сірі тони, а також проміжні варіації — від жовтуватого-сірого до червонувато-коричневого, від бурого-зеленого до брудно-зеленого, що робить кожен шматочок прополісу унікальним.

Запах прополісу стійкий і приємний, наповнений багатогранними пряними, бальзамними нотками, що нагадують аромат бруньок дерев, меду і воску. Смак у нього терпкий і трохи гіркуватий, із легкою пекучістю, яка відразу відчувається на язиці. З часом, при тривалому зберіганні, прополіс темнішає, стає твердим і крихким, втрачаючи свою первісну пластичність.

Температура значно впливає на консистенцію прополісу: при звичайній кімнатній температурі він твердий, але при підвищенні до 20–30 градусів стає більш в'язким, ніби розм'якшується. Коли температура піднімається до 36–40 градусів, прополіс стає м'яким і пластичним, легко приймаючи форму. При нагріванні до 80–104 градусів він плавиться, а якщо його підпалити, то поширюється характерний запах ладану, що є однією з його відмінних рис.

Прополіс важчий за воду, і цей показник залежить від кількості воску: чим більше воску міститься у прополісі, тим менша його питома вага, яка в середньому становить близько 1,127 г/см³. Якщо говорити про хімічні властивості, то чистий прополіс відрізняється від воску значно вищими показниками кислотного числа, ефірного числа і числа омилення, що свідчить про його складний і багатокомпонентний склад.

Для розчинення прополісу застосовують різні розчинники, вибір яких залежить від мети використання. Це можуть бути спирти — метиловий або етиловий, ефірні олії, бензин, скипидар, етер, хлороформ, ацетон, бензол, терпентин, а також рослинні і мінеральні олії чи поліетиленгліколь. Водою прополіс розчиняється дуже погано — лише на 1–3%. Найчастіше для виготовлення екстрактів використовують етиловий спирт, а також різні жири — рослинні чи тваринні — при температурі 80–100 градусів, молоко, вазелін, вазелінову олію або ланолін. Такий широкий вибір розчинників дозволяє максимально ефективно використовувати властивості прополісу у різних фармацевтичних і косметичних препаратах.

1.2. Флавоноїди в прополісі: характеристика флавонів і флавонолів.

Флавоноїди — це одна з найважливіших біологічно активних складових прополісу, які відіграють ключову роль у його лікувальних властивостях. У прополісі їх виявлено понад 19 різновидів, і саме вони забезпечують значну частину його фармакологічної активності.

Ці сполуки — природні антиоксиданти, що захищають клітини організму від ушкоджень, спричинених вільними радикалами. Завдяки цьому флавоноїди уповільнюють процеси старіння, знижують ризик розвитку хронічних захворювань, зокрема серцево-судинних і онкологічних. Їхня здатність пригнічувати окисні процеси сприяє загальному оздоровленню організму.

Вони виявляють виражену протизапальну дію: вони гальмують утворення біологічно активних речовин, що провокують запалення, зменшують набряки й біль. Також вони мають антибактеріальні, противірусні й протигрибкові властивості, що значно підсилює антисептичний ефект прополісу. Цікаво, що флавоноїди можуть порушувати метаболізм мікроорганізмів, пригнічуючи їх ріст, але не спричиняючи розвитку стійких форм, як це часто буває з антибіотиками.

Крім того, флавоноїди зміцнюють капіляри, зменшують проникність і ламкість судин, покращують мікроциркуляцію. Вони також здатні стимулювати імунну систему, посилюючи захисні сили організму й сприяючи швидшому одужанню при різних захворюваннях.

Флавоноїди в прополісі — це не просто активні речовини, а невидимі диригенти складної симфонії зцілення, яку творить цей унікальний природний дар. Вони не діють на самоті: в їхньому оточенні — ефірні олії, органічні кислоти, рослинні бальзами, кожен з яких має свою роль. Та разом вони створюють гармонійну єдність, що перевершує суму своїх частин. Ця взаємодія — справжня синергія, в якій одна молекула посилює іншу, відлунюючи потужною хвилею лікувальної сили.

Через цю складну природню взаємодію прополіс виявляє себе не просто як набір активних інгредієнтів, а як живий організм, що відчуває, реагує і допомагає. Синтетичні аналоги, хоч і точні в формулі, не мають тієї живої, природної мудрості, яку несе флавоноїдний комплекс прополісу — мов у стародавньому рецепті, дбайливо складеному самою природою.

Флавоноїди — це серце прополісу, його пульс і ритм. Це розум його клітинної мови, його пам'ять і інстинкт самозахисту. Вони діють тонко, розумно, зважено — мов добрі лікарі, що не лише знімають симптоми, а шукають й усувають причину. Їхня робота відбувається на глибинах, які не видно неозброєному окові: там, де починаються запалення, де ховається біль, де згасає сила — флавоноїди несуть порядок, злагоду і оновлення.

Саме завдяки їм прополіс уже тисячоліттями залишається вірним союзником людства в боротьбі за здоров'я. І поки існуватиме бджола — цей маленький алхімік природи, що творить прополіс з нектару, смол і сонця — доти триватиме ця тиха, але могутня підтримка, дана людині самою природою.

Якщо дивитись на флавоноїди не в контексті їх ролей в прополісі, а з хімічної точки зору то флавоноїди належать до групи біологічно активних речовин поліфенольної природи, що мають загальну структурну формулу $C_6-C_3-C_6$. Їх назва походить від латинського слова *flavus*, що означає «жовтий», адже перші виявлені сполуки цього типу — кверцитрин (з кори дуба), рутин (з гречки та рути), робінін (з акації) — мали характерне жовтувате забарвлення.

Фізико-хімічні властивості флавоноїдів мають низку характерних особливостей. Вони є кристалічними речовинами, кожна з яких має свою температуру плавлення. До групи безбарвних представників належать флавани, катехіни, ізофлавани, флаванони, лейкоантоціанідини — вони утворюють прозорі кристали. Натомість флавори, флавоноли, халкони та аурони мають жовтувате або помаранчеве забарвлення. Антоціани цікаві тим,

що їхній колір змінюється залежно від кислотності середовища: в кислих умовах вони набувають червоного чи рожевого відтінку, а в лужних — синюватого або блакитного.

Агліконові форми флавоноїдів добре розчиняються в органічних розчинниках, таких як діетиловий ефір, ацетон чи спирти, але майже не розчиняються у воді. У той час як флавоноїдні глікозиди демонструють розчинність у гарячій воді та розведених спиртах. Варто також зазначити, що флаваноли, зокрема катехіни, мають оптичну активність. Катехін існує у чотирьох ізомерних формах, які відрізняються не лише кутом і напрямком оптичного обертання (наприклад, D- та L-катехіни, D- та L-епікатехіни), але й різною біологічною активністю.

Наприклад, лише L-епікатехін проявляє Р-вітамінну активність, тоді як інші ізомери її не мають. Флаванони та флаваноли — сполуки нестійкі, вони можуть легко змінюватися під дією окисників: зокрема, флаванони переходять у халкони, а флаваноли — у лейкоантоціанідини.

Флавоноїдні О-глікозиди здатні розщеплюватися в умовах кислотного, лужного або ферментного гідролізу. Наприклад, при обробці слабкими мінеральними кислотами (концентрацією від 0,1 до 1%) під час нагрівання, 3-О-глікозиди гідролізуються досить швидко. У той час як для розщеплення 7-О-глікозидів потрібне тривале нагрівання (кілька годин) з більш концентрованими кислотами — 5–10%. Проте в присутності лугів цей процес значно пришвидшується. Гідроліз С-глікозидів проводиться за допомогою так званої суміші Кіліані, яка складається з концентрованої хлороводневої кислоти та льодяної оцтової кислоти.

Біосинтез флавоноїдів відбувається за допомогою комбінованого механізму. А-кільце формується шляхом ацетатного циклу, тоді як В-кільце — через перетворення шикімової кислоти. Ця кислота за участю АТФ фосфорилується, перетворюючись на 5-фосфошикімову кислоту, яка, реагуючи з фосфоенолпіровиноградною кислотою, переходить у 3-

енолпірувілшикімат-5-фосфат, а далі — в хоризмову кислоту. У процесі внутрішньомолекулярного перегрупування хоризмова кислота трансформується у префенову кислоту.

Префенова кислота — ключовий метаболіт, з якого в подальшому утворюються флавоноїди, ароматичні амінокислоти, кумарини та інші сполуки поліфенольного характеру. Після амінування й одночасного декарбоксилювання префенової кислоти можуть синтезуватися фенілаланін або тирозин. Їхнє дезамінування, відповідно, призводить до утворення коричної та пара-кумарової кислот:

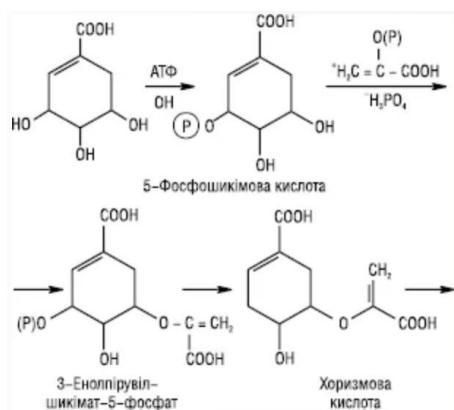


Рис. 1

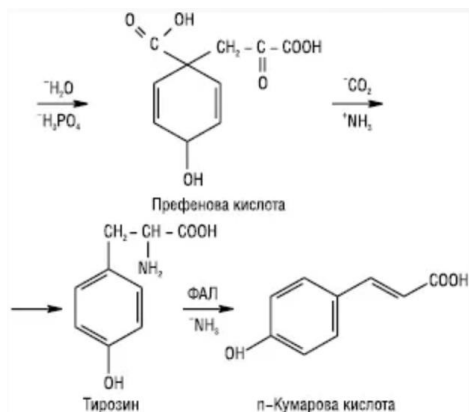


Рис. 2

Триоцтова кислота реагує з п-кумаровою кислотою. Внаслідок їх конденсації, циклізації та енолізації утворюється халкон.

