

Određivanje biodostupnosti odabranih polifenolnih sastavnica propolisa u uvjetima in vitro simulirane probave

Perak Junaković, Eleonora

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:728078>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

Eleonora Perak Junaković

**ODREĐIVANJE BIODOSTUPNOSTI ODABRANIH
POLIFENOLNIH SASTAVNICA PROPOLISA U
UVJETIMA *IN VITRO* SIMULIRANE PROBAVE**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Terzić, dr.med.vet.

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Eleonora Perak Junaković

**BIOACCESSIBILITY RESEARCH OF SELECTED
PROPOLIS POLYPHENOLS BY *IN VITRO*
SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Assoc. prof. Svjetlana Terzić, DVM

Zagreb, 2023.

Zahvala

Posebno bih se željela zahvaliti mentorici izv. prof. dr.sc. Svjetlani Terzić na pruženoj prilici i odabiru teme, na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju, a nadasve na prenesenom znanstvenom i stručnom znanju. Hvala Vam na usmjeravanju i motivaciji tijekom cijelog istraživanja i pisanja ovog doktorskog rada. Hvala na prijateljskom odnosu i spremnosti na pomoć kad god je bilo potrebno.

Najiskrenije se zahvaljujem dr.sc. Kseniji Šandor na kontinuiranoj pomoći i poticaju tijekom provođenja istraživanja i pisanja doktorskog rada. Hvala na prenesenom bogatom znanju, na podršci i prijateljskom razgovoru tijekom cijelog istraživanja.

Hvala ravnatelju Hrvatskog veterinarskog instituta izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu i akademiku Željku Cvetniću na prilici i razumijevanju tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Veliko hvala voditeljici Laboratorija za analizu veterinarsko medicinskih proizvoda dr. sc. Ireni Žarković i kolegama dr.sc. Miroslavu Andrišiću, dr. sc. Kseniji Šandor, Anji Vujnović, dr. vet. med., Katji Vretenar Špigelski, dr. med. vet., Sonji Sinković, dr. med. vet., Dominiki Fajdić, dr. med. vet., Mirti Pehnac, dr. med. vet. i Ana-Mariji Bolarić na kolegijalnosti, prijateljskoj pomoći i savjetima.

Hvala voditeljici Laboratorija za mikrobiologiju hrane za životinje dr. sc. Andrei Humski i voditeljici Laboratorija za određivanje rezidua dr. sc. Nini Bilandžić na ustupljenoj opremi i prostoru za provedbu istraživanja.

Veliko hvala dr. sc. Miroslavu Beniću na susretljivosti i nesebičnoj pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

Želim se iskreno zahvaliti prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na velikoj pomoći u fazi ocjene doktorskog rada, na ohrabrenju i toplom prijateljskom odnosu.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu doktorskog rada na trudu te stručnim i konstruktivnim prijedlozima.

Neizmjerne se zahvaljujem mami Marici, tati Matiji, bratu Josipu i sestri Elizabeti, teti Ruži, Radi i Teu, kao i brojnoj obitelji što ste uvijek bili tu za mene i klince kad god je trebalo.

Najveća hvala mojim najmilijima Marku, Juditi i Mati što su vjerovali u mene i ohrabrivali me, hvala na ogromnom strpljenju i razumijevanju, bez vaše ljubavi i podrške ovaj doktorski rad ne bi bilo moguće završiti. Ovo je za vas.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka pri Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu, pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Svjetlane Terzić, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
1.1. Svrha rada	3
1.2. Pretpostavke ovog istraživanja su:	4
1.3. Uporabljene metode	4
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Polifenolni spojevi.....	5
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva i klasifikacija polifenola	5
2.1.2. Flavonoidi	8
2.1.3. Neflavonoidi	13
2.2. Propolis.....	15
2.2.1. Kemijski sastav i fizikalno-kemijska svojstva	15
2.2.2. Polifenoli u propolisu	16
2.3. Priprava uzoraka za analizu	18
2.3.1. Ekstrakcija sirovog propolisa	18
2.3.2. Inkapsulacija	20
2.3.3. Liofilizacija.....	23
2.4. Kvalitativno i kvantitativno određivanje polifenolnih spojeva u propolisu.....	24
2.4.1. Tekućinskokromatografsko određivanje pojedinačnih polifenola.....	26
2.5. Digestibilnost (probavljivost) polifenola.....	28
2.5.1. Modeli in vitro	31
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Sirovi propolis.....	35
3.2. Kemikalije.....	36
3.2.1. Priprava ekstrakata propolisa.....	36
3.2.2. Spektrofotometrijske analize	36
3.2.3. Tekućinskokromatografske analize	36
3.2.4. In vitro simulacija GID-a	37
3.3. Pribor i oprema	37
3.3.1. Obrada sirovog propolisa	37

3.3.2. Priprava ekstrakata propolisa.....	38
3.3.3. Spektrofotometrijske analize	39
3.3.4. Tekućinskokromatografske analize	39
3.3.5. Simulacija GID-a in vitro.....	40
3.4. Referentni materijal.....	41
3.5. Analitičke metode.....	42
3.5.1. Postupak obrade sirovog propolisa	42
3.5.2. Postupci i tehnike ekstrakcije uzoraka propolisa.....	42
3.5.3. Spektrofotometrijske analize	45
3.5.4. Tekućinskokromatografske analize (RP-HPLC-PDA)	47
3.6. Simulacija GID-a in vitro	51
3.6.1. Protokol simulacije GID-a in vitro	51
3.6.2. Analize uzoraka prije i nakon oralne, želučane i crijevne faze probave.....	54
3.6.3. Izračun udjela biodostupnih polifenola.....	55
3.7. Statistička obrada podataka.....	57
§ 4. REZULTATI	58
4.1. Fizikalno-kemjska svojstva sirovog propolisa	58
4.2. Razvoj i optimizacija tekućinskokromatografske metode.....	60
4.3. Priprava i analiza uzoraka propolisa	64
4.3.1. Ekstrakcijske tehnike.....	64
4.3.2. Optimizacija pripreve kompleksa propolisa liofilizacijom	68
4.4. Validacija metode RP-HPLC-PDA.....	77
4.5. Analize oralnih, želučanih i crijevnih frakcija in vitro simulirane probave	84
4.5.1. Rezultati tekućinskokromatografskih analiza.....	84
4.5.2. Rezultati spektrofotometrijskih analiza	97
§ 5. RASPRAVA	102
5.1. Istraživanja PC, GN, KR, CA i CAPE u ekstraktima kontinentalnog tipa propolisa	104
5.2. Biodostupnost odabranih polifenola u uvjetima in vitro simulirane GID	109
5.2.1. Biodostupnost odabranih polifenola iz kontinentalnog tipa propolisa	109
5.2.2. Biodostupnost glavnih skupina polifenola iz kontinentalnog tipa propolisa.....	116
§ 6. ZAKLJUČAK.....	119
§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	122
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	123
§ 9. DODATAK	XVII
§ 10. ŽIVOTOPIS.....	XXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ODREĐIVANJE BIODOSTUPNOSTI ODABRANIH POLIFENOLNIH SASTAVNICA PROPOLISA U UVJETIMA *IN VITRO* SIMULIRANE PROBAVE

Eleonora Perak Junaković

Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska

U ovome radu istražena je stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost polifenola pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline u uvjetima simulirane probave *in vitro* (oralna i želučana faza te faza probave u tankom crijevu s dva modela: centrifugiranjem i dijalizom kroz polupropusnu membranu) na dva uzorka kontinentalnog propolisa i smjese standarda odabranih polifenola. Različitim ekstrakcijskim postupcima i korištenjem određenih nosača istraženi su ekstrakti prikladni za oralnu primjenu te analizirani validiranom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz primjenu UV-detektora s nizom fotodioda (eng. *High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detection*, HPLC-PDA). Primjenom 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD) i postupkom liofilizacije dobiven je u vodi topljivi kompleks propolis-HP- β -CD s najvećim udjelom polifenola. Rezultati analiza RP-HPLC-PDA oba uzorka kontinentalnog propolisa pokazali su stabilnost odabranih polifenola tijekom svih faza simulirane probave. Biodostupnost svih polifenola u uvjetima *in vitro* nakon dijalize kroz polupropusnu membranu bila je vrlo niska u odnosu na model s centrifugiranjem. Nadalje, rezultati ukazuju da u modelu s centrifugiranjem nema razlike u biodostupnosti polifenola između dva uzorka kontinentalnog tipa propolisa. Vodena suspenzija liofilizata kompleksa propolis-HP- β -CD pokazala se kao potencijalna djelatna tvar u farmaceutskim proizvodima za oralnu primjenu.

(XXVII + 143 stranica, 35 slika, 28 tablica, 203 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biodostupnost/ HP- β -CD/ HPLC/ polifenoli/ propolis/ simulacija probave

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Terzić, zn. savj. u trajnom zvanju

Rad prihvaćen: 11. siječnja, 2023.

Ocjenitelji

prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, PMF, Zagreb

prof. dr. sc. Predrag Novak, PMF, Zagreb

doc. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, zn. savj., IMI, Zagreb

Zamjena: dr. sc. Irena Čaleta, zn. sur., Selvita d.o.o., Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

BIOACCESSIBILITY RESEARCH OF SELECTED PROPOLIS POLYPHENOLS BY *IN VITRO* SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION

Eleonora Perak Junaković
Croatian Veterinary Institute, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Croatia

In this work, the stability, bioaccessibility and dialysability of polyphenols pinocembrin, galangin, chrysin, caffeic acid and phenylethyl ester of caffeic acid were investigated after *in vitro* simulated digestion (oral and gastric phase and small intestine phase with two models: centrifugation and dialysis through a semi-permeable membrane) on two samples of continental propolis and standard mixture of selected polyphenols. Extracts suitable for oral administration prepared by various extraction procedures and the use of certain carriers have been investigated and analyzed by validated RP-HPLC-PDA method. Using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) carbohydrate and by lyophilisation procedure, a propolis water-soluble complex with the highest polyphenol content was prepared. The results of RP-HPLC-PDA analysis of both propolis samples showed the stability of selected polyphenols during all phases of simulated digestion. The bioaccessibility of all polyphenols in *in vitro* conditions after dialysis through a semi-permeable membrane was very low compared to the centrifugation model. Furthermore, the results indicate that in the model with centrifugation there is no difference in the bioaccessibility of polyphenols between the two samples of the continental type of propolis. The aqueous suspension of the lyophilisate of the propolis-HP- β -CD complex proved to be a potential active substance in pharmaceutical products for oral administration.

(XXVII + 143 pages, 35 figures, 28 tables, 203 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: bioaccessibility/ digestion simulation/ HP- β -CD/ HPLC/ polyphenols/ propolis

Supervisor: Assoc. Prof. Svjetlana Terzić, Scientific Advisor in Tenure

Thesis accepted: January 11th, 2023

Reviewers:

Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor, PMF, Zagreb

Dr. Predrag Novak, Full Professor, PMF, Zagreb

Dr. Irena Brčić Karačonji, Scientific Advisor, IMI, Zagreb

Substitute: Dr. Irena Čaleta, Research Associate, Selvita d.o.o., Zagreb

§ 1. UVOD

Ljekovito i aromatično bilje i proizvodi dobiveni od njih od davnina se koriste za ublažavanje zdravstvenih tegoba te liječenje različitih bolesti. Mnogi biljni spojevi imaju dugoročan blagotvorni utjecaj na zdravlje ljudi, stoga je posljednjih nekoliko desetljeća povećan interes znanstvenika za njihova bioaktivna svojstva i primjenu u humanoj i veterinarskoj medicini. Koncentracijski najzastupljeniji biološki aktivni spojevi u biljaka, tj. sekundarni metaboliti biljaka, su polifenoli. Polifenoli imaju strukturnu i zaštitnu ulogu u biljkama, a bioaktivnost ovih fenolnih spojeva očituje se najčešće nakon unosa u organizam hranom, dodatcima prehrani ili primjenom kozmetičkih proizvoda koji ih sadržavaju, što je kroz mnoga znanstvena istraživanja i dokazano.^{1,2,3}

Usprkos visokim koncentracijama ovih prirodnih spojeva u biljkama, njihova biodostupnost, odnosno udio oslobođene i apsorbirane tvari u odnosu na udio prije unosa u organizam i biorasploživost, tj. raspoloživi udio tvari u ciljnom tkivu nakon apsorpcije u odnosu na ukupni udio prije unosa u organizam može biti niska i jako promjenjiva kako između različitih skupina polifenola, tako i između pojedinačnih spojeva iste skupine.^{4,5,6} Navedeno se posebice odnosi na kompleksne matrice poput sirovog (nativnog) propolisa.

Propolis se zbog svojih nepovoljnih organoleptičkih svojstava i niske biorasploživosti nativnog oblika vrlo rijetko, kao takav, upotrebljava za izradu funkcionalnog dodatka prehrani ili kao djelatna tvar u farmaceutskim proizvodima, stoga se najčešće primjenjuje kao ekstrakt u različitim otapalima. Poznato je da bioaktivna svojstva propolisa uvelike ovise o ekstrakcijskoj metodi i pripravi ekstrakata. Velika većina ekstrakata pripravlja se u vodenim otopinama etanola različitih volumnih omjera (70-96 %), jer je propolis dobro topljiv u etanolu. S druge strane, etanol nije pogodno otapalo jer vrlo često izaziva alergije, a osim toga nepoželjan je u pripravcima namijenjenima djeci kao i u veterinarskoj medicini.⁷ Iz tih razloga je naše istraživanje bilo usmjereno ka pripravi u vodi topljivog pripravka kompleksa propolisa s nosačem 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD-om), koji će imati visoku koncentraciju odabranih spojeva, biti ugodnog okusa i biti u stabilnom obliku kako ne bi došlo do smanjenja koncentracija polifenolnih spojeva, što

bi imalo za posljedicu smanjenje bioaktivnih svojstava potencijalnog pripravka za primjenu kroz usta.

Strukturna raznolikost, fizikalno-kemijska svojstva bioaktivnih spojeva, ali i njihova varijabilnost u uzorcima propolisa iz različitih geografskih područja upućuju na važnost optimizacije ekstrakcijskih postupaka potrebnih za njihovu izolaciju i/ili odvajanje od ostalih spojeva matrice. Dosadašnja istraživanja pokazuju da: etanolni ekstrakti propolisa sadrže najveće koncentracije polifenola, da su u kontinentalnom tipu propolisa među najzastupljenijim spojevima pinocembrin (PC), galangin (GN), krizin (KR), kavena kiselina (eng. *Caffeic Acid*, CA) i feniletil ester kavene kiseline (eng. *Phenyl Ethyl Ester Caffeic Acid*, CAPE) te da je biodostupnost ukupnih polifenolnih spojeva nakon oralne primjene propolisa niska.^{8,9} Iako je CAPE jedan od tipičnih sastojaka kontinentalnog tipa propolisa s dokazanim antioksidacijskim i antitumorskim djelovanjem,^{10,11} u hrvatskom propolisu je tek nedavno identificiran.¹²

U mnogobrojnim znanstvenim istraživanjima biodostupnost polifenola određena je tijekom simulirane želučano-crijevne probave *in vitro* (eng. *Gastrointestinal Digestion*, GID) u hrani biljnog podrijetla i ljekovitom bilju.^{4,9,13} Međutim, prema dostupnoj literaturi ne postoje istraživanja provedena s ciljem određivanja biodostupnosti pojedinačnih polifenolnih spojeva iz nekoliko različitih skupina tijekom simulirane GID *in vitro* nakon oralne primjene inkluzijskog kompleksa ekstrakta propolisa i HP- β -CD-a.

Ovo istraživanje će po prvi puta pružiti uvid u stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost navedenih polifenolnih spojeva u pripremljenom kompleksu propolis-HP- β -CD s kontinentalnog područja Republike Hrvatske u uvjetima probave *in vitro* u ustima, želudcu i tankom crijevu.

1.1. Svrha rada

S obzirom na to da je svrha ovog istraživanja dobivanje u vodi topljivog pripravka propolisa pogodnog za oralnu primjenu, odabrani pripravak podvrgnut je simulaciji GID-a *in vitro*, kako bi se utvrdila stabilnost i biodostupnost pojedinačnih polifenola prolaskom kroz probavni sustav (usnu šupljinu, želudac i tanko crijevo) te dijalizibilnost prolaskom kroz polupropusnu membranu. Dobiveni rezultati pružaju uvid u dosad neistražene mogućnosti i svojstva polifenola propolisa kao funkcionalnog dodatka prehrani ili u liječenju, a koji ima blagotvorne učinke, kako na ljudski tako i na životinjski organizam. Istraživanja su provedena s dva uzorka propolisa kontinentalnog podrijetla, ali s različitim lokacijama Republike Hrvatske kako bi se što sigurnije moglo interpretirati rezultate i potvrditi pretpostavke.

