

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Martina Delač i Karla Tomljanović
**Primjena *fingerprinta* fenolnih spojeva u karakterizaciji i
dokazivanju autentičnosti propolisa**

Zagreb, 2021.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Centru za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Zorana Zorića, višeg znanstvenog suradnika, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.“

POPIS KRATICA

2,5-DHBA	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
3,4-DHBA	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid
AOA	antioksidacijska aktivnost
AOK	antioksidacijski kapacitet
APCI	kemijska ionizacija atmosferskog tlaka
APPI	fotoionizacija pod atmosferskim tlakom
CA	kafeinska kiselina
CAPE	fenetil ester kavene kiseline
ChA	klorogenska kiselina
CinA	cinamična kiselina
DHBA	dihidroksibenzojeva kiselina
EGKG	epigalokatehin galat
EK	epikatehin
EKG	epikatehin galat
ESI	elektrosprej ionizacija
FA	ferulinska kiselina
GA	galna kiselina
GC	plinska kromatografija
GC-MS	plinska kromatografija s masenim detektorom
GC-MS/MS	vezani sustav plinske kromatografije – tandemski maseni spektrometrija
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPLC-ESI-MS/MS	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s tandem masenim detektorom i elektrosprej-ionizacijom
K-3-G	kamferol-3- <i>o</i> -glukozid
K-3-R	kamferol-3-rutinozid
LOD	granica detekcije
LOQ	granica kvantifikacije
MS	maseni spektrometrija

MS/MS	tandemska masena spektrometrija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
ORAC	kapacitet apsorpcije kisikovih radikala
<i>p</i> CA	<i>p</i> -kumarinska kiselina
<i>p</i> HBA	4-hidroksibenzojeva kiselina
ProCA	protokatehinska kiselina
Q-3-G	kvercetin-3- β -d-glukozid
QA	kinična kiselina
RSD	relativno standardno odstupanje
Rt	retencijsko vrijeme
SA	siringinska kiselina
SinA	sinapinska kiselina
Trans-CinA	trans-cinamična kiselina
UPLC	ultravisokoučinkovita tekućinska kromatografija
UV	ultraljubičasto
VA	vanilinska kiselina

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	2
3. TEORIJSKI DIO.....	3
3.1. Propolis.....	3
3.1.1. Kemijski sastav	3
3.1.2. Utjecaj na zdravlje	4
3.2. Fenolni spojevi	5
3.2.1. Fenolni spojevi u propolisu.....	6
3.2.1.1. Karakterizacija propolisa	7
3.2.2. Metode izolacije fenolnih spojeva	8
3.2.2.1. Masena spektrometrija u analizi fenolnih spojeva	9
3.3. Standardizacija kvalitete propolisa.....	10
3.3.1. Kriteriji kvalitete propolisa.....	10
3.3.2. Patvorenje propolisa	13
3.4. Validacija analitičkih metoda.....	14
3.4.1. Parametri validacije	15
3.4.1.1. Specifičnost / Selektivnost	16
3.4.1.2. Linearnost.....	16
3.4.1.3. Preciznost.....	16
3.4.1.4. Područje.....	17
3.4.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	17
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. Materijali	19
4.1.1. Uzorci	19
4.1.3. Aparatura i pribor.....	20
4.1.3. Kemikalije i standardi	21
4.2. Metode.....	22
4.2.1. Ekstrakcija.....	22
4.2.2. Validacija metode	23
4.2.2.1. Selektivnost.....	23
4.2.2.2. Linearnost.....	23
4.2.2.3. Preciznost.....	24
4.2.2.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	24

4.2.3. Određivanje i karakterizacija fenolnih spojeva u propolisu primjenom LC-MS/MS	24
4.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	27
4.2.5. Statistička obrada podataka.....	28
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
5.1. Validacija metode.....	29
5.2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva u propolisu primjenom LC-MS/MS.....	39
5.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	49
6. ZAKLJUČCI.....	53
7. ZAHVALE	54
8. LITERATURA.....	55
9. SAŽETAK	64
10. SUMMARY	65

1. UVOD

Sama riječ *propolis* dolazi od grčkih riječi *pro* (ispred, na ulazu) i *polis* (grad, zajednica) (Gavanji i Larki, 2017; Santos i sur., 2019). Ime je dobio po tome što ima protektivnu ulogu, odnosno pčele ga primarno koriste za izradu i popravke košnice. Propolis je ljepljiva supstanca koju proizvode medonosne pčele tako što skupljaju biljne izlučevine, vosak i pelud te ih miješaju s vlastitom slinom (Ristivojević i sur., 2015a). Postoji duga tradicija primjene propolisa u terapijske svrhe zbog dokazanih pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje kao što su antibakterijsko, antivirusno, antioksidativno i antikancerogeno (Pobiega i sur., 2017; Ishida i sur., 2018; Osés i sur., 2020). Ti se učinci pripisuju sinergističkim djelovanjem fenolnih spojeva u propolisu. Dosadašnja istraživanja su pokazala da propolis sadrži značajne količine flavonoida i fenolnih kiselina, ali da koncentracije pojedinačnih polifenola variraju (Hernandez-Zarante i sur., 2018; Osés i sur., 2020). Glavni faktor koji na to utječe je biljna flora područja s kojeg je prikupljen, no postoje i sekundarni čimbenici poput klime i godišnjeg doba (Nascimento i sur., 2019). Zato fenolni *fingerprint* propolisa može dati uvid u njegovo zemljopisno podrijetlo i kakvoću te potencijalno zamijeniti dostupne kemijske metode za kontrolu kvalitete propolisa koje daju ograničene informacije (Bankova i sur., 2019).

S obzirom da je propolis složena smjesa promjenjivog sastava, potrebne su točne i precizne tehnike za analizu uzoraka. Jedna od njih je vezani sustav tekućinske kromatografije – tandemska masena spektrometrija (LC-MS/MS). Zbog nedostatnih literaturnih podataka o provjerenoj metodi za određivanje profila polifenola u propolisu primjenom LC-MS/MS, potrebno je razviti validiranu metodu. Uspostavljanjem korelacije između fenolnog *fingerprinta*, podrijetla i antioksidacijske aktivnosti propolisa moguće je preciznije dokazati kvalitetu i autentičnost nedovoljno istraženog sirovog propolisa te komercijalnih etanolnih ekstrakata propolisa s područja Republike Hrvatske.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Propolis, otkriven još davnih dana u starom Egiptu, danas je zbog svog bogatog fenolnog sastava pronašao svoju važnost i upotrebu u kozmetičkoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Sve više se spominje njegovo protuupalno, antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje i općenito pozitivni učinci na ljudski organizam.

Međutim, fenolni sastav propolisa može znatno varirati ovisno o lokaciji prikupljanja, vrsti pčela, načinu ishrane pčela, temperaturi, sezoni prikupljanja i uvjetima skladištenja. Kako je u dostupnoj literaturi vrlo malo podataka o fenolnom profilu propolisa na području Hrvatske i razlikama u sastavu i antioksidacijskoj aktivnosti s obzirom na regiju, ciljevi ovog rada bili su:

1. Razvijanje i validacija metode za određivanje fenolnih spojeva u propolisu
2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva primjenom LC-MS/MS u svrhu karakterizacije uzoraka
3. Dokazivanje autentičnosti propolisa primjenom *fingerprinta* fenolnih spojeva
4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti propolisa iz različitih regija Hrvatske

3. TEORIJSKI DIO

3.1. Propolis

Propolis je prirodna smolasta smjesa nalik na vosak koju produciraju pčele te je sastavni materijal za izradu košnica. Pčele donjim čeljustima sakupljaju propolis, uglavnom iz smola i pupova cvijeća i drveća, ali i drugih dijelova biljaka kao što su lišće i plodovi. Nose ih u košnicu u peludnim vrećicama koje se nalaze na njihovim stražnjim nogama (Santos i sur., 2019). Putem, odnosno tijekom sakupljanja i modeliranja smole, pčele također dodaju tvari endogenog podrijetla poput sline i enzima (Wagh, 2013; Ahangari i sur., 2018; Özkök i sur., 2021).

Propolis se često naziva pčelinjim ljepilom jer služi kao vezivna tvar za pričvršćivanje saća, popunjavanje rupa, saniranje pukotina ili sužavanje ulaza u košnicu u periodu zimskih mjeseci, a koristi se i za oblaganje trupova usmrćenih neprijatelja poput osa ili uginulih pčela koji nisu mogli biti izneseni iz košnice (slika 1) (Salatino i sur., 2011; Gavanji i Larki, 2017).



Slika 1. Pčela propolisom mumificira trup insekta (izvor: Sweetree Honey)

Propolis ima antiseptička svojstva kojima se štite zalihe meda i ličinke od infekcija mikroorganizmima te smanjuje rast mikroba na zidovima košnice (Paspuleti i sur., 2017). To je vrlo bitno jer pčele žive združeno u skučenom prostoru pa je visok rizik od zaraze koja se lako može pretvoriti u epidemiju unutar košnice. Također, zbog svoje nepropusnosti, propolis je barijera koja sprječava strujanje zraka i gubitak vode zadržavajući vlagu i stalnu temperaturu unutar košnice (Kuropatnicki i sur., 2013; Paspuleti i sur., 2017; Ahangari i sur., 2018).

3.1.1. Kemijski sastav

U propolisu je dosad identificirano preko 300 kemijskih struktura (Elnakady i sur., 2017; Ahangari i sur., 2018) što ga čini vrlo kompleksnim materijom. Sastav mu je varijabilan, ali generalno se može reći da se sastoji od smole (50 %), voska (30 %), eteričnih ulja (10 %), peluda (5 %) i drugih komponenata kao što su aminokiseline, šećeri, fenolne kiseline, esteri,

flavonoidi, terpeni i aromatski spojevi (Paspuleti i sur., 2017; Ahangari i sur., 2018; Özkök i sur., 2021). Propolis sadrži i neke vitamine poput B₁, B₂, B₆, C i E te minerale poput magnezija, kalcija, kalija, natrija, bakra, cinka, mangana i željeza (Paspuleti i sur., 2017).

Kemijski sastav propolisa ovisi o biljnoj flori i tkivima, sezoni, klimi, godišnjem dobu i genetskoj raznolikosti unutar košnice (Ristivojević i sur., 2015; Nascimento i sur., 2019; Özer, 2020). Neki autori, uz te faktore, navode još i količinu sunčeve svjetlosti, količinu vlage i mineralni sastav tla (Pobiega i sur., 2017). To znači da su komponente koje ulaze u sastav propolisa različitog podrijetla i nekonstantnog omjera što čini propolis svake pojedine košnice unikatnim.

3.1.2. Utjecaj na zdravlje

Postoji cijeli niz istraživanja koja opravdavaju široku primjenu propolisa i njegovu rastuću popularnost. Dokazano je da posjeduje višeznačajne biološke aktivnosti: protuupalnu, antibakterijsku (protiv bakterija *Echerichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*), antifungalnu (protiv gljivica *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* te sprječavanje produkcije aflatoksina gljivice *Aspergillus flavus*), antivirusnu (protiv virusa HIV-a i *Herpes simplex*), antihipertenzivnu, antikancerogenu i antioksidativnu (Wang i sur., 2016; Gavanji i Larki, 2017; Paspuleti i sur., 2017; Pobiega i sur., 2017; Batista i sur., 2018; de Oliveira Reis i sur., 2019; Osés i sur., 2020). Pozitivni učinci primjene propolisa na ljudski organizam bili su predmetom raznih istraživanja čiji je pregled prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Pozitivni učinci primjene propolisa na pojedine organe i organske sustave.

<i>organ/organski sustav</i>	<i>učinak</i>	<i>izvor</i>
gastrointestinalni	inhibicija rasta i prijanjanje trofozoita, izlječenje gljadize, ublažavanje simptoma ulkusa	Paulino i sur., 2015; da Silva i sur., 2018
reprodukcijski (ženski)	inhibicija rasta gljivica uzročnika vaginalnih infekcija, liječenje kroničnog vaginitisa	Capoci i sur., 2015; Santos Bezerra i sur., 2015
imunološki	poticanje produkcije antitijela, aktivacija makrofaga, inhibicija oslobađanja histamina	Al-Hariri, 2019
kardiovaskularni	regulacija lipidnih profila u serumu i smanjenje povećanja tjelesne mase, smanjenje aterogenih indeksa	Braakhuis, 2019; Oršolić i sur., 2019
neurološki	sudjelovanje u zaštiti ozljede mozga nakon cerebralne ishemije	Braakhuis, 2019

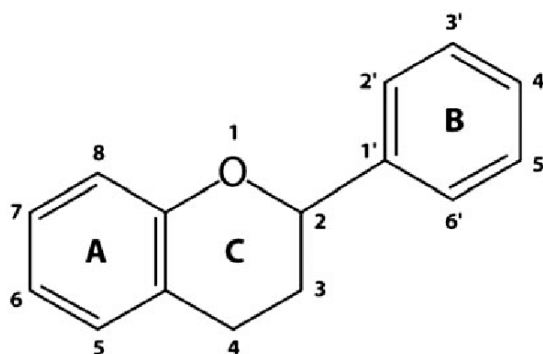
usna šupljina	smanjenje razvoja bakterijskih plakova i patogeni koji uzrokuju parodontitis, učinkovitost u zacjeljivanju kirurških rana	Jain i sur., 2014
jetra	uzrokuje pozitivne biokemijske i histopatološke promjene kod bezalkoholne bolesti masne jetre	Kismet i sur., 2017
koža	poticanje sinteze kolagena, učinkovitost u liječenju vulgarnih akni, promicanje zacjeljivanja i zatvaranja rana, smanjenje stvaranja slobodnih radikala kod opekline	Ali i sur., 2015; Dos Santos Thomazelli i sur., 2017; Braakhuis, 2019

Iz navedenih istraživanja može se zaključiti da primjena propolisa kao dodatka prehrani može značajno doprinijeti ljudskom zdravlju i prevenciji različitih oboljenja. Osim što ima važnu ulogu u prevenciji, ublažavanju i liječenju akutnih i kroničnih stanja, ovaj moćni proizvod zbog svog specifičnog sastava sve više se koristi i u održavanju vitalnosti.

3.2. Fenolni spojevi

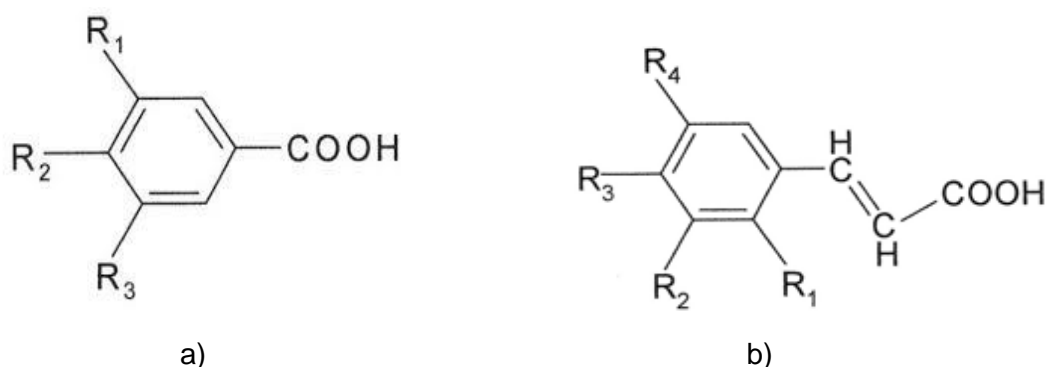
Fenolni spojevi su jedni od najvažnijih i najrasprostranjenijih sekundarnih biljnih metabolita te su prisutni u svim biljnim tkivima. To je grupa spojeva koja posjeduje jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten. Do sada je otkriveno više od 8000 pojedinačnih fenolnih spojeva različitih molekulskih struktura, a prema jednoj od najosnovnijih podjela razlikujemo flavonoide i neflavonoide (de la Rosa i sur., 2019).

Flavonoidi sadrže dva benzenska prstena povezana propanskim lancem (slika 2) te se mogu podijeliti u šest glavnih skupina: flavoni, flavanoni, flavan-3-oli, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Međusobno se razlikuju prema stupnju hidroksilacije i metilacije prstenova A i B. U prirodi ih najčešće nalazimo u obliku glikozida, odnosno vezane na šećere (D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakuronska kiselina i rutinoza), a rjeđe dolaze u obliku aglikona (de la Rosa i sur., 2019).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (de la Rosa i sur., 2019).

Skupina neflavonoida uključuje fenolne spojeve s vrlo raznolikom kemijskom strukturom, od kojih većina ima manje kompleksnu molekulsku strukturu i masu od flavonoida, ali postoje i neki spojevi složene strukture i velike molekulske mase. Jednu od najvažnijih skupina neflavonoida čine fenolne kiseline koje sadrže jednu fenilnu skupinu supstituiranu jednom karboksilnom skupinom i jednom ili više –OH skupina (slika 3). Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve, hidroksicimetne i druge hidroksifenilne kiseline, razlikujući se prema duljini lanca koji sadrži karboksilnu skupinu. Hidroksibenzojeve kiseline se rijetko nalaze u slobodnom obliku, odnosno često su glikozilirane ili vezane za strukturne komponente biljnih stanica (de la Rosa i sur., 2019).



Slika 3. Osnovna struktura: a) derivata hidroksibenzojeve kiseline i b) derivata hidroksicimetne kiseline (Ignat i sur., 2011)

3.2.1. Fenolni spojevi u propolisu

Kako bi se utvrdio biološki značaj propolisa, postoje dva glavna pristupa analizi njegovog djelovanja: 1) analiza pojedinačnih fenolnih spojeva i njihovog bioaktivnog djelovanja i 2) analiza ukupnog ekstrakta propolisa u kojem su prisutni svi fenolni spojevi.

Različite skupine polifenolnih spojeva imaju vrlo važnu ulogu u određivanju biološke aktivnosti propolisa, ali neka istraživanja su pokazala da interakcije, odnosno sinergija između različitih spojeva imaju važniju ulogu od pojedinačne količine polifenolnih spojeva (Dezmirean i sur., 2017). Brojna istraživanja su pokazala da propolis sadrži niz različitih fenolnih spojeva, uključujući i fenolne kiseline i flavonoide. Od flavonoida u propolisu su određeni flavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavoni i flavan-3-oli. Većina identificiranih spojeva propolisa prisutna je u obliku aglikona jer tijekom sakupljanja propolisa pčele luče β -glukozidazu koja uklanja ostatke šećera glikoziliranih flavonoida prisutnih u biljkama (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2017).

Flavanoni su jedna od najznačajnijih skupina, a u propolisu je identificirano više od 40 različitih struktura. Pinocebrin, pinostrobin, naringenin, sakuranetin i izosakuranetin određeni su kao najrasprostranjeniji flavanoni u europskom, kineskom, netropskom azijskom i sjevernoameričkom propolisu (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2017).

Iako su manje zastupljeni od flavanona, **flavoni** i **flavonoli** također se često nalaze u propolisu od kojih su najzastupljeniji apigenin, krizin, tektokrizin, galangin, kvercetin, kamferol, luteolin, rutin (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2017; Saftić, 2018).

Prisutnost **izoflavnona** u europskom propolisu je vrlo rijetka, međutim spojevi iz ove skupine (daidzein, formononetin, vestiton) pronađeni su u crvenom brazilskom propolisu, vjerojatno podrijetlom iz mahunarki.

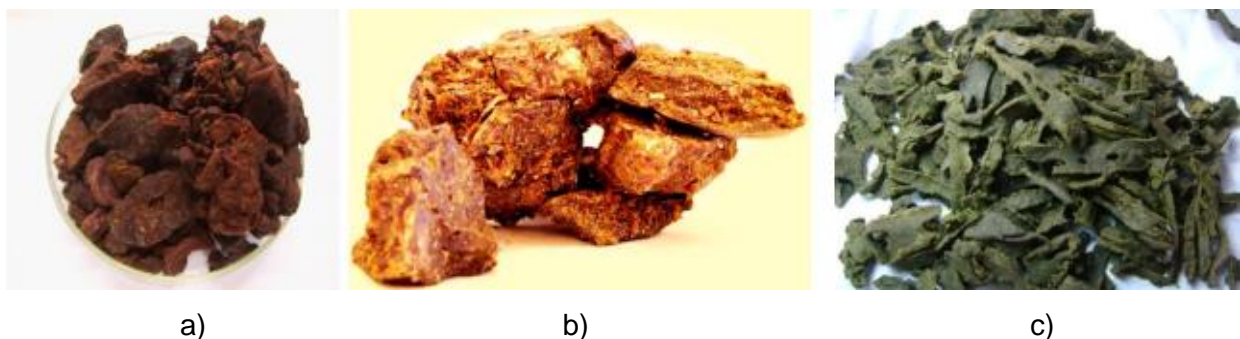
Spojevi iz skupine **flavan-3-ola** u propolisu nisu kvantificirani u značajnijim koncentracijama, no prema rezultatima Saftić (2018) iz ove skupine flavonoida kvantificirane su manje količine katehina, epikatehina, epigalokatehina i epigalokatehin galata.

Fenolne kiseline propolisa obuhvaćaju hidroksibenzojeve (galna kiselina, protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina, *p*-hidroksinezojeva kiselina) i hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska kiselina, cinamična kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina, izoferulinska kiselina i *trans*-cinamična kiselina (Escriche i Juan-Borras, 2018; Gardini i sur., 2018; Saftić, 2018).