Для добування флавоноїдів із рослинної сировини зазвичай застосовують нижчі спирти, зокрема етанол або метанол. Отриманий спиртовий екстракт концентрують до водної фази, після чого додають воду і здійснюють обробку хлороформом. Це дозволяє відокремити небажані супутні речовини, як-от ліпіди, хлорофіл, каротиноїди, воски, жирні олії

тощо. Очищений водний залишок далі піддають поетапному вилученню за допомогою розчинників зі зростаючою полярністю: діетиловий ефір, етилацетат, пропанол, бутанол. Таким способом отримують окремі фракції — аглікони, моносахариди, біозиди та тріозиди. Цей метод, заснований на поступовому підвищенні полярності розчинника, називають фракційним екстрагуванням.

Щоб розділити флавоноїди на окремі сполуки, застосовують колонкову хроматографію з використанням носіїв на зразок силікагелю, поліаміду або целюлози. Елюювання проводять за допомогою суміші хлороформу зі спиртом, поступово підвищуючи концентрацію спирту в розчині.

Для виявлення флавоноїдів існує характерна аналітична реакція — ціанідина проба, часто у варіанті за Сінодою. Принцип полягає у взаємодії металевого магнію з концентрованою хлороводневою кислотою, внаслідок чого відбувається відновлення і утворюються антоціанідинові сполуки.

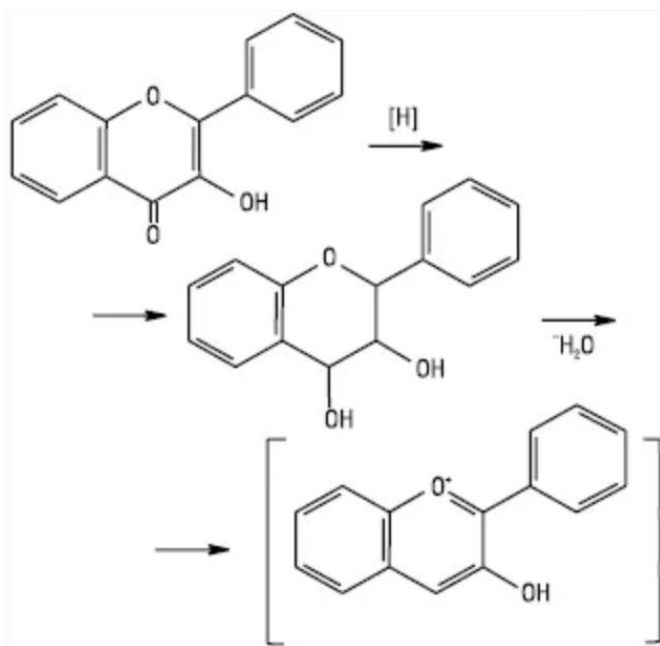


Рис. 3

Халкони та аурони ціанідинової реакції не дають, але з концентрованою хлоридною кислотою утворюють червоне забарвлення за рахунок утворення оксонієвих солей. При цьому глікозиди дельфінідину дають синьо-червоне забарвлення, ціанідину — яскраво-червоне, а пеларгонідину — оранжево-

червоне. Ізофлавіони, флавіони дають жовте забарвлення, іноді — червоне. Флаванони — від малинового до яскраво-червоного.

Основні методи виявлення флавоноїдів ґрунтуються на їх здатності вступати в характерні хімічні реакції, що супроводжуються утворенням забарвлених продуктів.

Таубек, наприклад, запропонував варіант реакції у присутності щавлевої кислоти, тоді як Вільсон використовував розчин борної та лимонної кислот у ацетоні. Варто зазначити, що флавіони, які не мають гідроксильної групи в положенні С-5, такої реакції не проявляють.

Взаємодія з п'ятихлористою сурмою (SbCl_5) у середовищі чотирихлористого вуглецю призводить до появи яскравих забарвлень — червоного або помаранчевого. Це пояснюється тим, що SbCl_5 функціонує як сильна кислота за типом Льюїса й викликає зміну кольору через ефект, схожий на той, який спричиняє сульфатна кислота. При цьому халкони забарвлюються у червоні та червоно-сині тони, флавіони — у жовті та оранжеві. Якщо в дигідрохалконах відсутній подвійний зв'язок між карбонільною групою та ароматичним кільцем, вони не вступають у цю реакцію.

Існує й реакція азосполучення. Флавоноїди, що мають вільну гідроксильну групу в положенні С-7, при взаємодії з діазотованим сульфаніламідом утворюють інтенсивно забарвлені азосполуки. Наприклад, флавіони, флавоноли й флавоноли при додаванні аміаку набувають помаранчевого кольору, а халкони з аурунами — червоно-пурпурного.

Ще одним способом виявлення є реакція з лужними розчинами. З формальної точки зору, сполуки без карбонільної групи (наприклад, катехіни, лейкоантоціанідини) або ті, де відсутній подвійний зв'язок між ОН- та СО-групами (як у флавононолів), не повинні забарвлюватись. Проте на практиці навіть ці речовини змінюють колір у лужному середовищі внаслідок побічних реакцій. Зокрема, катехіни дають жовто-червоне забарвлення через

утворення окиснених продуктів, бо дуже чутливі до дії кисню. Флаванони з лугами спочатку формують безбарвні або світло-жовті розчини, які згодом змінюють колір на насичено-жовтий чи червоний через їхнє перетворення в халкони. Халкони й аурони миттєво утворюють червоні або пурпурні розчини. У той час як флавори й флавоноли забарвлюються у жовтий, а полігідроксильовані флавоноли — у червоний або синій колір.

Для аналізу та розділення флавоноїдів широко застосовують методи паперової хроматографії (ПХ) і тонкошарової хроматографії (ТШХ). Під впливом ультрафіолетового випромінювання (довжина хвилі 360 нм) ці сполуки демонструють здатність до флуоресценції. Наприклад, флавори, флавонол-3-глікозиди, флаванони та халкони світяться темно-коричневими відтінками, тоді як флавоноли з їх похідними — жовтими або жовто-зеленими. Аури виявляються коричневим світінням, птерокарпани — блідо-блакитним, а куместани — яскраво-бірюзовим. Ізофлавори зазвичай залишаються невидимими під цим світлом. Для виявлення хроматограм застосовують спеціальні хромогенні реагенти, які дають характерне забарвлення — це можуть бути спиртові розчини лугів, натрію гідрокарбонат, хлорид алюмінію, аміачні пари тощо.

Для визначення кількості флавоноїдів запропоновано багато підходів: гравіметричний аналіз, титрування (зокрема потенціометричне в неводних середовищах або комплексонометричне), а також флуориметрія, полярографія, фотоколориметрія. Водночас, найбільше поширення набув спектрофотометричний метод. Його суть полягає у створенні кольорових комплексів з металевими іонами, утворенні азосполук або реакції з борною кислотою, після чого вимірюється оптична щільність у ультрафіолетовій частині спектра.

Щодо ролі флавоноїдів у рослинному організмі, науковці виділяють кілька ключових функцій. Зокрема, вони виконують роль антиоксидантів, беручи участь у процесах окиснення і відновлення. Завдяки здатності

поглинати ультрафіолетове випромінювання, ці сполуки також захищають хлорофіл від руйнування. Крім того, флавоноїди відіграють роль у заплідненні рослин. Їхнє вивчення викликає значний інтерес у наукових і медичних колах завдяки широкому спектру біологічної активності та низькому рівню токсичності.

Структура флавоноїдної молекули складається з двох фенольних фрагментів (кілець А і В), які з'єднані трьохвуглецевим ланцюгом. Ці кільця вважаються похідними від сполук фенілпропаноїдного ряду.

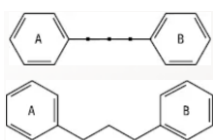


Рис 4

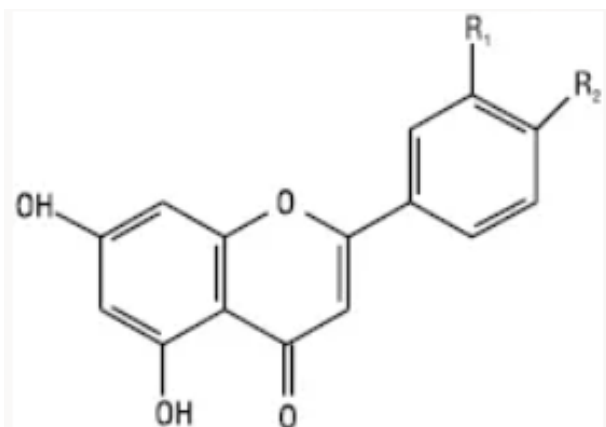
Класифікація флавоноїдів здійснюється на основі ступеня окиснення пропанового фрагмента, місця приєднання фенільного кільця В до пропанового фрагмента і величини окисного циклу. Група флавоноїдів містить 3 основні підгрупи, які відрізняються за місцем приєднання кільця В до пропанового фрагмента.