Stoga su ciljevi izrade ove doktorskog rada:

- kvalitativno i kvantitativno odrediti i potvrditi odabrane polifenole s odabranim lokacijama istog geografskog područja propolisa razvojem i optimizacijom spektrofotometrijskih metoda i metode temeljene na primjeni sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz primjenu UV-detektora s nizom fotodioda (eng. *High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detection*, HPLC-PDA),
- istražiti i odabrati optimalan postupak pripreme uzorka propolisa i nosač za ekstrakt propolisa prikladan za oralnu primjenu,
- istražiti i utvrditi stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost polifenola tijekom GID-a primijenjenih u obliku smjese standarda i pripravka propolisa uz nosač,
- utvrditi utjecaj struktura odabranih polifenola na njihovu stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost tijekom GID,
- utvrditi razlike u udjelu biodostupnih polifenolnih spojeva na dva modela simulacije probave *in vitro*: centrifugiranjem ili dijalizom kroz polupropusnu membranu (dijaliza),
- utvrditi razlike u biodostupnosti polifenola s obzirom na različitu lokaciju istog geografskog područja propolisa.

1.2. Pretpostavke ovog istraživanja su:

- ultrazvučnom ekstrakcijom u 70%-tnom etanolnom ekstraktu bit će ekstrahiran najveći udio polifenola,
- propolis kao matrica imat će značajan utjecaj na biodostupnost odabranih polifenola,
- dijalizibilna frakcija (nakon dijalize kroz polupropusnu membranu) simulirat će apsorpciju polifenola kroz stijenku tankog crijeva,
- udio ukupnih polifenolnih spojeva i flavonoida određenih spektrofotometrijskim metodama UV/VIS, ali i koncentracija PC, KR, GA, CA i CAPE određena metodom HPLC-PDA bit će vrlo različita za dva uzorka propolisa s različitih lokacija istog geografskog područja,
- model simulacije probave *in vitro* (centrifugiranjem ili dijalizom) imat će značajan utjecaj na koncentracije biodostupnih polifenola,
- odabrana polazna koncentracija polifenolnih spojeva u ekstraktu propolisa za simulaciju probave *in vitro* bit će kritični uvjet za njihovo određivanje u pojedinim fazama probave,
- odabrane polifenolne sastavnice nakon dijalize bit će moguće kvantificirati jer će biti u svom početnom obliku tj. ostati će stabilne tijekom simulirane GID *in vitro*.

1.3. Uporabljene metode

Analize određivanja sadržaja pojedinačnih polifenola, kao i analize određivanja ukupnih fenola, ukupnih flavona i flavonola te ukupnih flavanona i dihidroflavonola u vodenim i etanolnim ekstraktima propolisa (EEP) te u frakcijama iz svake faze GID-a, provest će se optimizacijom i validacijom spektrofotometrijskih metoda UV/VIS i metode HPLC-PDA kako bi se postigli što osjetljiviji analitički uvjeti metoda.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

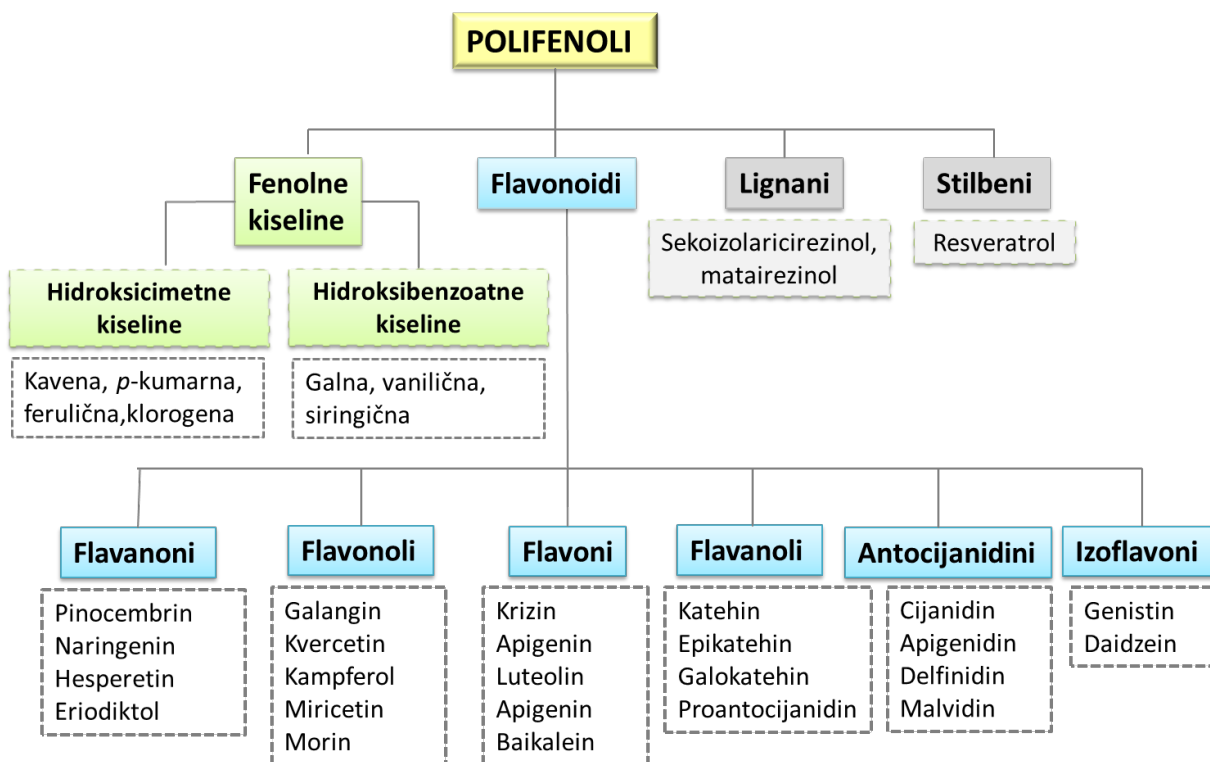
2.1. Polifenolni spojevi

2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva i klasifikacija polifenola

Polifenoli su najveća skupina sekundarnih metabolita biljaka, a obuhvaćaju vrlo heterogeni spektar spojeva, od jednostavnih spojeva poput fenolnih kiselina, do velikih polimeriziranih spojeva kao što su kondenzirani tanini. Fenol je ujedno i trivijalni naziv za monohidroksibenzen, najjednostavniji spoj skupine. Opća molekulska formula fenolnih spojeva je Ar-OH, pri čemu Ar označava fenil, supstituirani fenil ili neku drugu arilnu skupinu povezanu s jednom ili više hidroksilnih skupina (-OH).^{14,15} Fenolna priroda ovih spojeva čini ih hidrofilnima, a time i topljivima u polarnijim organskim otapalima i njihovoj smjesi s vodom.

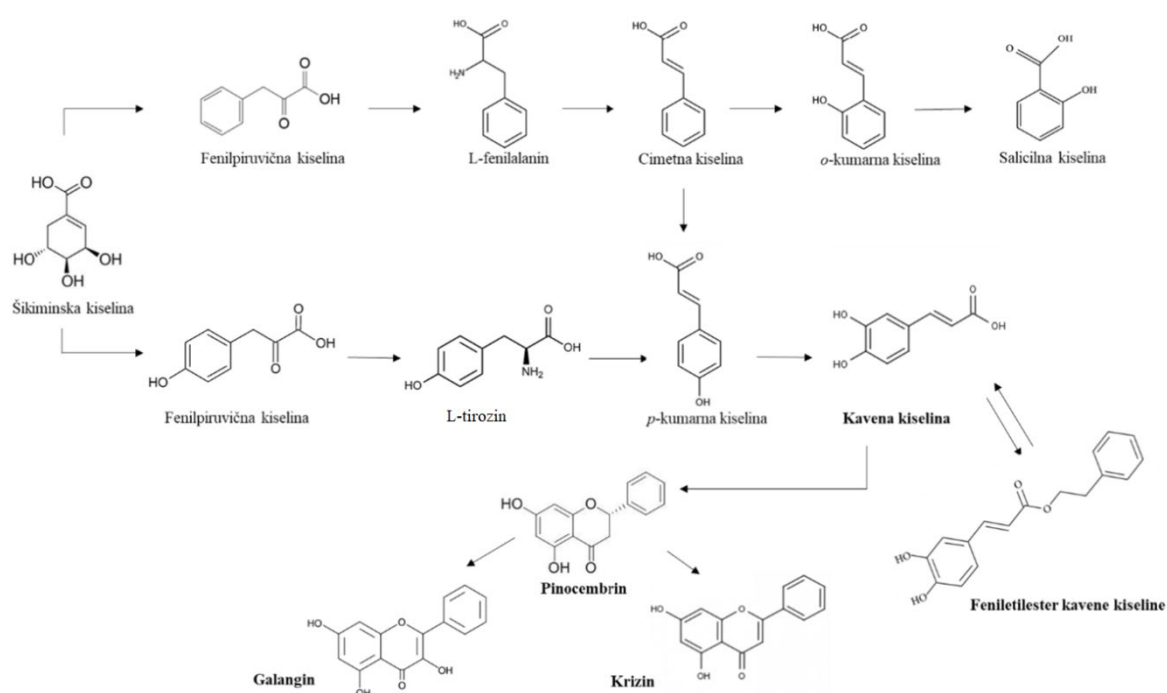
Do sada ih je otkriveno više od 8000, a većina polifenola u biljkama je u konjugiranom obliku s monosaharidima, polisaharidima te u obliku estera. Takvi polifenoli imaju višestruke uloge poput pigmentacije (prvenstveno plodova i cvjetova), doprinose okusu i aromi, štite biljku od UV zračenja, oksidacijskog stresa, patogena i teških klimatskih uvjeta, a uključeni su i u rast, razmnožavanje i antioksidacijsku zaštitu.^{16,17} Mnogobrojnim znanstvenim istraživanjima utvrđena su njihova pozitivna biološka djelovanja na živi organizam poput protuupalnog, antimikrobnog, antifugalnog, diuretičkog, antihepatotoksičnog, antikancerogenog, hipoglikemijskog, analgetskog, antialergijskog, antihipertenzivnog, antikoagulirajućeg te antioksidacijskog djelovanja.^{2,18,19,20,21,22,23} Zaštitna uloga ovih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, a time i sprječavanju nastanka oksidacijskog stresa u slučaju bolesti uzrokovanih neravnotežom oksidacijskih procesa u tijelu.^{24,25}

S obzirom na veliku raznolikost fenolnih spojeva, postoji nekoliko načina njihove klasifikacije prema biosintetskom putu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Prema kemijskoj strukturi dijele se u dvije osnovne skupine: flavonoide i ne-flavonoide,²⁶ a ova klasifikacija prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Klasifikacija polifenola prema kemijskoj strukturi (prilagođeno prema²⁶)

Biosinteza polifenola odvija se najvećim dijelom fenilpropanoidnim metaboličkim putem šikiminske kiseline preko fenilalanina kao njenog prekursora te niza enzima koji određuju brzinu reakcija, a svi nastali spojevi imaju slične osnovne strukture (Slika 2.) koje dalje mogu biti hidroksilirane, metoksilirane, glikozidirane s monosaharidima i polisaharidima ili acilirane tj. esterificirane. Iako se posljednjih nekoliko godina intenzivno istražuju, detaljni koraci biosintetskih putova nisu još uvijek potpuno razjašnjeni te se u literaturi često nailaze oprečni rezultati. Međutim, većina polifenolnih spojeva su derivati *trans*-cimetne kiseline nastale deaminacijom L-fenilalanina uz pomoć L-fenilalaninamonijliaze^{12,27} (Slika 2).

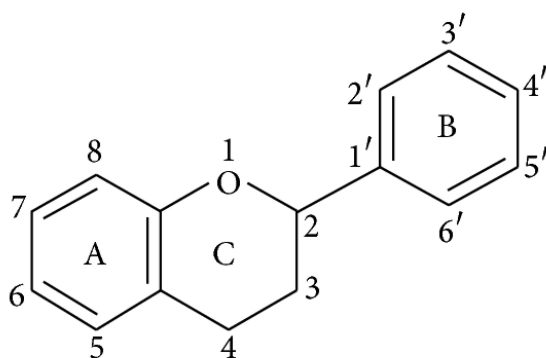


Slika 2. Sinteza flavonoidnih i neflavonoidnih fenolnih spojeva (prilagođeno prema¹²)

2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina najviše istraženih polifenolnih spojeva, široko rasprostranjenih u koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću biljaka.²⁸ Flavonoidi su sastavni dio prehrane ljudi i životinja, a budući da pripadaju fitokemikalijama, nije moguća njihova sinteza u ljudskom ili životinjskom organizmu. Propolis je visokovrijedan pčelinji proizvod bogat flavonoidima i ostalim polifenolnim sastavnicama.

Prema kemijskim obilježjima, osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan, C₁₅ (C₆-C₃-C₆), odnosno 1-fenil-3-(3-hidroksifenil)propan-1-ol koji gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena stvara flavan od kojeg nastaju ostale skupine flavonoida. Drugim riječima, ova osnovna aglikonska struktura flavonoida obuhvaća 2 benzenska prstena (A i B) povezanih heterocikličkim prstenom pirana ili pirona (C-prsten) u sredini koji sadrži kisik (Slika 3).

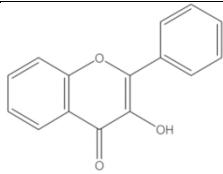
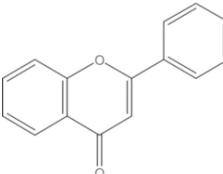
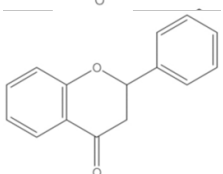
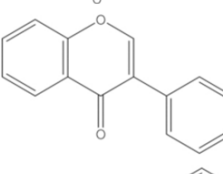
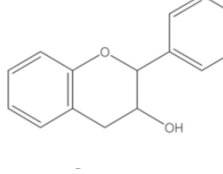
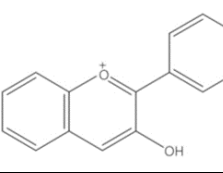


Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (preuzeto iz²)

U prirodi se flavonoidi nalaze u slobodnom (aglikonskom) obliku bez šećerne jedinice ili u konjugiranom obliku, dok je u biljkama najčešći glikozidni oblik zbog jedne ili više šećernih skupina vezanih preko hidroksilne (*O*-glikozid) ili ugljik-ugljik (*C*-glikozid) veze. Do danas je pronađeno više od 60 šećera koji su glikozidnom vezom povezani s aglikonima na položajima C3 ili C7, a najčešći glikozidi su glukozid, galaktozid, ramnozid, arabinozid, glukuronid i malonil.²⁰ Osim vezanja na šećerne jedinice, flavonoidi mogu kelirati mnoge metalne ione stvarajući time komplekse metal-flavonoid koji imaju snažnija svojstva uklanjanja slobodnih radikala nego aglikoni flavonoida.^{29,30}

Podjela flavonoida (Tablica 1) kao i razlike među pojedinim podskupinama, proizlaze iz različitog broja i rasporeda vezanih hidroksilnih skupina, ali i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije te stupnja nezasićenosti prstena C. Na temelju vezanih supstituenata flavonoidi se mogu podijeliti na sljedeće podskupine: flavanole, flavone, flavanone, izoflavone, flavan-3-ole i antocijane te ostale flavonoide poput čalkona, dihidročalkona, dihidroflavonola, flavan-3,4-diola, kumarina i aurona.^{2,31}

Tablica 1. Strukturne formule osnovnih skupina flavonoida i predstavnici svake skupine (prilagođeno prema²⁰)

Skupina flavonoida	Struktura	Flavonoid	Supstitucijska skupina
Flavonol		Kvercetin Kampferol Galangin	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,4'-OH 3,5,7-OH
Flavon		Luteolin Krizin Apigenin	5,7,3',4'-OH 5,7-OH 5,7,4'-OH
Flavanon		Naringenin Pinocembrin Hesperetin	5,7,4'-OH 5,7-OH 3,5,3'-OH
Izoflavon		Daidzein Genistein	7,4'-OH 5,7,4'-OH
Flavanol		Katehin Epikatehin Galokatehin	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3', 4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH, 3-galat
Antocijanidin		Pelargonidin Cijanidin Delfinidin	3,5,7,4'-OH;3',5'-H 3,5,7,4',-OH,3,5OMe 3,5,7,3',4',5'-OH

U flavonoidnoj strukturi, fenilna skupina je smještena na poziciju 2 pironskog prstena (C-prsten), kod izoflavonoida je na poziciji C3, dok je kod čalkona i dihidročalkona pironski prsten otvoren. Flavonoidi i tokoferoli (vitamin E) dijele zajedničku strukturu, kromanski tj. benzopiranski prsten.³²

Gledajući rasprostranjenost flavonoida, pojedine skupine je moguće detektirati u više vrsta hrane biljnog podrijetla, dok je prisutnost drugih ograničena samo na određenu vrstu hrane. Unos flavonoida hranom na globalnoj se razini uvelike razlikuje među populacijama, s obzirom da ovisi o dostupnosti izvora pojedine vrste hrane te prehrambenim navikama različitih demografskih skupina.