Od ostalih fenolnih komponenti u nekim geografskim područjima mogu biti prisutni stilbeni, liganani i kumarini, iako je njihova pojava u propolisu zapravo vrlo rijetka (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2017). Međutim, fenolni sastav među uzorcima se može razlikovati s obzirom na lokaciju uzgoja i izvoru kojeg pčele koriste.

3.2.1.1. Karakterizacija propolisa

Uzimajući u obzir botaničko i geografsko podrijetlo te kemijski profil, propolis se može primarno podijeliti u nekoliko najčešćih tipova: propolis topole (europski), brazilski i pacifički propolis. Uz navedene, još su opisani mediteranski tip, *Magnifera indica* tip, aspenski tip te miješani tipovi (Saftić, 2018). Primarna uočljiva razlika među različitim tipovima propolisa je boja. Ona je uglavnom smeđa, no može varirati od zelene, crvene do crne boje, ovisno o izvoru smole u blizini košnice. Slika 4 prikazuje neke vrste propolisa.



Slika 4. Razlike u boji i morfologiji između različitih tipova propolisa: brazilski crveni propolis (a), topolin propolis (b) i brazilski zeleni propolis (c). (izvor: Healthy with honey)

Na europskom kontinentu najznačajniji je propolis topole (tzv. „poplar“ tip) koji se izrađuje od vrsta iz roda *Populus*, najčešće je to crna topola (*Populus nigra*). Zbog intenzivnog razvoja kromatografskih metoda i njihove primjene u kemijskoj karakterizaciji propolisa, topolin propolis se dodatno može podijeliti na podtipove: narančasti propolis (Pobiega i sur., 2017) koji je najdominantniji u Europi, plavi propolis, a neki znanstvenici ističu i zeleni propolis (Chasset i sur., 2016). Za svaki tip i podtip karakteristična je količina i vrsta polifenolnih spojeva koji se ujedno koriste kao biomarkeri za njihovo razlikovanje (Pobiega i sur., 2017). Europski tip propolisa obilježava visoka koncentracija fenolnih kiselina i njihovih estera te različitih flavonoida. Od flavonoida se posebno ističu pinocembrin, krizin, galangin, pinobanksin-3-O-acetat i pinobanksin koji su ujedno sekundarni metaboliti crne topole. Kod brazilskog tipa propolisa uočen je drugačiji fenolni sastav i njega karakterizira visok sadržaj artepilina C, *p*-kumarinske kiselina, drupanina i dihidroksicimetnih kiselina. Fenolni spojevi u brazilskom tipu dolaze od vrste *Baccharis dracunculifolia* (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2017; Saftić, 2018).

3.2.2. Metode izolacije fenolnih spojeva

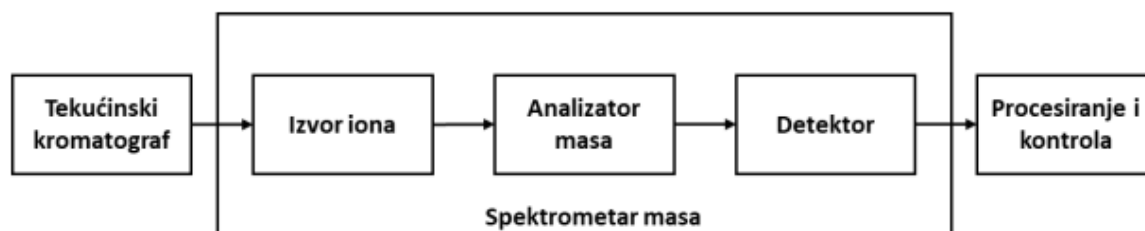
Unatoč brojnim isprobanim metodama izolacije fenolnih komponenti, neke metode su češće korištene od drugih, što zbog jednostavnosti, što zbog vjerodostojnijih rezultata. Jednostavnije metode analize fenolnog profila temelje se na spektrofotometrijskoj metodi gdje je moguće brzo i kvantitativno odrediti ukupne fenolne sastavnice propolisa, zbog čega je ova metoda danas korištena za rutinsku kontrolu propolisa. Spektrofotometrijskom metodom dobiva se sadržaj ukupnih fenola, no kompletna karakterizacija aktivnih spojeva propolisa zahtijeva njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Kromatografske tehnike poput plinske kromatografije (eng. „Gas chromatography“, GC) te visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (eng. „High-performance liquid chromatography“, HPLC) osiguravaju i identifikaciju i kvantifikaciju ukupnih, kao i pojedinačnih fenolnih spojeva. Budući da fenolne komponente dolaze u obliku aglikona te kao glikolizirani i estrificirani spojevi, važno je selektirati i razvijati adekvatne metode određivanja koje će omogućiti njihovu učinkovitu separaciju i identifikaciju. Detekcija polifenola se uglavnom vrši pomoću ultraljubičaste (UV) apsorpcije, a u novije vrijeme za rutinsku analizu i standardizaciju propolisa koristi se masena spektrometrija (MS), kao i kombinacija iste s UV detektorima ili tehnikom nuklearne magnetske rezonancije (Falcao i sur., 2013; Galeotti i sur., 2018). S obzirom da je propolis smjesa koja nema konstantan sastav te zahtijeva analizu svakog pojedinog uzorka, potrebne su brze i precizne metode. MS/MS sustav omogućava detaljnu i brzu analizu flavonoida i fenolnih kiselina te se tom metodom može uspješno odrediti i potvrditi kvaliteta i autentičnost proizvoda.

Iz tog razloga je razvijen LC-ESI-MS/MS sustav (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s tandem masenim detektorom i elektrosprej-ionizacijom) koji omogućava odabir

prekursor iona i fragmentaciju svakog produkta razdvajanja HPLC sustavom. Ovom metodom moguće je preciznije odrediti biološko podrijetlo propolisa i osigurati visoku razinu u kontroli kvalitete (Falcao i sur., 2013).

3.2.2.1. Masena spektrometrija u analizi fenolnih spojeva

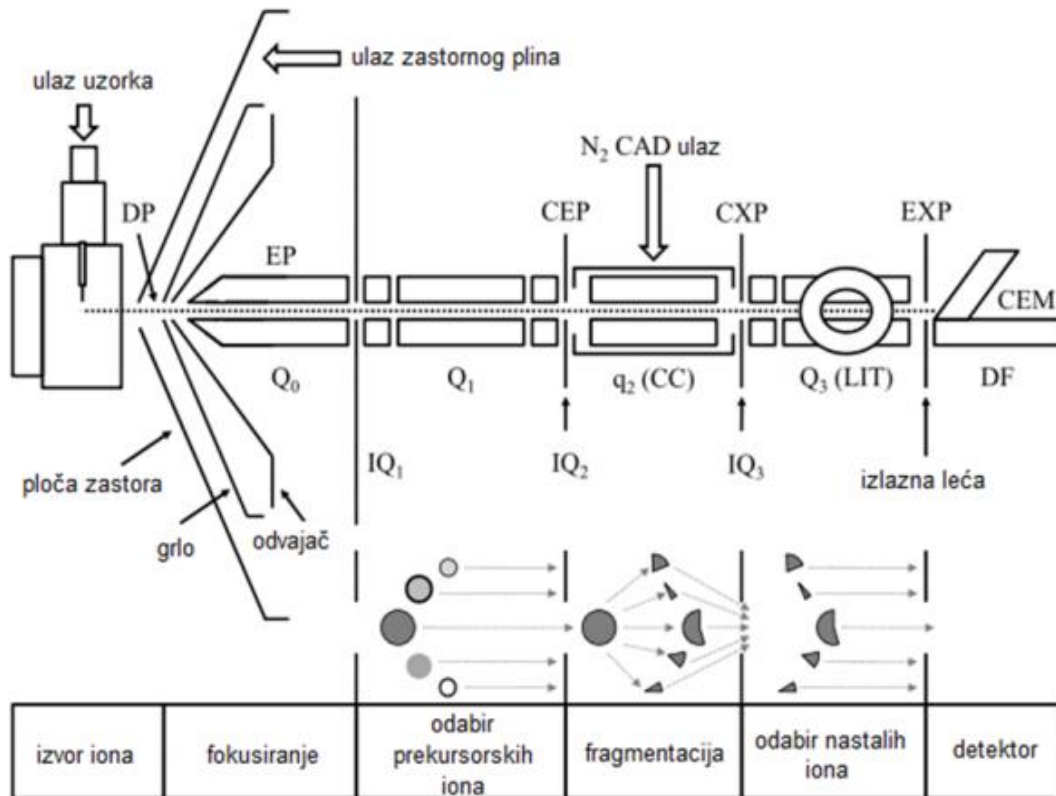
Osnovni princip MS je stvaranje iona iz anorganskih ili organskih spojeva određenom metodom za separaciju tih iona na temelju odnosa njihove mase i naboja (m/z), te identifikacija i kvantitativna analiza (Gross, 2004). Masena spektrometrija najčešće se kombinira s tekućinskom kromatografijom (LC-MS ili LC-MS/MS), gdje se izvor iona analita nalazi u otopini ili s plinskom kromatografijom (GC-MS ili GC-MS/MS). Tekućinski kromatograf i maseni spektrometar mogu biti povezani međuspojem koji omogućuje otparavanje tekuće faze, ionizaciju neutralnih molekula analita te njihovo uvođenje u analizator spektrometra (Cindrić i sur., 2009). Pojednostavljena blok shema vezanog sustava prikazana je na slici 5.



Slika 5. Blok shema vezanog sustava LC-MS (Kovač, 2020)

Uzorak se uvodi u obliku kapljica u ionizator koji mogu biti različitih izvedbi: ionizacija kroz elektrosprejni ionizator (ESI), kemijska ionizacija pod atmosferskim tlakom (APCI) i fotoionizacija pod atmosferskim tlakom (APPI) (de Hoffmann i Stroobant, 2007). Uzorak zatim dolazi do analizatora, dijela spektrometra koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Parametri koji definiraju i karakteriziraju analizator masa su snaga razlučivanja, točnost mjerenja mase, područje mjerenja mase i brzina snimanja spektra (Cindrić i sur., 2009). Snaga razlučivanja je zapravo djelotvornost odvajanja iona koje imaju vrlo male razlike u masi (Murray i sur., 2013). Točnost se odnosi na sposobnost spektrometra masa da odredi molekulsku masu što bliže onoj stvarnoj, dok je područje mjerenja raspon između donje i gornje granice koja se može odrediti. Brzina snimanja spektra se odnosi na brzinu snimanja zadanog raspona masa u masenim jedinicama po sekundi te se izražava kao Dalton po sekundi (Da/s). Jedan od najzastupljenijih analizatora je kvadrupol koji se sastoji od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane gdje jedan par pri tome ima pozitivni, a drugi negativni naboj (Cindrić i sur., 2009). Ioni nastali u analizatoru masa na detektoru se prevode u mjerljivi signal koji se potom grafički prikazuje kao spektar masa. Kako bi se pri MRM analizama postigao najbolji intenzitet signala, prekursorski ion te ioni produkti zahtijevaju posebno optimizirane uvjete. Nastanak fragmenata (produkt iona) ovisi o strukturi molekule, jer se određene kemijske grupe kao što

su hidroksilne lako kidaju te su potrebne niske kolizijske energije, dok su druge snažno vezane te se za nastanak fragmenata moraju upotrijebiti snažniji uvjeti (Sulyok i sur., 2006).



Slika 6. Princip rada MS/MS uređaja (Varga, 2010).

Također, pomoću MS/MS detektora prati se retencijsko vrijeme odnosno vrijeme zadržavanja fragmenta koje je bitno za naknadnu kvantifikaciju i kvalifikaciju kako bi se potvrdilo da se u određenom uzorku nalazi određeni spoj u odnosu na standard.

Prednosti LC-MS/MS u odnosu na tradicionalne molekularne tehnike su višestruke. Od glavnih prednosti može se istaknuti visoka sposobnost propusnosti, veća osjetljivost i jednostavnost standardizacije, točnost i ponovljivost. Primjena LC-MS/MS je našla svoje mjesto u kliničkoj biokemiji, toksikološkim analizama i u postavljanju *fingerprinta* fenolnog profila (Pitt, 2009).

3.3. Standardizacija kvalitete propolisa

3.3.1. Kriteriji kvalitete propolisa

Proizvodnja propolisa je u Hrvatskoj zakonski djelomično regulirana *Pravilnikom o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda* (Pravilnik, 2000). U Pravilniku se navode četiri uvjeta kojima mora udovoljavati propolis na tržištu: mora sadržavati najmanje 35 % tvari koje se ekstrahiraju alkoholom, ne smije sadržavati više od 5 % mehaničkih nečistoća ni dijelova pčela,

ne smije sadržavati više od 30 % voska te ne smije sadržavati katran ni spojeve slične katranu (Pravilnik, 2000). Izuzev toga, ne postoje drugi zakonski uvjeti koji bi garantirali samu kvalitetu i koji bi na globalnoj razini omogućili i olakšali pravično trgovanje propolisom i njegovim proizvodima.

Danas neki znanstvenici predlažu metodologiju i kriterije kvalitete koji bi se mogli primjenjivati u praksi da bi se približili svjetskoj standardizaciji propolisa (Keskin i Kolayli, 2018; Bankova i sur., 2019). Bankova i sur. (2019) smatraju da analizi treba prethoditi određivanje tipa propolisa nekom od analitičkih metoda (npr. GC-MS, LC-MS, NMR), ali da je moguće preskočiti taj korak ukoliko je poznata točna lokacija i biljno podrijetlo propolisa. U svom radu autori su predložili i parametre kakvoće koji su primjenjivi na bilo koji uzorak propolisa, bez obzira na vrstu koji uključuju: sadržaj tvari topljive u 70 %-tnom etanolu, sadržaj vode, sadržaj pepela i mehaničke nečistoće. Granice predloženih prihvatljivih vrijednosti prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Prihvatljivi rasponi vrijednosti parametara kakvoće primjenjivi na sve vrste propolisa (Bankova i sur., 2019).

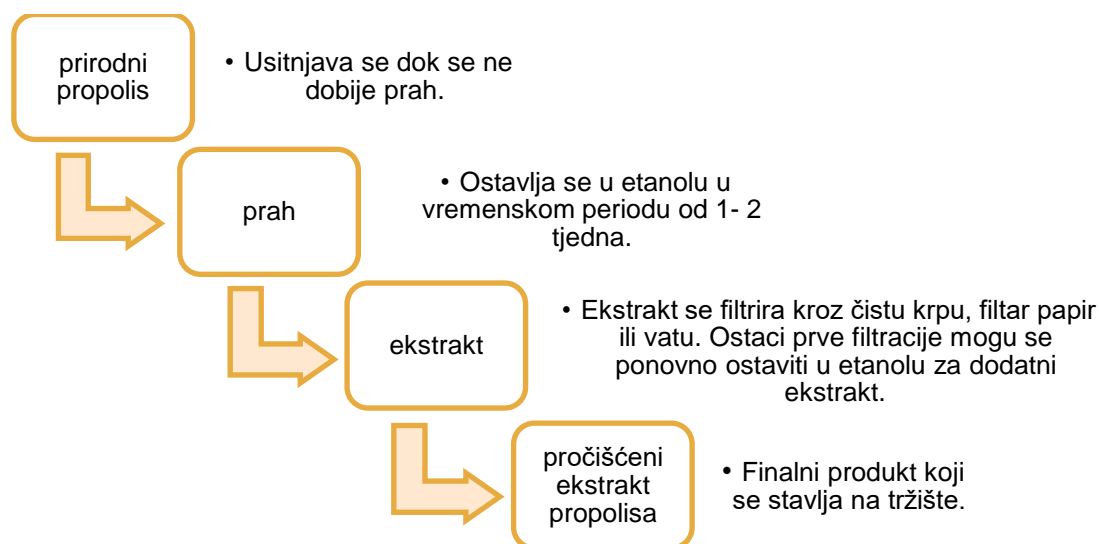
<i>parametar</i>	<i>maseni udio u sirovom propolisu (%)</i>
tvari topljive u etanolu (70 % v/v)	≥ 45
voda	≤ 8
pepeo	≤ 5
mehaničke nečistoće	≤ 6

Također, navode nekoliko specifičnih kriterija i standardnih vrijednosti bioaktivnih konstituenata za topolin propolis (tablica 3).

Tablica 3. Prihvatljivi rasponi vrijednosti parametara kakvoće za propolis topole prema Bankovoj i sur. (2019).

<i>parametar</i>	<i>maseni udio u sirovom propolisu (%)</i>
ukupni fenoli	≥ 21
ukupni flavoni i flavonoli	≥ 4
ukupni flavononi i dihidroflavonoli	≥ 4

Međutim, nativni propolis, odnosno propolis u obliku u kojem se nalazi u košnici, rijetko je pogodan za izravno stavljanje u gotove proizvode. Obično se tretira organskim otapalom, najčešće etanolom jer se pokazalo da se biološki aktivni sastojci u njemu dobro otapaju (International Honey Commission Congress, 2017), a istovremeno je netoksičan i kao takav se koristi kao temelj za komercijalne preparate. Slika 7 prikazuje osnovne korake proizvodnje etanolnog ekstrakta propolisa.



Slika 7. Shema uobičajenog postupka kojim pčelari pripremaju etanolne ekstrakte propolisa. (Conrad, 2016)

Međutim, ovdje se otvara nova problematika jer je sirovina koja se ekstrahirala nepoznatog sastava. Keskin i Kolayli (2018) ustanovili su neke fenolne spojeve koji su karakteristični samo za anatolski tip propolisa te sugeriraju da je *fingerprint* polifenola, odnosno ukupni sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida i tanina važan kriterij za standardizaciju alkoholnih ekstrakata propolisa. Uz to, Özkök i sur. (2021) smatraju da je za profiliranje propolisa bitno određivanje raznolikosti fenolnih komponenata te količine antioksidansa mjerenjem antioksidativnog kapaciteta kako bi se mogla provesti standardizacija na međunarodnom nivou. Na Kongresu *Međunarodne komisije za med* (International Honey Commission) 2017. predstavljen je rad koji je imao za cilj razviti standardizaciju ekstrakata propolisa koji se bazira na analitičkim metodama koje omogućavaju detekciju određenog broja fenolnih spojeva koji bi se koristili kao markeri kvalitete uzoraka koji pripadaju istoj vrsti propolisa. Kao primarni biljeg kvalitete istaknuta je količina spoja CAPE (fenetil ester kafeinske kiseline). Osim na ekstrakte, ovaj biomarker primjenjiv je i na sirovi propolis (Keskin i sur., 2017).

Zbog velikog broja različitih vrsta propolisa, fluktuacija u sastavu i jedinstvenosti s obzirom na mikrolokaciju, postavljanje kriterija kvalitete te standardizacija propolisa velik je

izazov. Trenutno ne postoji precizna globalna standardizacija, ali zbog sve veće upotrebe i mnogobrojnih pripravaka na bazi propolisa na tržištu (slika 8), trebalo bi odrediti norme u pogledu kvalitete i sigurnosti za uporabu na području zdravlja, prehrane i kozmetike.



Slika 8. Neki komercijalni proizvodi na bazi propolisa (izvori: Red Seal, Plattner Bienenhof, NZ Health Food Co., Bua organics, Milea All Organic)

Standardizacija proizvoda na bazi propolisa je potrebna i kako bi se spriječili sve češći i „popularniji“ pokušaji patvorenja propolisa. Budući da je analiza propolisa vrlo izazovna, rutinske analize koje određuju ukupan sastav bioaktivnih komponenti nisu dovoljne. Jedan od razloga je široka lepeza fenolnih spojeva u propolisu, od kojih svaki ima različit farmakološki put i način djelovanja. Ako se standardizacija ograniči na koncentraciju samo jednog fenolnog spoja, postoji vjerojatnost da svi uzorci neće sadržavati istu tu komponentu, jer se fenolni sastav može razlikovati, pa takav način standardizacije neće biti primjenjiv. Zbog toga je potrebno identificirati ukupni fenolni profil uzoraka i standardizaciju prilagoditi ovisno o željenom krajnjem farmakološkom djelovanju.

3.3.2. Patvorenje propolisa

Kemijski *fingerprint* hrane se može definirati kao molekularni marker koji predstavlja karakterističan identitet odnosno sastav hrane omogućujući učinkovitiju sposobnost razlikovanja. Potreba određivanja *fingerprinta* ciljanih spojeva u hrani nije povezana samo s kvalitetom proizvoda, već i s njihovom sigurnošću za ljudsko zdravlje. Iako je namjerno patvorenje hrane i pića radi prevare potrošača u bilo kojem dijelu svijeta ilegalno, ostvarenje brzih ekonomskih prihoda postaje vrlo primamljivo i globalno rašireno. Neki od ciljeva patvorenja mogu biti povećanje volumena i težine, prikrivanje lošije kvalitete, zamjena autentičnih tvari s jeftinijima, pri čemu jedino proizvođač ima korist, dok potrošač trpi štetu (Medina i sur., 2018).