I підгрупа — власне флавоноїди, або справжні флавоноїди, або суфлавоноїди.

II підгрупа — ізофлавоноїди.

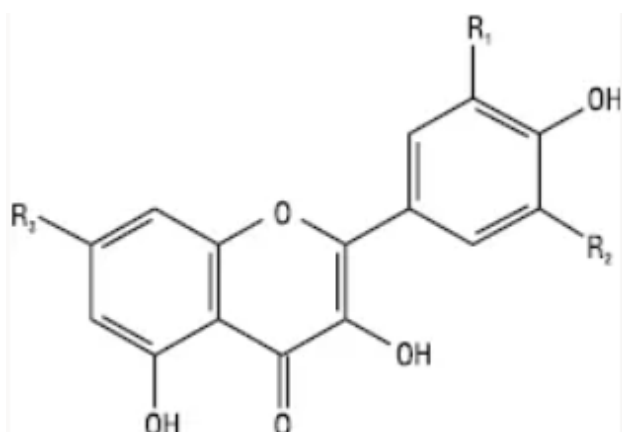
III підгрупа — неофлавоноїди.

Флаволи



Назва	R ₁	R ₂
Хризин	H	H
Апігенін	H	OH
Акацетин	H	OCH ₃
Лютеолін	OH	OH
Хризоееріол	OCH ₃	OH
Діосметин	OH	OCH ₃

Флавоноли



Назва	R ₁ C-3'	R ₂ C-5'	R ₃ C-7
Кемпферол	H	H	OH
Кверцетин	OH	H	OH
Ізорамнетин	OCH ₃	H	OH
Мірицетин	OH	OH	OH
Рамнетин	OH	H	OCH ₃

Частота і перевага заміщення будь-якого положення залежить від структури аглікону. Так, наприклад, у флавонів заміщення відбувається в положенні С-7, рідше — у С-3', С-4'; у С-глікозидів — у С-6, С-8. У флавонолів зазвичай заміщення відбувається в положенні С-3 або С-7. Цукрові залишки представлені D-глюкозою, D-галактозою, D-ксилозою, L-рамнозою, L-арабінозою, D-глюкуроною та D-галактуроною кислотами. Здебільшого у флавоноїдах глікозидах цукрові залишки зв'язані з агліконами напівацетальним зв'язком через атом кисню. О-глікозиди залежно від кількості та положення цукрових залишків можуть бути монозидами, біозидами, диглікозидами, тріозидами. Цукровий ланцюг може бути лінійним або розгалуженим.

1.3. Рутин як маркерний флавонол

Рутозид, або рутин (також відомий як кверцетин-3-О-рутинозид чи софорин), є глікозидом флавоноїду кверцетину й належить до сполук групи вітаміну Р. Він широко поширений у природі, зокрема в листках, плодах та квітках багатьох рослин, і має цінні біологічні властивості.

Вперше цю речовину було виділено в 1842 році з рослини рута запашна, звідки й походить його назва. Рутин став об'єктом дослідження через його здатність зміцнювати стінки капілярів, знижувати їх проникність і ламкість, а також підвищувати ефективність дії аскорбінової кислоти (вітаміну С).

Рутин являє собою дрібнокристалічний порошок зеленувато-жовтого кольору, без вираженого запаху та смаку. Він практично не розчиняється у воді, слабо розчинний в етанолі і майже не розчиняється у гарячому спирті, кислотних розчинах, ефірі, хлороформі, ацетоні та бензолі. Водночас добре розчиняється в лужних розчинах. Орієнтовно 1 грам рутину розчиняється в 8 літрах води або в 200 мл кип'яченої води, а також у 7 мл метанолу та в етилацетаті. Під дією рамнодіастази ця сполука піддається гідролізу, тоді як емульсин її не розщеплює. Температура плавлення становить приблизно 210

°C. Ультрафіолетове поглинання має максимуми на довжинах хвиль 259 і 362 нм.

Сьогодні рутин входить до складу низки лікарських засобів, які використовуються при захворюваннях, пов'язаних із порушенням судинної проникності, запаленнями, застудними станами тощо. Серед таких препаратів — Аскорутин, Антигрипін, Аеровіт, Комплівіт-Актив, Вобензим, Декамевіт, Ундевіт та інші. У фармакології рутин цінується за антиоксидантні, протизапальні та капілярозміцнювальні властивості, що робить його важливим компонентом у комплексному лікуванні та профілактиці.

Рутин, як і кверцитрин, є глікозидною формою флавоноїду кверцетину. Їхні хімічні структури майже ідентичні, основною різницею є тип приєднаного цукру та кількість гідроксильних груп у його складі. Завдяки подібним властивостям, обидві речовини активно застосовуються в медицині як засоби для зміцнення судин. Їх включають до складу численних полівітамінних комплексів та фітотерапевтичних препаратів.

Рутин як ліганд здатен утворювати комплекси з катіонами, сприяючи транспортуванню поживних елементів із ґрунтового середовища до клітин рослини. У людському організмі рутин приєднується до іонів Fe^{2+} , блокуючи їх взаємодію з пероксидом водню. Така реакція запобігає утворенню вільних радикалів, які здатні пошкоджувати клітини. Крім того, рутин проявляє антиоксидантну активність.

На додаток, встановлено, що в невеликих концентраціях рутин здатен пригнічувати активність судинно-ендотеліального фактора росту (VEGF), тобто виступати як інгібітор ангіогенезу — процесу утворення нових кровоносних судин. Це відкриває перспективи застосування рутина в терапії окремих видів злоякісних новоутворень.

Також дослідження на лабораторних мишах виявили у рутина опосередковану антидепресивну активність, пов'язану з впливом на

канабіноїдну систему. Зокрема, під час експериментів було відзначено посилення активності CB1-рецепторів і відповідних білків у мозковій тканині. Окрім цього, зафіксовано зростання експресії коактиватора PGC-1 α та білка SIRT1. Враховуючи його вплив на канабіноїдні, PPAR- γ та опіїдні рецептори, рутин може мати потенціал як багатофункціональний засіб для запобігання або лікування захворювань, пов'язаних із дисбалансом у регуляції цих сигнальних шляхів.

1.4. Огляд досліджень вмісту флавоноїдів у зразках прополісу різного походження

Отримання екстракту прополісу для мас-спектрометричного дактилоскопіювання

Процедуру проводять при температурі 30 °C, додаючи по 10 мл абсолютного етанолу (виробник Merck, Дармштадт, Німеччина) на кожні 3 грами необробленого прополісу.

Нерозчинні залишки видаляють шляхом фільтрації. Отримані етанольні витяжки поміщають у морозильну камеру при температурі –16 °C на ніч. Після охолодження проводять повторну фільтрацію за тієї ж температури з метою зниження вмісту воскових домішок у витяжках.

Отримання летких сполук із прополісу

Ароматичні речовини, що відповідають за характерний запах прополісу, становлять менше 1% від загальної маси, але відіграють важливу роль у його біологічній активності. Крім того, ці леткі сполуки можуть виконувати функцію запахових сигналів для медоносних бджіл під час збору смолистих речовин (Leonhardt et al., 2010).

Для їх вилучення застосовують кілька методів, зокрема: парову дистиляцію, гідродистиляцію за методом Клевенджера, комбіновану дистиляційно-екстракційну техніку (Лайкенс-Нікерсон), а також екстракцію розчинниками, включаючи ультразвукову й мікрохвильову обробку. Додатково використовують статичну або динамічну екстракцію у

надводному просторі, а також твердофазну мікроекстракцію. Обраний спосіб екстракції значною мірою впливає на якісний і кількісний склад летких компонентів (Banská, Popova & Trusheva, 2014).

У даному випадку описано один із найпоширеніших підходів — дистиляційно-екстракційний метод, згідно з публікацією Банкової та співавторів (1998). Загальні методи виділення летких речовин з продуктів бджільництва розглянуті у роботі Torto та колег (2013).

Заморожений прополіс витримують у морозильній камері при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом ночі. Після цього його подрібнюють до частинок розміром 10–80 мкм за допомогою кавомолки (див. розділ 3.1.1).

Відважте 3 г подрібненого прополісу, помістіть у круглодонну колбу об'ємом 100 мл, після чого долийте 80 мл дистильованої води.

У другу аналогічну колбу налейте 50 мл суміші н-пентану та діетилового ефіру у співвідношенні 1:1 за об'ємом, і охолодіть її у крижаній бані.

Проведіть перегонку на апараті Лайкенса-Нікерсона протягом 4 годин (схема наведена на рис. 3, за Queiroga et al., 2005).

По завершенні перегонки водну фазу відокремлюють за допомогою ділильної лійки, а органічну фазу зберігають у холодильнику до подальших маніпуляцій.

Водну фазу промивають 5 мл охолодженої суміші н-пентану та діетилового ефіру (1:1, об/об).

Органічну фазу осушують над безводним сульфатом натрію: додають 3 г речовини, струшують протягом 5 хвилин, після чого фільтрують через фільтрувальний папір. Осад промивають 1 мл крижаної суміші тих самих розчинників.

Розчинник видаляють за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску без нагрівання.

Отримані леткі компоненти можуть бути піддані подальшому аналізу за допомогою газової хроматографії (ГХ), газової хроматографії з мас-спектрометрією (ГХ-МС) або використані в біологічних дослідженнях.