2.1.2.1 Flavanoni

Strukturu flavanona čini 2,3-dihidro-2-fenilkroman-4-on, a pironski prsten ove strukture nije u ravnini jer sadrži zasićenu C2-C3 vezu prstena C. Posljednjih desetljeća znatno je porastao broj identificiranih flavanona i njihovih 3-hidroksi derivata, dihidroflavonola. Flavanoni imaju jedinstvenu strukturu koja čini veliki broj supstituiranih derivata ove podskupine kao npr. prenilirani flavanoni, furanoflavanoni, piranoflavanoni, benzilirani flavanoni.

Pinocembrin

Pinocembrin (PC) je dihidroksiflavanon čije su dvije hidroksi skupine smještene na pozicijama C5 i C7, identificiran je u medu, propolisu, te biljkama poput korijena đumbira i divljeg mažurana. Jedan je od najčešće korištenih flavonoida u farmaceutskoj industriji. Vrlo dobro su istražena njegova farmakološka djelovanja što uključuje antimikrobno, protuupalno, antioksidacijsko i antitumorsko djelovanje.^{33,34,35} Još uvijek se intenzivno proučava razvoj novih lijekova temeljenih na sastavu s PC, no zbog ograničavajućeg faktora, a to je njegova slaba topljivost i bioraspoloživost,^{36,37} potrebna su dodatna istraživanja mehanizma njegovog djelovanja kako bi se kliničkim studijama opravdala njegova primjena u medicinske svrhe.

2.1.2.2. Flavonoli

Flavonoli su najrasprostranjeniji flavonoidi u hrani, najčešće u obliku glikozida. Struktura flavonola uključuje 3-hidroksiflavonsku bazu u obliku 3-hidroksi-2-fenilkroman-4-ona s planarnim prstenima, a razlikuju se u položaju hidroksilne skupine na fenilnom prstenu. Namirnice bogate flavonolima su luk, brokula, čaj, jabuke i crno vino.^{38,39} Flavonoli poput

kvercetina i kampferola pojedinačno imaju 279 odnosno 347 različitih glikozidnih kombinacija.⁴⁰

Galangin

Galangin (GN), odnosno 3,5,7-trihidroksiflavon je prirodni flavonol pronađen u medu, propolisu i ljekovitom bilju iz porodice đumbirovki (*Zingiberaceae*),⁴¹ dobro je topljiv u organskim otapalima kao što su etanol, dimetilsulfoksid (DMSO), dimetilformamid, a djelomično je topljiv u vodenim puferima. U znanstvenoj literaturi opisana su antimikrobna,^{42,43} antiperoksidacijska,⁴⁴ antitumorska⁴⁵ i protuupalna svojstva⁴⁶ galangina kao i njegov utjecaj u kontroli pretilosti.⁴⁷ U mnogim istraživanjima utvrđeno je da GN posjeduje i snažna antioksidacijska svojstva.⁴⁸ Intenzivno se provode istraživanja postojećih, ali i novih svojstava galangina.

2.1.2.3. Flavoni

Flavoni i njihovi 3-hidroksi derivati flavonoli, uključujući njihove glikozide, metokside i druge acilirane produkte na sva tri prstena, čine ovu podskupinu flavonoida najvećom među svim polifenolima, međutim nisu široko rasprostranjeni u biljkama. Kemijska struktura flavona uključuje 2-fenil-benzo- γ -pironsku osnovu s dva fenilna prstena (A i B) povezana pironskim prstenom (C). Flavoni su strukturno slični flavonolima, no karakteristika ove podskupine je odsutnost -OH skupine na poziciji C3.

Krizin

Krizin (KR) pripada skupini flavona kemijskog imena 5,7-dihidroksiflavon te je široko rasprostranjen u biljnim vrstama. Posebno svojstvo flavona je prisutnost dvostruke veze između C2 i C3 atoma u C-prstenu te nedostatak atoma kisika na C3, a što je vidljivo na strukturi KR. U komercijalne svrhe upotrebljava se kao inhibitor aromatizacije androsterona i testosterona u estrogen,⁴⁹ a kemijska priroda molekule krizina povezana je s njegovim protuupalnim, protutumorskim i antioksidacijskim učinkom.^{50,51,52}

2.1.2.4. Flavan-3-oli

Flavanoli ili flavan-3-oli nazivaju se i katehini. Flavan-3-oli predstavljaju veliki broj spojeva, od monomernih jedinica (kao što su katehini, epikatehini i glaokatehini), dimera do oligomera i polimernih oblika koji se nazivaju proantocijanidinima ili kondenziranim taninima.⁵³

Različitim od ostalih flavonoida čini ih odsustvo dvostruke veze između C2 i C3, te karbonilne veze na C4 u C-prstenu. Zbog zasićenosti C-prstena te hidroksilacije na C3, flavanoli imaju dva kiralna centra na molekuli, na položaju C2 i C3, stoga su moguća četiri dijastereoizomera. Katehin je izomer s *trans* konfiguracijom, a epikatehin ima *cis* konfiguraciju te svaka od ove dvije konfiguracije ima dva stereoizomera npr. (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin. (+)-katehin i (-)-epikatehin su dva izomera najraširenija u hrani biljnog podrijetla. Flavanoli i njihovi oligomeri (s dvije do sedam monomernih jedinica) poznati su kao jaki antioksidansi prisutni u mnogim vrstama voća poput grožđa, jabuka i borovnica te su povezani s pozitivnim učincima na zdravlje.⁵⁴

2.1.2.5. Izoflavoni

Izoflavoni su uz flavonole i flavone najzastupljeniji flavonoidi u hrani biljnog podrijetla i gotovo isključivo se nalaze u hrani na bazi soje te u mahunarkama. B-prsten izoflavona povezan je s C3 pozicijom na prstenu C. Izoflavoni imaju značajan utjecaj na ljudsko zdravlje s obzirom na to da mahunarke, a posebice soja, čine veliki udio u prehrani mnogih naroda i kultura. Genistein i daidzein su predstavnici izoflavona pronađeni u soji i crvenoj djetelini, najčešće u obliku 7-*O*-glukozida ili 6"-*O*-malonil-7-*O*-glukozida.⁵⁵

2.1.2.6. Antocijanidini

Antocijanidini su osnovne sastavnice crvenog, plavog i ljubičastog pigmenta većine latica cvijeća, voća i povrća te određenih vrsta žitarica npr. crne riže. Glikozidi antocijanidina u biljkama nazivaju se antocijani. Cijanidin, delphinidin i pelargonidin su najrašireniji antocijanidi, te se 90 % antocijana temelji na cijanidinu, delphinidinu i pelargonidinu kao i njihovim metiliranim derivatima. Postoji više od 500 antocijana ovisno o hidroksilnim, metoksi skupinama na B-prstenu te glikozilaciji različitim šećerima. Boja antocijana ovisi o pH uvjetima: crveni su u kiselim, a plavi u bazičnim uvjetima. Osim toga, i hidroksilacija ili metoksilacija aromatskih prstena te glikozilacija šećerima ili aciliranim šećerima također može utjecati na boju antocijana. Antocijani su kemijski stabilni u kiselim uvjetima, dok se pri visokim pH vrijednostima raspadaju.⁵⁶

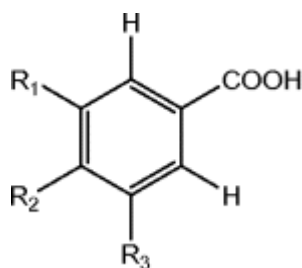
2.1.3. Neflavonoidi

Fenolne kiseline su neflavonoidne polifenolne sastavnice. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan s karboksilnom skupinom te s jednom ili više hidroksilnih/metoksi skupina (Slika 4 A i B). Fenolne kiseline pojavljuju se najčešće u obliku estera, glikozida ili amida, no rijetko u slobodnom obliku. Dvije su skupine fenolnih kiselina ovisno o broju i poziciji hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu: hidroksibenzoatne kiseline i hidroksicimetne kiseline te njihovi derivati. Hidroksibenzoatne kiseline imaju sedam ugljikovih atoma (C₆-C₁) te čine najjednostavnije fenolne kiseline u prirodi, najčešće prisutne u povrću, dok hidroksicimetne kiseline imaju 9 ugljikovih atoma (C₆-C₃), u namirnicama su prisutne u obliku jednostavnih estera s kininskom kiselinom ili glukozom.⁵⁷

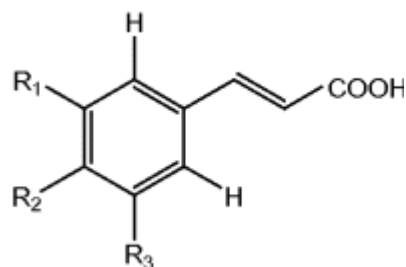
Derivati hidroksicimetne kiseline su ferulinska, kavena, p-kumarinska i sinapinska kiselina, a derivati hidroksibenzoatne kiseline su galna, vanilična, siringična i protokatehnična kiselina.

Fenolne kiseline imaju snažnu antioksidacijsku, antimikrobnu, protuupalnu, antikancerogenu aktivnost te su predmet mnogobrojnih istraživanja,^{58,59} a njihova biološka aktivnost potječe od aglikonskog dijela molekule.

A)



B)



Slika 4. Struktura fenolnih kiselina: **A)** hidroksibenzoatne kiseline; **B)** hidroksicimetne kiseline

2.1.3.1. Kavena kiselina

Kavena kiselina (CA, eng. *Caffeic Acid*) pripada skupini hidroksicimetnih kiselina. Kavena kiselina i njezini derivati široko su rasprostranjeni fenol-karboksilni spojevi u biljnim vrstama te se posljedično u organizam unose hranom kao i flavonoidi, a količina CA u nekoj biljci ovisi o biljnoj vrsti kojoj pripada. Kavena kiselina kao antioksidans smanjuje proizvodnju aflatoksina B₁, što joj posljedično otvara mogućnost primjene kao prirodnog antifungicida.⁶⁰ Sinergijska primjena visokih doza različitih antioksidansa, uključujući i CA, smanjuje rast tumora u pokusnih životinja.^{10,61}

2.1.3.2. Feniletil ester kavene kiseline (CAPE)

Jedan od najsnažnijih bioaktivnih spojeva propolisa s dokazanim terapijskim učinkom u prevenciji mnogih bolesti je CAPE. Njegova najveća uloga je u antioksidacijskom djelovanju te u sprječavanju prekomjernog nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva, kao i u imunomodulacijskom, protuupalnom, antimikrobnom i antitumorskom, djelovanju.^{10,62,63,64,65}

2.2. Propolis

2.2.1. Kemijski sastav i fizikalno-kemijska svojstva

Brojni dokazani terapijski učinci polifenolnih spojeva na zdravlje ljudi i/ili životinja razlog su intenzivnom proučavanju i zanimanju velikog broja znanstvenika, a propolis kao jedan od najfascinantnijih pčelinjih proizvoda ujedno je i bogati izvor polifenola. Propolis je smolasta tvar kojeg proizvode pčele medarice (*Apis mellifera*, L.) od različitih smola koju prerađuju djelovanjem enzima žlijezda slinovnica i miješanjem s voskom, a zbog svog ljepljivog smolastog sastava naziva se još i pčelinje ljepilo. Naziv propolis dolazi od grčke riječi 'pro'-prije ili ispred i 'polis'-grad zbog njegove funkcije pri izgradnji i regulaciji ulaza u košnicu. Pčelama propolis služi kao građevni materijal u košnicama, za zatvaranje rupa i pukotina te za obnavljanje i učvršćivanje saća.⁶⁶ Osim toga, propolis u košnicama osigurava kemijsku obranu od mikroorganizama, održava nižu razinu bakterija i plijesni u košnici u odnosu na okolinu te služi za balzamiranje većih insekata i malih životinja uginulih u košnici, a koji su preveliki da bi ih pčele iznijele van košnice.

Ljekovitost propolisa prepoznata je još od antičkih vremena. Tijekom povijesti koristio se u narodnoj medicini u različitim kulturama u svrhu zacjeljivanja rana i zaštite od infekcija,⁶⁷ dok posljednjih desetljeća znanstvenici intenzivno provode razna istraživanja propolisa nastojeći produbiti dosadašnja saznanja o njegovim svojstvima i učincima. Pri tome se osobita važnost pridaje istraživanjima flavonoida, fenolnih kiselina i njihovim esterima.⁶⁸ Antibakterijsko,^{22,69} protuupalno,⁶¹ imunomodulacijsko,⁷⁰ antialergijsko,⁷¹ antitumorsko,¹⁸ antimikrobno,⁷² citotoksično⁷³ i antioksidacijsko^{22,74} djelovanje samo su neka od bioloških djelovanja propolisa kojima se bave brojna objavljena istraživanja. Široki spektar bioloških učinaka koji mogu dovesti do poboljšanja zdravlja i prevencije bolesti te niska toksičnost u odnosu na sintetičke lijekove, čimbenici su zbog kojih je primjena propolisa u medicini te farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji sve značajnija.^{75,76}

Sirovi propolis je vrlo složena smjesa spojeva čiji se kemijski sastav, boja i aroma mijenjaju prema geografskim i klimatskim zonama. Kemijski sastav i organoleptička svojstva propolisa te koncentracija spojeva propolisa ovise također i o godišnjem dobu, dijelovima biljaka (npr. pupoljci stabala, cvijeće, pelud) te općenito o dominantnoj vegetaciji područja aktivnosti pčela. Sastav propolisa čini balzamski dio koji potječe od prikupljenog dijela s

biljaka, i nebalzamski dio koji dodaju pčele što ukupno prema osnovnim spojevima čini oko: 50-60% smole koja sadrži polifenole, 20-30% voska, 10% eteričnih ulja, 5% peluda i 5% različitih organskih spojeva te vitamina i minerala.⁷⁷

U propolisu je do sada identificirano više od 300 spojeva. Međutim, sastav propolisa još uvijek nije do kraja istražen, te se tijekom kemijske karakterizacije novih vrsta propolisa često identificiraju i nove sastavnice. Ipak, propolis se za sada može razvrstati u samo nekoliko kategorija, od kojih je propolis dobiven iz porodica topola (*Populus alba*, *Populus tremula* i *Populus nigra*) takozvani topola tip (eng. *Poplar type*), kontinentalni ili propolis umjerene klime, a koji je najveći izvor propolisa u Europi.⁷⁸ Najznačajnije biološki aktivne sastavnice ove vrste propolisa su flavonoidni aglikoni (flavoni, flavonoli i flavanoni), supstituirane cimetne kiseline i njihovi esteri.^{79,80} Za razliku od kontinentalnog propolisa, novija istraživanja ukazala su na postojanje nove karakteristično diterpenske vrste propolisa specifične za afričko i europsko sredozemno područje, nazvane mediteranski propolis.^{81,82} Vrsta propolisa koja je vrlo dobro istražena je brazilski zeleni propolis, kojeg karakteriziraju fenolne kiseline, prenilirane fenolne kiseline i flavonoidi.⁷⁸ Neke od manje istraženih vrsta propolisa su pacifički, aspenski, južnoamerički.⁸³

U Hrvatskoj ne postoji jedinstvena vrsta propolisa. Naime, u kontinentalnom dijelu Hrvatske, koji pripada euroazijskoj - sjeverno američkoj regiji, zastupljen je topola vrsta, čiji se sastav, a time i vrsta, postupno mijenja kako se prelazi na gorski dio Hrvatske, a zatim i na područje jadranske obale i otoke, odnosno mediteranski dio Hrvatske (Slika 5). Novijim kemometrijskim istraživanjem propolisa iz različitih regija Hrvatske prvi puta je potvrđena i mediteranska vrsta propolisa u uzorcima iz jadranske regije.^{84,85}

2.2.2. Polifenoli u propolisu

Polifenoli imaju značajnu ulogu u farmakološkoj i biološkoj aktivnosti propolisa.^{86,87,88} Za razliku od glikozida flavonoida prisutnih u većini biljaka, u propolisu se najvećim dijelom nalaze flavonoidni aglikoni, odnosno flavonoidi bez supstituenata na benzenskom prstenu.⁸⁹ Za topola tip propolisa karakteristični su aglikoni flavonoida poput PC, pinobanksina, pinostrobin, naringenina, GN i KR te fenilpropanoidne kiseline i esteri npr. kavena kiselina i esteri.^{22,90,91,92}