U novije vrijeme provode se intenzivna istraživanja kojima se nastoji utvrditi brzi i izravni analitički postupak koji može pružiti pouzdanu karakterizaciju *fingerprinta* ekstrakata propolisa. Takav *fingerprint* bi omogućio brzo tipiziranje uzoraka propolisa i određivanje njegova zemljopisnog podrijetla i autentičnosti. Kako bi se utvrdilo podrijetlo uzoraka propolisa,

identifikacija ključnih karakterističnih spojeva *fingerprinta* omogućuje potencijalnu korelaciju. Metoda analize *fingerprinta* fenolnih spojeva smatra se učinkovitom i pouzdanom metodom koja je prikladna za analizu velikog broja uzoraka kako bi se ukazalo na kvalitativne razlike među uzorcima složenog kemijskog sastava u čemu se jako uspješna pokazala masena spektrometrija. U istraživanju koje su proveli Sun i sur. (2014) istražene su kemijske komponente u različitim uzorcima propolisa prikupljenim na različitim mjestima i stvoren je specifični *fingerprint* koji se pokazao korisnim za kontrolu kvalitete ekstrakata u farmaceutskim pripravcima. Naime, HPLC-ESI/MS analiza može pružiti rješenje za dobivanje tipičnih *fingerprinta* propolisa i pouzdanu identifikaciju velikog broja polifenolnih komponenata. Ukoliko se na kromatogramu nalazi neuobičajena komponenta, *fingerprint* će onemogućiti njegovo trenutno prepoznavanje što je korisno za dokazivanje autentičnosti.

Prema Katekhaye i sur. (2019) do patvorenja propolisa dolazi zbog povećane potražnje i ograničene ponude. Jedan od čestih oblika patvorenja propolisa je korištenje neobrađene smole s biljaka umjesto nativnog propolisa. Huang i sur. (2014) su identificirali katehol kao biomarker za patvorene uzorke. Katehol je fenolni spoj koji je prisutan prirodno u mnogim biljkama te ga biljna smola sadržava u velikim količinama. Propolis u svom kemijskom sastavu sadrži i mnoge enzime među kojima se ističe polifenol oksidaza koja ima mogućnost oksidacije katehola. Iz tog razloga propolis u svom fenolnom sastavu nema katehol, dok ga biljne smole imaju te se na taj način može dokazati autentičnost. Studija o propolisu topole daje dobar primjer o patvorenju propolisa. Crna topola (*Populus nigra*) kao produkt daje smolu velike sličnosti u kemijskom sastavu, posebno flavonoida, s *poplar* propolisom (Katekhaye i sur., 2019). To su potvrdili i Zhang i sur. (2015) u čijem istraživanju je gotovo 27 od 50 uzoraka propolisa bilo patvoreno. Osim prethodno navedenog katehola, kao marker može poslužiti i salicin koji su nalazi u smoli, ali ne i u propolisu. Salicin se hidrolizira β -glikozidazom prisutnom u slini medonosnih pčela tijekom sakupljanja i prerade propolisa.

Kako bi se pomoću LC-MS/MS odredio kompleksni fenolni profil propolisa i potencijalne komponente koje će opovrgnuti autentičnost uzorka, metoda prethodno mora proći postupak validacije.

3.4. Validacija analitičkih metoda

Prije nego se za upotrebu odobri analitička metoda mora joj se utvrditi valjanost te osigurati pouzdanost i točnost. Stoga se provodi validacija metode. Prema Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju (eng. International Organization for Standardization, ISO) „validacija je proces definiranja analitičkih zahtjeva i potvrđuje da metoda pod razmatranjem ima obilježja dosljedna onom što program zahtijeva“, a potrebno ju je provesti (Kaštelan-Macan, 2003):

- pri uvođenju nove metode;

- prilikom prenamjene ili modifikacije postojeće metode;
- nakon svake promjene ili većeg servisa mjernog instrumenta;
- prije primjene nenormiranih metoda i njihovog korištenja izvan normiranog područja;
- kada se rezultati dobiveni normiranom metodom s vremenom mijenjaju.

Prilikom validacije neke analitičke metode potrebno je ispuniti zadane preduvjete te koristiti uređaje koji odgovaraju potrebnim propisima, rade ispravno i koji su kalibrirani. Materijali (reagensi i otopine) moraju biti poznatog sastava i čistoće. Standardi mogu biti referentni (imaju certifikate) ili radni („in house“ standardi, čiji se identitet, sadržaj i čistoća mora dokazati analizama).

Iako ne postoje univerzalni propisi koji se primjenjuju kod validacije metode, koriste se različite smjernice i upute mjerodavnih organizacija koje pomažu u kreiranju vlastitog plana, odnosno protokola validacije koji se nastoji prilagoditi rješavanju pojedinog analitičkog problema.

Plan validacije bi trebao sadržavati sljedeće korake:

- definiranje metode;
- odabir prikladnih parametara validacije;
- postavljanje kriterija prihvatljivosti;
- provedba laboratorijskih eksperimenata;
- obrada podataka i usporedba s postavljenim kriterijima;

Na temelju rezultata validacije, laboratorij daje izjavu o prikladnosti metode za namjeravanu upotrebu (Kaštelan-Macan, 2003).

3.4.1. Parametri validacije

Parametri validacije se definiraju kao kvantitativne veličine kemijskog mjernog procesa koje naznačuju doseg kvalitete mjernog procesa, pomažu pri izboru optimalne metode i donošenju odluke o njenoj primjenjivosti kod specifičnih mjerenja (Kaštelan-Macan, 2003). S obzirom da se validacija provodi u onom opsegu koji je dovoljan da metoda udovoljava potrebama za zadanu upotrebu, u postupku validacije ispituju se različiti parametri te nije nužno ispitivati sve parametre istovremeno.

Struka, regulativa i zakonodavstvo prihvatili su osam osnovnih parametara tj. izvedbenih značajki validacije (Lazarić, 2012):

- Specifičnost / Selektivnost (eng. Specificity / Selectivity)
- Linearnost (eng. Linearity)
- Preciznost (eng. Precision)
 - Ponovljivost (eng. Repeatability)
 - Međupreciznost (eng- Intermediate precision)

- Obnovljivost (eng. Reproducibility)
- Točnost (eng. Accuracy)
- Područje (eng. Range)
- Granica detekcije (eng. Limit of Detection, LOD)
- Granica kvantifikacije (eng. Limit of Quantitation, LOQ)
- Robusnost

3.4.1.1. Specifičnost / Selektivnost

Specifičnost, odnosno selektivnost je svojstvo metode da se točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost su dva odvojena pojma. Specifična je metoda ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit, dok je selektivna metoda ona kojom se može odrediti više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj. Selektivnost je nezaobilazan parametar prilikom validacije većine analitičkih metoda. U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku (Lazarić, 2012). Specifičnost ultravisokoučinkovite tekućinske kromatografije UPLC-a dobiva se postavljanjem optimalnih kromatografskih uvjeta kao što su: sastav mobilne faze, temperatura kolone te detektor. Kada se selektivnost ne može jednoznačno dokazati jednom metodom, preporučuje se kombinacija dvije ili više analitičkih metoda.

3.4.1.2. Linearnost

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku (Lazarić, 2012). Prilikom određivanja linearnosti potrebno je napraviti baždarni pravac za analit pri najmanje pet različitih koncentracija u velikom rasponu te svaku koncentraciju napraviti u najmanje tri do šest ponavljanja. Iz baždarnog dijagrama moguće je izračunati koeficijent korelacije, te nagib i odsječak pravca.

3.4.1.3. Preciznost

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo:

- Preciznost pod uvjetima ponovljivosti, odnosno ponovljivost – izražava preciznost pod istim radnim uvjetima (jedan laboratorij, ista aparatura, isti reagensi) u kratkom vremenskom razdoblju;
- Međupreciznost – izražava preciznost pod različitim uvjetima (različiti dani, različiti analitičari, različita oprema) unutar istog laboratorija;

- Obnovljivost – izražava preciznost između laboratorija, a određuje se analiziranjem alikvota homogenog uzorka u različitim laboratorijima, uz različite okolišne i radne uvjete, ali unutar zahtijevanih parametara metode.

Granice prihvatljivosti za RSD vrijednosti za parametar preciznosti metode postavljene su ovisno o prirodi uzorka u kojem se određuju. Za određivanje sadržaja u prehranbenim i ekološkim uzorcima, preciznom metodom smatra se ona s RSD vrijednostima između 2 i 20 % (Lazarić i Gašljević, 2006).

3.4.1.4. Područje

Područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Za određivanje područja nije potrebno izvoditi posebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz studije linearnosti (Lazarić, 2012).

3.4.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u analiziranom uzorku koja se može detektirati, ali ne i nužno kvantificirati pri određenim uvjetima. LOD je potrebno odrediti samo kod metoda za određivanje nečistoća u uzorku kvantitativnom metodom ili limit testom. Limit kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita koja se može kvantificirati uz prihvatljivu razinu preciznosti i točnosti. Ovaj parametar validacije metode od velike je važnosti kada je određuju analiti u tragovima (Huber, 2007).

LOD i LOQ se određuju razrjeđivanjem osnovne otopine, a rezultati se mogu procjenjivati na tri načina. Moguće je procijeniti vizualno, pomoću omjera signal/šum ili statističkom obradom podataka.

Omjer signal/šum se primjenjuje za analitičke postupke sa baznom linijom pri čemu se uspoređuju signali uzoraka poznatih niskih koncentracija analita sa signalom slijepe probe i tako se odredi najmanja koncentracija pri kojoj se analit može sa sigurnošću detektirati. Prihvatljivi omjeri su 3:1 ili 2:1 za LOD, a 10:1 za LOQ.

Pri određivanju vrijednosti LOD i LOQ statističkom obradom podataka na osnovi odstupanja signala i nagiba, nagib se procijeni iz kalibracijske krivulje, a za standardno odstupanje se uzme ostatna standardna devijacija regresijskog pravca u koncentracijskom području granice detekcije. LOD i LOQ se u tom slučaju računaju prema formulama (ICH Harmonized tripartite guideline, 2005):

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{\sigma}{a} \quad (1) \qquad \text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{a} \quad (2) \qquad \sigma = \frac{Se}{Sd} \quad (3)$$

gdje je:

σ = ostatna standardna devijacija

α = nagib regresijskog pravca

S_e = standardna greška

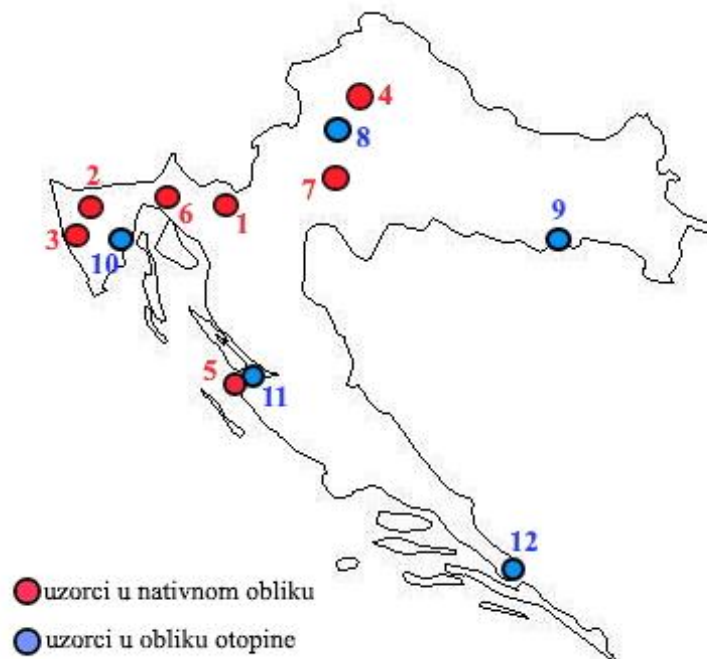
S_d = standardna devijacija

4. MATERIJALI I METODE

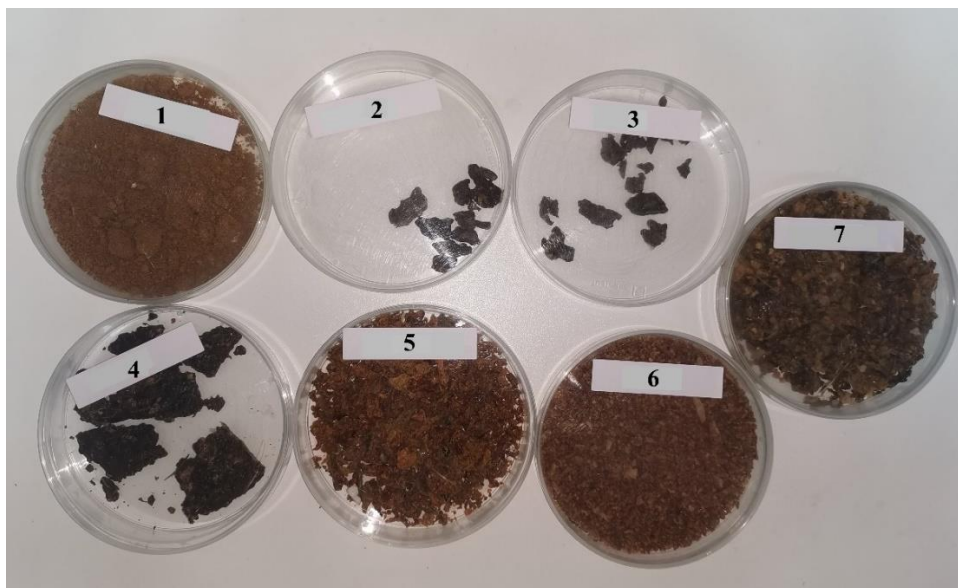
4.1. Materijali

4.1.1. Uzorci

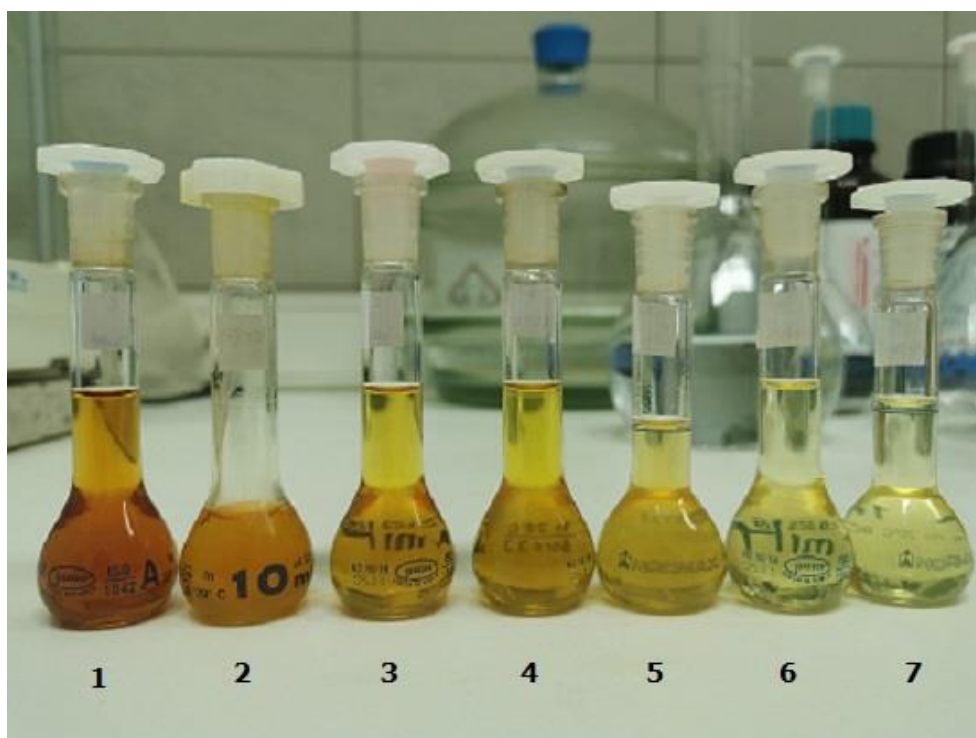
Ukupno 12 uzoraka propolisa prikupljeno je direktno od proizvođača u veljači 2021. godine na različitim lokacijama u Hrvatskoj. Slika 9 prikazuje njihov zemljopisni položaj na karti Hrvatske. Pet uzoraka s lokacija Metković, Labin, Slavonski Brod, Vrsi i Zagreb dobiveni su od pčelara u obliku etanolnih otopina nepoznatih koncentracija. Sedam uzoraka je nabavljeno u svom izvornom obliku iz pčelinjaka na lokacijama Čavle, Motovun, Pokupsko, Radoši, Vrbovsko, Vrsi te Sveti Ivan Zelina. Slika 10 prikazuje uzorke koji su nabavljeni u izvornom obliku, dok slika 11 prikazuje etanolne otopine tih uzoraka.



Slika 9. Lokacije u RH na kojima su izuzimani uzorci propolisa (1 – Vrbovsko, 2 – Motovun, 3 – Radoši, 4 – Sveti Ivan Zelina, 5 – Vrsi, 6 – Čavle, 7 – Pokupsko, 8 – Zagreb, 9 – Slavonski Brod, 10 – Labin, 11 – Vrsi, 12 – Metković).



Slika 10. Uzorci sirovog propolisa (1 – Vrbovsko, 2 – Motovun, 3 – Radoši, 4 – Sveti Ivan Zelina, 5 – Vrsi, 6 – Čavle, 7 – Pokupsko) (izvor: vlastita fotografija)



Slika 11. Etanolne otopine uzoraka sirovog propolisa (1 – Sveti Ivan Zelina, 2 – Vrsi, 3 – Vrbovsko, 4 – Pokupsko, 5 – Čavle, 6 – Radoši, 7 – Motovun) (izvor: vlastita fotografija)

4.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura

- Analitička vaga Kern, ABT 220-4M; Sartorius m-power (Njemačka) (točnosti $\pm 0,0001$ g)

- Tehnička vaga (Mettler Toledo, SAD) (točnosti $\pm 0,01$ g)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic 40H (Elma, Njemačka)
- Kupelj od rotavapora RV 10 (IKA, Njemačka)
- Vortex ZX3 (Velp, Italija)
- pH-metar inolab pH 7110 (WTW, Njemačka)
- Spektrofotometar Uviline 9400 (Secomam, Francuska)
- Čitač mikrotitarskih pločica Clariostar sa software-om MARS 2.0 (BMG Labtech, Njemačka)
- Frižider za ultraduboko smrzavanje ScanCool SCL210E (Labogene, Danska)
- Tekućinski kromatograf Agilent series 1290 RRLC (Agilent, SAD) opremljen:
 - binarnom pumpom
 - autosamplerom
 - termostatiranim kolonama
 - Agilent trostrukim kvadropolnim masenim spektrometrom (6430) s ESI izvorom iona software-om MassHunter Workstation for QQQ
- Statistički program Statistica 10.0, (StatSoft, Inc., SAD)

Pribor

- Odmjerne tikvice (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL, 1000 mL)
- Mikropipete (volumena 10-100 μ L, 100 -1000 μ L i 0,5-5 mL)
- Stakleni lijevci
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Vijale za UPLC
- Filtar papir Whatman br. 40 (Whatman International Ltd., Velika Britanija)
- Magnetski mješači
- Plastična lađica za vaganje
- Tarionik
- Pinceta

4.1.3. Kemikalije i standardi

Sve uporabljene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

Kemikalije

Za ekstrakciju polifenola:

- Etanol (96 % v/v) (BDH Prolabo, Velika Britanija)
- Etanol (70 %, v/v)
- Metanol (80 %, v/v)

Za UPLC-MS/MS analizu:

- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ (Millipore, SAD)
- Acetonitril HPLC čistoće, (Prolabo, Velika Britanija)
- Mravlja kiselina p.a., (Prolabo, Velika Britanija)

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti:

- Fluorescein (C₂₀H₁₀Na₂O₅) (Honeywell Riedel-de-Haën, Njemačka)
- 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Acros Organics, Belgija)
- Kalij dihidrogenkarbonat (KH₂PO₄) (Acros Organics, Belgija)

Standardi

Standardi fenolnih kiselina:

Galna kiselina, Klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, Kafeinska kiselina, Ferulinska kiselina, Kinična kiselina, Siringinska kiselina, Vanilinska kiselina, Cinamična kiselina (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

Sinapinska kiselina, Protokatehinska kiselina (Extrasynthese, Francuska)

Standardi flavonoida:

Apigenin, Eskuletin, Naringenin, Galangin, Pinocembrin, Skopoletin, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka);

Katehin, Epikatehin galat (EKG), Epigalohatehin galat (EGKG), Miricetin, Luteolin (Extrasynthese, Francuska);

Krizin (Acros Organics, Belgija)

Standardi flavonol-glikozida:

Kvercetin–3-β-D-glukozid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka);

Kamferol 3-O-glukozid (Extrasynthese, Francuska)

Kvercetin 3-O-rutinozid / rutin (Acros Organics, Belgija)

4.2. Metode

4.2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz svih uzoraka propolisa provedena je prema postupku koji je opisan u nastavku. Uzorci propolisa prije provođenja postupka ekstrakcije se usitne i homogeniziraju u tarioniku. U Erlenmayerovu tikvicu odvaži se 5 g ± 0,001 g uzorka, doda se

5 mL 70 % vodene otopine etanola (v/v), smjesa se propuše inertnim plinom dušikom te se postupak ekstrakcije provodi na ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C/50 minuta. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira kroz filter papir u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni otapalom za ekstrakciju do oznake. Etanolni ekstrakti se zatim preliju u plastičnu epruvetu (Falcon) od 15 mL, propušu s dušikom i čuvaju na -60 °C do trenutka provođenja analiza.

4.2.2. Validacija metode

Prema protokolu zadani su zahtjevi za validaciju za određivanje ukupnih fenola iz ekstrakta propolisa. U tablici 4, prikazani su parametri koji su validirani te njihovi kriteriji prihvatljivosti prema Lazarić i Gašljević (2006) uz male modifikacije.

Tablica 4. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti.