Газохромато-мас-спектрометричне дослідження прополісу

Газова хроматографія, поєднана з мас-спектрометрією (ГХ-МС), належить до дефісних методів аналізу й широко використовується для дослідження складних природних сумішей, таких як прополіс. Цей метод забезпечує ефективне розділення індивідуальних сполук завдяки газовій хроматографії, а також дозволяє здійснювати точну ідентифікацію речовин за допомогою мас-спектрометрії. Завдяки цьому підходу можна сформувати детальний хімічний профіль прополісу, що має значення для його стандартизації, порівняльного аналізу та контролю якості.

Аналіз нелетких компонентів прополісу методом ГХ-МС

Оскільки значна частина біологічно активних речовин прополісу не є леткими за звичайних умов, перед газохроматографічним аналізом необхідно провести їх дериватизацію. Це дозволяє зробити сполуки більш леткими та менш полярними. Найчастіше для цього застосовують реагент N,O-біс(триметилсиліл)трифтороацетамід (BSTFA), який забезпечує утворення триметилсилільних похідних. Такі сполуки придатні для аналізу в режимі електронного удару методом ГХ-МС, як описано у працях Банкової та співавторів (1987) і Greenaway (1990).

Підготовка зразків

Сухі екстракти прополісу, одержані згідно з методикою, викладеною у пункті 3.1.1, піддають дериватизації. Для цього 5 мг екстракту змішують із 50 мкл сухого піридину, після чого додають 75 мкл BSTFA. Суміш нагрівають до 80 °C і витримують при цій температурі протягом 20 хвилин. Отриманий силільований екстракт далі використовують для газохромато-мас-спектрометричного аналізу.

Газохроматографічно-мас-спектрометричний аналіз

Для проведення ГХ-МС аналізу використовують відповідне обладнання, наприклад, газовий хроматограф Hewlett-Packard 5890 серії II Plus, що під'єднаний до мас-спектрометра Hewlett-Packard 5972, згідно з методикою, описаною Трушевою та співавт. (2011). Для розділення компонентів застосовують капілярну колонку типу HP5-MS завдовжки 30 метрів, з внутрішнім діаметром 0,25 мм і товщиною плівки 0,5 мкм. У разі потреби можна використовувати й інші колонки з подібними параметрами, залежно від мети дослідження. Температурна програма зазвичай починається з 60 °C і поступово підвищується до 300 °C зі швидкістю 5 °C за хвилину, з подальшим утриманням температури протягом 10 хвилин. Як газ-носіє використовуються гелій з витратою 0,8 мл/хв. Пропорція розподілу становить 1:10. Інжектор нагрівають до 280 °C, а температура зони розділу підтримується на рівні 300 °C. Іонізація здійснюється при напрузі 70 еВ. Для забезпечення достовірності результати аналізу повторюють у двох паралельних зразках. Умови аналізу можуть варіювати залежно від моделі приладу та необхідності оптимізації процесу розділення, як зазначено в роботі Isidorov та співавт. (2014).

ГХ-МС аналіз летких складників прополісу

Аналіз летких компонентів прополісу також проводять на газовому хроматографі Hewlett-Packard 5890 серії II Plus у парі з мас-спектрометричним детектором Hewlett-Packard 5972, як описано Банковою та співавт. (1998). У цьому випадку застосовується капілярна колонка типу SPB-1 завдовжки 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною плівки 0,25 мкм. За необхідності можуть бути використані інші подібні колонки. Температурний режим передбачає нагрівання від 40 до 280 °C зі швидкістю підвищення температури 6 °C/хв. Газом-носієм також є гелій з витратою 0,8 мл/хв. Пропорція розподілу підтримується на рівні 1:10. Інжектор нагрівається до 280 °C, а температура розділової зони – до 300 °C. Іонізація

здійснюється при напрузі 70 еВ. Аналіз кожного екстракту виконують у двох повторях для підвищення точності результатів. Варто враховувати, що умови газохроматографічного аналізу можуть коригуватись залежно від особливостей обладнання та завдань дослідження, як зазначено у роботах Cheng та ін. (2013), Kaškonienė та ін. (2014), а також Nunes & Guerreiro (2012).

LC-MS хімічне профілювання прополісу

Завдяки своїй відносно полярній природі, що зумовлена наявністю кількох гідроксильних груп у структурі молекул, складові прополісу добре піддаються аналізу за допомогою методів м'якої іонізації, сумісних з рідинною хроматографією. Саме тому ВЕРХ-ДАД і рідинна хроматографія в поєднанні з мас-спектрометрією (РХ-МС) є провідними методами для дослідження бальзамічної фракції прополісу (Sforcin & Bankova, 2011). Для структурної ідентифікації нових сполук ефективними є мас-спектрометричні дослідження з використанням електророзпилювальної іонізації (ESI-MS), як у режимі негативних (Falcão et al., 2010), так і позитивних іонів (Piccinelli et al., 2011).

Високоєфективна рідинна хроматографія залишається провідним методом розділення в аналізі природних речовин (Steinmann & Ganzera, 2011). Сучасні досягнення у сфері стаціонарних фаз і обладнання, здатного працювати під тиском до 1300 бар, ще більше зміцнюють позиції цього методу (Steinmann & Ganzera, 2011). Залежно від характеристик досліджуваних сполук можуть застосовуватися різні типи детекторів, серед яких для аналізу прополісу найчастіше використовуються DAD та мас-спектрометр.

Екстракція та LC-MS аналіз прополісу

Протягом останніх років застосування РХ-МС для якісного та кількісного аналізу компонентів прополісу набуває дедалі більшого поширення. Екстракцію здійснюють згідно з методикою, викладеною в

розділі 3.1.1. Отриманий сухий етанольний екстракт (10 мг) розчиняють у 1 мл 80% етанолу. Перед аналізом зразок фільтрують через нейлонову мембрану з розміром пор 0,2 мкм (Whatman). У наступному розділі детально описано параметри хроматографічного та мас-спектрометричного аналізу, які рекомендовано використовувати для дослідження прополісу.

Мас-спектрометричне дактилоскопіювання зразків прополісу методом електророзпилювальної іонізації (ESI-MS)

Проби прополісу готують згідно з методикою, описаною в розділі 3.1.1. Після цього етанол видаляють випарюванням на водяній бані при температурі 50 °C до повного висихання. Отриманий сухий екстракт розчиняють у 70% водно-метанольному розчині, у якому концентрація екстракту становить 50 нг/мл. До розчину додають 5 мкл амоніаку (гідроксид амонію).

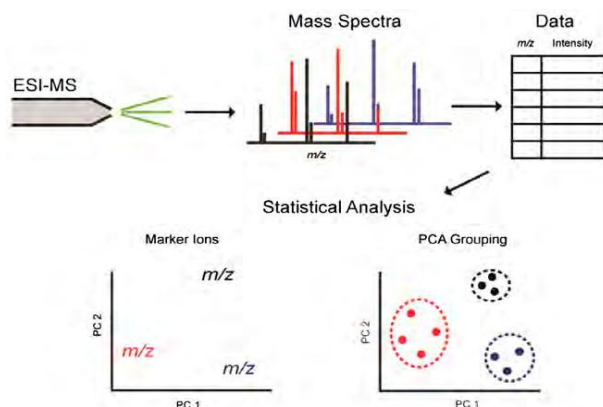
Підготовлений розчин вводиться безпосередньо у джерело іонізації гібридного мас-спектрометра високої роздільної здатності Micromass Q-TOF з точністю до 5 ppm. Введення здійснюється за допомогою шприцевого насоса (Harvard Apparatus) зі швидкістю подачі 15 мкл/хв. Основні параметри мас-спектрометра: напруга на капілярі — 3,0 кВ, напруга на конусі — 30 В.

Через високий вміст кислотних сполук у прополісі, найбільш інформативними є мас-спектри, отримані в режимі негативних іонів, оскільки саме вони забезпечують найкраще розділення зразків. Це спостереження було підтверджене під час подальших досліджень хімічного «відбитка пальця» прополісу, виконаних Sawaya, da Silva, Cunha та Marcucci (2011).

Для обробки отриманих даних застосовується простий хемометричний підхід — аналіз головних компонент (PCA), який реалізується у програмному забезпеченні Pirouette (версія 2.60, Infometrix, Woodinville, WA, США). Детальніші статистичні рекомендації наведено у BEEBOOK (Pirk et al., 2013). Для побудови моделей використовують два найбільш характерні іонні маркери кожного зразка, значення яких виражаються як інтенсивності

відповідних сигналів. Перед PCA дані проходять автоматичне масштабування.

Обробка отриманих даних дозволяє класифікувати зразки прополісу відповідно до їхнього географічного походження (Sawaya et al., 2004). Крім цього, тандемна мас-спектрометрія з використанням індукованої зіткненням дисоціації (CID) застосовується для структурної ідентифікації специфічних іонів-маркерів. Серед таких сполук ідентифіковано дикафеойлхінну кислоту, 3,5-дипреніл-4-гідроксикоричну кислоту, піноцембрін, хризин, 3-преніл-4-гідроксикоричну кислоту, 2,2-диметил-6-карбоксиетилен-2H-1-бензопіран і п-кумарову кислоту.



Схематичне зображення основних етапів ESI-MS дактилоскопії представлено на рисунку 4, який демонструє процес іонізації, реєстрації мас-зарядного відношення (m/z), інтенсивностей іонів, та подальший статистичний аналіз методом PCA з метою виявлення кластерів та маркерних іонів.