2.2.2.1. Najznačajniji polifenoli u propolisu kontinentalne Hrvatske

Dosadašnja istraživanja kemijskog sastava propolisa s područja Republike Hrvatske teško su usporediva zbog korištenih različitih ekstrakcijskih postupaka, otapala, omjera mase uzorka i volumena ekstraktanta, ali i načina izražavanja sadržaja polifenolnih spojeva, kao i zbog samog podrijetla uzoraka. Međutim, zajedničko im je da flavonoidi poput krizina, galangina i pinocembrina prevladavaju u kontinentalnom propolisu,^{22,74,91,93,94} a osim toga navedeni flavonoidi nisu prisutni u sastavu mediteranskog propolisa.¹² Za razliku od istraživanja Jerkovića i suradnika, Kosalec i suradnici su utvrdili da razlike u sastavu propolisa postoje samo na kvantitativnoj razini, dok se kvalitativno kemijski profil uzoraka iz cijele Hrvatske podudara.^{12,93} Barbarić i suradnici potvrdili su GN, KR i PC kao koncentracijski najzastupljenije flavonoide, a u radu Mašeka i suradnika utvrđeno je u kontinentalnom hrvatskom propolisu prisutnost estera fenolnih kiselina poput CAPE, benzilkafeata, benzilkumarata i estera cimetine kiseline te flavonoida GN, PC, pinobanksina, pinobanksin-3-acetata i krizina, s vrlo malim udjelom terpena.^{22,73} U istom radu Mašeka i suradnika uočene su velike razlike u kemijskom sastavu različitih ekstrakata, no nije pronađena poveznica između kemijskog sastava i biološke aktivnosti. Sobočanec i suradnici objavili su da su flavonoidi (KR, GN i PC) najdominantniji u sastavu propolisa kontinentalne Hrvatske te da imaju ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti propolisa.⁹⁵ U radu Jerkovića i suradnika po prvi puta je u sastavu mediteranskog propolisa s područja Republike Hrvatske identificiran CAPE, polifenol dokazane snažne antioksidacijske aktivnosti.^{12,63}

Zbog raznolikosti kemijskog sastava i bioloških svojstava ekstrakata propolisa ukazuje se potreba za standardizacijom kada ga se koristi u istraživanjima bioloških aktivnosti njegovih spojeva, radi dobivanja pouzdanih i ponovljivih rezultata.^{83,84,96,97}

2.3. Priprava uzoraka za analizu

2.3.1. Ekstrakcija sirovog propolisa

Propolis se u svom nativnom obliku ne može upotrebljavati u terapijske svrhe, odnosno kroz usta, zbog prevladavajućeg smolastog i voštanog sastava i posljedično slabe topljivosti u vodi, te je potrebno njegovo pročišćavanje ekstrakcijom. Na taj se način uklanja inertni materijal, a polifenolna frakcija je sačuvana. Niska topljivost polifenolnih spojeva u vodi predstavlja veliki problem za medicinsku primjenu propolisa, zbog njihove niske bioraspoloživosti nakon apsorpcije u organizmu. S druge strane, niska topljivost aglikona flavonoida u vodi, kao i njihovo kratko vrijeme zadržavanja u tankom crijevu i niska apsorpcija imaju povoljni učinak gledajući da teško može doći do predoziranja unosom flavonoida putem hrane. Budući da topljivost propolisa desetljećima predstavlja izazov, dosadašnja istraživanja spojeva propolisa velikim dijelom odnose se na problem njihove ekstrakcije iz matrice.

Priprava i ekstrakcija uzoraka propolisa ovisi o veličini čestica, količini voska, te o kemijskim svojstvima njegovih spojeva odnosno strukturi tih molekula, polaritetu, koncentraciji, broju aromatskih prstena i hidroksilnih skupina. Uobičajeni ekstrakcijski postupci pripreme uzoraka propolisa su maceracija (MCR) 70%-tnim etanolom i Soxhletova ekstrakcija. Međutim, sve je češća primjena novijih tehnika ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (engl. *Microwave-assisted extraction*, MPE) ili ultrazvukom (engl. *Ultrasound extraction*, UE) zbog kraćeg vremena i bolje učinkovitosti ekstrakcije propolisa ili manjeg utroška organskih otapala.^{96,98,99} Voda, apsolutni etanol, smjese etanola i vode (70 %, 80 %, 90 % i 96 % v/v), glicerol, metanol ili DMSO samo su neka od otapala korištenih u pripremi uzoraka propolisa za biološka ispitivanja o kojima također ovisi njihova biološka aktivnost.^{76,100,101,102,103} Iako je primjena vodenih ekstrakata propolisa biološki najsigurnija, problem vodenih ekstrakata propolisa je niska koncentracijska razina njegovih aktivnih spojeva zbog nepotpune topljivosti u vodi. Povećanje njihove topljivosti i otpuštanja iz matrice može se postići povećanjem ekstrakcijske snage vode dodavanjem kootapala, što pak može uzrokovati novi problem. Naime, različita otapala mogu ekstrahirati različite biološki aktivne sastavnice propolisa koje mogu imati različite biološke učinke.¹⁰⁴ Osim toga, i vrijeme ekstrakcije, svjetlo i temperatura bitno utječu na iskorištenje ekstrakcije, odnosno prinos.⁹⁷ Stoga je u istraživanjima bioaktivnosti spojeva propolisa od iznimne važnosti odabir

pogodne koncentracije polifenolnih spojeva te odgovarajućeg ekstrakcijskog postupka i prikladnog otapala.

Većina spojeva propolisa je topljiva u etanolnim otopinama, te se etanolni ekstrakt propolisa (EEP) najčešće koristi u različitim istraživanjima,^{22,80,82,93} a najnovijim istraživanjima utvrđeno je da je optimalan volumni omjer etanol : voda = 80 : 20.^{103,105} Priprava i primjena u vodi topljivog derivata propolisa (engl. *Water-soluble derivate of propolis*, WSDP) objavljena je u istraživanjima imunološke i antitumorske aktivnosti,¹⁸ a u novijim istraživanjima antioksidacijskog učinka propolisa primijenjena je i patentirana tehnologija ekstrakcije propolisa takozvana multi-dinamična ekstrakcija (eng. *Multi Dynamic Extraction*) za dobivanje hidroglicerolnih ekstrakata propolisa.^{6,102} Osim navedenih tehnika, pojedina istraživanja temeljila su se na ekstrakciji na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE),¹⁰⁶ međutim, osim u analizi propolisa, do danas tehnika SPE nije pronašla mjesto u široj primjeni. Nekolicina autora je za pripravu ekstrakata upotrebljavala i ekstrakciju tekuće-tekuće, koristeći pri tome organska otapala poput heksana, dietiletera, acetona, kloroforma pri čemu su ovi ekstrakti pokazali antibakterijsku, antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost u uvjetima *in vitro*.^{107,108,109}

Otapala koja se po količini ekstrahiranih polifenolnih spojeva mogu usporediti s etanolom, a uz to su neškodljiva za primjenu kroz usta, su propilenglikol, glicerol te polietilenglikol (PEG)^{7,103,110,111,112} koji se zbog male molekulske mase i izrazite hidrofilnosti često koristi u proizvodnji farmaceutskih pripravaka. Kubiene i suradnici utvrdili su da je dodavanjem polietilenglikola 400 (PEG 400) u vodenu otopinu propolisa moguće povećati ekstrakcijsku snagu vode te na taj način ekstrahirati polifenole iz propolisa u koncentracijskim razinama vrlo bliskim onima dobivenim ekstrakcijom etanolom.^{110,111} Osim primjene PEG-a, Galeotti i suradnici su primjenom patentiranog postupka ekstrakcije polifenola iz propolisa utvrdili da je kemijski sastav uzoraka propolisa ekstrahiranih iz iste sirovine, ali otopljenih u različitim otapalima poput vodene otopine glicerola, propilenglikola, etanola ili ulja, vrlo sličan, iako se kvantitativno sastav razlikovao. Kao posljedica sličnog kvalitativnog sastava, i antioksidacijska aktivnost ekstrakata je bila vrlo slična.¹⁰³ Za razliku od vodene otopine PEG-a, u radu Šuran i suradnika dokazano je da bezvodni PEG 400 kao ekstrakcijsko otapalo, ekstrahira polifenolne spojeve vrlo sličnih koncentracija kao i 70%-tni etanol, te da nema

statistički značajnih razlika u količini ukupnih fenola i antioksidacijskoj aktivnosti između ova dva ekstrakta.⁷

2.3.2. Inkapsulacija

Polifenoli kao djelomično polarni spojevi, slabo su topljivi u vodi te imaju slabu bioraspoloživost nakon oralne primjene. Zbog navedenog, ovi spojevi imaju ograničenu primjenu u farmaceutskim proizvodima. U svrhu poboljšanja farmakokinetičkih svojstava koriste se mnogobrojne metode, poput smanjenja veličine čestica, nanosuspenzije, upotreba površinski aktivnih tvari, stvaranja soli ili čvrste disperzije,¹¹² a vrlo djelotvorna tehnika za uspješno povećanje topljivosti ovih spojeva uključuje inkapsulaciju određenog spoja te stvaranje inkluzijskog kompleksa. Inkapsulacija je tehnika kojom se ciljna molekula obavija intertnom molekulom s ciljem očuvanja njezinih funkcionalnih svojstava. Obavijena molekula naziva se inkapsulirana tvar (molekula gost), dok se molekula domaćina (tvari koja inkapsulira) naziva nosač. Glavne prednosti inkapsulacije u odnosu na ostale tehnike su:¹¹⁴

- prikrivanje intenzivnog okusa i mirisa,
- poboljšana sigurnost proizvoda,
- kontrolirano otpuštanje djelatne tvari u predviđenom vremenu i trajanju,
- kontrola pojedinih svojstava djelatne tvari (veličina čestica, struktura, topljivost u polarnim ili nepolarnim otapalima, boja),
- zaštita djelatnih tvari od oksidacije te razgradnje toplinom ili svjetlošću,
- poboljšana stabilnost tijekom proizvodnje i u gotovom proizvodu,
- poboljšano rukovanje inkapsuliranom tvari,
- poboljšana propusnost kroz biološke membrane i bolja bioraspoloživost.

Vrlo je važan izbor materijala nosača. Najčešće je to polarna tvar koja olakšava otapanje nepolarne molekule u vodenoj otopini i time se postiže njezina široka primjenjivost. Ostale fizikalno-kemijske karakteristike koje su važne pri odabiru nosača su:

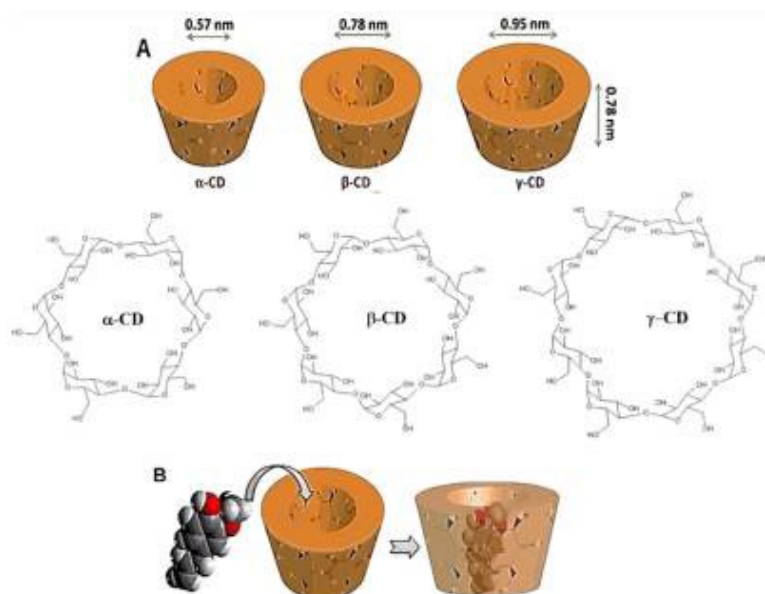
- molekulska masa radi kompatibilnosti s veličinom inkapsulirane tvari,
- sposobnost stvaranje filma,
- sposobnost stvaranja raznih kemijskih interakcija s inkapsuliranom tvari, koja utječe na strukturu cijele kapsule,

- inertnost nosača u odnosu na inkapsuliranu tvar.

Kao nosači lipofilnih molekula najčešće se primjenjuju liposomi, proliposomi, mikrosfere, gelovi, prolijekovi, ciklodekstrini,^{115,116} ali i lipidi (fosfolipidi), proteini (želatina, mliječni proteini, soja), polisaharidi (celuloza, škrob, ksantanska guma, alginati), modificirani polisaharidi i oligosaharidi i njihovi derivati (modificirani škrob, modificirana celuloza), agar. Proces inkapsulacije posljedično vodi prema sušenju zamrzavanjem (liofilizaciji) ili sušenju raspršivanjem kompleksa „domaćin-gost“.

U radu Šturma i suradnika ispitana je priprava u vodi topljivih pripravaka propolisa s visokim sadržajem polifenola inkapsuliranih u različitim nosačima poput arapske gume, maltodekstrina i inulina. Tehnike korištene za inkapsulaciju bile su liofilizacija i sušenje raspršivanjem. Pripravicima je određen sastav polifenola, antioksidacijska aktivnost, karakterizirani su s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva, određena im je inkapsulacijska učinkovitost te otpuštanje inkapsuliranih polifenola u vodenim otopinama. U radu je dokazano da je od istraživanih nosača arapska guma zbog svoje amfifilne strukture najprikladniji nosač za inkapsulaciju ekstrakata propolisa, dok se maltodekstrin pokazao kao ekonomski najisplativiji materijal.¹¹⁷

Ciklodekstrini su naziv za skupinu cikličkih oligosaharida, koji stvaranjem inkluzijskih kompleksa s nepolarnom molekulom mogu promijeniti njena nepovoljna fizikalno-kemijska svojstva ili biološku aktivnost. Tako je slučaj s ciklodekstrinima koji su biokompatibilne i netoksične tvari, stoga je njihova primjena u lijekovima različitih farmaceutskih oblika i putova primjene vrlo raširena.¹¹⁸ Kemijska struktura ciklodekstrina (Slika 5 A i B) sastoji se od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica (α -, β -, γ -ciklodekstrin) vezanih α -1,4-glikozidnom vezom što čini hidrofilnu vanjsku površinu, a središnji dio sastoji se od lipofilne šupljine koja je omeđena C-C, C-H i C-O-C vezama.^{119,120}



Slika 5. A) Vrste ciklodekstrina i njihove kemijske strukture; **B)** shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa (preuzeto iz ¹²⁰)

Najtopljiviji je γ -ciklodekstrin, a β -ciklodekstrin ima najširu primjenu zbog jednostavnog načina proizvodnje te ekonomičnosti. Inkluzijski kompleksi (Slika 5 B.) formirat će se samo s molekulama koje su kompatibilne veličine kako bi se uklopile u šupljinu ciklodekstrina, te onima koje su slabije polarne od vode. Tijekom nastajanja kompleksa, molekula ili određena funkcionalna skupina molekule zadržava se u šupljini ciklodekstrina Van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama, a u nekim slučajevima i vodikovim vezama, međutim vezanje dviju molekula ne uključuje kovalentne veze. Nastajanjem kompleksa postiže se dinamička ravnoteža, odnosno u vodenim otopinama su molekule inkapsulirane tvari u stanju stalne izmjene vezanog i slobodnog oblika. ¹¹⁸

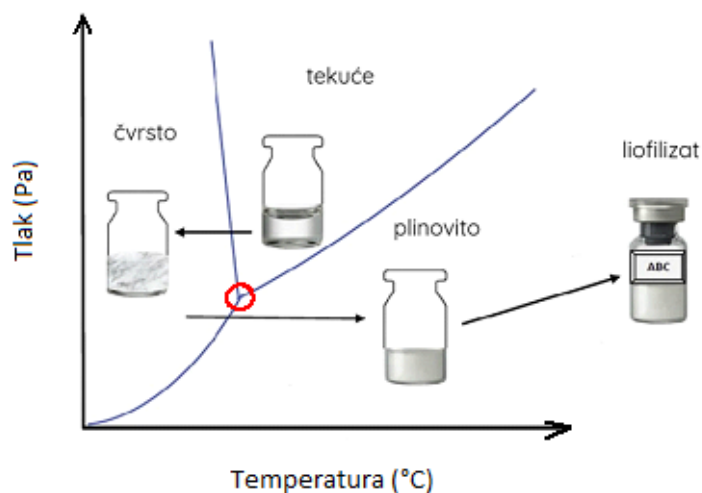
Nastajanje kompleksa propolisa i β -ciklodekstrina prvi je put objavljeno 1987. u radu Szente i suradnika, ¹²¹ a inkapsulacija propolisa i polifenolnih spojeva propolisa ciklodekstrinima potvrđena je i kasnije studijama ^{122,123,124,125}. U studiji Nafadyja i suradnika istraživanje se temeljilo na primjeni β -ciklodekstrina za izolaciju slabo topljivih spojeva brazilskog tipa propolisa, no iskorištenje izdvojenih spojeva bilo je vrlo nisko. ¹²⁴ Tri tipa rumunjskog propolisa podvrgnuti su ekstrakciji primjenjujući tri različite koncentracije vodene otopine etanola uz β -ciklodekstrin, a kompleksi su analizirani pretražnom/skenirajućom mikroskopijom (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) i

termogravimetrijskom analizom te je određena antioksidacijska aktivnost.¹²² Inkapsulacija spojeva grčkog propolisa u β -ciklodekstrinu je provedena u studiji Kalogeropoulou i suradnika koristeći modificiranu metodu prema studiji¹²⁴ odnosno EEP je inkapsuliran sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom kako bi se poboljšala topljivost i bioraspoloživost određenih spojeva propolisa. Pri tome je u uvjetima *in vitro* praćeno otpuštanje polifenola iz šupljine ciklodekstrina. Istraživanjem je utvrđeno da na učinkovitost inkapsulacije i bioraspoloživost spojeva utječe veličina i struktura molekule gosta te da su manje molekule uspješnije inkapsulirane, međutim teže otpuštene iz unutrašnjosti ciklodekstrina, dok su veće molekule različitih struktura lakše otpuštane s obzirom da su bile slabije vezane u kompleksu.¹²³

Do sada je provedeno nekoliko studija vezanih uz biološku aktivnost inkluzijskog kompleksa propolisa i ciklodekstrina te pojedinačnih polifenolnih spojeva i različitih vrsta ciklodekstrina.^{11,126,127} Navedena istraživanja kompleksa propolisa i ciklodekstrina pokazala su učinkovitu antidijabetičku, antiproliferativnu, antitumorsku aktivnost te aktivnost u induciranju apoptoze.