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	Informacija
Linearnost	$r > 0,9$
Preciznost	
<ul style="list-style-type: none"> • Ponovljivost injektiranja • Ponovljivost pripreme standarda 	<ul style="list-style-type: none"> RSD <5% RSD <11%

4.2.2.1. Selektivnost

Selektivnost metode se odredi na način da se pripremi otopina jednog uzorka propolisa i otopine standarda, te se provjeri usporedbom kromatograma postoje li interferencije iz matriksa u zadanom području ispitivanja. Selektivnost metode prikaže se LC-MS/MS kromatogramom uzorka propolisa.

4.2.2.2. Linearnost

Linearnost metode određena je injektiranjem otopina standarda u 6 različitih koncentracija. Standardi su kroz sustav LC-MS/MS puštani u obliku „stock otopina“ tj. u kombinaciji nekoliko standarda istovremeno te zbog toga koncentracije standarda nisu fiksne. Otopina svakog „stock“ standarda injektirana je tri puta. Iz dobivenih kromatograma očitaju se odzivi pojedinih standarda i izračuna se njihova srednja vrijednost. Na temelju dobivenih rezultata odredi se jednadžba baždarnog pravca za svaki standard, nagib pravca, odsječak te koeficijent determinacije (r^2).

4.2.2.3. Preciznost

Preciznost metode određena je pomoću ponovljivosti injektiranja i ponovljivosti pripreme standarda.

Ponovljivost injektiranja

Prema metodi svaka pripremljena otopina standarda (uzeta je srednja koncentracija) injektira se šest puta. Izračuna se srednja vrijednost površine pika i RSD, te vrijeme zadržavanja i pripadajući RSD.

Ponovljivost pripreme standarda

Ponovljivost pripreme standarda određena je injektiranjem srednje koncentracije otopine standarda. Otopina se injektira šest puta te se iz dobivenih kromatograma očitaju površine pika. Iz dobivenih podataka izračuna se srednja vrijednost površine pika, omjer koncentracije i površine i RSD.

4.2.2.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su injektiranjem tri najniže koncentracije standarda. Iz rezultata je dobivena jednadžba pravca baždarnog pravca na temelju čijeg su nagiba i ostatnog standardnog odstupanja statistički procijenjene granice detekcije i granice kvantifikacije za svaki standard posebice.

Za izračun ostatnog standardnog odstupanja koristi se sljedeća formula (Eurachem, 2011):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 * c_j)]^2}{n - 2}}$$

gdje je:

A_j – površina uzorka

B_0 – odsječak regresijskog pravca

B_1 – nagib regresijskog pravca,

c_j – koncentracija uzorka

n – broj uzoraka

4.2.3. Određivanje i karakterizacija fenolnih spojeva u propolisu primjenom LC-MS/MS

Tekućinska kromatografija (LC) uz MS/MS detekciju provedena je na tekućinskom kromatografu Agilent series 1290 RRLC koji je opremljen binarnom pumpom, autosamplerom, termostatiranim kolonama, Agilent trostrukim kvadropolnim masenim spektrometrom (6430) s

ESI izvorom iona te software-om MassHunter Workstation for QQQ. Instrument je prikazan na slici 12.

Princip određivanja:

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom ultradjelotvorne tekućinske kromatografije (UPLC) uz MS/MS detekciju – metoda vanjskog standarda temelji se na gradijentnoj eluciji pri čemu se ekstrahirani fenolni spojevi eluiraju u nizu padajuće polarosti. UPLC uz MS/MS je provedena prema metodi koju su prethodno opisali Elez Garofulić i sur. (2018), uz određene modifikacije prikazane u tablici 5 i kromatografskim uvjetima.

U ovoj analizi korištene su mobilne faze: A (0,1 % mravlja kiselina u H₂O) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu).

Postupak određivanja:

Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na vezanom sustavu ultradjelotvorne tekućinskom kromatografu (UPLC) Agilent 1290 spojenom na maseni spektrometar Agilent QqQ 6430 (Agilent, Santa Clara, SAD) (slika 12).



Slika 12. Vezani sustav tekućinske kromatografije s masenom spektroskopijom (izvor: vlastita fotografija)

Određivanje je provedeno pri kromatografskim uvjetima prikazanim u tablici 5.

Tablica 5. Kromatografski uvjeti za određivanje fenolnih spojeva

Kolona	Fortis C18, 1,7 μ m (100 x 2,1 mm I.D.)
Pokretna faza	Otapalo A: 0,1 % mravlja kiselina u redistiranoj vodi
	Otapalo B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor	MS/MS trostruki kvadropol (QqQ)
Ionski izvor	ESI
MS parametri	Temperatura plina: 300 °C
Protok plina (N2)	11 L/h
Nebulizer	40 psi
Pozitivni/negativni napon na kapilari	+4000 V / -3500 V
Maseni detektor	MRM mode (m/z od 100 do 1000)
Eluiranje	gradijentno (gradijent prikazan u Tablici 6.)
Temperatura	35 °C
Vrijeme trajanja	12,5 min

Tablica 6. Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (Elez Garofulić i sur., 2018).

<i>t</i> (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL/min)
0	95	5	0,35
10	65	35	0,35
10,1	20	80	0,35
11	20	80	0,35
11,1	95	5	0,35
12,5	95	5	0,35

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva:

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih prekursor i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija je provedena na sljedeći način: izoferulinska kiselina kvantificirana je prema standardu ferulinske kiseline, epikatehin standardom katehina, krizin-5-metil eter, tektokrizin i metoksikrizin prema standardu krizina, *p*-DHBA, 3,4-DHBA kiselina,

2,5-DHBA i DHBA su kvantificirane prema standardu galne kiselina, verbaskozid je kvantificiran preko *p*-kumarinske kiseline, pinobanksin-5-metil eter acetat je kvantificiran prema standardu pinocembrina, *trans*-cinamična prema cinamičnoj kiselini, vanilin prema vanilinskoj kiselini, kamferol i kamferol-3-rutinozid prema standardu kamferol-3-glukozida, feniletil kafeat prema standardu kafeinske kiseline, luteolin metil eter prema standardu luteolina, apigenin-*O*-7-glukozid prema standardu apigenina, sakuranetin prema standardu naringenina, kvercetin, kvercetin dimetil eter, pinobanksin, ramnetin i izoramnetin prema standardu kvercetin-3-glukozida. Dobivene koncentracije izražene su kao mg/g uzorka sirovog propolisa, odnosno kao mg/L uzorka komercijalnog ekstrakta.

4.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip metode

Antioksidacijski kapacitet ekstrakta propolisa određen je pomoću standardizirane ORAC metode prema Prior i sur. (2005). U pripremljenom fosfatnom puferu pH 6,59 pripremljene su otopine fluorescina, otopina Trolox standarda (131,85 μM), izvor radikala 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida te odgovarajuća razrjeđenja uzorka.

Postupak određivanja

U svaku jažicu otpipetira se 150 μL fluorescina. Kao slijepa proba koristi se fosfatni pufer pH 6,59. Za otopinu Troloxa napravi se šest razrjeđenja koja se otpipetiraju u jažice predviđene za standarde. U preostale jažice otpipetira se 25 μL prethodno pripremljenih razrjeđenja uzorka (50x, 100x, 200x, 300x, 400x, 600x, 800x, 1000x). Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 37 °C/30 min prije početka mjerenja. Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, uređaj se programira da automatski injektira 25 μL AAPH. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje 2 h pri temperaturi od 37 °C. Trolox služi kao standard te se dobivene vrijednosti izražavaju preko Trolox ekvivalenta ($\mu\text{M TE/L}$ uzorka).



Slika 13. Uređaj za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom, Clariostar
(izvor: vlastita fotografija)

4.2.5. Statistička obrada podataka

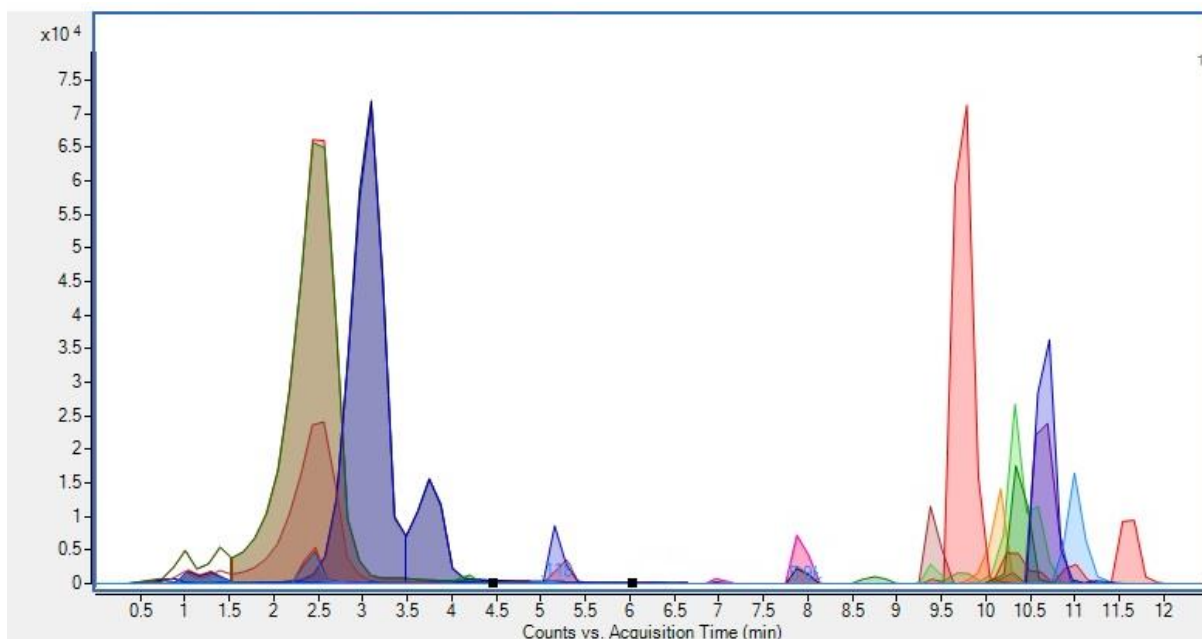
S ciljem utvrđivanja utjecaja lokacije na fenolni sastav propolisa te antioksidacijsku aktivnost za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Za usporedbu uzoraka korištena je dvosmjerna analiza varijance (two-way ANOVA), a marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom. Rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Svi statistički testovi provedeni su na razini značajnosti $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Validacija metode

Postupkom validacije metode za određivanje ukupnih fenola u propolisu provjerena je selektivnost (slika 14), preciznost injektiranja (tablica 7), preciznost ponovljivosti pripreme standarda (tablica 8), linearnost te granica detekcije i granica kvantifikacije (tablica 11).

Specifičnost, odnosno selektivnost je svojstvo metode da se točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u uzorcima. Jedan uzorak propolisa je analiziran LC-MS/MS instrumentom. Nakon MS/MS analize analizirana je interferencija matriksa na dobiveni MRM kromatogram na način da su uspoređena retencijska vremena i MRM tranzicije između kromatograma dobivenog analizom uzorka (slika 14) i kromatograma dobivenog analizom mješavine standarda. Metoda se pokazala selektivnom jer može odrediti više komponenti istodobno bez interferencije matriksa propolisa na tijek analize i rezultate .



Slika 14. LC-MSMS kromatogram propolisa u MRM-u

Preciznost označava stupanj podudaranja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. U postupku validacije za dokazivanje preciznosti provedena je ponovljivost injektiranja i ponovljivost pripreme standarda.

Tablica 7. Preciznost injektiranja.

<i>Standard</i>	<i>Koncentracija (mg/L)</i>	<i>Srednja vrijednost površine pika</i>	<i>SD</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Srednje vrijeme zadržavanja (min)</i>	<i>SD</i>	<i>RSD (%)</i>
STANDARDI FENOLNIH KISELINA							
GA	15,83	1095	1,29	0,12	1,29	0,00	0,00
ChA	19,17	15630	2,90	0,02	0,82	0,00	0,00
pCA	16,67	5336	1,65	0,03	7,44	0,01	0,13
CA	55	4406	2,19	0,05	6,05	0,01	0,17
FA	52,5	924	1,68	0,18	1,26	0,00	0,00
QA	18,33	2122	2,18	0,10	8,77	0,05	0,57
SA	35	616	1,78	0,29	11,01	0,07	0,64
VA	7,085	1274	2,22	0,17	9,14	0,03	0,33
CinA	7,918	476	2,20	0,46	1,69	0,00	0,00
SinA	52,5	350	1,48	0,42	11,48	0,06	0,52
ProCA	31,67	9641	2,88	0,03	8,48	0,02	0,24
STANDARDI FLAVONOIDA							
Apigenin	20	962	1,64	0,17	11,54	0,02	0,17
Eskuletin	1	45933	4,05	0,01	4,02	0,01	0,25
Naringenin	4,5	24268	1,84	0,01	1,22	0,01	0,82
Galangin	0,0625	2261	2,54	0,11	11,38	0,06	0,53
Pinoembrin	2,5	11079	3,07	0,03	10,94	0,05	0,46
Skopoletin	10	16079	2,99	0,02	9,11	0,04	0,44
Katehin	26,25	1616	1,48	0,09	1,08	0,00	0,00
EKG	28,75	590	1,66	0,28	10,93	0,05	0,46
EGKG	32,5	3031	1,21	0,04	11,95	0,05	0,42
Miricetin	36,67	393	1,87	0,48	7,98	0,00	0,00
Luteolin	31,67	5114	2,24	0,04	10,83	0,05	0,46
Krizin	0,031	8502	2,65	0,03	11,44	0,05	0,44
STANDARDI FLAVONOL-GLIKOZIDA							
Rutin	12,5	1393	1,78	0,13	11,25	0,04	0,36
Q-3-G	110	14081	2,41	0,02	7,85	0,02	0,25
K-3-G	105	20879	2,47	0,01	10,64	0,04	0,38

Ponavljanjem injektiranja otopina standarda srednje koncentracije u istim mjernim uvjetima (isti mjerni postupak, isti analitičar, isti instrument, isto mjesto i kratko vremensko razdoblje), dobiveni su kromatogrami iz kojih je izračunata srednja vrijednost površine pikova i standardna devijacija te vrijeme zadržavanja, odnosno retencijsko vrijeme i standardna devijacija. Iz navedenih vrijednosti izračunate su relativne standardne devijacije koje su pokazatelj preciznosti metode. U tablici 7 su prikazani rezultati ponovljivosti injektiranja. Iz tablice možemo vidjeti da su izračunate RSD vrijednosti svih standarada između 0,01% i

0,48% te su one unutar granica prihvatljivosti kod metoda za određivanje sadržaja u prehrambenim i ekološkim uzorcima (RSD <5%) (Lazarić i Gašljević, 2006).

Tablica 8. Preciznost ponovljivosti pripreme standarda

<i>STANDARD</i>	<i>KONCENTRACIJA (mg/L)</i>	<i>SREDNJA VRIJEDNOST POVRŠINE PIKA</i>	<i>SREDNJA VRIJEDNOST KONCENTRACIJE/ SREDNJA VRIJEDNOST POVRŠINE PIKA</i>	<i>RSD (%)</i>
STANDARDI FENOLNIH KISELINA				
GA	15,83	1095	0,0145	0,12
ChA	19,17	15630	0,0012	0,02
<i>p</i> -CA	16,67	5336	0,0031	0,03
CA	55	4406	0,0125	0,05
FA	52,5	924	0,0568	0,18
QA	18,33	2122	0,0086	0,10
SA	35	616	0,0568	0,29
VA	7,085	1274	0,0056	0,17
CinA	7,918	476	0,0166	0,46
SinA	52,5	350	0,1500	0,42
ProCA	31,67	9641	0,0033	0,03
STANDARDI FLAVONOIDA				
Apigenin	20	962	0,0208	0,17
Eskuletin	1	45933	0,0000	0,01
Naringenin	4,5	24268	0,0002	0,01
Galangin	0,0625	2261	0,0000	0,11
Pinocembrin	2,5	11079	0,0002	0,03
Skopoletin	10	16079	0,0006	0,02
Katehin	26,25	1616	0,0162	0,09
EKG	28,75	590	0,0487	0,28
EGKG	32,5	3031	0,0107	0,04
Miricetin	36,67	393	0,0933	0,48
Luteolin	31,67	5114	0,0062	0,04
Krizin	0,031	8502	0,0000	0,03
STANDARDI FLAVONOL-GLIKOZIDA				
Rutin	12,5	1393	0,0090	0,13
Q-3-G	110	14081	0,0078	0,02
K-3-G	105	20879	0,0050	0,01

Uzastopnim injektiranjem srednjih koncentracija otopina standarda u istim mjernim uvjetima dobiveni su kromatogrami iz kojih su očitane površine pikova i izračunate njihove srednje vrijednosti. Iz tih podataka izračunat je omjer koncentracije pojedinog standarda i pripadajuće srednje vrijednosti te je izračunata relativna standardna devijacija. RSD vrijednosti

kreću se od 0,01 % za kamferol-3-O-glukozid do 0,48% za miricetin, što je unutar granica prihvatljivosti (RSD <11%). U tablici 8 prikazane su sve navedene vrijednosti za svaki ispitivani standard (Lazarić i Gašljević, 2006).

Tablica 9. Rezultati ponovljivosti mjerenja s otopinama standarda fenolnih kiselina na tri različite koncentracije.

STANDARD	GA	ChA	p-CA	CA	FA	QA	SA	VA	CinA	SinA	ProCA	
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)	0,08	0,96	0,1678	0,028	2,625	0,1833	1,75	1,77	1,9795	2,62	0,159	
Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	
	1	31,00	135,00	56,00	32,00	64,00	22,00	31,00	364,00	125,00	23,00	55,00
	2	31,15	134,63	55,79	32,66	66,12	23,52	30,85	363,17	127,42	23,85	54,42
	3	29,56	135,65	55,08	33,50	64,76	21,94	30,17	362,52	126,35	22,63	52,92
	4	30,68	136,10	54,43	31,98	65,31	22,50	32,50	366,96	125,95	24,94	53,97
	5	32,07	133,27	57,18	30,94	62,93	20,37	32,13	364,45	123,39	23,44	55,52
	6	31,83	135,89	56,55	32,77	63,45	22,71	31,94	363,87	125,84	22,08	56,34
Srednja vrijednost	31,05	135,09	55,84	32,31	64,43	22,17	31,43	364,16	125,66	23,32	54,70	
Standardna devijacija	0,90	1,05	0,99	0,87	1,19	1,05	0,89	1,53	1,36	1,00	1,20	
Koeficijent varijabilnosti (%)	2,88	0,78	1,77	2,71	1,85	4,75	2,84	0,42	1,08	4,30	2,20	
STANDARD	GA	ChA	p-CA	CA	FA	QA	SA	VA	CinA	SinA	ProCA	
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)	15,83	19,17	16,67	55,00	52,50	18,33	35,00	7,085	7,918	52,5	31,67	
Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	
	1	1095,00	15630,00	5336,00	4406,00	924,00	2122,00	616,00	1274,00	476,00	350,00	9641,00
	2	1096,34	15625,35	5335,06	4409,42	922,79	2120,06	616,98	1277,01	475,31	352,24	9637,27
	3	1097,12	15628,30	5334,18	4407,65	923,09	2119,88	613,35	1275,64	476,98	351,19	9639,94

	4	1095,73	15629,89	5337,98	4405,19	926,53	2125,31	618,24	1271,18	478,76	348,82	9645,48
	5	1093,38	15633,64	5338,32	4406,56	925,99	2123,96	617,79	1276,31	472,18	349,16	9643,36
	6	1094,99	15632,09	5335,47	4402,97	922,70	2121,12	615,50	1272,91	476,68	348,46	9640,07
Srednja vrijednost		1095,43	15629,88	5336,17	4406,30	924,18	2122,06	616,31	1274,51	475,99	349,98	9641,19
Standardna devijacija		1,29	2,90	1,65	2,19	1,68	2,18	1,78	2,22	2,20	1,48	2,88
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,12	0,02	0,03	0,05	0,18	0,10	0,29	0,17	0,46	0,42	0,03
STANDARD		GA	ChA	p-CA	CA	FA	QA	SA	VA	CinA	SinA	ProCA
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)		50,67	76,67	44,44	110,00	105,00	48,89	70,00	56,67	63,33	105,00	63,33
	Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
	1	3192,00	37154,00	21457,00	7673,00	1835,00	7938,00	1336,00	8487,00	4129,00	607,00	13926,00
	2	3190,43	37149,48	21453,88	7670,07	1833,64	7937,35	1334,47	8482,26	4125,66	606,69	13924,48
	3	3195,58	37150,03	21454,97	7672,12	1834,06	7935,93	1332,93	8485,95	4124,92	605,03	13920,64
	4	3193,34	37157,74	21455,57	7672,76	1836,77	7941,19	1337,11	8488,82	4127,36	608,84	13922,17
	5	3191,01	37156,69	21460,07	7673,39	1838,30	7940,80	1339,97	8490,34	4137,74	610,13	13931,63
	6	3190,22	37156,42	21459,93	7675,94	1834,01	7936,31	1336,68	8489,13	4133,93	604,51	13929,25
Srednja vrijednost		3192,10	37154,06	21456,90	7672,88	1835,30	7938,26	1336,19	8487,25	4129,77	607,03	13925,70
Standardna devijacija		2,06	3,56	2,60	1,90	1,86	2,24	2,41	2,91	5,05	2,16	4,18
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,06	0,01	0,01	0,02	0,10	0,03	0,18	0,03	0,12	0,36	0,03

Tablica 10. Rezultati ponovljivosti mjerenja s otopinama standarda flavonoida na tri različite koncentracije.