Застосування однакових методів екстракції та аналізу дозволяє проводити порівняння між зразками прополісу та рослинами, які є потенційними джерелами смолистих речовин. Це, у свою чергу, сприяє встановленню зв'язку між певними рослинами та відповідними типами прополісу, що характерні для конкретних регіонів (Marcucci, Sawaya, Custodio, Paulino, & Eberlin, 2008).

Мас-спектрометрична дактилоскопія є ефективним інструментом для детального аналізу хімічного складу прополісу, визначення потенційних

джерел рослинного походження та оцінки можливого терапевтичного потенціалу. Окрім електророзпилювальної іонізації (ESI), у подібних дослідженнях використовується також інноваційне джерело іонізації — легка звукова іонізація навколишнього середовища (EASI) (Sawaya et al., 2010). Через велику кількість іонів, що виявляються у кожному спектрі, застосування хемометричних підходів, зокрема аналізу головних компонент (PCA), є доцільним і часто необхідним. Отримані результати дозволяють не лише групувати подібні зразки та виділяти характерні іони-маркери, але й у певних випадках виявляти зв'язок між їхнім хімічним складом і біологічною активністю.

ЯМР-аналіз прополісу

З часу відкриття явища ядерного магнітного резонансу (ЯМР) ця методика набула широкого застосування як аналітичний інструмент у дослідницьких лабораторіях по всьому світу. ЯМР-спектроскопія є одним із провідних методів для дослідження молекулярної структури (Kwan & Huang, 2008). Також відомо, що цей метод ефективний для аналізу складних матриць, таких як рослинні екстракти, продукти харчування та біологічні рідини (Forseth & Schroeder, 2011). Зокрема, ЯМР все активніше застосовується в галузі контролю якості харчової продукції та натуральних речовин, хоча його потенціал ще не повністю реалізований. Висока інформативність ЯМР-спектрів і простота підготовки зразків роблять цей метод надзвичайно привабливим для оцінки складу продукції.

Однією з основних переваг ЯМР над іншими методами є можливість одночасного отримання як структурної, так і кількісної інформації про велику кількість хімічних сполук в межах одного вимірювання. Попри складність аналізу сумішей, ЯМР-спектроскопія є надзвичайно цінною з аналітичної точки зору (Lin & Shapiro, 1997).

Завдяки розвитку технологій, зокрема впровадженню спектрометрів з вищими магнітними полями, які забезпечують кращу чутливість і

спектральну роздільність, інтерес до 1D- та 2D-ЯМР у контексті рутинного аналізу складних систем значно зріс (Charlton, Farrington, & Brereton, 2002; Fan, 1996).

Аналіз сумішей методом ЯМР зазвичай здійснюється за двома підходами: (а) попереднє розділення компонентів суміші перед ЯМР-дослідженням або (б) безпосередній аналіз самої суміші. Перший підхід застосовується при потребі дослідити ізольовані компоненти, однак він не є предметом цього обговорення. Другий варіант дозволяє здійснити загальну характеристику суміші без додаткових процедур, окрім розчинення в дейтерованому розчиннику. Спектри, отримані таким чином, вважаються хімічними «відбитками пальців» аналізованої речовини. Враховуючи їхню складність, для обробки даних використовують методи попередньої обробки сигналів та багатовимірний статистичний аналіз, зокрема хемометричні підходи (Papotti, Bertelli, Plessi, & Rossi, 2010).

Підготовка зразків

Оскільки прополіс є твердим матеріалом, для його аналізу необхідно спочатку провести екстракцію з використанням 70% етанолу. У випадку безпосереднього аналізу екстракту в ЯМР-спектрах спостерігатимуться інтенсивні сигнали розчинника. Для їхнього усунення рекомендується видалити розчинник під дією слабкого потоку азоту при низькій температурі. Цей процес може виконуватись як у самій ЯМР-пробірці, так і за межами її, з подальшим перенесенням твердого залишку в об'єм обраного дейтерованого розчинника.

Вибір розчинника має критичне значення: використання D₂O призведе до втрати сигналів, пов'язаних із гідроксильними групами (спиртовими, фенольними, карбоксильними), які широко представлені в прополісі. Для збереження таких сигналів найкращим варіантом є застосування DMSO-d₆ (дейтерований диметилсульфоксид) (Papotti et al., 2010). Співвідношення між

кількістю екстракту та об'ємом розчинника визначається індивідуально для кожного зразка залежно від практичних умов.

Процедура підготовки зразка:

- Відібрати 1 мл етанольного екстракту прополісу (див. розділ 3.1) та випарити розчинник досуха при кімнатній температурі в потоці азоту.
- Розчинити сухий залишок у 0,5 мл DMSO-d₆.
- Додати 20 мкл тетраметилсилану (ТМС) як внутрішній стандарт.
- Провести ЯМР-дослідження без зволікань.

ЯМР-аналіз прополісу

Типовий ¹H ЯМР-спектр гідроалкогольного екстракту прополісу в ДМСО-d₆ представлений на рисунку 5. Існує велика кількість сигналів, присутніх у багатьох спектральних областях, особливо в області між 1 і 8 ppm.

З цієї причини проста інтерпретація такого спектрів рідко буває можливою. Тим не менш, для правильної інтерпретації результатів часто необхідне попереднє визначення основних сигналів. Таке визначення можна виконати, використовуючи дані, отримані з одновимірних ЯМР-експериментів, і порівнюючи їх з літературними даними або з даними, отриманими для чистих стандартних сполук. Остаточне правильне визначення можна отримати за допомогою найбільш інформативних двовимірних експериментів, таких як COSY, HSQC і HMBC. У таблиці 3 наведені дані про призначення деяких відомих компонентів прополісу. Приклад такого застосування наведено в роботі Bertelli, Papotti, Bortolotti, Marcazzan, and Plessi (2012).

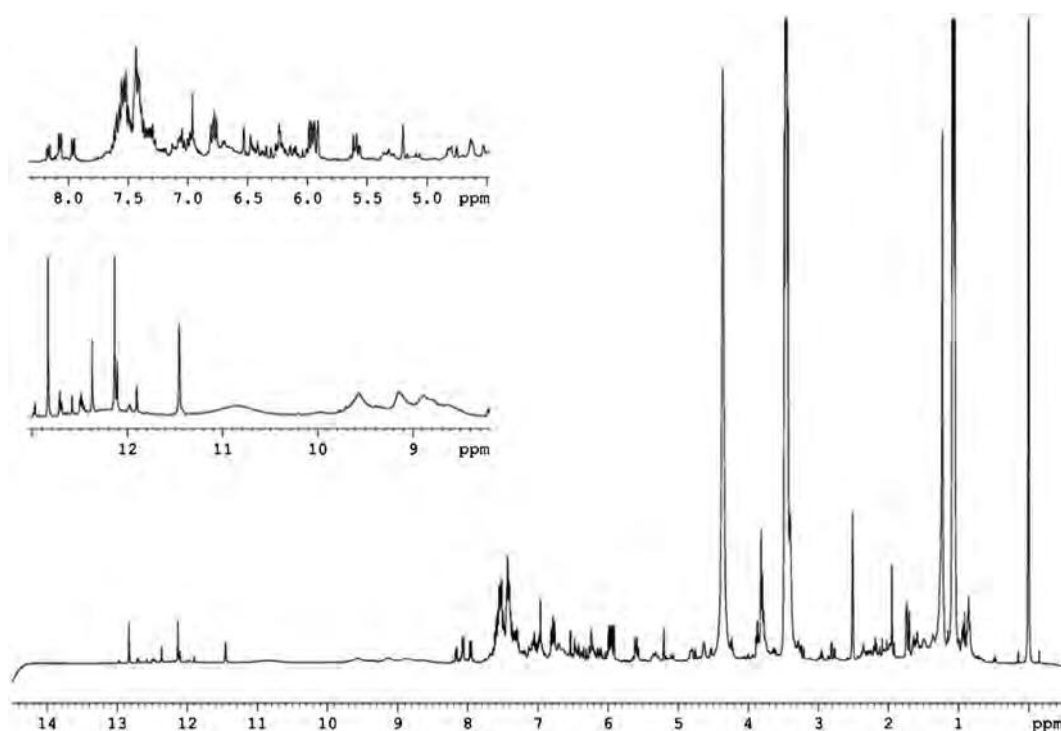


Рисунок 5. Типовий ^1H ЯМР спектр екстрактів прополісу в ДМСО- d_6 (Parotti et al., 2010).

Застосування методу ЯМР до зразків прополісу генерує дуже складні спектри, які необхідно обробити перед спектральними розрахунками і згодом проаналізувати хемометричними методами. Сигнали ЯМР можна використовувати як інтенсивність або інтегрувати.

Якщо ви вирішили використовувати спектри як інтенсивність, ідеальна попередня обробка повинна включати наступні кроки.

Відкалібруйте фазові спектри, встановивши сигнал стандартної сполуки ТМС на 0 ppm.

Кожен спектр генерує файл, що містить кілька тисяч точок даних, які відповідають часовому інтервалу, тобто кількості точок, отриманих і оцифрованих приладом уздовж спектральної ширини. Експортуйте ці файли та зберіть їх у набір даних.