2.3.3. Liofilizacija

Liofilizacija, tj. proces sušenja zamrzavanjem ili kriodesikacija je proces kojim se uklanja voda ili drugo otapalo iz zamrznutog uzorka procesom sublimacije. Tehnika je široko primjenjiva u pripravi farmaceutskih i prehrambenih proizvoda. Ovim se postupkom povećava stabilnost tvari osjetljivih na toplinu ili tvari nestabilnih u vodenim otopinama.¹²⁸ Proces liofilizacije sastoji se od tri koraka: 1) zamrzavanje otopine uzorka, 2) primarno sušenje i 3) sekundarno sušenje. Vrlo važan korak u procesu liofilizacije je zamrzavanje uzorka, pri čemu otopina uzorka mora biti zamrznuta na temperaturu koja je najmanje tri puta niža od temperature smrzavanja otapala. Nakon toga, u liofilizatoru pod niskim tlakom (0,1 – 0,3 mbar) i pri niskoj temperaturi (-50 °C) slijedi primarno sušenje tj. sublimacija tijekom koje voda direktno prelazi iz čvrstog u plinovito stanje, bez prijelaza u tekuću fazu. Liofilizacijom se postižu uvjeti tlaka i temperature ispod trojne točke tvari, tj. točke pri kojoj su sva tri agregatna stanja u ravnoteži (Slika 6.). U sekundarnom sušenju se difuzijom i desorpcijom uklanja voda zaostala u uzorku te je ovaj korak u liofilizaciji neophodan jer zaostala voda utječe na kvalitetu krajnjeg proizvoda.¹²⁹



Slika 6. Shematski prikaz prijelaza otopine uzorka između agregatnih stanja pri procesu liofilizacije (prilagođeno prema ¹³⁰)

2.4. Kvalitativno i kvantitativno određivanje polifenolnih spojeva u propolisu

Budući da različita otapala ekstrahiraju različite sastavnice propolisa što posljedično utječe i na njihovu biološku aktivnost, razvijaju se vrlo raznolike i osjetljive analitičke metode za detekciju i kvantifikaciju ovih spojeva, ovisno o namjeni. Spektrofotometrijske kolorimetrijske metode su jednostavne, brze i relativno ekonomične metode kvantifikacije flavonoida i fenolnih kiselina. ^{99,131} Iako su ove metode korisne za brzo pretraživanje velikog broja uzoraka, navedenim metodama nije moguće odrediti sadržaj pojedinačnih spojeva propolisa, a uz navedeno i omogućavaju kvantifikaciju samo do određenih koncentracijskih razina. Ipak, UV/VIS spektrofotometrija je i danas jedna od glavnih polaznih metoda za određivanje polifenolnog sastava propolisa. ^{80,132}

Najčešće korišteni postupak za rutinsko spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola (eng. *Total Phenols*, TP) i ostalih skupina flavonoida u propolisu temelji se na metodi prema Folin-Ciocalteu. ^{90,93,133,134} Metoda je prikladna za fenolne kiseline i flavonoide s obzirom na strukturu fenolnog kostura ovih bioaktivnih spojeva propolisa. Poznato je da topola tip propolisa sadržava veliku količinu flavanona i dihidroflavonola te flavona i

flavonola, stoga se za određivanje njihovog sadržaja koriste različite metode, ovisno o vrsti reakcije pojedine skupine flavonoida sa specifičnim reagensima korištenim u određenoj metodi. Metoda kojom se određuje sadržaj ukupnih flavona i flavonola (eng. *Total Flavones and Flavonols*, TFF) temelji se na stvaranju kompleksa aluminijevih iona (Al^{3+}) s karbonilnim i hidroksilnim skupinama određenog flavonoida. Prema dostupnoj literaturi određivanje sadržaja ukupnih flavanona i dihidroflavonola (eng. *Total Flavanones and Dihydroflavonols*, TFD) temelji se na međudjelovanju ovih tvari s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) u kiselim uvjetima te stvaranju obojenih fenilhidrazona.^{74,83,135} Brze i jednostavne spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja polifenola dobra su osnova za daljnje specifične analize profila polifenola.

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FT-IR) je analitička tehnika kojom se također može učinkovito odrediti sastav složenih prirodnih uzoraka kao što je propolis.^{136,137} Naime, svaka tvar zbog jedinstvenih funkcionalnih skupina i veza u specifičnom valnom području ima karakteristični „otisak prsta” odnosno jedinstveni IR-spektar. FT-IR je jedna od brzih i jednostavnijih instrumentalnih tehnika za direktnu analizu sirovog propolisa i ekstrakata propolisa.

Za određivanje kemijskog profila propolisa najčešće se koriste kromatografske instrumentalne tehnike. Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) omogućuje detaljnu identifikaciju određivanjem molekulske mase, odnosno strukture spojeva.^{22,82} Međutim, većina spojeva propolisa nije dovoljno hlapljiva za analizu GC-MS, čak niti nakon derivatizacije. Najučinkovitija tehnika koja se koristi za analizu propolisa je HPLC uz primjenu detektora PDA ili detektora spektrometra masa (eng. *Mass Spectrometer*, MS).^{72,93,138} Učinkovitim tehnikama u biomedicinskim istraživanjima propolisa pokazali su se i vezani sustavi tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MSⁿ) uz primjenu kemijske ionizacije elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) s negativnim ili pozitivnim načinom snimanja iona i analizatora masa poput trostrukog kvadrupolnog analizatora (engl. *Triple Quadrupole*, QqQ), kvadrupola s analizatorom masa s mjerenjem vremena leta (engl. *Quadrupole Time-of-Flight*, Q-TOF) te hibridnog analizatora kvadrupola Orbitrap-a, ionske stupice i analizatora koji koristi ionsko ciklotronsku rezonanciju (eng. *Linear Ion Trap Quadrupole Orbitrap*, LTQ Orbitrap).^{6,102,139}

LC-MS u kombinaciji s različitim analizatorima masa pokazala se kao najpoželjnija instrumentalna tehnika u određivanju kemijskog profila i vrste propolisa (LC-Q-TOF), u analizi aglikona flavonoida, fenolnih kiselina, njihovih estera i metabolita za određivanje kemijskog sastava u različitim vrstama uzoraka (LC-QqQ i UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS)^{84,92,139} te za potvrdu strukture polifenola u uzorcima propolisa.^{140,141,142}

2.4.1. Tekućinskokromatografsko određivanje pojedinačnih polifenola

Od svih navedenih tehnika, HPLC se najčešće primjenjuje u analizi polifenolnih spojeva iz propolisa zbog relativno polarne strukture ovih tvari te što HPLC omogućuje dobru razlučljivost analiziranih spojeva zajedno s njihovim derivatima ili razgradnim produktima prisutnim u niskim koncentracijskim razinama u kompleksnim matricama. Prema literaturnim podacima^{90,125,143} prednost HPLC-a u analizama polifenolnih spojeva nad drugim tehnikama je i primjena različitih kromatografskih kolona, vrsta detektora te njihovo serijsko povezivanje.¹⁴⁴ Tekućinskokromatografsko razdvajanje različitih polifenola unaprijeđeno je uvođenjem kolona s obratnom nepokretnom fazom (eng. *Reversed Phase*, RP) te su razne RP kolone primijenjene u analizi aglikona, glikozida flavonoida i ostalih fenolnih spojeva.^{94,145,146,147} Sustavi s nepokretnom fazom oktadecilsilikagel (C₁₈) najčešće se primjenjuju u analizi polifenola zbog svoje robusnosti, no nedostatak ovog sorbensa je dugo vrijeme analize te u izrazito baznim uvjetima dolazi do razgradnje reaktivnih silanolnih skupina (-Si-OH) na površini silikagela. Odabir nepokretne faze, pokretne faze, načina eluiranja, tehnika i detekcija uvelike ovise o samoj namjeni odnosno radi li se o kvalitativnoj ili kvantitativnoj analizi svih skupina polifenola, pojedine skupine ili određivanju samo jedne sastavnice.

Repolles i suradnici razvili su metodu HPLC za simultano određivanje aglikona različitih skupina flavonoida iz zelenog čaja, crnog vina i naranče, a pri tome su koristili monolitnu nepokretnu fazu na bazi silikagela (kolona punjena s visoko poroznim monolitnim štapićima s bimodalnom strukturom pora) zbog njenih poboljšanih hidrodinamičkih svojstava u usporedbi s konvencionalnim nepokretnim fazama punjenjem česticama. Pouzdanost metode ispitana je parametrima linearnosti, preciznosti i osjetljivosti metode određivanjem granica detekcije i kvantifikacije. Postignuto je linearno područje u rasponu od 1 do 50 µg mL⁻¹ te

granice detekcije od $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ za naringenin do $0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ za katehin. Dobivene vrijednosti za granice detekcije su niže nego u istraživanjima s konvencionalnim C_{18} kolonama.¹⁴⁶

Nadalje, u navedenim istraživanjima analize polifenola provode se na sobnoj temperaturi, ali i pri temperaturama 30 ili 40 °C pri čemu se temperatura do 30 °C pokazala najprikladnijom za analizu polifenola.^{96,111,140,148}

Kromatografska tehnika tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti (eng. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je zbog znatno poboljšanih performansi u odnosu na HPLC učinkovitija i brža tehnika sa značajno poboljšanom djelotvornošću i osjetljivošću te ekonomičnošću u vidu kraćeg vremena analize i manjeg utroška otapala pokretne faze.

Odabir izokratnog ili gradijentnog eluiranja pokretne faze ovisi o broju i vrsti polifenolnih spojeva u uzorcima propolisa. Najčešća otapala koja se koriste u nepolarnom organskom dijelu pokretne faze su acetonitril i metanol, a u polarnom vodena otopina formijantne, acetatne ili trifluoroacetatne kiseline u ulozi aditiva za poboljšanje simetrije i vrhova pikova.^{7,96,140} Slobodne fenolne kiseline, kao što su CA, klorogena i ružmarinska kiselina, mogu biti analizirane uz izokratnu pokretnu fazu, no istovremena analiza fenolnih kiselina različitih kemijskih struktura i polarosti provodi se gradijentnim eluiranjem, često zbog nemogućnosti razdvajanja vrlo bliskih pikova.^{73,149} Eluiranja polifenolnih spojeva primjenom RP-HPLC-a s polarnom pokretnom fazom A i nepolarnom organskom fazom B su ovisna o njihovom stupnju polarosti te je redoslijed eluiranja sljedeći: fenolne kiseline, glikozidi flavanona, glikozidi flavonola, glikozidi flavona, glikozidi flavan-3-ola te naposljetku aglikoni flavonoida.⁹⁴ Zbog velike različitosti spojeva s obzirom na različite hidroksilne, metoksilne i glikozidne skupine na benzenskom prstenu, učestalo je preklapanje kromatografskih pikova pojedinih pripadnika različitih polifenolnih skupina. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita u uzorcima propolisa koriste se razni detektori, od kojih su najvećoj mjeri u upotrebi DAD, fluorescentni detektor (eng. *Fluorescence Detector*, FLD), MS i nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Flavonoidi i fenolne kiseline sadrže najmanje jedan aromatski prsten ili konjugiranu dvostruku vezu te pokazuju apsorpciju u području UV ili UV/VIS u rasponu valnih duljina 190 - 550 nm stoga je DAD detektor najčešći izbor. Kako bi se potvrdila struktura flavonoida

i dobili nedvojbeni rezultati, sve je češća primjena više različitih tehnika i načina detekcije (npr. DAD, MS/MS, IR i NMR), a LC-MS u kombinaciji s različitim analizatorima masa pokazala se kao najpoželjnija tehnika u određivanju kemijskog profila i vrste propolisa (LC-Q-TOF) te u analizi aglikona flavonoida, fenolnih kiselina, njihovih estera i metabolita u uzorcima biološkog materijala (LC-QqQ).^{139,140,141,142} Međutim,, FLD se pokazao osjetljivijim u usporedbi s DAD-om u analizi pojedinih polifenola poput katehina i vanilinske kiseline, s obzirom na njihova fluorescencijska svojstva.¹⁴⁴

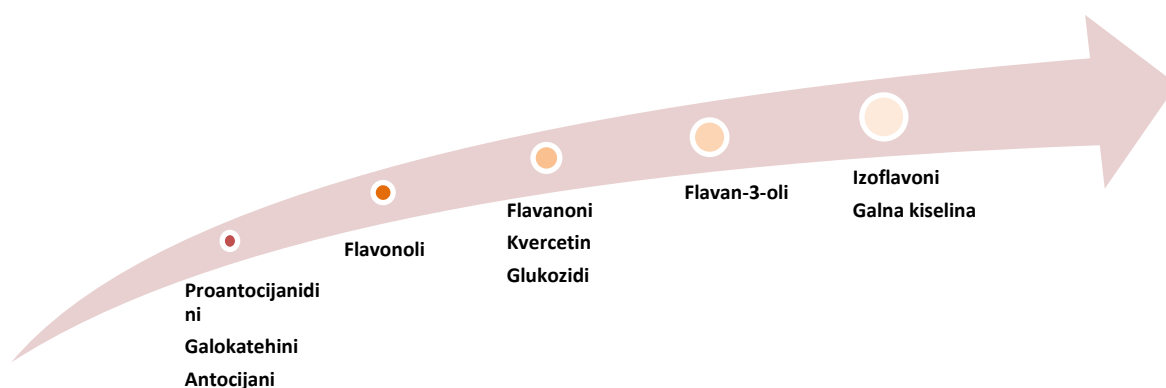
2.5. Digestibilnost (probavljivost) polifenola

Moguću biološku aktivnost polifenola u organizmu ljudi i životinja određuje njihova bioraspoloživost. Iako dosadašnja istraživanja kemijskog sastava propolisa potvrđuju najveće koncentracije određenih polifenolnih spojeva u EEP kontinentalnog tipa, bioraspoloživost se među polifenolima može znatno razlikovati. Stoga, oni polifenoli koji su najzastupljeniji u određenoj matrici, mogu imati vrlo loš profil biodostupnosti i bioraspoloživosti u odnosu na njihovu početnu koncentraciju, a osim toga pojedini polifenolni spoj može pokazivati biološku aktivnost *in vitro*, međutim, ukoliko je njegova bioraspoloživost niska, tada će mu i biološka aktivnost *in vivo* biti mala.¹⁵⁰