STANDARD	Apigenin	Eskuletin	Naringenin	Galangin	Pinocebrin	Skopoletin	Katehin	EKG	EGKG	Miricetin	Luteolin	Krizin	Rutin	Q-3-G	K-3-G
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)	0,2	0,02	0,045	0,0156	0,025	0,01	0,655	1,44	0,813	1,833	0,1583	0,0016	0,625	0,55	2,625
Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
1	12,00	239,00	38,00	540,00	120,00	1301,00	42,57	47,30	86,25	18,50	13,65	430,00	69,35	92,00	48,00
2	12,96	240,10	37,59	538,44	121,11	1304,13	41,48	48,16	84,19	18,65	12,61	433,46	69,87	90,15	46,62
3	11,62	241,62	36,97	541,52	120,63	1302,45	41,94	48,84	85,74	19,35	12,13	432,85	68,45	92,35	45,28
4	11,09	238,49	38,61	540,66	119,34	1300,94	42,78	45,97	87,15	20,56	14,34	431,52	68,19	91,66	49,43
5	12,34	239,38	39,03	543,52	118,98	1302,01	44,13	46,15	88,09	17,41	13,97	429,47	70,16	93,74	48,09
6	13,08	238,77	37,85	541,85	120,33	1301,31	43,33	47,49	86,54	18,07	13,14	430,16	67,84	92,51	47,87
Srednja vrijednost	12,18	239,56	38,01	541,00	120,07	1301,97	42,71	47,32	86,33	18,76	13,31	431,24	68,98	92,07	47,55
Standardna devijacija	0,77	1,15	0,73	1,73	0,80	1,21	0,95	1,12	1,32	1,09	0,84	1,64	0,95	1,18	1,42
Koeficijent varijabilnosti (%)	6,35	0,48	1,93	0,32	0,67	0,09	2,23	2,36	1,53	5,82	6,31	0,38	1,38	1,28	3,00
STANDARD	Apigenin	Eskuletin	Naringenin	Galangin	Pinocebrin	Skopoletin	Katehin	EKG	EGKG	Miricetin	Luteolin	Krizin	Rutin	Q-3-G	K-3-G
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)	20,00	1,00	4,5	0,0625	2,5	10	26,25	28,75	32,5	36,67	31,67	0,03125	12,5	110,00	105,00
Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
1	962,00	45933,00	24268,00	2261,00	11079,00	16079,00	1616,00	590,00	3031,00	393,00	5114,00	8502,00	1393,00	14081,00	20879,00
2	963,39	45937,87	24270,09	2258,11	11075,85	16074,96	1617,92	591,96	3032,16	390,10	5114,85	8500,09	1395,19	14084,80	20883,69
3	964,80	45936,62	24269,91	2264,56	11077,77	16077,60	1614,57	588,16	3030,35	391,97	5117,36	8501,37	1394,80	14082,64	20880,07
4	960,18	45929,18	24265,28	2263,71	11084,35	16083,19	1615,33	592,24	3031,83	395,37	5111,17	8505,94	1395,94	14079,33	20877,04

	5	961,71	45927,47	24266,86	2259,06	11081,74	16080,36	1618,24	589,31	3029,42	394,45	5112,29	8498,67	1392,04	14080,49	20878,22
	6	961,28	45932,22	24268,49	2260,43	11078,09	16081,92	1615,59	588,97	3032,63	393,54	5115,55	8504,08	1391,67	14078,03	20877,19
Srednja vrijednost		962,23	45932,73	24268,11	2261,14	11079,47	16079,51	1616,28	590,11	3031,23	393,07	5114,20	8502,03	1393,77	14081,05	20879,20
Standardna devijacija		1,64	4,05	1,84	2,54	3,07	2,99	1,48	1,66	1,21	1,87	2,24	2,65	1,78	2,41	2,47
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,17	0,01	0,01	0,11	0,03	0,02	0,09	0,28	0,04	0,48	0,04	0,03	0,13	0,02	0,01
STANDARD		Apigenin	Eskuletin	Naringenin	Galangin	Pinocembrin	Skopoletin	Katehin	EKG	EGKG	Miricetin	Luteolin	Krizin	Rutin	Q-3-G	K-3-G
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)		80,00	160,00	180,00	0,5	30,00	40,00	52,50	57,50	65,00	73,33	63,33	0,25	40,00	220,00	210,00
	Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
	1	30505,00	208473,00	281559,00	12665,00	95586,00	55624,00	5699,00	1488,00	5513,00	522,00	10828,00	42132,00	25608,00	26256,00	37254,00
	2	30508,16	208469,10	281548,82	12662,69	95580,47	55618,84	5703,13	1485,54	5512,24	520,05	10822,85	42135,55	25612,16	26255,57	37251,11
	3	30504,22	208465,55	281555,69	12660,08	95584,11	55621,34	5700,80	1484,93	5510,07	521,19	10825,93	42134,70	25611,98	26251,13	37253,60
	4	30502,94	208472,19	281556,55	12664,41	95590,00	55628,80	5696,92	1489,92	5514,43	525,34	10829,14	42130,03	25605,27	26253,39	37259,94
	5	30506,27	208477,76	281566,67	12668,57	95591,31	55627,04	5698,14	1490,08	5515,68	523,37	10834,18	42129,22	25607,64	26261,17	37257,46
	6	30501,16	208480,03	281563,37	12667,97	95583,39	55624,96	5699,35	1488,89	5513,33	521,24	10831,01	42131,34	25610,46	26259,44	37253,65
Srednja vrijednost		30504,62	208472,94	281558,35	12664,79	95585,88	55624,16	5699,56	1487,89	5513,13	522,20	10828,52	42132,14	25609,25	26256,12	37254,96
Standardna devijacija		2,46	5,36	6,26	3,20	4,12	3,65	2,17	2,20	1,92	1,89	3,94	2,52	2,73	3,72	3,17
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,01	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,04	0,15	0,03	0,36	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01

Ponovljivost mjerenja se dokazala uzastopnim mjerenjem otopina standarda flavonoida i fenolnih kiselina na tri različite koncentracije (najniža, srednja i najviša). Otopine standarda su injektirane 6 puta te su rezultati ponovljivosti prikazani u tablicama 9 i 10 izračunate su srednje vrijednosti površine pikova, pripadajuća standardna devijacija i koeficijent varijabilnosti koji je kod fenolnih kiselina određen u rasponu od 0,01% (kod najveće koncentracije klorogenske kiseline i *p*-kumarinske kiseline) do 4,75% (kod najniže koncentracije kinične kiseline), dok je kod flavonoida određen u rasponu od 0,00% (kod najveće koncentracije eskuletina i naringenina) do 6,35% (kod najniže koncentracije apigenina). Iz koeficijenta varijabilnosti uočljivo je da nije bilo velikih odstupanja u dobivenim rezultatima odziva te da je metoda za većinu spojeva pouzdana i precizna (RSD <5%) (Marinčić i Barišić, 2008).

Rezultati analitičkih svojstva metode: područje linearnosti, pripadajuće jednadžbe pravaca i koeficijenti determinacije te limiti detekcije i kvantifikacije prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Analitička svojstva metode

STANDARD	POČETNA KONCENTRACIJ A (mg/L)	PODRUČJE LINEARNOSTI	JEDNADŽBA PRAVCA	KOEFICIJENT DETERMINACIJE	LIMIT DETEKCIJE - LOD (mg/L)	LIMIT KVANTIFIKACIJE - LOQ (mg/L)
STANDARDI FENOLNIH KISELINA						
GA	0,08	0,08 - 50,67	$y = 59,553x + 214,52$	0,9884	1,1622	3,5219
Cha	0,96	0,96 - 76,67	$y = 508,15x + 2046,5$	0,9510	3,0847	9,3476
<i>p</i> -CA	0,1678	0,1678 - 44,44	$y = 526,9x - 681,19$	0,9562	0,1055	0,3196
CA	0,028	0,028 - 110	$y = 68,906x + 470,08$	0,9797	6,5904	19,9709
FA	2,625	2,625 - 105	$y = 16,352x + 80,72$	0,9892	39,4206	119,4563
QA	0,1833	0,1833 - 48,89	$y = 156,63x - 259,93$	0,9811	0,1067	0,3235
SinA	1,75	1,75 - 70	$y = 18,586x - 38,406$	0,9864	6,8981	20,9035
VA	1,77	1,77 - 56,67	$y = 147,72x + 218,83$	0,9987	0,6568	1,9903
CinA	1,9795	0,9795 - 63,33	$y = 64,579x - 61,745$	0,9950	0,9554	2,8953
SinA	2,62	2,62 - 105	$y = 5,5482x + 30,429$	0,9789	15,8323	47,9766
ProCA	0,159	0,159 - 63,33	$y = 228,2x + 884,97$	0,9633	0,0913	0,2765
STANDARDI FLAVONOIDA						
Apigenin	0,2	0,20 - 80	$y = 431,15x - 1929,9$	0,9521	0,4388	1,3297
Eskuletin	0,02	0,02 - 160	$y = 1244,1x + 19410$	0,9475	0,3453	1,0463
Naringenin	0,045	0,045 - 180	$y = 1621,2x + 19713$	0,9366	0,0229	0,0693
Galangin	0,0156	0,0156 - 0,5	$y = 24645x + 540,84$	0,9928	0,0208	0,0630

Pinocembrin	0,025	0,025 - 30	$y = 3199,6x + 2331,1$	0,9932	0,1037	0,3142
Skopoletin	0,01	0,01 - 40	$y = 1357,3x + 5056,2$	0,9482	11,9559	36,2301
Katehin	0,655	0,655 - 52,5	$y = 102,2x - 340,82$	0,9455	0,0400	0,1213
EKG	1,44	1,44 - 57,5	$y = 25,562x - 1,0704$	0,9576	36,3899	110,2720
EGKG	0,813	0,813 - 65	$y = 90,244x + 155,5$	0,9727	0,4986	1,5109
Miricetin	1,833	1,833 - 73,33	$y = 7,1972x + 58,302$	0,9297	2,9873	9,0524
Luteolin	0,1583	0,1583 - 63,33	$y = 176,47x - 534,26$	0,9820	0,1973	0,5980
Krizin	0,0016	0,0016 - 0,25	$y = 164026x + 1984,7$	0,9932	0,0029	0,0089
STANDARDI FLAVONOL-GLIKOZIDA						
Rutin	0,625	0,625 - 40	$y = 713,75x - 2109,2$	0,9448	0,0424	0,1286
Q-3-G	0,55	0,55 - 220	$y = 119,02x + 796,81$	0,9922	0,5002	1,5156
K-3-G	2,625	2,625 - 210	$y = 194,95x - 2464,9$	0,9553	1,0457	3,1689

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji određivanog fenolnog spoja u uzorku propolisa. Kod kromatografskih metoda linearnost se određuje injektiranjem različitih koncentracija standarda te praćenjem ovisnosti odziva detektora o koncentraciji standarda (Lazarić, 2012). U svrhu ispitivanja linearnosti provedeno je mjerenje na šest koncentracijskih razina te je u tablici 11 prikazano područje linearnosti za svaki ispitivani standard. Na osnovi omjera dobivenih odziva o koncentraciji standarda, matematički, putem linearne regresije dobiveni su baždarni pravci (u obliku $y=ax+b$) s naznačenim koeficijentom determinacije. Dobiveni koeficijenti determinacije su u rasponu od 0,9297 do 0,9987. Postavljeni kriterij prihvatljivosti za linearnosti je bio $r>0,9$ te je iz tablice 11 vidljivo da svaki standard zadovoljava kriterije.

Granica detekcije (LOD) označava najmanju količinu nekog fenolnog spoja u propolisu koja se može kvantitativno dokazati uz odgovarajuću preciznost, dok je granica kvantifikacije (LOQ) najmanja količina koja se može kvantificirati odnosno brojčano odrediti uz odgovarajuću preciznost i istinitost (Huber, 2007). LOD i LOQ određivani su statistički injektiranjem tri najniže koncentracije otopina standarda. Na temelju dobivenih jednadžbi pravca i pripadajućeg nagiba i ostatnog standardnog odstupanja statistički su procijenjene granice detekcije i granice kvantifikacije za svaki standard posebice čije su vrijednosti prikazane u tablici 11. Iz prikazanih podataka je vidljivo da su LOD i LOQ vrijednosti u širokom rasponu te da su za neke standarde potrebne male koncentracije kako bi se spoj detektirao i kvantificirao, dok su za neke standarde potrebne velike koncentracije. Uočljivo je da za otopinu standarda ferulinske kiseline i otopinu standarda epikatehin galata (EKG) granica kvantifikacije nije u području ispitivane linearnosti,

već ju prelazi što znači da su najveće injektirane koncentracije trebale biti veće od upotrijebljenih.

5.2. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva u propolisu primjenom LC-MS/MS

Za određivanje i karakterizaciju fenolnih spojeva u komercijalnim uzorcima propolisa i sirovom propolisu korištena je metoda LC-MS/MS. Kako bi se karakterizirali i kvantificirali spojevi u uzorcima propolisa, provedene su ionske tranzicije. S ciljem optimizacije parametara MS/MS detekcije za pojedini uzorak provedeni su eksperimenti snimanja cjelokupnih spektara masa svakog spoja kako bi se prikupio bar jedan ion prekursor, dok su se MS/MS spektri snimali kako bi se prikupile tranzicije prekursora karakteristične za pojedini fenolni spoj. Optimizirani MRM parametri odabrani za MS/MS detekciju su prikazani u tablici 12. Za spojeve koji nisu imali svoje referentne standarde, identifikacija je temeljena na literaturnim podacima. Identifikacija spojeva u uzorcima je provedena usporedbom retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarda, ionizacijskog moda, usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) te podudaranjem fragmentor voltaže (V) i kolizijske energije (CE). U tablici 12. je prikazano 50 spojeva, od čega je 28 flavonoida, 2 kumarina i 20 fenolnih kiselina, od kojih je većina identificirana u uzorcima propolisa.

Tablica 12. Ionske tranzicije dobivene optimizacijom UPLC-MS/MS sustava za određivanje fenolnih spojeva u uzorcima propolisa.

SPOJ	Mr	Rt (min)	Prekursor ion (m/z)	Produkt ioni (m/z)	Ionizacijski mod	Fragmentor voltaža (V)	Kolizijska energija (CE)
EK ^b	290,26	0,74	291	139 123	+	100	10
ChA ^a	354,31	0,82	353	191	-	80	10
Kvercetin ^b	302,24	1,07	303	153	+	100	5
Katehin ^a	290,26	1,08	291	165 139	+	100	10
Krizin-5-metil eter ^b	268,00	1,11	269	152	+	120	30
Ramnetin ^b	316,26	1,17	314,9	165 121	-	160	18 24
Pinobanksin ^b	272,25	1,20	271	252,9 225	+	140	18
Naringenin ^a	272,26	1,22	270,9	151 118,9	-	140	12 24
FA ^a	194,18	1,26	193	178 149	-	80 100	5 6
GA ^a	170,12	1,29	169	125	-	100	10

				79			20
CinA ^a	148,16	1,69	147	103	-	70	5
<i>p</i> -HBA ^b	138,12	2,03	137	93	-	80	5
				65			34
Trans-CinA ^b	148,16	2,86	148,9	131	+	70	18
				103			2
Vanilin ^b	152,15	3,99	151	136	-	80	5
Eskuletin ^a	178,14	4,02	177	133	+	105	15
CA ^a	180,16	6,05	179	135	-	80	10
				117		100	24
3,4-HBA ^b	154,12	6,10	152,9	108	-	90	30
				81			16
				53			18
Di-HBA ^b	154,12	6,43	153	109	-	70	10
<i>p</i> -CA ^a	164,05	7,44	163	119	-	80	10
				93		90	36
Rutin ^a	610,00	7,85	611	465	+	120	5
				303			15
Q-3-G ^a	464,10	7,85	465	303,1	+	100	5
Miricetin ^a	318,24	7,98	316,8	151	-	150	22
Izoferulinska kiselina ^b	194,18	8,15	193	134	-	80	10
ProCA ^a	154,12	8,48	153	109	-	80	10
QA ^a	192,17	8,77	191	85	-	150	20
Tektokrizin ^b	268,26	8,95	268,9	255	+	170	36
				226,6			34
Skopoletin ^a	192,16	9,11	191	176	+	80	8
VA ^a	168,14	9,14	166,9	152	-	90	10
				123			6
				108			14
Kvercetin dimetil eter ^b	330,29	9,24	331	301	+	100	5
2,5-DHBA ^b	154,12	9,52	152,8	108	-	80	20
				81,8			16
				53			20
Izoramnetin ^b	316,26	10,52	317	257	+	100	10
K-3-G ^a	448,40	10,64	449	287	+	100	5
Sakuranetin ^b	286,27	10,68	284,9	165	-	110	12
				119			28
				93			10
Luteolin ^a	286,24	10,83	287	153	+	140	25
Kamferol ^b	286,24	10,84	286,8	165	+	100	10
				242		200	30
				153,5		100	36
				121		100	32

K-3-R ^b	594,52	10,91	595	287	+	120	15
EKG ^a	442,37	10,93	442,9	273	+	100	5
Pinocembrin ^a	256,25	10,94	257	257	+	100	5
				213	-	140	16
				151	-	140	20
CAPE ^b	284,31	11,01	283	161	-	80	10
SA ^a	198,17	11,01	199,1	140,1	-	90	10
Luteolin metil eter ^b	300,26	11,04	301	258	+	140	25
Metoksi-krizin ^b	241,00	11,09	285	242	+	120	30
Verbaskozid ^b	624,59	11,37	623	461,4	-	200	28
				161			38
Apigenin-O-7-glukozid ^b	432,40	11,37	430,9	311	-	200	24
				268			36
Galangin ^a	270,24	11,38	269	252	-	170	24
				169			24
				143			30
Pinobanksin-5-metil eter acetat ^b	286,27	11,38	327	195	-	100	25
Krizin ^a	254,24	11,44	253	103	+	170	36
				69	+	170	50
				253	-	140	5
SinA ^a	224,21	11,48	223,1	208,1	-	90	5
Apigenin ^a	270,05	11,54	271	153	+	80	30
EGKG ^a	458,37	11,95	459	285,2	+	120	5
				139			15

^apotvrđeno sa standardom; ^bpotvrđenom s literaturom

Za detaljnije određivanje fenolnog *fingerprinta* uzoraka te njihovu karakterizaciju određene su koncentracije svakog pojedinog spoja. Koncentracije su izražene u miligramima po litri gotovog komercijalnog ekstrakta, odnosno u miligramima na 100 g uzorka sirovog propolisa. U tablici 13 prikazane su njihove koncentracije u komercijalnim ekstraktima.