Вирішуйте проблеми неспіввісності апостеріорно, використовуючи відповідне програмне забезпечення. Хорошим прикладом програмного забезпечення є програма Icoshift з відкритим вихідним кодом, що працює в

середовищі Matlab (Savorani, Tomasi, & Englesen, 2009). Хоча хімічний зсув ядра зазвичай вважається досить стабільним, необхідно враховувати, що деякі експериментальні фактори (рН, іонна сила, розчинник, неоднорідність поля, температура) можуть впливати на абсолютне і відносне положення ЯМР-сигналу, спричиняючи незначні або значні варіації хімічних зсувів по ширині спектра (Bertelli et al., 2012). Нерозв'язані піки в одному спектрі можуть бути розв'язані або більш перекриті в іншому спектрі. Це особливо важливо при аналізі складних сумішей, таких як екстракти прополісу, в яких присутня велика кількість подібних сполук.

Щоб зменшити кількість точок даних, не розглядайте всі спектральні області, позбавлені сигналів і сигналів розчинника, а згодом видаліть їх. Якщо кількість спектральних змінних залишається дуже великою, зменшіть її ще більше, знизивши спектральну роздільну здатність.

Статистичний аналіз спектрів ЯМР набору даних, що містить спектри, можна застосувати багатовимірні хемометричні методи. Існує низка багатовимірних методів, які можна використовувати для аналізу ЯМР-спектрів (Brereton, 2013):

Аналіз головних компонент (PCA): PCA є неконтрольованою технікою і дозволяє виразити велику частину загальної варіації даних за допомогою меншої кількості змінних, які можуть бути використані для графічного представлення популяції вибірок і для визначення найбільш значущого вихідного фактора(ів).

Дискримінантний аналіз (DA): Дискримінантний аналіз - це контрольована методика, яка використовується для визначення того, чи є дана класифікація справ на ряд груп є доречною. DA можна використовувати, наприклад, для перевірки певної кластеризації випадків, отриманих за допомогою неконтрольованого методу, такого як PCA або кластерний аналіз. Крім того, цей аналіз можна використовувати для класифікації невідомих зразків.

Дискримінантний аналіз методом найменших квадратів (PLS-DA): PLS-DA можна описати як регресійне розширення PCA, що дає максимальну коваріацію між вимірними даними (розподіл спектральних інтенсивностей ЯМР) і змінною відгуку (представленою в цьому випадку можливою класифікацією зразків).

Зазвичай, перед застосуванням одного з вищезгаданих методів до даних ЯМР-спектроскопії слід виконати певну статистичну попередню обробку. Найбільш корисними для покращення результатів є нормалізація, центрування середнього значення та автомасштабування. Важливо мати велику кількість зразків для перехресної перевірки отриманих моделей, а також набір тестів для зовнішньої перевірки. На сьогоднішній день існує не так багато опублікованих робіт, в яких ЯМР-спектроскопія використовувалася для дослідження екстрактів прополісу у вигляді сумішей. Менегеллі та ін. (2013) використовували ЯМР для ідентифікації деяких компонентів бразильського прополісу, використовуючи екстракти безпосередньо без будь-яких етапів ізоляції та очищення. Вони використовували одно- та двовимірний ЯМР для вивчення хімічного профілю зразків. (Менегеллі та ін., 2013).

Два різних дослідження повідомляють про використання ЯМР для порівняння різних видів прополісу. Куеста-Рубіо та ін. (2007) вивчали три різні сорти кубинського прополісу, використовуючи одновимірну ЯМР ^1H і ^{13}C як метод хімічного дактилоскопу, ВЕРХ-ПДА і ВЕРХ-МС. Аналогічна робота була опублікована в 2010 році тими ж авторами (Hernandez et al., 2010).

Watson та ін. (2006) використовували ЯМР та PCA для побудови моделі класифікації прополісу різного географічного походження. У цьому випадку автори використовували техніку бакетування. Ця методика полягає в поділі спектрів на різні невеликі області, після чого сигнали, присутні в кожній області, інтегруються, а результати по площі використовуються як

спектральні змінні. Отримана модель змогла класифікувати зразки з різних світу.

Rapotti та ін. (2010) опублікували статтю про використання ЯМР-спектроскопії для класифікації зразків прополісу за способом виробництва. У цій роботі автори використовували не тільки спектри ЯМР ^1H , але й ^1H - ^{13}C ЯМР ГМБХ. У першому випадку спектри використовували як інтенсивність, так і після інтегрування основних сигналів. У другому випадку об'єм сигналів двовимірних спектрів розраховувався шляхом додавання інтенсивності точок, розташованих у попередньо визначених вручну областях, що оточують кореляції, і всі спектри оброблялися з використанням однієї і тієї ж карти областей, що представляють інтерес. Для класифікації прополісу відповідно до його ЯМР-відбитків на різних наборах даних був використаний загальний дискримінантний аналіз (GDA) (Rapotti et al., 2010). Отже, ЯМР є дуже потужним інструментом для дослідження прополісу, а використання ЯМР у поєднанні з відповідною процедурою обробки даних та багатовимірними статистичними методами дозволяє розробити достатньо ефективні та адекватні моделі для класифікації прополісу. Цікаво відзначити, що найкращі результати зазвичай отримують при використанні ^1H ЯМР, який є найпростішим і найшвидшим методом.

Спектрофотометричний аналіз прополісу тихоокеанського типу

Оскільки основними компонентами та біологічно активними речовинами прополісу тихоокеанського типу є пренільовані флаванони, аналіз прополісу цього типу проводиться на основі їх кількісного визначення.

Екстракція прополісу. Процедура, описана в розділі 3.8.1.1, використовується для вилучення прополісу тихоокеанського типу.

Загальний вміст флаванонів. Для визначення загального вмісту флаванонів застосовують процедури, описані в розділі 3.8.1.3. Однак для калібрування використовують метанольні розчини суміші прополіну С-прополіну D 4:1 (мас./мас.) (Porova, Chen, Chen, Huang, & Bankova, 2010).

Критерії та стандарти якості

Прополіс - це бджолиний продукт рослинного походження, тому стандартизація прополісу подібна до стандартизації лікарських рослин: вона повинна ґрунтуватися на концентрації біологічно активних компонентів. Різні види прополісу характеризуються різними хімічними профілями, і, очевидно, не може бути єдиних хімічних критеріїв для стандартизації та контролю якості в цьому відношенні. Специфічні критерії, засновані на концентрації біологічно активних вторинних метаболітів, повинні бути сформульовані для окремих хімічних типів прополісу. Міжнародна медова комісія пропонує значення концентрації біологічно активних компонентів для двох найпоширеніших видів прополісу - європейського тополиного прополісу (тип Poplar) і бразильського зеленого прополісу (тип Baccharis), які визначаються, як описано в розділах 3.8.1 і 3.8.2.

Для бразильського зеленого прополісу ці показники визначаються бразильським законодавством (Sawaya et al., 2011).

Вимірювання загальної антиоксидантної здатності

Цей підхід ґрунтується на відновленні фосфомолібдену за допомогою прополісу та створенні зеленого фосфатного комплексу в кислих умовах. В експериментальній методиці об'єм зразка 0,3 мл змішували з розчином реагентів, що складався з 3 мл сполуки, яка містила 0,6 ммоль сірчаної кислоти, 28 ммоль фосфату натрію та 4 ммоль молібдату амонію. Реакційні пробірки інкубували при 95° С протягом 90 хвилин, а потім охолоджували до кімнатної температури. Поглинання кожного зразка оцінювали довжині хвилі 695 нм за допомогою спектрофотометра (LABOMED, INC).

Аналіз мінералів

Вміст різних елементів (кальцію, заліза, калію, магнію, марганцю, натрію, фосфору, стронцію та цинку) у зразках прополісу було проаналізовано за допомогою оптичного спектрометра. Зразки піддавали гомогенізації, причому проби відбирали у вихідному та зневодненому станах,

після чого проводили сушіння та подальший аналіз вмісту Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K, Sr та Zn. Після того, як зразки були подрібнені в порошок після висушування, 0,5 г кожного зразка поміщали в пробірку об'ємом 50 мл і додавали 5 мл азотної кислоти. Зразки поміщали під годинникове скло і піддавали нагріванню в сушильній шафі при 50° С протягом 2 год, після чого температуру підвищували до 90° С протягом 30 хв. Після охолодження до температури навколишнього середовища додавали 2 мл перекису водню. Потім зразки піддавали подальшому циклу нагрівання тривалістю 10 хв при температурі 90° С, після чого температуру підвищували до 120° С протягом 30 хв. Після цього зразки розводили 30 мл дистильованої води. За допомогою термостата визначали

Підготовлені зразки прополісу аналізували на вміст мінералів за допомогою оптико-емісійного спектрометра з індуктивно-зв'язаною плазмою (iCAP) відповідно до рекомендацій виробника.

Загальний вміст фенолів

Метод Фоліна-Чіокалтеу є найбільш широко використовуваним для спектрофотометричного кількісного визначення загальних фенолів (Waterman and Mole, 1994). Метод був застосований до прополісу (Bonvehí et al., 1994; Bonvehí and Coll, 1994, 2000; Woisky and Salatino, 1998) з використанням галової кислоти як референтної сполуки для калібрування. Однак галова кислота є незначним компонентом прополісу. Вона міститься переважно в тропічних зразках (Велика та ін., 2000) і рідко присутня в зразках тополиного типу. Тому здавалося розумним протестувати інші сполуки як еталони для калібрування. Ані кавова, ані галова кислоти не виявилися придатними референтними сполуками через встановлений низький рівень відновлення - 48 і 51%, відповідно. Ми припустили, що принаймні однією з причин низького відновлення є наявність великої кількості флаванонів і дигідрофлавонолів у прополісі тополиного типу. Дійсно, коли загальний вміст фенолів у модельній суміші флаванонів і

дигідрофлавонолів визначали за методом Фоліна-Чіокальтеу з використанням кавової кислоти для калібрування, вилучення становило лише 34%. Очевидно, що для коректного аналізу прополісу тополиного типу необхідна інша референтна сполука для калібрування. Враховуючи хімічний склад зразків, суміш флаванону і флавонолу виявилася корисною альтернативою фенольним кислотам. Попередні експерименти показали, що суміш піноцембрину і галангіну в пропорції 2:1 забезпечує прийнятні результати (86% вилучення).