Polifenoli propolisa, većinom u obliku aglikona, estera i polimera, hidroliziraju djelovanjem enzima probavnog sustava ili crijevne mikroflore jer se u svojim izvornim oblicima ne mogu dalje apsorbirati u organizmu. Većina polifenola je relativno dobro topljiva u vodi. Međutim, neki polifenoli tvore komplekse s proteinima ili mineralima te njihova biološka dostupnost (engl. *Bioaccessibility*) tj. gastrointestinalna (engl. *Gastrointestinal*, GI) stabilnost ovisi o njihovom oslobađanju iz matrice i zadržavanju u pojedinim dijelovima probavnog tj. gastrointestinalnog sustava (eng. *Gastrointestinal Tract*, GIT) s obzirom na različite medije u tim dijelovima. Biodostupnost se definira kao učinkovitost probave i apsorpcije. Odnosno, može se reći da biodostupnost znači probavljivost ili apsorptivnost određene tvari, odnosno sastavnice hrane ili lijeka unesenog oralnim putem. Izražava se kao udio oslobođene i apsorbirane sastavnice u odnosu na njen ukupni udio prije unosa u organizam. Tako se biodostupnost može predočiti i kao probavljena frakcija ispitivane sastavnice hrane ili pripravka koja je difundirala kroz epitel crijevnog sustava te se smatra da

je ta frakcija i apsorbirana. Bioraspoloživost se može definirati kao raspoloživi udio apsorbiranog i detektiranog aktivnog spoja ili skupine spojeva u ciljnom tkivu u odnosu na ukupnu količinu oralno primjenjenog lijeka. Dosad objavljena istraživanja dokazala su da struktura polifenolnih spojeva ima veliki utjecaj na njihovo otpuštanje iz matrice i posljedično, na njihovu biodostupnost i bioraspoloživost.^{1,151,152} Osim o strukturi, bioraspoloživost pojedine sastavnice uvelike ovisi o mnogim fizikalno-kemijskim faktorima poput molekulske mase, topljivosti, lipofilnosti, stupnja glikozidacije i hidroksilacije, stabilnosti sastavnice tijekom probave, otpuštanju iz matrice, metabolizmu pojedinog organizma učinkovitošću prolaska kroz epitel i sl.^{2,153,154,155} Nadalje, apsorpcija polifenola uvjetovana je i primijenjenom dozom, načinom primjene, spolnim razlikama, mikrobiološkom sastavu debelog crijeva te načinom prehrane.⁰

Prethodna istraživanja^{27,156,157,158} pokazuju da polifenoli ne podliježu metaboličkim promjenama u usnoj šupljini kao ni u kiselim želučanim uvjetima, već nepromijenjeni dolaze u tanko i debelo crijevo. Pojedini flavonoidi (u obliku aglikona) zbog hidrofobne prirode mogu pasivno proći epitel tankog crijeva, dok konjugirani flavonoidi odlaze u debelo crijevo gdje se metaboliziraju i apsorbiraju.^{152,154,159} Crijevna mikroflora ima ključnu ulogu u metabolizmu i oslobađanju hidroksicimetnih kiselina i flavonoida od njihovih konjugiranih oblika cijepanjem esterske ili glikozidne veze.^{151,160,161} Također, crijevna mikroflora pospješuje hidrolizu flavona, flavonola i flavanona, te su metaboliti nastali ovakvom razgradnjom jednostavne aromatske kiseline, kao što je hidroksifenilacetatna kiselina iz flavonola i hidroksifenilpropionska kiselina iz flavona i flavanona.¹⁶² Gledajući odnos bioraspoloživosti po skupinama flavonoida istraživanjima uočeno je da najbolji profil bioraspoloživosti imaju flavanoni i izoflavoni, dok flavonoli, flavoni i flavanoli zbog slabe apsorpcije i brze eliminacije imaju relativno slabu bioraspoloživost (Slika 7).^{154,163}



Slika 7. Apsorpcija i bioraspoloživost pojedinih skupina polifenola (prilagođeno prema ^{154,163})

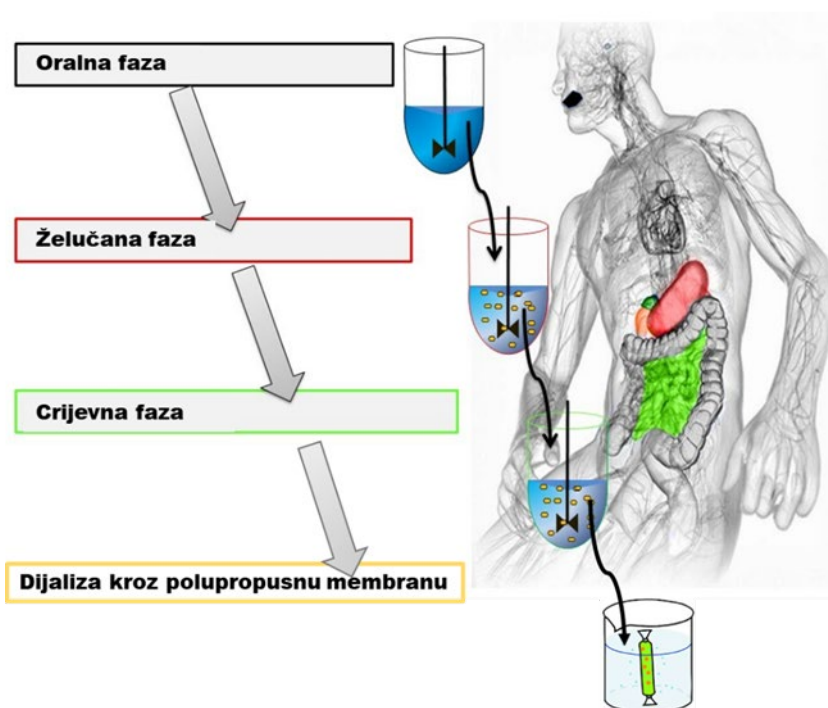
Gardana i suradnici su istražujući apsorpciju polifenola nakon oralne primjene standardiziranog i pročišćenog ekstrakta propolisa utvrdili prisutnost nekoliko polifenola u ljudskoj plazmi nakon unosa oralnim putem, uključujući PC, GN, CR, CA i CAPE iz čega se može zaključiti da su polifenoli prisutni u tom ekstraktu apsorbirani, metabolizirani te mogu biti biološki aktivni. ¹⁶⁴ Fenolne kiseline u sastavu propolisa najvećim su dijelom derivati hidroksibenzoične ili hidroksicimetne kiseline. Anioni koji nastaju ionizacijom fenolnih kiselina u lužnatim uvjetima tankog crijeva imaju slabiju sposobnost pasivne difuzije kroz crijevnu stjenku. ¹⁶⁵ Na poboljšanje biodostupnosti fenolnih kiselina tijekom probave djeluju enzimi esteraze i/ili crijevna mikroflora. U radu Gonthier i suradnika dokazano je da se CA i njeni esteri transformiraju u 3-(3'-hidroksifenil) propionsku i benzoatnu kiselinu. Također, pod utjecajem crijevne mikroflora dolazi do dekarboksilacije i metabolizma CA u 4-etilkatehol. ¹⁶⁶ Mali broj istraživanja opisuje CAPE i njegovu bioraspoloživost. ^{167,168} Celli i suradnici su istraživali stabilnost CAPE u plazmi ljudi i štakora kao i u uzorcima urina. Zaključili da CAPE podliježe hidrolizi u CA u pokusima *in vitro* i u *in vivo* na štakorima, međutim u ljudskoj plazmi ne dolazi do hidrolize CAPE, vjerojatno zbog odsustva enzima karboksilesteraze. U plazmi štakora CA je detektirana *in vitro* nakon 6 sati. ¹⁶⁸ Chen i suradnici utvrdili su da put primjene ima značajni utjecaj na bioraspoloživost GN i njegovih metabolita, glukuronida nakon primjene oralnim putem i sulfata nakon primjene u venu. Bioraspoloživost GN nakon oralne primjene je bila jako niska (3,67 %) s obzirom da brzo metabolizira u galangin glukuronid. ¹⁶⁹ U skladu s ovim istraživanjem, Curti i suradnici su istraživali biodostupnost GN i KR nakon jednokratne i produljene primjene propolisa. Niti jedan od navedenih flavonoida nije bio detektabilan u plazmi miševa, dok je samo metabolit GN (u obliku glukuronida) bio detektabilan 5 min nakon jednokratne primjene. Osim toga, dokazana je brza apsorpcija i metabolizam GN te kratka bioraspoloživost oba flavonoida

nakon produljene primjene.⁶ Guo i suradnici ispitivali su *in vivo* apsorpciju pinocembrin-7-O- β -D-glukozida u štakora i njegovu *in vitro* biotransformaciju te su utvrdili da glikozid PC vrlo brzo metabolizira u aglikon u kiselim uvjetima ili hidrolitičkom reakcijom bakterija i enzima te da je ovaj metabolit apsorbiran u krvotok kao glavna bioaktivna tvar.¹⁷⁰

2.5.1. Modeli *in vitro*

Apsorpcija i metabolizam polifenola propolisa u GIT-u intenzivno se proučava primjenom modela *in vitro*,^{7,171} kultura stanica¹⁷² te istraživanjima *in vivo*.^{142,173}

Jednostavni modeli *in vitro* postali su važan alat u istraživanjima simulacije GID-a te se simulacijom fizioloških uvjeta u organizmu može predvidjeti biodostupnost određenih spojeva hrane ili dodataka hrani. Stoga, kako bi se procijenila biodostupnost pojedine sastavnice kao i njezina bioaktivnost, ovakvi modeli sve više zamjenjuju *in vivo* pokuse na životinjama. Naime u svrhu zaštite dobrobiti pokusnih životinja animalni modeli se nastoje što je moguće više zamijeniti istraživanjima *in vitro* odnosno primjenom koncepta 3R načela: zamjenjivanje (engl. *Replacement*), smanjivanje (engl. *Reduction*) i poboljšavanje (engl. *Refinement*). Sukladno propisima o dobrobiti životinja u pokusu prilikom istraživanja navedene postulate treba primijeniti kada je god to moguće, odnosno nastojati zamijeniti animalni model s prikladnim laboratorijskim postupkom, smanjiti broj životinja u pokusima i poboljšati uvjete životinjama u pokusu. U pokusima biodostupnosti najjednostavniji modeli *in vitro* su statički modeli koji se provode kao jednodijelni model, npr. simulirajući samo želučanu fazu, ili višedijelni model, u kojem se oralna, želučana faza i faza tankog crijeva provode uzastopno. Kontrolni parametri, omjer uzorka i probavne tekućine, pH i koncentracija enzima, u statičkim modelima su određeni na početku svake faze i stalni su tijekom određene faze, te označavaju moguće prosječne fiziološke uvjete. Višedijelni statički model probave, prikazan na Slici 8. započinje kratkotrajnom oralnom fazom u ustima gdje se uzorak hrane miješa sa slinom simulirajući žvakanje uz dodatak enzima α -amilaze. Nakon oralne faze, smjesa hrane i oralne tekućine premješta se u simulirani želudac te započinje želučana faza. U ovoj fazi pH se djelovanjem kloridne kiseline snizi na optimalnu pH vrijednost od 2,5 do 3, pri čemu se hrana dalje probavlja uz simuliranu želučanu tekućinu i enzim pepsin. Ta faza traje oko dva sata. Uzorak se dalje probavlja u fazi tankog crijeva djelovanjem žučnih soli i pankreatina, a pH se neutralizira.¹⁷⁴



Slika 8. Shema *model in vitroa* simulacije želučanocrijevne probave (prilagođeno prema ¹⁷⁵)

S obzirom na to da se sastavnice hrane jednim dijelom apsorbiraju pasivnom difuzijom kroz epitel ili uz pomoć enterocita, završetkom faze u tankom crijevu, biodostupnost se određuje nakon centrifugiranja, centrifugiranja/filtracije ili difuzije uzorka na polupropusnim membranama određenih veličina pora.^{176,177} Membrana za dijalizu je polupropusna celulozna membrana ujednačenih veličina pora kroz koje polifenoli mogu pasivno difundirati. Simulirajući stjenku tankog crijeva, membrane propuštaju samo male topljive molekule, poput aglikona flavonoida kako bi se razdvojila topljiva polifenolna frakcija od probavne tekućine. Temeljem slobodnog difuzijskog mehanizma koji je jedan od glavnih apsorpcijskih putova polifenola, samo polifenoli male molekulske mase odnosno, molekulskih masa koje su manje od promjera pora membrane mogu proći, dok zaostaju oni većih masa. Stoga odabir membrane ovisi o molekulskim masama ispitivanih polifenola. Prednost ovog načina određivanja biodostupnosti i dijalizibilnosti polifenola je da je moguće vrlo brzo dobiti informacije koje se mogu lako preslikati na živi organizam.

Iako modeli probave *in vitro* ne mogu obuhvatiti sve dinamičke aspekte GIT-a, tim modelima može se predvidjeti biodostupnost polifenola ili čak usporediti rezultati s onima dobivenim u eksperimentima *in vivo*. Naime, neki rezultati *in vitro* i *in vivo* mogu se

uspoređivati, primjerice za spojeve poput aglikona flavonoida koji se većinom apsorbiraju iz tankog crijeva.

Najčešće istraživana biodostupnost polifenola *in vitro* je na ljekovitom bilju i voću.^{160,176,177,178,179} Bouayed i suradnici su proučavali polifenole u različitim sortama jabuka te je najveća dijalizibilnost u pojedinim sortama jabuka bila je $20,74 \pm 5,34$ %, a najmanja je bila $0,52 \pm 0,05$ %.^{176,177}

Provedena istraživanja podloga su istraživanjima biodostupnosti polifenola *in vitro* u propolisu. Yesiltas i suradnici i Yen i suradnici analizirali su različite frakcije nakon *in vitro* probave propolisa i njihove biološke učinke te su odredili sastav i koncentraciju antioksidansa dostupnih u ljudskom GIT-u.^{7,171} Dokazano je da koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u frakciji unutar polupropusne membrane raste u odnosu na želučanu fazu (eng. *Gastric Phase*, GF) što potencijalno može značiti oslobađanje spojeva iz matrice tijekom GID-a. Osim ovog istraživanja,⁷ U studiji Yeen i suradnika istraživane su različite smjese otapala (etanol, glicerol, voda) korištene za ekstrakciju uzoraka propolisa te je dokazano da EEP (95 %) sadržava najveći udio ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u frakciji oralne faze probave u odnosu na želučanu i crijevnu fazu.¹⁷¹ Navedeni rezultati upućuju da je udio polifenola u želučanoj i crijevnoj fazi niži zbog djelovanja enzima te procesa dijalize.

Ozkan i suradnici proveli su istraživanje biodostupnosti peluda koji je sastavni dio propolisa, na različitim uzorcima izuzetim diljem turske obale kako bi usporedili sadržaj polifenola i njihovu biodostupnost koju su određivali spektrofotometrijskim metodama. Razmatrajući dobivene rezultate utvrđene su značajne razlike u bioaktivnosti i biodostupnosti uzoraka peluda uzimajući u obzir različitost geografskog područja te sezonu prikupljanja, što je utjecalo na kemijski sastav peluda odnosno fenolni profil. Molekulska struktura polifenola također je utjecala na njihove apsorpcijske karakteristike. Kiselost želučanih uvjeta nije imala utjecaj na spojeve male molekulske mase poput galne ili askorbinske kiseline. Istraživanjem je dokazano da je većina polifenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost uzoraka peludi izgubljena tijekom probave te predlažu inkapsulaciju peludi kako bi se obogatili prehrambeni proizvodi.¹⁸⁰

Cianciosi i suradnici ispitivali su vezu između stabilnosti polifenola i antioksidacijskog kapaciteta meda te u ovisnosti o metodi pročišćavanja ekstrakata nakon simulacije GID-a

in vitro u ljudi. Određivali su ukupne flavonoide i fenolne sastavnice spektrofotometrijskim metodama UV/VIS prije i nakon simulacije probave *in vitro*. Njihovi su rezultati pokazali da dolazi do smanjenja u količini polifenola tijekom probave, a posljedično i da se antioksidacijska aktivnost uzoraka meda smanjuje. Također, metoda pročišćavanja uzorka nakon simulacije probave *in vitro* imala je utjecaj na količinu polifenola i antioksidacijsku aktivnost, a najučinkovitijim se pokazalo pročišćavanje centrifugiranjem.¹⁸¹

Istraživanje Seraglio i suradnika provedeno je u svrhu određivanja učinka GID-a *in vitro* na biodostupnost polifenola, minerala te antioksidacijsku aktivnost vrsta meda *Mimosa scabrella* Benth. Tijekom GID-a *in vitro* ispitivani polifenoli pokazali su izrazitu stabilnost, pa čak i u nekim slučajevima povišenje u koncentraciji tijekom faze tankog crijeva, što upućuje na to da vezanje polifenola na ostale sastavnice meda, poput minerala i proteina sprječava njihovu razgradnju. Za određivanje sadržaja polifenolnih spojeva prije GID-a *in vitro* i nakon želučane, tj. faze tankog crijeva upotrijebljena je metoda LC-ESI-MS/MS s osjetljivošću određenom parametrima granice detekcije (0,03 – 1,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i granice određivanja (0,20 - 3,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$).⁹

Utjecaj ciklodekstrina na biodostupnost najznačajnijih polifenola komine masline istraživali su Radić i suradnici pomoću simulacije probave *in vitro* tijekom faza GF i IF, te njihov utjecaj na ispitivanje propusnosti pomoću Caco-2 epitelnih stanica. Polifenoli su kvantificirani metodom HPLC-FLD te dobiveni rezultati pokazuju da su ciklodekstrini i matrica komine masline imali značajan utjecaj na apsorpciju. Rezultati su bili specifični i usko vezani za primijenjeni cikodekstrin i polifenol. Također, pokazano je da su istraživani polifenoli stabilni tijekom simulacije probave *in vitro*, a da su slobodni polifenoli primarno apsorbirani pasivnom difuzijom, dok je kompleksna matrica komine masline negativno utjecala na propusnost polifenola kroz epitel. Najveću propusnost (67 %) imao je uzorak koji je sadržavao ekstrakt komine masline inkapsuliran s HP- β -CD-om u koncentraciji 16 mg mL^{-1} .¹⁸²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sirovi propolis

U svrhu istraživanja određivanja biodostupnosti odabranih polifenolnih sastavnica propolisa u uvjetima simulirane probave *in vitro* provedeno je preliminarno istraživanje¹⁸³ vezano za spektrofotometrijska određivanja glavnih polifenolnih skupina u etanolnim ekstraktima sirovog propolisa iz različitih regija Hrvatske. U tu su svrhu uzorci sirovih propolisa prikupljeni tijekom 2019. i 2020. godine s područja kontinentalne i jadranske regije Republike Hrvatske od lokalnih certificiranih pčelara (Tablica 2).