Tablica 13. Masene koncentracije detektiranih fenolnih spojeva u komercijalnim ekstraktima propolisa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

	Buzet	Metković	Slavonski Brod	Vrsi	Zagreb
γ (mg/L)					
FLAVONI I DERIVATI					
Apigenin	1,70 ± 0,03	67,23 ± 0,28	193,83 ± 1,37	217,78 ± 2,54	76,01 ± 1,50
Apigenin-O-7-glukozid	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,61 ± 0,04	1,44 ± 0,04	0,14 ± 0,02
Krizin	0,42 ± 0,03	1,57 ± 0,03	4,02 ± 0,07	2,97 ± 0,05	1,38 ± 0,03
Krizin-5-metileter	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00

Luteolin	839,91 ± 3,97	3024,37 ± 6,83	3996,76 ± 8,73	823,16 ± 2,21	13502,15 ± 9,5
Luteolin metil eter	21,95 ± 1,03	77,65 ± 2,22	55,24 ± 1,78	178,58 ± 2,37	214,13 ± 2,13
Metoksikrizin	0,03 ± 0,01	0,60 ± 0,53	1,69 ± 0,04	0,80 ± 0,02	4,33 ± 0,05
Tektokrizin	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>FLAVONOLI I DERIVATI</i>					
Galangin	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,04
Izoramnetin	7,52 ± 0,26	116,39 ± 1,52	354,80 ± 2,21	141,07 ± 2,53	48,70 ± 0,56
Kamferol	278,34 ± 2,26	65,35 ± 0,73	10,61 ± 1,37	60,54 ± 1,85	69,30 ± 1,54
K-3-G	201,01 ± 2,22	5,83 ± 0,16	4,52 ± 0,53	4,67 ± 0,21	8,12 ± 0,27
K-3-R	6,02 ± 0,24	1,22 ± 0,06	1,00 ± 0,05	1,37 ± 0,06	0,96 ± 0,04
Kvercetin	5,43 ± 0,11	4,61 ± 0,13	11,05 ± 0,26	20,30 ± 0,37	8,53 ± 0,44
Kvercetin dimetil eter	4,13 ± 0,08	1,08 ± 0,07	1,65 ± 0,07	3,75 ± 0,14	2,29 ± 0,09
Q-3-G	1,61 ± 0,25	3,55 ± 0,04	6,22 ± 0,09	4,50 ± 0,09	1,48 ± 0,08
Miricetin	24,86 ± 1,09	120,07 ± 1,13	19,53 ± 0,15	27,05 ± 1,74	13,34 ± 0,78
Ramnetin	15,21 ± 1,46	14,96 ± 0,90	7,84 ± 0,15	43,18 ± 1,06	7,86 ± 0,19
Rutin	0,66 ± 0,02	0,68 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,53 ± 0,02
<i>FLAVANONI I DERIVATI</i>					
Naringenin	0,34 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,78 ± 0,03	0,92 ± 0,06
Pinobanksin	8,61 ± 0,67	30,67 ± 1,17	31,28 ± 0,66	70,36 ± 1,65	41,85 ± 1,20
Pinobanksin 5-metil eter acetat	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Pinocembrin	134,43 ± 1,37	1204,92 ± 2,28	3614,31 ± 5,29	2696,80 ± 6,50	1018,67 ± 4,53
Sakuranetin	291,95 ± 1,65	30,80 ± 0,59	4,05 ± 0,33	12,58 ± 0,32	29,99 ± 0,76
<i>FLAVAN-3-OLI I DERIVATI</i>					
EGKG	3,49 ± 0,19	5,81 ± 0,22	2,56 ± 0,09	3,17 ± 0,16	1,93 ± 0,11
EK	2,39 ± 0,13	5,68 ± 0,36	5,68 ± 0,41	4,11 ± 0,40	3,17 ± 0,31
EKG	7,67 ± 0,24	14,84 ± 0,37	2,92 ± 0,07	6,45 ± 0,43	5,99 ± 0,59
Katehin	3,49 ± 0,08	5,81 ± 0,51	2,56 ± 0,22	3,17 ± 0,29	1,93 ± 0,12
<i>KUMARINI</i>					
Eskuletin	0,43 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,01	1,14 ± 0,00	0,34 ± 0,02
Skopoletin	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,02
<i>HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE I DERIVATI</i>					
2,5-DHBA	0,72 ± 0,03	1,25 ± 0,04	1,29 ± 0,97	1,32 ± 0,04	0,35 ± 0,02
3,4-DHBA	2,29 ± 0,16	1,68 ± 0,06	1,41 ± 0,04	1,85 ± 0,08	1,28 ± 0,03
DHBA	2,80 ± 0,12	2,26 ± 0,09	2,69 ± 0,12	1,31 ± 0,04	1,11 ± 0,03
GA	27,24 ± 1,21	3,61 ± 0,14	5,83 ± 0,26	1047 ± 1,07	1,71 ± 0,12
p-HBA	8,29 ± 0,23	16,98 ± 1,07	34,02 ± 0,75	4,46 ± 0,13	78,78 ± 1,43
ProCa	1,81 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,26 ± 0,01
SA	4,71 ± 0,17	9,19 ± 0,68	27,96 ± 0,42	31,94 ± 0,55	6,00 ± 0,32
Vanilin	3,81 ± 0,14	17,33 ± 0,63	75,51 ± 1,53	2,84 ± 0,12	193,27 ± 1,38
VA	3,44 ± 0,11	10,79 ± 0,66	12,16 ± 0,28	2,27 ± 0,71	34,48 ± 0,79
<i>HIDROKSICIMETNE KISELINE I DERIVATI</i>					
CinA	0,46 ± 0,02	1,19 ± 0,05	35,49 ± 0,72	1,63 ± 0,03	9,06 ± 0,93
CAPE	200,74 ± 2,40	1038,05 ± 5,47	774,97 ± 2,60	1618,81 ± 4,12	883,89 ± 2,60

FA	59,17 ± 1,03	182,74 ± 1,46	310,33 ± 2,00	105,28 ± 1,62	769,82 ± 1,43
Izoferulinska kiselina	60,26 ± 0,75	167,67 ± 1,31	279,57 ± 1,63	57,16 ± 1,06	783,51 ± 1,60
CA	81,97 ± 0,69	2,64 ± 0,11	86,46 ± 1,53	3,94 ± 0,07	121,76 ± 1,04
ChA	2,66 ± 0,08	0,71 ± 0,02	0,32 ± 0,00	1,35 ± 0,02	1,38 ± 0,05
p-CA	5,21 ± 0,49	11,13 ± 0,41	19,69 ± 1,34	5,43 ± 0,18	38,29 ± 0,91
SinA	13,97 ± 0,90	29,12 ± 0,70	16,84 ± 0,23	15,49 ± 0,54	13,64 ± 0,13
trans-cinA	17,01 ± 1,05	39,55 ± 1,53	197,36 ± 2,29	21,35 ± 0,42	31,58 ± 0,41
Verbaskozid	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,44 ± 0,02
OSTALE					
QA	5,34 ± 0,07	1,32 ± 0,03	0,89 ± 0,06	1,12 ± 0,01	1,38 ± 0,04

U analiziranim ekstraktima propolisa komercijalnog podrijetla od fenolnih spojeva najzastupljeniji su bili apigenin, luteolin, luteolin metil eter, izoramnetin, kamferol, pinocembrin, fenil etil kafeat, ferulinska kiselina, izoferulinska kiselina i kafeinska kiselina. Ristivojević i sur. (2015b) te Bankova i sur. (2002) su u svojim studijama kao karakteristične spojeve propolisa topolinog tipa izdvojili, između ostalih, ferulinsku kiselinu, fenilne estere kafeinske kiseline, luteolin, apigenin i naringenin, a poseban je naglasak stavljen na flavonoide koji su nesupstituirani na B prstenu poput pinobanksina, pinocembrina, galangina, krizina, kamferola i kvercetina (Ristivojević i sur., 2015b; Mašek i sur., 2018; Osés i sur., 2020). Kao jedan od najbitnijih spojeva tog tipa propolisa smatraju fenil etil kafeat koji je odgovoran za razne pozitivne učinke na zdravlje (Ristivojević i sur., 2015b; Chang i sur., 2017; Mašek i sur., 2018), a nalazi se u uzorcima u visokim koncentracijama. Velika podudarnost fenolnog profila analiziranih uzoraka s literaturnim podacima te usklađenost s rezultatima o zastupljenosti pojedinih skupina fenolnih spojeva ukazuje na to da je propolis korišten za izradu ovih ekstrakata topolinog tipa. Unatoč tomu, neki uzorci imaju nešto drugačiji *fingerprint* polifenola jer sadrže pojedine spojeve u značajno višim, odnosno nižim koncentracijama od ostalih. Primjeri su za to uzorak podrijetlom iz Buzeta koji sadrži kamferol-3-glukozid i sakuranetin u višim koncentracijama nego ostali ekstrakti, uzorak iz Vrsa koji ima značajno više galne kiseline od drugih i ekstrakt iz Slavenskog Broda koji se ističe po sadržaju cinamične i *trans*-cinamične kiseline. Autori kao objašnjenje takvih pojava navode nejednakost flore s obzirom na zemljopisne mikrolokacije te preferencije pčela prema određenim biljnim vrstama (Bankova, 2009), ali i klimu (Nascimento i sur., 2019) koja nije homogena u cijeloj Hrvatskoj. Zato se nerijetko događa da uzorci propolisa, iako iste vrste, imaju nezanemarive razlike kad je u pitanju *fingerprint* fenolnih spojeva. Također, razlike u fenolnom sastavu među ovim uzorcima mogu ukazivati i na to da je nužna stroža kontrola, odnosno potreba za verifikacijom komercijalnih ekstrakata. Tablica 14 prikazuje kvantificirane koncentracije svakog pojedinog ispitivanog spoja u uzorcima sirovog propolisa.

Tablica 14. Maseni udio fenolnih spojeva u uzorcima sirovog propolisa s različitih područja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

	Čavle	Motovun	Pokupsko	Radoši	Vrbovsko	Sv. Ivan Zelina	Vrsi
w (mg/100 g propolisa)							
<i>FLAVONI I DERIVATI</i>							
Apigenin	3,43 ± 0,16	8,12 ± 0,66	44,04 ± 0,72	13,22 ± 0,60	14,97 ± 0,54	10,52 ± 0,34	232,24 ± 1,85
Apigenin-O-7-glukozid	0,45 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,18 ± 0,00	0,54 ± 0,06	0,60 ± 0,05	0,90 ± 0,11
Krizin	2,42 ± 0,15	0,90 ± 0,05	4,38 ± 0,13	0,69 ± 0,06	3,52 ± 0,16	3,30 ± 0,26	3,56 ± 0,14
Krizin-5-metil eter	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01
Luteolin	9522,96 ± 7,25	211,97 ± 1,76	1269,22 ± 4,01	446,08 ± 2,88	1151,33 ± 4,85	905,88 ± 3,93	446,42 ± 3,13
Luteolin metil eter	18,35 ± 0,79	8,26 ± 0,55	28,61 ± 1,41	49,59 ± 2,30	104,23 ± 1,31	32,36 ± 0,18	450,63 ± 2,53
Metoksikrizin	0,26 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,22 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,29 ± 0,07
Tektokrizin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<i>FLAVONOLI I DERIVATI</i>							
Galangin	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,56 ± 0,09
Izorametnin	13,43 ± 0,31	5,70 ± 0,16	164,55 ± 1,13	7,83 ± 0,23	45,53 ± 0,54	35,56 ± 0,58	261,41 ± 1,54
Kamferol	20,64 ± 0,31	18,09 ± 0,65	8,22 ± 0,46	36,44 ± 0,7	7,55 ± 0,29	6,61 ± 0,45	25,78 ± 0,76
K-3-G	14,23 ± 0,74	2,16 ± 0,16	1,97 ± 0,23	17,85 ± 0,62	2,12 ± 0,13	2,10 ± 0,16	7,63 ± 0,33
K-3-R	0,87 ± 0,07	1,09 ± 0,12	0,88 ± 0,09	0,45 ± 0,06	1,08 ± 0,14	1,40 ± 0,21	1,40 ± 0,18
Kvercetin	3,31 ± 0,27	7,40 ± 0,28	13,70 ± 0,36	16,16 ± 0,50	7,61 ± 0,27	3,90 ± 0,17	19,38 ± 0,88
Kvercetin dimetil eter	4,11 ± 0,55	4,21 ± 0,38	3,68 ± 0,4	10,48 ± 1,39	3,60 ± 0,14	5,31 ± 0,82	7,88 ± 0,31
Q-3-G	3,52 ± 0,29	3,66 ± 0,22	2,95 ± 0,26	3,57 ± 0,25	3,25 ± 0,23	2,01 ± 0,21	4,00 ± 0,65
Miricetin	15,74 ± 0,47	22,71 ± 0,61	20,90 ± 0,75	19,87 ± 0,56	23,74 ± 0,52	22,19 ± 0,82	30,71 ± 1,04
Ramnetin	13,00 ± 0,44	26,66 ± 0,47	30,41 ± 0,65	5,05 ± 0,29	13,82 ± 0,31	25,99 ± 0,46	47,46 ± 0,58
Rutin	1,02 ± 0,13	1,18 ± 0,10	1,10 ± 0,12	0,15 ± 0,03	1,13 ± 0,16	1,35 ± 0,16	1,44 ± 0,21
<i>FLAVANONI I DERIVATI</i>							
Naringenin	0,61 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,49 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,04
Pinobanksin	15,13 ± 0,52	22,68 ± 0,64	23,93 ± 0,75	17,38 ± 0,58	14,46 ± 0,62	32,73 ± 0,78	21,10 ± 0,72
Pinobanksin 5-metil eter acetat	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Pinocembrin	237,98 ± 2,04	86,08 ± 1,17	1736,85 ± 4,14	25,05 ± 0,86	724,98 ± 3,34	369,91 ± 2,44	3304,27 ± 6,29
Sakuranetin	3,21 ± 0,23	25,36 ± 0,43	3,49 ± 0,19	58,91 ± 0,63	8,22 ± 0,25	4,68 ± 0,19	10,39 ± 0,36
<i>FLAVAN-3-OLI I DERIVATI</i>							
EGKG	1,39 ± 0,09	1,21 ± 0,05	1,48 ± 0,06	1,21 ± 0,04	1,41 ± 0,05	2,57 ± 0,10	2,09 ± 0,07
EK	5,79 ± 0,24	3,28 ± 0,13	3,67 ± 0,14	4,60 ± 0,19	3,19 ± 0,04	4,26 ± 0,11	1,48 ± 0,07
EKG	4,83 ± 0,18	4,08 ± 0,48	6,58 ± 0,44	3,33 ± 0,19	7,25 ± 0,54	3,92 ± 0,20	8,58 ± 0,59
Katehin	2,12 ± 0,17	2,35 ± 0,26	4,28 ± 0,50	2,78 ± 0,24	3,55 ± 0,43	2,37 ± 0,31	2,37 ± 0,06
<i>KUMARINI</i>							
Eskuletin	0,55 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,46 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,55 ± 0,03
Skopoletin	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<i>HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE I DERIVATI</i>							
2,5-DHBA	0,85 ± 0,06	2,03 ± 0,26	1,64 ± 0,16	1,18 ± 0,11	1,77 ± 0,17	1,93 ± 0,29	2,06 ± 0,19
3,4-DHBA	0,88 ± 0,06	2,00 ± 0,18	2,23 ± 0,23	1,67 ± 0,19	1,83 ± 0,19	2,72 ± 0,25	2,75 ± 0,24

DHBA	1,51 ± 0,27	4,38 ± 0,51	2,78 ± 0,31	4,68 ± 0,33	1,57 ± 0,21	1,11 ± 0,20	2,03 ± 0,23
GA	7,40 ± 0,54	2,65 ± 0,13	7,59 ± 0,32	15,05 ± 0,51	5,20 ± 0,24	9,00 ± 0,31	5,96 ± 0,23
<i>p</i> -HBA	35,08 ± 0,49	35,01 ± 0,48	30,01 ± 0,74	34,85 ± 0,41	30,27 ± 0,39	43,29 ± 0,89	18,65 ± 0,44
ProCa	0,38 ± 0,04	0,54 ± 0,09	0,53 ± 0,11	1,26 ± 0,23	0,35 ± 0,04	0,59 ± 0,10	0,26 ± 0,04
SA	32,91 ± 0,47	31,00 ± 0,44	28,26 ± 0,65	26,23 ± 0,60	28,02 ± 0,42	20,78 ± 0,27	39,94 ± 0,62
Vanilin	82,34 ± 0,42	9,54 ± 0,25	31,60 ± 0,40	7,10 ± 0,21	37,18 ± 0,53	75,66 ± 0,92	1,59 ± 0,19
VA	7,47 ± 0,45	7,57 ± 0,33	8,33 ± 0,35	10,33 ± 0,31	7,75 ± 0,38	12,62 ± 0,39	5,91 ± 0,17
<i>HIDROKSICIMETNE KISELINE I DERIVATI</i>							
CinA	10,28 ± 0,47	4,72 ± 0,24	1,92 ± 0,20	2,16 ± 0,22	1,72 ± 0,20	3,24 ± 0,34	3,44 ± 0,37
CAPE	132,88 ± 1,10	66,53 ± 0,75	851,43 ± 3,10	19,44 ± 0,84	262,95 ± 2,09	322,09 ± 2,35	1588,31 ± 4,91
FA	174,95 ± 1,56	327,63 ± 2,18	391,62 ± 2,16	405,08 ± 2,16	607,06 ± 2,26	648,17 ± 1,94	138,25 ± 1,27
Izoferulinska kiselina	83,56 ± 1,11	339,62 ± 1,70	197,46 ± 2,22	375,71 ± 2,45	614,77 ± 3,25	634,47 ± 3,64	42,94 ± 1,18
CA	182,28 ± 1,76	152,78 ± 1,21	161,13 ± 1,37	167,92 ± 1,13	184,16 ± 1,71	166,06 ± 1,09	181,97 ± 1,02
ChA	0,37 ± 0,07	1,21 ± 0,14	1,08 ± 0,11	2,82 ± 0,23	0,76 ± 0,13	0,28 ± 0,04	0,82 ± 0,15
<i>p</i> -CA	31,50 ± 0,62	36,45 ± 0,70	34,90 ± 0,74	42,79 ± 1,03	42,84 ± 1,03	69,50 ± 1,37	5,93 ± 0,16
SinA	13,97 ± 0,38	20,42 ± 0,66	15,76 ± 0,46	25,43 ± 0,53	18,27 ± 0,58	26,86 ± 0,60	21,49 ± 0,56
trans-cinA	15,64 ± 0,48	91,12 ± 0,90	22,98 ± 0,40	63,96 ± 0,82	41,68 ± 0,43	49,77 ± 0,58	47,08 ± 0,71
Verbaskozid	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,06	0,32 ± 0,09	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,30 ± 0,80	0,25 ± 0,06
<i>OSTALI SPOJEVI</i>							
QA	0,44 ± 0,03	4,67 ± 0,14	0,75 ± 0,07	4,59 ± 0,18	1,38 ± 0,12	0,64 ± 0,07	1,92 ± 0,17

U uzorcima sirovog propolisa u najvećim se koncentracijama općenito pojavljuju luteolin, luteolin metil eter, izoramnetin, ramnetin, pinocembrin i pinobanksin od flavonoidnih spojeva te fenil etil kafeat, ferulinska, izoferulinska, kafeinska, *p*-kumarinska i *trans*-cinamična i *p*-hidroksibenzojeva kiselina od fenolnih kiselina. Vidljivo je da se spojevi kvantificirani u najvišim koncentracijama uglavnom pojavljuju i u komercijalnim ekstraktima. Kao razlike u odnosu na njih može se istaknuti prisutnost ramnetina, pinobanksina, *p*-hidroksibenzojeve, *p*-kumarinske i *trans*-cinamične kiseline u značajno visokim koncentracijama. Mnogi autori te spojeve ujedno smatraju jednim od svojstvenih za topolin propolis (Bankova i sur., 2002; Medić-Šarić i sur., 2013; Mašek i sur., 2018; Osés i sur., 2020). Na temelju cjelokupnog fenolnog *fingerprinta* može se potvrditi da ovi uzorci hrvatskog propolisa također pripadaju topolinom tipu. Međutim, i među njima postoje individualne razlike u koncentracijama pojedinačnih spojeva pa je tako npr. u propolisu iz Vrsi detektirana vrlo visoka količina apigenina, a u propolisu podrijetlom iz Čavla i Sv. Ivana Zeline vanilina. U studiji koju su proveli Sorucu i Oruç (2019) kao uzroci ovakvih pojava navodi se nadmorska visina te godišnje doba u kojem je propolis prikupljen iz košnice. Autori tvrde da propolis sadrži više apigenina ukoliko je prikupljen u proljeće u odnosu na jesen te na nadmorskoj visini iznad 500 metara (Sorucu i Oruç, 2019). Jerković i sur. (2016) u svojoj studiji navode kako su od ispitivanih uzoraka hrvatskih propolisa najviše vanilina sadržavali uzorci iz Virovitice, Gorskog Kotara te sa

sjeverne hrvatske obale te da se uglavnom pojavljuje u proporcionalnom odnosu s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom zbog zajedničkog biosintetskog puta, no ta se pojava ne primjećuje u ovim rezultatima.

Kad objedinimo rezultate, može se reći da svi uzorci imaju *fingerprint* koji sadrži većinu fenolnih spojeva u dovoljnim količinama da bi se okarakterizirali kao topolin tip propolisa. To je u skladu s očekivanjima jer se Hrvatska nalazi u području umjerene klime gdje je takav propolis najrasprostranjeniji. Ne postoje neočekivana odstupanja od „standardnog“ profila polifenola propolisa topole koji je opisan u literaturi. Prisutne su manje varijacije koje se mogu objasniti razlikama u lokalnim florama, klimi i sezoni u kojem je prikupljen propolis što navodi na zaključak da je propolis svake košnice jedinstven o čemu je već bilo govora. Istovremeno, to je dokaz da je uistinu kompleksan postupak standardizacije te uvođenja kriterija za određivanje autentičnosti propolisa.

Radi boljeg uvida u rezultate i statističke obrade podataka, rezultati su također prikazani i grupirano, izraženi kao suma koncentracija spojeva koji pripadaju istoj skupini polifenola (flavoni, flavonoli, flavanoni, flavan-3-oli, kumarini, hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i ostali spojevi), gdje se vrijednosti označene različitim slovima statistički značajno razlikuju kod $p \leq 0,05$. Izražene su koncentracije svakog identificiranog spoja. Koncentracije su izražene u miligramima po litri komercijalnog ekstrakta, odnosno u miligramima na 100 g uzorka sirovog propolisa. U tablici 15 prikazane su izračunate koncentracije po grupama fenolnih spojeva za komercijalne ekstrakte. Bitno je istaknuti da kod komercijalnih alkoholnih ekstrakata propolisa nije poznata masa sirovine i volumen otapala koji su se koristili za njihovu izradu. Znači da je to jedan od čimbenika varijacije sadržaja polifenola.

Tablica 15. Raspodjela flavonoida i fenolnih kiselina u komercijalnim ekstraktima propolisa.