Аналіз зразків прополісу та верифікація результатів методом ВЕРХ

Хімічний профіль екстрактів прополісу тополиного може бути охарактеризований наступними параметрами: загальний вміст флавонів і флавонолів, загальний вміст флаванонів і дигідрофлавонолів, загальний вміст фенолів. Спектрофотометричні методи, використані в цій роботі для кількісного визначення цих класів сполук, показали достатню точність і прецизійність при тестуванні на модельних сумішах (табл. 3). Далі була проведена перевірка цих результатів на реальних зразках.

Для цього кількісні результати, отримані спектрофотометричними методами, порівнювали з результатами, отриманими за допомогою ВЕРХ-аналізу тих самих зразків. Передбачалося, що, хоча методом ВЕРХ було визначено лише обмежену кількість фенольних сполук, саме вони є основними компонентами у зразках (понад 90% від загальної кількості), і порівняння між двома наборами результатів буде прийнятним та інформативним. Загалом, результати, отримані двома методами (табл. 4), продемонстрували задовільну узгодженість, що було підтверджено за допомогою t-критерію Стьюдента. У більшості випадків значення флавонів і флаванонів, визначені методом ВЕРХ, були нижчими, ніж ті, що були отримані спектрофотометричним методом. Причиною, ймовірно, було те, що деякі другорядні компоненти відповідного типу (наприклад, апігенін, кверцетин, кемпферид тощо) не були кількісно визначені методом ВЕРХ. З

іншого боку, спектрофотометричний підхід забезпечив дещо нижчу кількість загальних фенолів, ніж було визначено методом ВЕРХ. Було зроблено припущення, що співвідношення компонентів в еталонній суміші піноцембрін:галангін (2:1) не було однаково придатним для всіх зразків, коли відносна кількість флавонів/флаванонів/інших фенолів у зразку варіювалася в дуже широкому діапазоні. Подальші варіації співвідношення піноцембрину і галангину в еталонній суміші виявилися неефективними, оскільки, покращуючи результати для певного зразка, вони могли призвести до погіршення результатів для іншого зразка. Маючи два набори результатів (отриманих спектрофотометричним методом і методом ВЕРХ), було цікаво перевірити кореляцію між складом (кількістю), визначеним кожним методом, і антибактеріальною активністю проти *Staphylococcus aureus* (Банкова та ін., 2003, неопубліковані результати). Статистичні дані показали подібні значення коефіцієнта кореляції для вмісту фенолів і МІК ($r^2 = 0,4648$ за спектрофотометрією; $r^2 = 0,4348$ за ВЕРХ), а також для вмісту флавонів/флаванонолів і МІК ($r^2 = 0,6414$ за спектрофотометрією; $r^2 = 0,6694$ за ВЕРХ). Спостерігається достовірна різниця між коефіцієнтами кореляції для вмісту флаванонів/дигідрофлаванонолів та МІК ($r^2 = 0,0064$ за спектрофотометрією; $r^2 = 0,0154$ за ВЕРХ). Незважаючи на недоліки, запропонована комбінація спектрофотометричних процедур видається дуже корисною для рутинних аналізів через простоту, хорошу повторюваність і прийнятну точність. Спроби досягти вищої точності вимагають складніших і дорожчих процедур та приладів. Робота буде продовжена з використанням валідованих методів для аналізу комерційних зразків прополісу.

РОЗДІЛ 2.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Відбір зразків прополісу для досліджень.

Одним із найбільш поширених та практичних способів збирання прополісу в умовах пасічного господарства є метод механічного зіскрібання. У ході свого дослідження я скористалась саме цим методом, оскільки він широко застосовується бджолярами на практиці і дозволяє отримати достатню кількість матеріалу для подальших аналітичних досліджень.

Процедура полягає в тому, що прополіс зіскрібують із поверхонь вулика, на яких він природно накопичується впродовж сезону. Зокрема, це можуть бути краї та бокові частини рамок, верхні та нижні планки, внутрішні стінки вуликових корпусів, а також дно. Такий підхід, згідно з літературними джерелами (Ellis & Hepburn, 2003; Krell, 1996), є традиційним і доволі ефективним, адже дає змогу зібрати значну масу прополісу без потреби у спеціалізованому обладнанні.

Найчастіше збирання зіскрібків здійснюється наприкінці активного бджільницького сезону, коли підготовка вуликів до зими передбачає їхнє очищення і дезінфекцію. Саме в цей період зручно збирати зразки для досліджень, оскільки концентрація прополісу в конструктивних елементах вулика є максимальною.

Однак, при такому способі відбору зразків слід брати до уваги кілька важливих факторів. По-перше, прополіс, зібраний зіскрібанням, часто є сумішшю речовин, накопичених за кілька сезонів. Це ускладнює визначення точного часу формування зразка, а отже, й контроль за його свіжістю. По-друге, на даний момент залишається відкритим питання впливу тривалості зберігання прополісу у вулику на його фізико-хімічні та біологічні властивості. Деякі дослідники припускають, що з часом активність біологічно важливих компонентів, зокрема антимікробних сполук, може зменшуватись. Проте достовірних експериментальних даних з цього питання

наразі недостатньо, тому, на мою думку, подальші дослідження у цьому напрямку є доцільними й актуальними.

Таким чином, зіскрібки з вуликів залишаються зручним та продуктивним способом збору прополісу, який широко застосовується на практиці, проте вимагає обережного підходу при інтерпретації результатів досліджень, зважаючи на можливі зміни складу зразків з часом.

2.2. Характеристика зразків прополісу.

Зразок 1

Вологість: 0,1064

Значення досить низьке, що свідчить про добру стабільність зразка та низький ризик мікробіологічного псування.

Розчинні та нерозчинні тверді речовини в етанолі: 84,56%

Високий вміст твердих речовин, які екстрагуються етанолом, вказує на високу концентрацію біологічно активних сполук, таких як флавоноїди, фенольні кислоти тощо.

pH: 4,98

Кисле середовище характерне для прополісу; це значення є типовим і може сприяти його антимікробній активності.

Електропровідність: 1,2 мСм/см

Помірне значення, що відображає наявність розчинних мінералів та електролітів.

Зольність: 2,5%

Наявність золи свідчить про мінеральний склад зразка; значення в межах норми.

Вміст воску: 40,01%

Середній вміст воску, характерний для натурального прополісу. Цей рівень воску не заважає його подальшому екстрагуванню або використанню.

Відновлювальна здатність: 85,7%

Високе значення, яке вказує на добру антиоксидантну активність зразка.

Загальна характеристика:

Зразок 1 — добре збалансований за всіма показниками. Має високий вміст біоактивних сполук та антиоксидантну активність, середній вміст воску і нормальну вологість. Ймовірно, це якісний зразок для подальших досліджень і практичного використання.

Зразок 2

Вологість: 0,1165

Найвищий рівень серед трьох зразків, але все ще в межах допустимого. Проте злегка підвищена вологість може впливати на стабільність при зберіганні.

Розчинні та нерозчинні тверді речовини в етанолі: 64,34%

Найнижчий показник серед усіх зразків. Це може свідчити про менший вміст флавоноїдів і фенольних речовин — можливо, внаслідок меншої біоактивності або розведення.

pH: 5,11

Найвище значення pH — менш кисле середовище, що може зменшити антибактеріальну дію.

Електропровідність: 1,3 мСм/см

Найвище значення електропровідності серед зразків, що може свідчити про більший вміст розчинних мінеральних солей.

Зольність: 2,9%

Найбільший вміст золи — знову ж таки, підтверджує більшу концентрацію мінералів.

Вміст воску: 5,96%

Дуже низький вміст воску. Це може бути наслідком очищення або особливості збирання. Такий зразок зручніший для екстрагування.

Відновлювальна здатність: 84,2%

Трохи нижча, ніж у інших зразків, але все ще свідчить про добру антиоксидантну активність.

Загальна характеристика:

Зразок 2 має найнижчий вміст воску, що спрощує його обробку, але при цьому містить найменше етанольнорозчинних речовин. Його мінеральний склад злегка вищий, але потенційна біоактивність може бути нижчою. Це може бути зразок із нижчою терапевтичною цінністю або такий, що зібраний із використанням інших умов. Зразок 3

Вологість: 0,0978

Найнижча вологість — ідеальний показник для зберігання та зменшення ризику мікробного забруднення.

Розчинні та нерозчинні тверді речовини в етанолі: 75,01%

Хороший показник, хоча трохи нижчий, ніж у Зразка 1. Можна припустити достатній вміст біоактивних речовин.

pH: 4,61

Найбільш кислий зразок, що може свідчити про вищу антимікробну активність.

Електропровідність: 1,1 мСм/см

Найнижче значення серед зразків — менше розчинних солей.

Зольність: 2,6%

Середній показник — свідчить про звичайний мінеральний вміст.

Вміст воску: 70,8%

Дуже високий вміст воску, що може ускладнювати екстракцію та обробку. Ймовірно, зразок містить багато воскових домішок, які зменшують концентрацію активних речовин на одиницю маси.