Tablica 2. Uzorci sirovih propolisa

Naziv i mjesto podrijetla sirovog propolisa	Područje/županija izuzetog sirovog propolisa	Oznaka propolisa	Geografske koordinate
Zagreb*	Zagrebačka	Zg	45°49'0"N 15°59'0"E
Valpovo*	Osječko-Baranjska	Vlp	45°40'N 18°25'E
Požega	Požeško-Slavonska	Pž	45°18'40"N 17°44'24"E
Senj	Ličko-Senjska	Snj	44°42'25"N 15°10'27"E
Dubrovnik	Dubrovačko-Neretvanska	Dub	42°39'13"N 18°05'41"E
Peščenica	Sisačko-Moslavačka	Pš	45°13'15"N 16°15'5"E

* uzorci korišteni u istraživanju pripreve uzorka i GID-u

Temeljem rezultata preliminarnog istraživanja uzoraka propolisa¹⁸³ navedenih u Tablici 2 u kojem je u uzorcima kontinentalnog tipa s područja Zagreba (Zg) i Valpova (Vlp) određen najveći sadržaj TP-a, TFF-a i TFD-a, za daljnje pokuse pripreve uzorka i GID-a u ovom doktorskom radu izabrani su navedeni uzorci. Ostali uzorci sirovih propolisa (Tablica 2) primijenjeni su kao slijepe probe u razvoju ili modifikaciji te optimizaciji i validaciji analitičkih metoda za određivanje odabranih polifenolnih sastavnica propolisa.

3.2. Kemikalije

3.2.1. Priprava ekstrakata propolisa

- etanol apsolutni, Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka);
- n-heksan, Honeywell, (Seelze, Njemačka)
- dietileter, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Njemačka)
- polietilenglikol 400, Sigma-Aldrich, (Mosbach, Njemačka);
- L-lizin, ≥ 98 % (TLC), Sigma-Aldrich, (Schnelldorf, Njemačka);
- fruktoza, komercijalna, za kolače, August Toepfer Zuckerhandelsgesellschaft Mbh & Co Kg, (Hamburg, Njemačka);
- dekstroza, Proseries dekstroza, EU za Polleo Adria d.o.o.;
- maltodekstrin, Proseries maltodekstrin, EU za Polleo Adria d.o.o.;
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, Wacker Chemie AG, (Burghausen, Njemačka).

3.2.2. Spektrofotometrijske analize

- Folin-Ciocalteuov reagens (smjesa fosfovolframata i molibdata), Sigma-Aldrich, (Buchs, Švicarska);
- natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Njemačka);
- aluminijev klorid, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Njemačka);
- sumporna kiselina, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Njemačka);
- 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH), Sigma-Aldrich, (Indija);
- kalijev hidroksid, Kemika, (Zagreb, Hrvatska);
- etanol, apsolutni, za analizu, Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka);
- metanol i voda (HPLC grade), Honeywell, (Seelze, Njemačka).

3.2.3. Tekućinskokromatografske analize

- metanol, HPLC-čistoće, Honeywell, (Francuska);
- voda, HPLC-čistoće, Honeywell, (Darmstadt, Njemačka);
- formijatna kiselina za masenu spektrometriju, ~ 98 %, Honeywell, (Mosbach, Njemačka);

3.2.4. *In vitro* simulacija GID-a

- α -amilaza iz ljudske sline, Sigma-Aldrich, (Saint Louis, Missouri, SAD);
- pepsin, svinjski, iz želučane sluznice, Sigma-Aldrich, (Saint Louis, Missouri, SAD);
- goveđa žuč, suha, nefrakcionirana, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD;
- pankreatin, svinjski, 8 x USP specifikacija, Sigma-Aldrich, (Saint Louis, Missouri, SAD);
- kalcijev klorid dihidrat, ACS Reagent, $\geq 99\%$, Honeywell, Fluka, (Seelze, Njemačka);
- kloridna kiselina, puriss, p.a., ACS reagent, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., fuming $\geq 37\%$, Sigma-Aldrich, (Seelze, Njemačka);
- kloridna kiselina Titripur, 1 mol L^{-1} , Reag. Ph. Eur., Reag. USP, Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka);
- natrijev hidrogenkarbonat, EMSURE, ACS, Reag. Ph. Eur., Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka);
- natrijev hidroksid, granule za analizu, EMSURE ISO, Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka);
- natrijev klorid krist., p.a., Kemika, (Zagreb, Hrvatska).

3.3. Pribor i oprema

U svim laboratorijskim pokusima korišteno je stakleno laboratorijsko posuđe čija preciznost i točnost odgovaraju međunarodnoj normi DIN. Sve priprave standardnih otopina i uzoraka propolisa te analize pripremljenih uzoraka provedene su na umjerenoj i kvalificiranoj laboratorijskoj opremi koja uključuje analitičke instrumente i uređaje.

3.3.1. *Obrada sirovog propolisa*

- metalne laboratorijske žlice i spatule, Bochem Instrumente GmbH, (Weilburg, Njemačka);
- laboratorijsko sito veličine pora $250 \mu\text{m}$, Retsch GmbH, (Haan, Njemačka);
- plastične vrećice s zatvaračem od 1 L, dimenzija $18 \times 26 \text{ cm}$;
- homogenizator, DP800 1000 W, La Moulinette XXL, Moulinex, (Francuska);
- kombinirani hladnjak/zamrzivač (od 2 do $8 \text{ }^\circ\text{C}$ / $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) korisne zapremine 495 L, HZO_700 BEZM, LTH Škofja Loka d. d., (Škofja Loka Slovenija).

3.3.2. Priprava ekstrakata propolisa

- plastične Pasteurove pipete, 3 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- stakleni lijevci, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);
- stakleni štapići, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);
- plastične epruvete s odgovarajućim čepovima, 12 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- plastične epruvete za centrifugiranje s odgovarajućim čepovima, 15 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- plastične epruvete za centrifugiranje s odgovarajućim čepovima, 50 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- staklene laboratorijske čaše, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);
- metalne laboratorijske žlice i spatule, Bochem Instrumente GmbH, (Weilburg, Njemačka);
- podesive automatske pipete s odgovarajućim nastavcima, od 10 µL do 100 µL, od 100 µL do 1000 µL, od 1000 µL do 5000 µL Eppendorf AG, (Hamburg, Njemačka);
- filter papir, Whatman No.4, promjer 110 mm, GE Healthcare UK Limited, (Buckinghamshire, Ujedinjeno Kraljevstvo);
- plastične brizgalice, 2 mL, CHIRANA T. Injecta, (Stara Tura, Slovačka);
- analitička vaga HR-202, AND, (Frankfurt, Njemačka);
- potenciometrijski titrator sa staklenom elektrodom za mjerenje pH, 888 Titrand, Metrohm AG, (Herisau, Švicarska);
- centrifuga Centric 322A, Tehnica Železniki d. o. o., (Železniki, Slovenija);
- ultrazvučna kupelj, RK-100 H, 230 V, Bandelin Sonorex, (Berlin, Njemačka);
- mikrovalna pećnica, MW73E-WB, 800 W, Samsung Electronics (M) Sdn. Bhd., (Selangor, Malezija);
- rotacijski uparivač, RV 10 control, IKA-Werke GmbH & Co. KG, (Staufen, Njemačka);
- zamrzivač, Ultrafreezer - 50 °C / - 86 °C, Fiocchetti, (Luzzara, Italija);
- pH-metar, PH 843P, Schott-Geräte GmbH, (Mainz, Njemačka);
- liofilizator, Lio 5P, Kambič d.o.o, (Semič, Slovenija);
- magnetska mješalica, Assistent, TMA 2071, Karl Hecht KG, (Sondheim, Njemačka);

- uparivač dušikom s vodenom kupelji N-EVAP 112, Organomotion Associates Inc., Berlin, (Massachusetts, SAD);
- hladnjak, temperatura od 2 do 8 °C, LTH Škofja Loka d. d., (Škofja Loka Slovenija).

3.3.3. Spektrofotometrijske analize

- plastične Pasteurove pipete, 3 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- odmjerne tikvice Klasa A, 10 mL, 25 mL, 100 mL, ISOLAB Laborgeräte GmbH, (Eschau, Njemačka);
- staklene laboratorijske čaše, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);
- metalne laboratorijske žlice i spatule, Bochem Instrumente GmbH, (Weilburg, Njemačka);
- podesive automatske pipete s odgovarajućim nastavcima, od 0,5 µL do 10 µL, od 10 µL do 100 µL, od 100 µL do 1000 µL, od 1000 µL do 5000 µL Eppendorf AG, (Hamburg, Njemačka);
- analitička vaga, AND, HR 202, (Frankfurt, Njemačka);
- kvarcna kiveta, 1 cm, HellmaOptik, (Jena, Njemačka);
- UV-VIS spektrofotometar Jenway Double Beam 6800 s Flight Deck software verzija 1.0, Bibby Scientific Ltd., (Staffordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.3.4. Tekućinskokromatografske analize

- staklene laboratorijske čaše, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);
- staklene pipete, Klasa AS, 5 mL, 10 mL, 25 mL, ISOLAB Laborgeräte GmbH, (Eschau, Njemačka);
- odmjerne tikvice Klasa A, 10 mL, 25 mL, ISOLAB Laborgeräte GmbH, (Eschau, Njemačka);
- filtri od teflona za filtraciju otapala, promjera 47 mm, veličine pora 1,5 µm, Supelco Analytical, Bellefonte, (Pennsylvania, SAD);
- filtri od regenerirane celuloze, promjera 15 mm, veličine pora 0,45 µm, Agilent Technologies, (Waldbronn, Njemačka);

- staklene bočice za HPLC-analizu s odgovarajućim čepovima, 2 mL, Agilent Technologies, (Waldbronn, Njemačka);
- vakuum-pumpa ME4R, Vacuubrand GmbH, (Wertheim, Njemačka);
- vakuum-stanica Agilent Technology, Palo Alto, (Kalifornija, SAD);
- vakuum-jedinica za filtriranje i otplinjavanje pokretne faze Aura Supelco Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Taufkirchen, Njemačka);
- uparivač dušikom s vodenom kupelji N-EVAP 112, Organomotion Associates Inc., Berlin, (Massachusetts, SAD);
- tekućinski kromatograf HPLC SpectraSYSTEM s detektorom s nizom fotodioda UV-6000 i ChromQuest 5.0 računalnim programom, Thermo Separation Products, (San Jose, Kalifornija, SAD);
- tekućinski kromatograf (U)HPLC Accela s detektorom s nizom fotodioda PDA i ChromQuest 5.0 računalnim programom, Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, (San Jose, California, SAD) (instrument i računalni program);
- kolona Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 150 mm x 4,6 mm (unutarnji promjer), veličina čestica 3,5 μm, s predkolonom 4-4, 14 mm x 4 mm (unutarnji promjer), veličine čestica 5 μm, Agilent Technology, (Santa Clara, Kalifornija, SAD).

3.3.5. Simulacija GID-a in vitro

- zatamnjene plastične epruvete za centrifugiranje s odgovarajućim čepovima, 15 mL, 50 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- odmjerne tikvice, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, ISOLAB Laborgeräte GmbH, (Eschau, Njemačka);
- plastične epruvete za centrifugiranje, 1,5 mL, DELTALAB S. L. U., (Barcelona, Španjolska);
- podesive automatske pipete s odgovarajućim nastavcima, od 0,5 μL do 10 μL, od 10 μL do 100 μL, od 100 μL do 1000 μL, od 1000 μL do 5000 μL Eppendorf AG, (Hamburg, Njemačka);
- staklene pipete, Klasa AS, 5 mL, 10 mL, 25 mL, ISOLAB Laborgeräte GmbH, (Eschau, Njemačka);
- staklene laboratorijske čaše, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, TLOS d. d., (Zagreb, Hrvatska);

- metalni stalci za epruvete, Bochem Instrumente GmbH, (Weilburg, Njemačka);
- membrane za dijalizu od regenerirane celuloze, Seamless semi-permeable, Spectra/Por 7 Dialysis Membrane, Pre-treated RC Tubing, MWCO: 3,5 kD, Spectrum Labs, (New Brunswick, NJ, SAD);
- analitička vaga HR-202, AND, (Frankfurt, Njemačka);
- pH-metar sa staklenom elektrodom Blue-line 18 pH, PH 843P, Schott-Geräte GmbH, (Mainz, Njemačka);
- vodena kupelj s termostatom i tresilicom, GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, (Burgwedel, Njemačka);
- centrifuga Rotanta 460, 460 R, Hettich Zentrifugen, (Tittlingen, Njemačka);
- zamrzivač, Ultrafreezer - 50 °C / - 86 °C, Fiocchetti, (Luzzara, Italija).

3.4. Referentni materijal

Tijekom razvoja, optimizacija i validacija spektrofotometrijskih i tekućinskokromatografskih metoda za određivanja odabranih polifenolnih sastavnica u uzorcima propolisa i analiza uzoraka sirovih propolisa i EEP te tijekom simulacije GID-a *in vitro* upotrijebljeni su referentni standardi flavonoida i fenolnih sastavnica navedeni u Tablici 3.

Tablica 3. Fizikalne i kemijske karakteristike standarda polifenola

Standard	Oznaka	Molekulska formula	Molekulska masa (g mol ⁻¹)	Čistoća (%)	Topljivost u vodi / mg mL ⁻¹	Proizvođač
Pinocembrin	PC	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,25	99,0	0,5	Sigma-Aldrich, Uzbekistan
Galangin	GN	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,24	98,4	netopljiv	Sigma-Aldrich, Kina
Krizin	KR	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,24	99,0	0,08	Sigma-Aldrich, Kina
Kavena kiselina	CA	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	98,5	0,6	Sigma-Aldrich, Kina
Feniletil ester kavene kiseline	CAPE	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	302,33	99,62	0,02	Sigma-Aldrich, Kina
Kvercetin	QC	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,23	96,0	0,06	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD
Galna kiselina	GA	C ₇ H ₆ O ₅	170,12	95,5	11,9	Sigma-Aldrich, Buchs, Švicarska

3.5. Analitičke metode

3.5.1. Postupak obrade sirovog propolisa

Uzorci sirovih propolisa dostavljeni su u označene plastične vrećice te skladišteni do obrade u zamrzivač na temperaturi od -10 do -20 °C. Zamrznuti uzorci sirovih propolisa su potom mehanički usitnjeni sjeckalicom i homogenizatorom te dodatno prosijani kroz laboratorijsko sito kako bi se odvojila mehanička onečišćenja poput kora drveća, lišća i dr.

Tijekom obrade uzoraka sirovih propolisa provedena su ispitivanja organoleptičkih parametara: izgled, konzistencija, boja i miris.

Usitnjeni uzorci sirovog propolisa pohranjeni su u plastične vrećice na temperaturi od -10 do -20 °C do analiza.