UZORAK	FLAVONOIDI (mg/L gotovog ekstrakta)					FENOLNE KISELINE (mg/L gotovog ekstrakta)		OSTALO (mg/L gotovog ekstrakta)
	Flavoni i derivati	Flavonoli derivati	Flavanoni i derivati	Flavan-3-oli	Kumarini	Hidroksibenzojeve kiseline i derivati	Hidroksicimetne kiseline i derivati	Ostalo
Buzet	867 ± 0,92 ^a	544,82 ± 1,02 ^e	435,37 ± 0,68 ^a	14,28 ± 0,34 ^c	0,53 ± 0,02 ^d	55,11 ± 1,13 ^a	441,45 ± 0,61 ^a	5,34 ± 0,07 ^d
Metković	3177,50 ± 3,39 ^c	333,80 ± 0,63 ^c	1266,97 ± 1,07 ^c	26,73 ± 0,38 ^e	0,35 ± 0,01 ^b	63,43 ± 2,03 ^b	1472,79 ± 1,33 ^b	1,32 ± 0,03 ^c
Slavonski Brod	4254,75 ± 1,43 ^d	417,96 ± 0,70 ^d	3649,97 ± 1,68 ^e	13,01 ± 0,29 ^b	0,23 ± 0,03 ^a	161,58 ± 1,91 ^c	1721,04 ± 1,30 ^c	0,89 ± 0,06 ^a

Vrsi	1227,93 ± 1, 54 ^b	307,69 ± 0,47 ^b	2780,57 ± 1,51 ^d	15,19 ± 0,39 ^d	0,25 ± 0,03 ^a	57,11 ± 0,13 ^a	1830 ± 1,08 ^d	1,12 ± 0,01 ^b
Zagreb	13800,00 ± 2,77 ^e	161,30 ± 0,33 ^a	1091,44 ± 1,30 ^b	12,30 ± 0,23 ^a	0,43 ± 0,04 ^c	317,23 ± 2,72 ^d	2653,23 ± 1,26 ^e	1,38 ± 0,04 ^c

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Dobiveni rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u sadržaju flavonoida i u sadržaju fenolnih kiselina. Koncentracija flavona kvantificirana u rasponu od 867,00 (Buzet) do 13800,00 mg/L (Metković) što čini najveću varijaciju među svim skupinama. Flavonoli su zastupljeni u koncentracijama 161,30-544,82 mg/L. Uzorak propolisa s lokacije Buzet sadrži najviše, a propolis iz Metkovića najmanje. Sadržaj flavanona je detektiran u koncentracijama 435,37-3649,97 mg/L. Uzorak iz Buzeta sadrži najnižu, a uzorak iz Slavenskog Broda najvišu koncentraciju. Po sadržaju flavan-3-ola ističe se ekstrakt propolisa iz Metkovića gdje je on najveći (26,73 mg/L), dok je u ostalim uzorcima u uskom rasponu (12,30-15,19 mg/L). Kumarini su generalno zastupljeni u nižim koncentracijama u usporedbi s ostalim flavonoidima (0,23-0,53 mg/L). Koncentracije svih flavonoida se statistički značajno razlikuju u svim mjestima prikupljanja propolisa kod $p \leq 0,05$. Jedino uzorci prikupljeni u Slavenskom Brodu i Zagrebu se statistički značajno ne razlikuju u koncentraciji kumarina. Rezultati istraživanja koje su proveli Kosalec i sur. (2005) su pokazali velike varijacije u koncentracijama flavanona, za razliku od flavona i flavonola, u komercijalnim ekstraktima propolisa s hrvatskog tržišta, što je u suprotnosti s našim rezultatima. Međutim, lokacije s kojih je prikupljen ispitivani propolis u toj studiji nisu navedene.

Za razliku od flavonoida, kod fenolnih kiselina postoje veća odstupanja u njihovim koncentracijama ovisno o lokaciji uzorka, što možemo i potkrijepiti s činjenicom da se svi uzorci statistički značajno razlikuju u količini fenolnih kiselina. Samo uzorak propolisa prikupljen s lokacija Vrsi i Buzet ne pokazuju značajnu razliku u količini hidroksibenzojevih kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline su zastupljene u rasponu 55,11-317,23 mg/L, odnosno 441,45-2653,23 mg/L gdje se najniža koncentracija obiju vrsta fenolnih kiselina pronalazi u uzorcima s lokacije Buzet, a najveća u uzorcima iz Metkovića.

Spojeva koji ne pripadaju skupini flavonoida ni fenolnih skupina ima u niskim koncentracijama u svim uzorcima. Propolis iz Buzeta ističe se s koncentracijom od 5,34 mg/L, a u ostalim ekstraktima ona iznosi 0,89-1,38 mg/L. Iako se koncentracije niske, jedino uzorci prikupljeni u Zagrebu i Metkoviću se značajno ne razlikuju.

Za razliku od uzoraka komercijalnih ekstrakta propolisa, kod uzoraka sirovog propolisa su isključeni faktori poput količine i vrste otapala ili mase sirovine za ekstrakciju jer su svi ekstrahirani istim postupkom. Unatoč tomu, postoje razlike u fenolnom profilu.

Tablica 16. Raspodjela flavonoida i fenolnih kiselina u uzorcima sirovog propolisa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

UZORAK	FLAVONOIDI (mg/100 g propolisa)				FENOLNE KISELINE (mg/100 g propolisa)			OSTALO (mg/100 g propolisa)
	Flavoni i derivati	Flavonoli i derivati	Flavanoni i derivati	Flavan-3-oli	Kumarini	Hidroksibenz ojeve kiseline i derivati	Hidroksicimet ne kiseline i derivati	Ostalo
Čavle	9550,02 \pm 4,14 ^g	89,96 \pm 0,17 ^a	256,97 \pm 0,71 ^c	14,12 \pm 0,37 ^d	0,63 \pm 0,06 ^d	168,82 \pm 0,34 ^e	645,63 \pm 1,40 ^a	0,44 \pm 0,03 ^a
Motovun	231,89 \pm 1,57 ^a	92,92 \pm 0,30 ^a	134,36 \pm 0,58 ^b	10,91 \pm 0,17 ^a	0,81 \pm 0,07 ^f	94,73 \pm 0,37 ^b	1040,69 \pm 1,43 ^b	4,67 \pm 0,14 ^f
Pokupsko	1351,34 \pm 2,82 ^f	248,74 \pm 0,35 ^d	1764,81 \pm 1,22 ^f	16,01 \pm 0,36 ^e	0,55 \pm 0,06 ^c	112,97 \pm 0,48 ^d	1678,61 \pm 1,93 ^d	0,75 \pm 0,07 ^c
Radoši	508,6 \pm 1,47 ^b	117,87 \pm 0,23 ^c	101,71 \pm 0,25 ^a	11,92 \pm 0,14 ^b	0,28 \pm 0,06 ^a	102,35 \pm 0,80 ^c	1105,50 \pm 1,47 ^c	4,59 \pm 0,18 ^f
Vrbovsko	1278,36 \pm 2,99 ^e	109,6 \pm 0,34 ^b	748,1 \pm 1,12 ^e	15,4 \pm 0,15 ^e	0,37 \pm 0,05 ^b	113,94 \pm 0,75 ^d	1774,40 \pm 2,66 ^e	1,38 \pm 0,12 ^d
Sv. Ivan Zelina	955,19 \pm 1,49 ^c	106,56 \pm 0,29 ^b	407,51 \pm 0,61 ^d	13,11 \pm 0,17 ^c	0,84 \pm 0,06 ^f	167,78 \pm 0,79 ^e	1920,75 \pm 1,51 ^f	0,64 \pm 0,21 ^b
Vrsi	1136,46 \pm 2,78 ^d	407,65 \pm 0,36 ^e	3336,12 \pm 2,42 ^g	14,52 \pm 0,22 ^d	0,72 \pm 0,06 ^e	79,15 \pm 0,66 ^a	2030,47 \pm 3,38 ^g	1,92 \pm 0,17 ^e

Koncentracije flavona su kvantificirane u rasponu 231,89-9550,02 mg/100 g gdje je najveća detektirana u propolisu iz Čavla, a najniža u uzorku propolisa s lokacije Motovun i svi se uzorci statistički značajno razlikuju. Određene koncentracije flavonola su od 89,96 do 407,65 mg/100 g gdje je najveća koncentracija određena u uzorku iz Vrsi, a najmanja u uzorku s lokacije Čavle. Uzorci s lokacija Čavle i Motovun nisu statistički značajno različiti, kao ni uzorci s lokacija Vrbovsko i Sv. Ivan Zelina. U sadržaju flavonona postoje velike varijacije jer je raspon koncentracija 101,71-3336,12 mg/100 g. Propolis s najvećom koncentracijom je prikupljen s lokacije Vrsi, a s najnižom potječe iz Radoša. Kod flavan-3-ola nije prisutna tolika varijacija te su koncentracije unutar raspona 10,91-16,01 mg/100 g, no opet se značajno razlikuju osim uzoraka s lokacija Čavle i Vrsi te s lokacija Pokupsko i Vrbovsko. Kao i kod komercijalnih ekstrakata propolisa, sadržaj kumarina je nizak (0,28-0,84 mg/100 g) u svim uzorcima te se nijedan posebno ne ističe po količini. Kosalec i sur. (2004) su uspoređivali količinu pojedinih skupina flavonoida u uzorcima sirovog propolisa iz kontinentalne Hrvatske. Studija je pokazala velike razlike u sadržaju flavonona što znači da su ovi rezultati u skladu s

time. Također su određivali koncentracije flavona i flavonola, no izražavane su kao zbroj pa nije moguće usporediti rezultate.

Usporedbom sadržaja hidroksibenzojevih kiselina, propolisu iz Vrsi ustanovljena je najniža koncentracija (79,15 mg/100 g), a propolis iz Čavla i Svetog Ivana Zeline ističu se s najvišom koncentracijom (168,82 i 167,78 mg/100 g), gdje se ne može uočiti statistički značajna razlika. Uzorci iz Pokupskog i Vrbovsko se također ne razlikuju u količini hidroksibenzojevih kiselina. Nasuprot tome, hidroksicimetne kiseline i derivati iz uzoraka sa svih lokacija se statistički značajno razlikuju i najmanje su zastupljeni propolisu iz Čavla, a najviša koncentracija je u ekstraktu propolisa podrijetlom iz Vrsa.

Ostalih polifenolnih spojeva generalno ima u niskim koncentracijama u svim uzorcima. No, ipak se po njihovom sadržaju ističu uzorci propolisa prikupljeni u Istri, odnosno s lokacija Radoši i Motovun (4,59 i 4,67 mg/100 g) koji se značajno ne razlikuju, dok se ostali statistički razlikuju u rasponu 0,44-1,92 mg/100 g.

Na temelju dobivenih rezultata za komercijalne ekstrakte i sirovi propolis može se reći da hrvatski propolis sadrži visok udio flavonoida i fenolnih kiselina. Brojni autori to navode kao karakteristiku propolisa topole, ističući visoku koncentraciju flavanona i flavona te hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina (Huang i sur., 2014; Ristivojević i sur., 2015b; Mašek i sur., 2018). Kao podrijetlo tih spojeva navode se upravo topolini eksudati (Ristivojević i sur., 2015b) što dodatno podupire tezu da se hrvatski propolis može tipizirati kao propolis topole. Huang i sur. (2014) u svojoj su studiji to potvrdili te naveli da je taj tip propolisa rasprostranjen gotovo u cijeloj Europi, odnosno u zoni umjerene klime u kojoj se nalazi i Hrvatska. Iako se može reći da uzorci pripadaju istom tipu propolisa, prisutne su neke individualne razlike u kemijskom sastavu. Tako se u rezultatima primjećuje pojava obrasca da je u uzorcima s lokacija Buzet, Radoši i Motovun, koje se nalaze u Istri, najniža koncentracija flavona. Također, polifenolni spojevi koji ne pripadaju flavonoidima ni fenolnim kiselinama, iako u niskim koncentracijama u svim uzorcima, u ta tri uzorka nalaze se u višestruko većim koncentracijama koje ne bi trebale ostati neopažene. Ova skupina fenolnih spojeva potencijalno se može koristiti kao biomarker za određivanje podrijetla, odnosno autentičnosti istarskog propolisa. To ukazuje na važnost same lokacije na kojoj je propolis prikupljen, jer ona sa sobom nosi faktore koji određuju sastav polifenola poput biljne flore, nadmorske visine te vremenskih uvjeta (Nascimento i sur., 2019; Sorucu i Oruç, 2019).

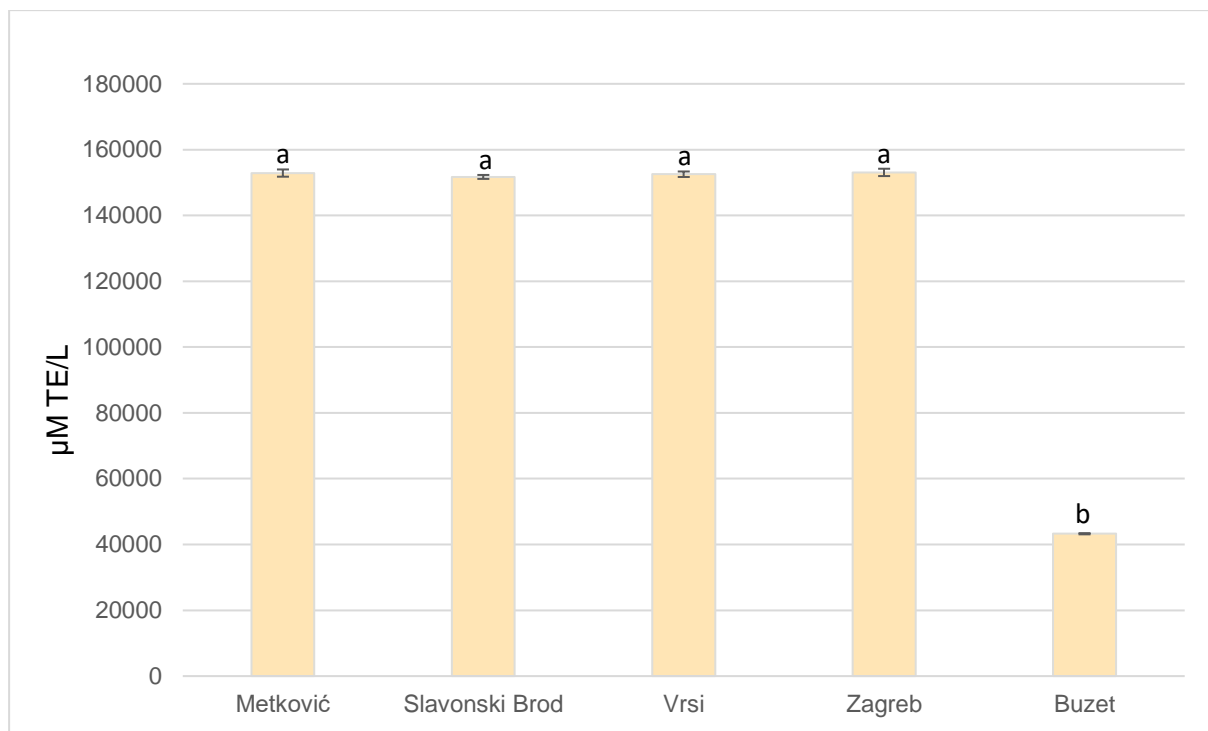
5.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Antioksidativni kapacitet uzoraka propolisa određena je ORAC metodom koja se zasniva na sposobnosti antioksidansa da neutralizira aktivnost peroksilnog radikala donirajući mu proton. Pri tome nastali peroksil radikal reagira s fluorescinom te nastaje nefluorescentni

produkt. Navedena reakcija uzrokuje pad fluorescencije reakcijske smjese koja se zatim kvantificira spektrofluorimetrijski. Rezultati antioksidacijske aktivnosti uzoraka propolisa izraženi su preko Trolox ekvivalenta kao $\mu\text{mol TE/L}$ (Cronin, 2004, Prior i sur., 2005).

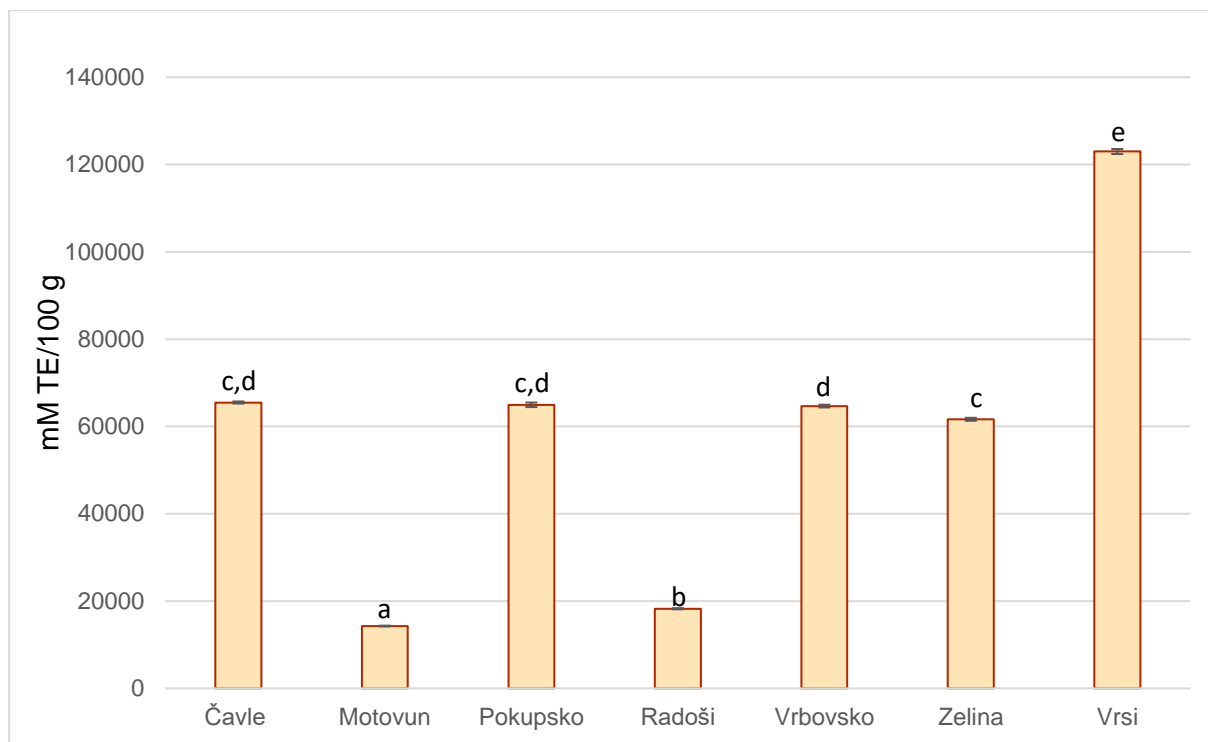
Iz rezultata prikazanih u grafu 1. uočljiv je visoki antioksidativni kapacitet (AOK) u svim uzorcima ekstrakata propolisa pri čemu je najmanji AOK određen u uzorcima propolisa s lokacije Buzet ($43265 \mu\text{mol TE/L}$) dok je u uzorcima s ostale četiri lokacije (Metković, Slavonski Brod, Vrsi i Zagreb) određen u rasponu $151809\text{--}153040 \mu\text{mol TE/L}$. Rezultati istraživanja koje su proveli Tlak Gajger i suradnici (2017) su pokazali da su najveću AOK imali uzorci iz kontinentalne Hrvatske što je slično rezultatima dobivenim u našem istraživanju za uzorke iz kontinentalnog dijela Hrvatske (Slavonski Brod i Zagreb) te s područja Biograda na Moru što je usporedivo s našim uzorcima uzetih s lokacije Vrsi. Iako je u navedenom istraživanju bila korištena druga metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta, rezultati se mogu usporediti obzirom na lokaciju, dok se konkretne vrijednosti ne mogu uspoređivati. Utjecaj geografske lokacije na antioksidativnu aktivnost propolisa istraživali su i de Oliviera Reis i suradnici (2019) čiji rezultati su pokazali da lokacija uzetog propolisa značajno utječe na antioksidativnu aktivnosti. Najveću AOK odredili su u uzorcima propolisa iz sjeveroistočnog dijela Brazila, dok je najmanja AOK određena u uzorcima propolisa uzetog iz jugoistočnog dijela Brazila.

Razlike u vrijednostima AOK određenih u uzorcima propolisa s različitih lokacija su donekle i očekivane s obzirom na različiti fenolni profil. Jedan od jačih antioksidanasa u propolisu je fenil etil kafeat (CAPE) (Russo i sur. 2002) koji je određen u najmanjoj koncentraciji u uzorcima iz Istre, dok je u najvećoj određen u uzorcima propolisa iz Vrsi što je u korelaciji s vrijednostima AOK. Međutim, bitno je naglasiti da CAPE nije jedini zaslužan za pozitivna svojstva propolisa tj. antioksidativna aktivnost je povezana sa sinergijom različitih polifenola (Silva i sur., 2011; Miguel i sur., 2013)



Graf 1. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u gotovim ekstraktima propolisa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Za razliku od komercijalnih ekstrakata, rezultati antioksidativne aktivnosti određenih u uzorcima sirovog propolisa pokazuju veće varijacije između uzoraka i znatno manje vrijednosti što možemo vidjeti u grafu 2. Isto kao i kod gotovih ekstrakata, najmanju antioksidativnu aktivnost imaju uzorci uzeti iz Istre, s lokacija Motovun i Radoši. Iako oba uzorka imaju niske vrijednosti, oni se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Veća antioksidativna aktivnost, koja je određena u vrijednosti od 61641 $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$ do 65484 $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$ uzorka, zabilježena je u uzorcima s lokacija Sv. Ivan Zelina, Čavle, Pokupsko i Vrbovsko. Slične rezultate su dobili Tlak Gajger i sur. (2017) koji su pokazali da veći AOK ima propolis uzet iz kontinentalne Hrvatske u odnosu na uzorke propolisa uzetih iz Istre. Najveću vrijednost AOK određena je u uzorku propolisa uzetog s lokacije Vrsi, čija izmjerena vrijednost iznosi 122983 $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$ uzorka. Usporedimo li dobivene ORAC vrijednosti s koncentracijama CAPE spoja, ponovno možemo zaključiti kako antioksidativna aktivnost proporcionalno raste s većom koncentracijom CAPE spoja.