Відновлювальна здатність: 86,4%

Найвищий показник — чудова антиоксидантна активність.

Загальна характеристика:

Зразок 3 має найвищу антиоксидантну активність і найнижчий рівень вологи, що є позитивними факторами. Однак надзвичайно високий вміст воску може ускладнити його обробку та знизити ефективність при прямому використанні.

Цей зразок потребує додаткового очищення перед використанням у фармацевтичних або косметичних цілях.

2.3. Методика підготовки проб (екстракція).

Прополіс (охоłodжений) натерти; зразок 1 г розчиняли в 30 мл 70% етанолу в колбі на 50 мл і залишали на 24 години при кімнатній температурі. Потім фільтрували, і процедуру повторювали. Попередні експерименти показали, що третя екстракція за тих самих умов не потрібна, оскільки останній екстракт дав негативну реакцію на 5% хлориду заліза, таким чином підтверджуючи, що дві послідовні екстракції забезпечують повне відновлення фенольних сполук. Екстракти фільтрували (паперовий фільтр Filtrak 388), об'єднували та розбавляли до 100 мл 70% етанолом у мірній колбі. Потім їх аналізували для визначення загального вмісту флаванону та дигідрофлавонолу.

Аликвоту (3 мл) того ж розчину перенесли в мірну колбу і розбавили до 50 мл метанолом. Він був додатково проаналізований для визначення загального вмісту фенолів, а також флавонів і флавонолів.

2.4. Метод визначення вмісту флавонів і флавонолів.

Спектрофотометричні методи дуже корисні для швидкого і простого кількісного визначення фенольних сполук у прополісі та для рутинного контролю препаратів прополісу. Існують ефективні, точні та надійні спектрофотометричні методи, які спрямовані на

визначення загального вмісту флавоноїдів або загального вмісту фенолів. Феноли і флавоноїди є основними складовими і найважливішими біологічно активними інгредієнтами декількох видів прополісу, і спектрофотометричні методи корисні для їх швидкого визначення.

Спектрофотометричний аналіз прополісу тополиного типу

Аналіз прополісу тополиного полягає в спектрофотометричному кількісному визначенні наступних груп фенольних сполук: (Попова та ін.,

2004): флаволи і флавоноли; флаванони і дигідрофлавоноли; загальні фенольні сполуки.

Загальний вміст флавонолів і флавонолів. Загальний вміст флавонолів і флавонолів вимірюють за допомогою спектрофотометричного аналізу, заснованого на комплексоутворенні з хлоридом алюмінію (Bonvehí & Coll, 1994). Метанольні розчини галангіну або рутину використовують як еталони для отримання калібрувального графіка. Аналітичну процедуру для вимірювання загальної кількості флавонолів та флавонолів виконують наступним чином:

Для побудови калібрувального графіка з рутином як стандартом приготуйте стандартний розчин галангіну 32 мкг/мл, розчинивши 3,2 мг у метанолі в мірній колбі на 100 мл.

Приготуйте серію робочих стандартних розчинів шляхом відповідного розведення основного стандартного розчину метанолом (у мірних колбах), щоб отримати діапазон концентрацій 4-32 мкг/мл (16,0; 8,0; 6,4; 4,0 мкг/мл).

Змішайте по 1 мл кожного з еталонних розчинів, 10 мл метанолу і 0,5 мл 5% $AlCl_3$ в метанолі (об'ємні) в мірній колбі і доведіть об'єм метанолом до 25 мл.

Залиште суміш на 30 хвилин і виміряйте поглинання при 425 нм.

Для бланку використовуйте 1 мл метанолу замість розчину галангіну в аналогічній процедурі.

Для отримання регресії слід побудувати графік залежності поглинання від концентрації (Міжнародна конвенція з гармонізації, [ICH], 1996).

Виконайте розрахунок за допомогою калібрувального рівняння для галангіну (крок 7):

$$c = aA + b$$

де c - концентрація, мг/мл; A - поглинання; a - нахил калібрувального графіка; b - перехват калібрувального графіка.

З цього значення за формулою вираховується відсотковий вміст флавонів і флавонолів у зразку прополісу:

$$P = c \times 100 \times 50 \times 100\%$$

де Р - відсотковий вміст у сирому прополісі; с - концентрація, мг/мл; $\bar{M}$ - середнє значення маси трьох паралельних зразків прополісу, відібраних для аналізу, мг.

У випадках, коли передбачено додаткове розведення розчину Б, це має бути відображено в рівнянні.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Додано (мг/мл)	Знайдено (мг/мл)	Відновлення (%)	СК ^(a) (мг/мл)	N ^(b) (%)	ВСК ^(c) (%)
0,0088	0,0096	109	0,0006	3	6,2
0,0177	0,0180	102	0,0010	10	5,5
0,0354	0,0360	102	0,0010	3	2,8

Примітки:

(a) СК — стандартне відхилення.

(b) N — кількість повторень.

(c) ВСК — відносне стандартне відхилення (у %).

Згідно з результатами валідації методу спектрофотометричного визначення флавонів і флавонолів у прополісі, можна зробити низку важливих висновків щодо точності та прецизійності проведених вимірювань.

1. Точність

Точність методу оцінювалася за показником відновлення (%), який варіювався в межах:

- 109% для концентрації 0,0088 мг/мл
- 102% для концентрацій 0,0177 та 0,0354 мг/мл

Ці значення знаходяться у прийнятних межах для аналітичного контролю якості, особливо враховуючи, що відновлення в діапазоні 90–110% є загальновизнаним критерієм відповідності для біологічних та рослинних матриць. Перевищення 100% може бути пов'язане з наявністю фонових речовин у матриці зразка або з дещо завищеною чутливістю реакції з хлоридом алюмінію.

2. Повторюваність

Показник стандартного відхилення (SD) залишався в межах:

- 0,0006–0,001 мг/мл

Відносне стандартне відхилення (RSD) становило:

- від 2,8% до 6,2%

Це свідчить про високу повторюваність методу при різних концентраціях. Значення RSD менше 10% вказують на добру внутрішньолабораторну відтворюваність і стабільність результатів.

3. Загальна оцінка методики

Отримані результати підтверджують, що застосована спектрофотометрична методика визначення загального вмісту флавонів і флавонолів у прополісі є:

- Надійною, оскільки демонструє добру точність і стабільну повторюваність;
- Придатною для кількісного аналізу, оскільки добре відтворює концентрації у діапазоні 0,0088–0,0354 мг/мл;
- Зручною для практичного використання, оскільки базується на доступних реагентах і проста у виконанні.

Таким чином, дана методика може ефективно використовуватись у дослідженнях якісного складу прополісу та у виробничому контролі при стандартизації продукту.

ВИСНОВКИ

У результаті виконаної дипломної роботи, присвяченої вивченню методів кількісного визначення біологічно активних компонентів прополісу, зокрема флавонів і флавонолів, було досягнуто поставленої мети — обґрунтовано ефективність спектрофотометричного методу для хімічної стандартизації прополісу.

Опрацьовано літературні джерела щодо хімічного складу прополісу, особливо його флавоноїдної фракції, яка визначає основну біологічну активність продукту. Встановлено, що серед флавоноїдів особливе місце посідають флавони та флавоноли, які проявляють антиоксидантну, протизапальну та антимікробну дію.

У межах експериментальної частини проведено екстракцію зразків прополісу, визначено вміст флавонів і флавонолів спектрофотометричним методом із використанням рутину як стандарту. За допомогою побудованого калібрувального графіка визначено концентрації сполук у трьох зразках прополісу, що дозволило порівняти їх за вмістом флавоноїдів. Найвищий вміст флавонів і флавонолів зафіксовано у зразку №1, що свідчить про вищу біологічну активність порівняно з іншими зразками.

Таким чином, результати дослідження підтверджують доцільність використання спектрофотометричного методу в аналітичній практиці для контролю якості та стандартизації прополісу за вмістом флавоноїдних сполук. Це сприяє покращенню фармацевтичної ефективності препаратів на основі прополісу та підвищенню безпеки для споживачів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal Leandro Moreira, Luís G. Dias, José Alberto Pereira, Leticia Estevinho * CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal
2. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.) August 2011 [Food Research International](#) 44(7):2217-2221 DOI:[10.1016/j.foodres.2010.11.001](#)
3. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity Article in Food and Chemical Toxicology · September 2012 DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.056 · Source: PubMed
4. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research ISSN: 0021-8839 (Print) 2078-6913 (Online) Journal homepage: [www.tandfonline.com/journals/tjar20](#)
5. The physicochemical characteristics and antioxidant attributes of propolis sourced from various regions in Iran [https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100603](#) Received 31 August 2024; Received in revised form 17 October 2024; Accepted 9 November 2024 Applied Food Research 4 (2024) 100603 Available online 12 November 2024 2772-5022/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license ([http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/](#)).
6. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск, 1990;
7. Литвиненко В.И. Природные флавоноиды. — Х., 1995;
8. Cody V., Middleton E. Jr., Harborne J.B. & Beretz A. (eds.) — Progress in Clinical and Biological Research, 1988. — Vol. 280, Plant Flavonoids in

Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties, Alan R. Liss, Inc.;

9. Cushman M., Nagarathnam D., Burg D.L. & Geahlen R.L. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues // J. Med. Chem. — 1991. — 34;

10. Kuppusamy U.R., Khod H.E. & Das, N.P. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase // Biochem. Pharmacol. — 1990. — № 40.