Graf 2. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u uzorcima sirovog propolisa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Antioksidativna svojstva propolisa, kao i drugih pčelinjih proizvoda osim o lokaciji ovisi o vrsti pčela, načinu ishrane pčela, temperaturi, sezoni prikupljanja i uvjetima skladištenja (Martinello i Mutinelli, 2021). Stoga, razlike u našim uzorcima mogu biti posljedica svih navedenih čimbenika, a ne samo lokacije. Iako je propolis proizvod s kompleksnim i varijabilnim fenolnim sastavom koji utječe na antioksidativnu aktivnost, dokazali smo da neovisno o regiji iz koje je uzet, posjeduje jaka antioksidacijska svojstva.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti sljedeće:

- Postupak validacije metode pokazao je da je metoda za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva u uzorcima propolisa selektivna, precizna, pouzdana, linearna u ispitivanom području koncentracija i dovoljno osjetljiva za niske koncentracije svih standarda osim EKG i ferulinske kiseline.
- Primjenom LC-MS/MS u uzorcima propolisa identificirano je ukupno 50 fenolnih spojeva, od toga je 30 flavonoida: 8 flavona, 11 flavonola, 5 flavanona, 4 flavan-3-ola i 2 kumarina. Fenolnih kiselina je ukupno je 19 od čega je 9 hidroksibenzojevih i 10 hidroksicimetnih. Jedan spoj koji je identificiran ne pripada skupini ni flavonoida ni fenolnih kiselina (kinična kiselina).
- Na području Hrvatske zastupljen je topolin tip propolisa, a fingerprint fenolnih spojeva te varijacije u koncentracijama pokazali su da nije uniforman te da postoje razlike u ovisnosti o regiji.
- Fingerprint fenolnih spojeva propolisa može se koristiti za tipizaciju, odnosno određivanje geografskog i botaničkog podrijetla propolisa. U budućnosti je moguća primjena fenolnog profila u svrhu utvrđivanja kakvoće i autentičnosti propolisa, no metoda prethodno treba biti dodatno razrađena i prilagođena za sustavno određivanje širokog spektra specifičnih uzoraka.
- Primjenom ORAC metode utvrđena je visok antioksidacijski kapacitet svih uzoraka propolisa, a razlike u intenzitetu antioksidacijskog kapaciteta određene su zbog različitog fenolnog profila uzoraka, koji je varirao u ovisnosti o regiji iz koje je propolis izuzet.
- Ovo istraživanje predstavlja značajan doprinos u razvijanju sukcesivnih metoda karakterizacije i određivanja autentičnosti propolisa, koristan alat pri provođenju standardizacije, kao i dodatnom profiliranju propolisa kao jednog od značajnijih dodataka prehrani na hrvatskom tržištu.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentoru doc. dr. sc. Zoranu Zoriću na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju, stručnim savjetima i podršci. Također se zahvaljujemo prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na čitanju rada i nesebičnoj pomoći tijekom svih faza izrade rada. Zahvaljujemo se i doc. dr. sc. Sandri Pedisić i dr. sc. Zrinki Čošić na brojnim savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, kao i Patriciji Lisici, mag. ing. na pomoći pri laboratorijskom radu. Također, zahvale upućujemo izv. prof. dr. sc. Janji Filipi sa Odjela za ekologiju, agronomiju i akvakulturu Sveučilišta u Zadru te svim pčelarima za susretljivost i dostavljene uzorke.

Za kraj, od srca se zahvaljujemo obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, motivaciji, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

8. LITERATURA

Ahangari, Z., Naseri, M., Vatandoost, F. (2018) Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod. J.* **13**, 285-292.

Al-Hariri, M. (2019) Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. *J. Family Community Med.* **26**(1), 57–60.

Ali, B. M. M., Ghoname, N. F., Hodeib, A. A., Elbadawy, M. A. (2015) Significance of topical propolis in the treatment of facial acne vulgaris. *Egypt J. Dermatol. Venerol.* **35**, 29.

Bankova, V. (2009) Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* **1**, 23-28.

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B.J., Da Silva Cunha, I.B., Danert, C., Eberlin, M.N., Falcão, S., Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K.B., Salas, A., Sawaya, A.C.H.F., Schwab, N.V., Sforcin, J.M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M., Zampini, C. (2019) Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Apic. Res.* **58**(2) 1–49.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G. (2002) Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch. C.* **57**, 530–533.

Batista, C.M. , Alves, A.V.F. , Queiroz, L.A., Lima, B.S. , Filho, R.N.P., Araújo, A.A.S., de Albuquerque Júnior, R.L.C., Cardoso, J.C. (2018) The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *J. Photochem. Photobiol. B.* **180**, 198–207.

Braakhuis, A. (2019) Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients.* **11**(11), 2705.

Bua organics [Slika] (bez dat.) Preuzeto 25. 4. 2021. s <https://www.buaorganics.com/products/propolis-magic-lip-balm>

Capoci, I. R. G., Bonfim-Mendonça, S., Arita, G.S., , Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2015**, 42-50.

Chang, H., Wang, Y., Yin, X., Liu, X., Xuan, H. (2017) Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complement. Altern. Med.* **17**, 471.

Chasset, T., Häbe, T.T., Ristivojevic, P., Morlock, G.E. (2016) Profiling and classification of French propolis by combined multivariate data analysis of planar chromatograms and scanning direct analysis in real time mass spectra. *J. Chromatogr. A.* **465**, 197-204.

Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218-232.

Conrad, R. (2016) Propolis processing: Part 1. Preuzeto 19.04.2017. s <https://www.beeeculture.com/processing-propolis-part-1/>

Cronin, J.R. (2004) Review: The Biochemistry of Alternative Medicine: Comparing Antioxidant Values with the ORAC Method. *Altern Complement Ther.* **10**, 167-170.

da Silva, L.M., de Souza, P., Al Jaouni, S.K., Harakeh, S., Golbabapour, S., de Andrade, S.F. (2018) Propolis and Its Potential to Treat Gastrointestinal Disorders. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2018**, 10-21.

De Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007) Ion Sources. Mass spectrometry - principles and applications, 3. izd., John Wiley & Sons, Chichester, str. 42-48.

De la Rosa, L. A. Moreno-Escamilla, J. O. Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. (2019) Chapter 12 - Phenolic Compounds. U: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (Yahia, E. M., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 253-271.

De Oliveira Reis, J. H., de Abreu Barreto, G., Cerqueira, J. C., Pereira dos Anjos, J., Andrade, L. N., Ferreira Padilham, F., Druzian, J. I., Souza Machado, B. A. (2019) Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasoundassisted extraction. *Plos One* **14** (7).

Dezmirean, D. S., Marghitas, L. A., Chirila, F., Copaciu, F., Simonca, V., Bobis, O., Erler, S. (2017) Influence of geographic origin, plant source and polyphenolic substances on

antimicrobial properties of propolis against human and honey bee pathogens. *J. Apic. Res.* **56** (5), 588-597.

do Nascimento, T.G., dos Santos Arruda, R.E., da Cruz Almeida, E.T., dos Santos Oliveira, J.M., Basílio-Júnior, I.D., Celerino de Moraes Porto, I.C., Rodrigues Sabino, A., Tonholo, J., Gray, A., Ebel R.E., Clements, C., Zhang, T., Watson, D.G. (2019) Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Sci. Rep.* **9**, 18293.

Dos Santos Thomazelli, A.P.F., Tomiotto-Pellissier, F., Da Silva, S.S., Panis, C., Orsini, T.M., Cataneo, A.H.D., Miranda-Sapla, M.M., Custódio, L.A., Hideko Tatakihara, V.L., Bordignon, J., Ferreira Silveira, G., Sforcin, J.M., Rogério PavaneIII, W., Conchon-Costa, I. (2017) Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar Leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*. *Cell. Immunol.* **311**, 22–27.

Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović-Uzelac, V. (2018)) UPLC-MS2 Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Food Sci.* **83**(11), 2782-2789.

Elnakady, Y., Rushdi, A., Franke, R., Abutaha, N., Ebaid, H., Baabbad, M., Omar, M.O., Al Ghamdi, A.A. (2017) Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* **7**, 41453.

Escrache, I., Juan-Borras, M. (2018) Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Res. Int.* **106**, 834-841.

EURACHEM Guide (2011) The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>

Falcao, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M., Vilas-Boas, M. (2013) Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochem. Anal.* **24**, 309-318.

Galeotti, F., Capitani, F., Fachini, A., Volpi, N. (2019) Recent advances in analytical approaches for the standardization and quality of polyphenols of propolis. *J. Med. Plants Res.* **13(19)**, 487-500.

Gardini, S., Bertelli, D., Marchetti, L., Graziosi, R., Pinetti, D., Plessi, M., Marcazzan, G. L. (2018) Chemical composition of Italian propolis of different ecoregional origin. *J. Apic. Res.* **57(5)**, 639-647.

Gavanji, S., Larki, B. (2017) Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chin. J. Integr. Med.* **23**, 201-207.

Gross, J. H. (2004) Introduction. Mass spectrometry, Springer, Berlin, str. 1-6.

Healthy with honey [Slika] (4. 1. 2015.) Preuzeto 22. 4. 2021. s <https://healthywithhoney.com/composition-of-propolis/>

Hernandez Zarante, M.S., del Rosario Abraham Juárez, M., Ceron Garcia, A., Ozuna Lopez, C., GUTIÉRREZ Chávez, J., SEGOVIANO Garfias, J., Avila Ramos, F. (2018) Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci. Technol.* **38(2)**, 210-215.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G., Hu, F. L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* **19**, 19610–19632.

Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G., Hu, F.-L. (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* **19**, 19610–19632.

Huber, L. (2007) Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2. izd., Taylor & Francis, Boca Raton.

ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 1-13.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.

IHC (2017) *Standardization of Propolis Extracts*, International Honey Commission, Bremen.

- Ishida, Y., Gao, R., Shah, N., Bhargava, P., Furune, T., Kaul, S.C., Terao, K., Wadhwa, R. (2018) Anticancer Activity in Honeybee Propolis: Functional Insights to the Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Complex With γ -Cyclodextrin. *Integr. Cancer Ther.* **17**(3), 867–873.
- Jain, S., Rai, R., Sharma, V., Batra, M. (2014) Propolis in oral health: a natural remedy. *World J. Pharm. Res.* **2**(1), 90–94.
- Jerković, I., Marijanović, Z., Kuš, P. M., Tuberoso, C. I. G. (2016) Comprehensive Study of Mediterranean (Croatian) Propolis Peculiarity: Headspace, Volatiles, Anti-Varroa-Treatment Residue, Phenolics, and Antioxidant Properties. *Chem. Biodiversity*, **13**(2), 210–218.
- Kaštelan-Macan, M. (2003) Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb.
- Katekhaye, S., Fearnley, H., Fearnley, J., Paradkar, A. (2019). Gaps in propolis research: challenges posed to commercialization and the need for an holistic approach. *J. Apic. Res.* **58**, 1–13.
- Keskin, M., Kolayli, S. (2018) Standardization of Propolis, is it Possible? *Uludag Bee J.* **18**(2), 101-110.
- Kismet, K., Ozcan, C., Kuru, S., Gencay Celekli, O., Celepli, P., Senes, M., Guclue, T., Sorkunc, K., Hucumenoglu, S., Besler, T. (2017). Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease? *Biomed. Pharmacother.* **90**, 863–871.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., Vladimir-Knežević, S. (2005) Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm.* **55**, 423–430.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., Vladimir-Knežević, S. (2004) Short communication Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* **54**, 65–72.
- Kovač, M. (2020) Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih žitarica. Disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W. (2013) Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, 1–11.

Lazarić, K. (2012). Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri*, 1, 61-64.

Lazarić, K., Gašljević, V. (2006) Validacija analitičkih metoda. Seminar "Svijet po mjeri". Hrvatsko mjeriteljsko društvo.

Marinčić, R., Barišić, A. (2008) Određivanje sadržaja teških metala u rabljenim i nerabljenim naftnim proizvodima ed x-ray spektrometrijom. *Goriva i maziva* **47**, 398-413.

Martinello, M., Mutinelli, F. (2021) Antioxidant activity in bee products: a review. *Antioxidants (Basel)* **10**, 71.

Mašek, T., Perin, N., Racané, L., Cindrić, M., Čipčić Paljetak, H., Perić, M., Matijašić, M., Verbanac, D., Radić, B., Šuran, J., Starčević, K. (2018) Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Different Extracts of Poplar Type Propolis. *Croat. Chem. Acta* **91(1)**, 81–88.

Medić-Šarić, M., Bojić, M., Rastija, V., Cvek, J. (2013) Polyphenols in Propolis and Wine, *Food Technol. Biotechnol.* **51(2)**, 159–170.

Medina, S., Pereira, J. A., Silva, P., Perestrelo, R., Câmara, J. S. (2019). Food fingerprints - A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food Chem.* **278**, 144-162.

Miguel, M. da G., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D., Lyoussi, B. (2013) Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* **23(1)**, 313–322.

Milea All Organic [Slika] (bez dat.) Preuzeto 25. 4. 2021. s <https://milea.ph/products/honey-propolis-shampoo-100ml>

Murray, K. K., Boyd, R. K., Eberlin, M.N., Langley, G.J., Li, L., Naito, Y. (2013) Definitions of terms related to mass spectrometry (IUPAC recommendation 2013). *Pure Appl. Chem.* **85(7)**, 1515-1609.

NZ Health Food Co. [Slika] (bez dat.) Preuzeto 25. 4. 2021. s <https://www.nzhealthfood.com/product/manuka-southr-propolis-700mg-capsules/>

Oršolić, N., Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Rogić, D., Odeh, D., Balta V., Perak Junakovi, E., Terzić, S., Jutrić, D. (2019) Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants*. **8**, 156.

Osés, S.M., Marcos, P., Azofra, P., De Pablo, A., Fernández-Muñío, M.Á., Sancho, M.T., (2020) Phenolic Profile, Antioxidant Capacities and Enzymatic Inhibitory Activities of Propolis from Different Geographical Areas: Needs for Analytical Harmonization. *Antioxidants*. **9**, 75.

Özer, E.D. (2020) Propolis and Potential Use in Food Products. *TURJAF*. **8**, 1139–1144.

Özkök, A., Keskin, M., Tanuğur Samancı, A.E., Yorulmaz Önder, E., Takma, Ç. (2021) Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis. *Appl. Biol. Chem.*, **64**, 37.

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S. H. (2017) Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–21.

Paulino, N., Coutinho, L. A., Coutinho, J. R., Vilela, G. C., da Silva Leandro, V. P., Paulino, A. S. (2015) Antiulcerogenic effect of Brazilian propolis formulation in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **6**, 580.

Pitt, J.J. (2009) Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* **30(1)**,19-34.

Plattner Bienenhof [Slika] (bez dat.) Preuzeto 25. 4. 2021. s <https://www.museo-plattner.com/en/propolis/71-propolis-spray-alcohol-free-30-ml.html>

Pobiega, K., Gniewosz, M., Kraśniewska, K. (2017) Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis. *Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln.* **2017**, 69–79.

Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (2000) Narodne novine **20**, Zagreb.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290-4302.

Red Seal [Slika] (bez dat.) Preuzeto 25. 4. 2021. s <https://www.redseal.co.nz/product/propolis-toothpaste/>

Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., Milojković-Opsenica, D. (2015b) Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 1869-1876.

Ristivojević, P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D. (2015a) Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS/MS) Study of Phenolic Profile of Serbian Poplar Type Propolis. *Phytochem. Anal.* **26**, 127-136.

Russo, A., Longo, R., Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* **73**, 21–29.

Saftić, L., Peršurić, Ž., Kraljević Pavelić, S. (2019) LC–QQQ and LC–QTOF MS methods for comprehensive detection of potential allergens in various propolis extracts. *Eur. Food Res. Technol.* **245**, 1981-1995.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Righi, A., Salatino, M. (2011) ChemInform Abstract: Propolis Research and the Chemistry of Plant Products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 925-936.

Santos Bezerra, K.K., Andrade Duarte De Farias, M.D.C., Borges Maracajá, P. (2015) Vaginal Yeasts and the Antifungal Action of Red Propolis Extract. *Int. Arch. Med.* **8**, 154-164.

Santos, L.M., Fonseca, M.S., Sokolonski, A.R., Deegan, K.R., Araújo, R.P., Umsza-Guez, M.A., Barbosa, J.D., Portela, R.D., Machado, B.A. (2020) Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J. Sci. Food Agric.* **100**, 1369-1382.

Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M. (2017). Phenolic Composition of Propolis. Bee Products - Chemical and Biological Properties, Springer, Cham, str. 99–111.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science.* **98(4)**, 828-834.

Silva, V., Genta, G., Moller, M.N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., Radi, R., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R., Heinzen, H., Fierro, W., Denicola, A. (2011) Antioxidant activity of Uruguayan propolis in vitro and cellular assays. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 6430-6437.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006) Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2649-2659.

Sun, S., He, J., Liu, M., Yin, G., Zhang, X. (2019) A Great Concern Regarding the Authenticity Identification and Quality Control of Chinese Propolis and Brazilian Green Propolis. *J. Food Nutr. Res.* **7(10)**, 725-735.

Sweetree Honey [Slika] (13. 6. 2016.) Preuzeto 22. 4. 2021. s https://www.sweetreehoney.co.nz/More+Info/The+Buzz+Blog/x_post/Products-of-the-hive-propolis-00118.html/

Tlak Gajger, I., Pavlović, I., Bojić, M., Kosalec, I., Srećec, S., Vlainić, T., Vlainić, J. (2017). The components responsible for antimicrobial activity of propolis from Continental and Mediterranean regions in Croatia. *Czech J. Food Sci*, **35(5)**, 376–385.

Varga, E. (2010) Validation and application of an LC-MS/MS based multi target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. Diplomski rad. University of Natural Resources and Applied Life Science, Beč.

Wagh, V.D. (2013) Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2013**, 1–11.

Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S.O., Kwon, S.W., Perumalsamy, H., Ahn, Y-J. (2016) Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern. Med.* **16**, 65-77.

Zhang, C. P., Ping, S., Wang, K., Huang, S., Hu, F. L. (2015) A survey of the incidence of poplar tree gum in propolis products on the Chinese retail market. *J. Apic. Res.* **54**, 30-35.

9. SAŽETAK

Martina Delač, Karla Tomljanović

Primjena *fingerprinta* fenolnih spojeva u karakterizaciji i dokazivanju autentičnosti propolisa

Propolis je ljepljiva supstanca koju proizvode medonosne pčele tako što skupljaju biljne izlučevine, vosak i pelud te ih miješaju s vlastitom slinom. Postoji duga tradicija primjene propolisa u terapijske svrhe zbog dokazanih pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje kao što su antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antioksidativno i antikancerogeno djelovanje. Navedeni učinci se pripisuju sinergističkim djelovanjem fenolnih spojeva u propolisu. Međutim, fenolni sastav propolisa može znatno varirati ovisno o lokaciji prikupljanja, vrsti pčela, načinu ishrane pčela, temperaturi, sezoni prikupljanja i uvjetima skladištenja. S obzirom da je propolis složena smjesa promjenjivog sastava korištena je prethodno validirana metoda LC-MS/MS kako bi se identificirali i kvantificirali fenolni spojevi u svrhu karakterizacije uzoraka i dokazivanja autentičnosti propolisa primjenom *fingerprinta* fenolnih spojeva. Primjenom LC-MS/MS u uzorcima propolisa identificirano je ukupno 50 fenolnih spojeva. Na području Hrvatske zastupljen je topolin tip propolisa, a *fingerprint* fenolnih spojeva te varijacije u koncentracijama pokazali su da nije uniformnog sastava jer postoje statistički značajne razlike u ovisnosti o regiji ($p < 0,05$). Primjenom ORAC metode utvrđen je visok antioksidacijski kapacitet svih uzoraka propolisa, a razlike u intenzitetu antioksidacijskog kapaciteta određene su zbog različitog fenolnog profila uzoraka, koji je varirao u ovisnosti o regiji iz koje je propolis uzet. *Fingerprint* fenolnih spojeva propolisa može se koristiti za tipizaciju, odnosno određivanje geografskog i botaničkog podrijetla propolisa. U budućnosti je moguća primjena fenolnog profila u svrhu utvrđivanja kakvoće i autentičnosti propolisa, no metoda prethodno treba biti dodatno unaprijeđena za sustavno određivanje širokog spektra uzoraka.

Ključne riječi: propolis, fenolni *fingerprint*, validacija, LC-MS/MS, ORAC

10. SUMMARY

Martina Delač, Karla Tomljanović

Application of phenolic fingerprint in characterization and verifying the authenticity of propolis

Propolis is a sticky substance produced by honeybees. They collect plant secretions, wax and pollen, and mix them with their own saliva. There is a long tradition of using propolis for therapeutic purposes due to the proven positive effects on human health such as antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant and anticancer. These effects are attributed to the synergistic action of phenolic compounds in propolis. However, the phenolic composition of propolis can vary considerably depending on location, species, diet of the bees, temperature, season and the storage conditions. Since propolis is a complex mixture of variable composition, the previously validated LC-MS/MS method was used to identify and quantify phenolic compounds for the purpose of characterizing samples and proving the authenticity of propolis using fingerprint of phenolic compounds. A total of 50 phenolic compounds were identified using LC-MS/MS in propolis samples. In the area of Croatia, poplar type of propolis is present, but phenolic fingerprint and variations in their concentrations indicate non-uniform composition because there are statistically significant differences depending on the region ($p < 0.05$). By applying ORAC method, high antioxidant capacity of all propolis samples was determined. The differences in the intensity of antioxidant capacity were determined due to the different phenolic profile of the samples, which varied depending on the region from which propolis was collected. The fingerprint of phenolic compounds of propolis can be used for characterizing, i.e. establishing the geographical and botanical origin of propolis. In the future, it is possible to use phenolic profile for determination of quality and authenticity of propolis. Method needs to be further developed for the systematic assessment of wide range of samples.

Keywords: propolis, phenolic fingerprint, validation, LC-MS/MS, ORAC