3.5.2. Postupci i tehnike ekstrakcije uzoraka propolisa

Ekstrakcija uzoraka sirovog propolisa provedena je na uzorku Vlp te su pri tome primijenjene tehnike MCR, UPE i MPE, s obzirom da je MCR najjednostavnija, UPE dokazano jedna od najučinkovitijih, a MPE najbrža ekstrakcijska tehnika.^{96,99}

3.5.2.1. Ekstrakti propolisa

Količina 0,5 g homogeniziranog propolisa ekstrahirana je primjenom MCR, MPE i UPE uz modifikacije temperature, vremena trajanja ekstrakcije i udjela otapala. Sve ekstrakcije provedene su u triplicatima, a uvjeti provedenih ekstrakcija prema vrsti ekstrakcijske tehnike prikazani su u Tablici 4. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani na 4 °C (4472 x g, 10 minuta) i pohranjeni u zamrzivaču (od -10 do -20 °C) preko noći. Drugi dan uzorci su ponovno centrifugirani u istim uvjetima i profiltrirani kroz filter papir kako bi se uklonio vosak te su nadopunjeni istim otapalom do oznake volumena u odmjerne tikvici od 10 mL. Za analizu HPLC ekstrakt u 40 % EtOH pripremljen je na način da je 1,0 mL otopine ekstrakta razrijeđeno pokretnom fazom u omjernoj tikvici volumena 10 mL. Ekstrakti u 70 %-tnom, 80 %-tnom i 90 %-tnom EtOH pripremljeni su razrijeđivanjem 0,1 mL ekstrakta pokretnom fazom u odmjerne tikvici od 10 mL.

Ekstrakti u 20 % PEG 400 analizirani su metodom HPLC direktno bez razrjeđivanja, dok je volumen od 1,0 mL pripravljenog 40 % PEG 400 ekstrakta razrijeđen pokretnom fazom u odmjernoj tikvici od 10 mL.

Sve pripravljene otopine prije analize HPLC profiltrirane su kroz filtar od regenerirane celuloze. Rezultati analiza HPLC izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ ekstrakta.

Tablica 4. Ekstrakcijski postupci i uvjeti ekstrakcija uzoraka sirovog propolisa

Vrsta ekstrakcije	Otopalo	Udio otopala (%)	Omjer propolis: otopalo	Uvjeti ekstrakcije	
				Vrijeme	Temperatura (°C)
MCR	EtOH	70	1 : 30	24 h	Sobna
UPE	EtOH	40	1 : 10	1 h	Sobna
	EtOH	70		1 h	
	EtOH	80		1 h	
	EtOH	90		1 h	
	PEG 400	20		2 h	
	PEG 400	40		2 h	
MPE	EtOH	70	1 : 10	2 x 10 s	-
	PEG 400	20		2 x 10 s	
	PEG 400	40		2 x 10 s	

MCR = maceracija; UPE = ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; MPE = mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija; EtOH = etanol; PEG 400 = polietilenglikol 400

3.5.2.2. Etanolni ekstrakt propolisa pripravljeni liofilizacijom

3.5.2.2.1. Pripravak bez nosača

Uzorci EEP, dobiveni pripravom opisanom u poglavlju 3.5.2.1. sa 70, 80 i 90 % etanolom uz UPE i koncentrirani uparavanjem pri sniženim tlakom i temperaturi 50 °C, liofilizirani su u uvjetima tlaka 0,1 – 0,3 mbar i temperature -50 °C. Dobiveni liofilizati otopljeni su u 5 mL ultračiste vode za analizu.

Za ispitivanje učinka UPE na prinos polifenola iz EEP-a, u ekstrakt reduciran uparavanjem pri sniženim tlakom i temperaturi 50 °C dodan je volumen 50 mL ultračiste vode. Dobivena reakcijska smjesa ekstrahirana je 2 sata u ultrazvučnoj kupelji, koncentrirana uparavanjem pod sniženim tlakom 72 mbar i temperaturi 50 °C te liofilizirana u uvjetima

tlaka 0,1 – 0,3 mbar i temperature -50 °C. Dobiveni liofilizat otopljen je u 5 mL ultračiste vode za analizu. Rezultati analiza HPLC izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ vodene otopine pripravka.

3.5.2.2.2. Priprava u vodi topljivog pripravka propolisa s L-lizinom (L-Lys)

Priprava je provedena uz modifikaciju u primjeni organskih otapala n-heksana i dietiletera u odnosu na petroleter i etilacetat korištene u radu Ivanovske i suradnika¹⁸⁴

Količina 0,5 g sirovog homogeniziranog sirovog propolisa macerirana je sa 70 %-tnim etanolom u omjeru etanol:propolis 30 : 1 tijekom 24 sata. Ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a potom i koncentriran uparavanjem pod sniženim tlakom i temperaturi 50 °C, nakon čega je provedena ekstrakcija tekuće-tekuće n-heksanom (3 x 20 mL) i dietileterom (3 x 20 mL). Nakon uparavanja organskog otapala, ukoncentrirana frakcija otopljen je u 8 % vodenoj otopini L-Lys uz miješanje na temperaturi 50 – 60 °C, nakon čega je otopina liofilizirana u uvjetima temperature -50 °C i tlaka 0,1 – 0,3 mbar.

Dobiveni liofilizat otopljen je u 5 mL vode te je prije analize HPLC 0,2 mL te otopine razrijeđeno pokretnom fazom do oznake volumena u odmjerne tikvici do 10 mL. Rezultati analiza HPLC izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ vodene otopine pripravka.

3.5.2.2.3. Priprava u vodi topljivog kompleksa propolisa kompleksiranjem EEP i vodene otopine ugljikohidrata

Pripravljene su 2,0, 4,0 i 6,0 % *m/V* vodene otopine ugljikohidrata za fazu inkapsulacije nosačem.

Na uzorku Vlp propolisa inkapsulacija EEP-a provedena je sa sljedećim nosačima: fruktozom (FRC), dekstrozom (DX), maltodekstrinom (MD) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD-om). Na uzorku Zg propolisa inkapsulacija EEP-a provedena je s HP- β -CD-om. EEP je pripremljen postupkom opisanim u poglavlju 3.5.2.2.1. u 70 %-tnom etanolu te je ekstrahiran 1 sat tehnikom UPE. Uzorak je potom koncentriran uparavanjem pod sniženim tlakom i temperaturi 50 °C te je u koncentrat dodano 50 mL 2,0, 4,0 ili 6,0 % *m/V* vodene otopine određenog ugljikohidrata. Inkapsuliranje dobivene smjese potpomognuto je ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Otopina kompleksa je potom koncentrirana uparavanjem pod sniženim tlakom (72 mbar) i temperaturi 50 °C, a koncentrat liofiliziran u uvjetima temperature -50 °C i tlaka 0,1 – 0,3 mbar.

Liofilizati su otopljeni u 5 mL ultračiste vode nakon čega je volumen od 1,0 mL dobivene suspenzije s FRC, DX i MD razrijeđen s pokretnom fazom do oznake volumena u odmjernoj tikvici volumena 10 mL, a suspenzija s HP- β -CD-om razrijeđena je tako da je 0,2 mL suspenzije razrijeđeno pokretnom fazom do oznake volumena 10 mL u odmjernoj tikvici.. Rezultati analiza HPLC izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ vodene otopine kompleksa.

3.5.2.2.4. Priprava u vodi topljivog kompleksa etanolnog ekstrakta smjese standarda PC, KR, GN, CA i CAPE i vodene otopine HP- β -CD

Postupkom opisanim u poglavlju 3.5.2.2.3. pripremljeni su i etanolni ekstrakti smjese standarda PC, KR, GN, CA i CAPE (EESS) koncentracija PC ($40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), KR ($12 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), GN ($20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), CA ($3,0 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) i CAPE ($4,0 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), a kao nosač primijenjen je HP- β -CD u koncentraciji 2,0 % *m/V*. Rezultati analiza HPLC izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ vodene otopine kompleksa.

3.5.3. Spektrofotometrijske analize

Spektrofotometrijske metode UV/VIS opisane, modificirane, optimizirane i validirane u preliminiranom istraživanju određivanja sadržaja TP, TFF i TFD u etanolnim ekstraktima sirovih propolisa navedenih u Tablici 2 primijenjene su i za određivanja sadržaja TP, TFF i TFD u kompleksima EEP-a uzoraka Vlp i Zg propolisa te kompleksa smjese standarda (std mix) prije i nakon svake faze simulacije GID-a *in vitro*.

3.5.3.1. Radni uvjeti i priprava otopina uzoraka za spektrofotometrijske analize

Određivanje sadržaja TP

Određivanje sadržaja ukupnih fenola provedeno je koristeći Folin-Ciocalteu-ov reagens. Za izradu baždarne krivulje korištena je temeljna otopina smjese standarda PC:GN koncentracije $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ u omjeru 2 : 1, a radni standardi pripremljeni su u radnom području od $16,5$ do $330 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Uzorak za analizu volumena 0,1 mL razrijeđen je 80 %-tnim etanolom u odmjernoj tikvici volumena 10 mL kako bi koncentracija odgovarala radnom području metode. Alikvot od 0,5 mL dobivene otopine dodan je u odmjernu tikvicu volumena 25 mL u koju je prethodno dodano 7,5 mL destilirane vode, nakon čega je dodano 2 mL Folin-Ciocalteu

reagensa i 3 mL 20 %-tne vodene otopine natrijevog karbonata. Odmjerna tikvica je potom nadopunjena destiliranom vodom do oznake volumena te je skladištena u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata (± 3 min). Apsorbancija dobivene otopine mjerena je na 760 nm.

Rezultati za sadržaj TP-a izraženi su u $\mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ vodene otopine kompleksa.

Određivanje sadržaja TFF

Sadržaj ukupnih flavona i flavonola određen je primjenom 5 % metanolne otopine aluminijevog klorida (AlCl_3). Priprava baždarnih krivulja za metodu TFF s QC kao referentnim standardom provedena je pripremom šest različitih koncentracija u rasponu od 1 do $64 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Uzorak za analizu volumena 0,1 mL razrijeđen je 80 %-tnim etanolom u odmjernoj tikvici volumena 10 mL. U odmjernoj tikvici volumena 25 mL je alikvot od 1,0 mL dobivene otopine razrijeđen s 10 mL metanola, te je dodano 0,5 mL metanolne otopine aluminijevog klorida i dopunjeno metanolom do oznake volumena. Reakcijska smjesa u odmjernoj tikvici skladištena je 30 minuta u mraku i na sobnoj temperaturi. Apsorbancija dobivene otopine mjerena je na 415 nm. Rezultati za sadržaj TFF-a izraženi su u $\mu\text{g QC mL}^{-1}$ vodene otopine kompleksa.

Određivanje sadržaja TFD

Metanolna otopina PC-a korištena je kao standardna otopina za pripremu baždarne krivulje za metodu TFD u rasponu od 90 do $900 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Uzorak za analizu volumena 1,0 mL razrijeđen je 80 %-tnim etanolom u odmjernoj tikvici volumena 10 mL kako bi koncentracija reakcijske smjese odgovarala linearnom radnom području metode. Reagens 2,4-DNPH pripremljen je otapanjem 1 g 2,4-DNPH u 2 mL 96 %-tne sulfatne kiseline u odmjernoj tikvici volumena 100 mL te je dobivena smjesa razrijeđena metanolom do oznake volumena. Miješanjem 1 mL razrijeđene otopine uzorka i 2 mL otopine 2,4-DNPH u odmjernoj tikvici dobivena je reakcijska smjesa koja je potom zagrijavana u vodenoj kupelji na $50\text{ }^\circ\text{C} / 50$ min. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa u odmjernoj tikvici razrijeđena je 10 %-tnim etanolnom otopinom kalijevog hidroksida (80 %-tni etanol). Volumen 1,0 mL dobivene otopine potom je razrijeđen metanolom u odmjernoj tikvici volumena 25 mL, a dobivena otopina je centrifugirana ($4472 \times g$, 10 minuta). Apsorbancija nadtaloga mjerena je na 495 nm. Rezultati za sadržaj TFD-a izraženi su u $\mu\text{g PC mL}^{-1}$ vodene otopine kompleksa.

3.5.4. Tekućinskokromatografske analize (RP-HPLC-PDA)

3.5.4.1. Radni uvjeti

Kromatografski uvjeti metode RP-HPLC-PDA za određivanje pojedinačnih PC, KR, GN, CA, CAPE polifenola metodom vanjskog standarda u ekstraktima i pripravcima propolisa prikazani su u Tablici 5:

Tablica 5. Kromatografski uvjeti metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obratnih faza uz primjenu UV-detektora s nizom fotodioda (eng. *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detection*, RP-HPLC-PDA)

Pokretna faza	A : B *= 45 : 55; izokratno eluiranje
Volumen injektiranja	5 μ L
Temperatura kolone	25 °C
Temperatura injektiranja	25 °C
Valna duljina detekcije	290 nm
Protok mobilne faze	0,9 mL min ⁻¹
Tlak na koloni	190 bar
Vrijeme analize	40 minuta

* A = Ψ (voda, metanol, formijatna kiselina) = 97 : 2 : 1

B = metanol

3.5.4.2. Priprava standardnih otopina odabranih polifenola za RP-HPLC-PDA analizu

Izvorne otopine PC, KR, GN, CA i CAPE masenih koncentracija 1,0 mg mL⁻¹ pripravljene su otapanjem certificiranih referentnih materijala u metanolu.

Standardna otopina kalibratora je smjesa PC, KR, GN, CA i CAPE, a pripravljena je razrjeđivanjem alikovota izvorne otopine pojedinog polifenola pokretnom fazom. Masene koncentracije pojedinog polifenola u kalibracijskim otopinama navedene su u Tablici 6.

Tablica 6. Kalibracijske otopine za analizu RP-HPLC-PDA

Kalibrator	γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
1.	2	2	5	2	1
2.	5	5	10	5	3
3.	10	8	15	10	5
4.	20	10	20	20	8
5.	30	12	25	30	10
6.	50	15	30	50	15
7.	60	18	40	60	20
8.	70	20	50	70	30

PC – pinocembrin; KR – krizin; GN – galangin; CA – kavena kiselina; CAPE – feniletil ester kavene kiseline

3.5.4.3. Validacija metode RP-HPLC-PDA

Validacija metode provedena je u laboratorijskim uvjetima provedbom validacijskog protokola prikazanog u Tablici 7, a sukladno zahtjevima definiranim za kompleksne matrice u Eurachem vodiču¹⁸⁵. Rezultati su obrađeni i statistički primjenjujući opisnu statistiku, linearnu regresiju i jednoslojnu analizu varijance (ANOVA: *Single Factor*, $p > 0,05$).

Selektivnost metode provjerena je usporedbom reprezentativnih kromatograma pokretne faze, otopina standarda, uzoraka matrice (uzorci propolisa), uzorka bez ciljnih analita te uzorka obogaćenog smjesom standarda.

Potvrda linearnosti provedena je na osam kalibracijskih točaka (kalibratora) u sljedećim intervalima nominalnih koncentracija polifenola: PC $37 \mu\text{g mL}^{-1}$, 6,7 – 233,3 %; KR $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, 16,7 – 166,7 %; GN $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, 20 – 200 %; CA $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, 6,7 – 233,3 %; CAPE $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 – 300 %. Za svaku kalibracijsku točku određena je srednja vrijednost površina kromatografskih pikova. Rezultati su obrađeni linearnom regresijom te je određen nagib i odsječak baždarnog pravca i Pearsonovog koeficijent korelacije (r_p).

Preciznost je ispitana višekratnim injektiranjem standardne smjese analita unutar istog dana (ponovljivost) i nekoliko dana uzastopno (srednja preciznost) te ponovljivošću pripreve uzorka i ponovljivošću pripreve uzorka drugi dan s kemikalijama drugih proizvodnih serija. Izračunat je %RSD svih mjerenja.

Granica detekcije (GD) pojedinačnih analita PC, KR, GN, CA i CAPE u metodi određena je izračunom standardnog rezidualnog odstupanja (s) i nagiba kalibracijske krivulje prema sljedećoj jednadžbi:

$$GD = 3,3 \times \frac{s}{\text{nagib}}$$

Granica određivanja (GO) analita PC, KR, GN, CA i CAPE u metodi određena je izračunom standardnog rezidualnog odstupanja (s) i nagiba kalibracijske krivulje prema sljedećoj jednadžbi:

$$GO = 10 \times \frac{s}{\text{nagib}}$$

Točnost metode provjerena je obogaćivanjem matrice uzorka poznatom koncentracijom smjese analita i određena je na tri kalibracijske točke unutar radnog područja metode (GO, 100 % i >150 % nominalne koncentracije polifenola). Za provedbu testa točnosti metode korišten je propolis Du kao slijepa proba (Tablica 2). Izračunati su analitički povrati analita iz matrice (engl. *Recovery*) i vrijednosti %RSD. Kriterij prihvatljivosti analitičkog povrata sukladan je vodiču AOAC za dodatke prehrani i biljke (AOAC, 2002).¹⁸⁶

Robusnost je ispitana provjerom stabilnosti otopina smjese standarda i otopina uzorka u pokretnoj fazi:

- nakon 72 sata na sobnoj temperaturi na svjetlu i u mraku;
- nakon 60 dana pohranjenih na temperaturi od 2 do 8 °C;
- tijekom dva ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja na -20 °C.

Razlika između masenih koncentracija svježe pripremljenog uzorka i istog uzorka nakon čuvanja na propisanoj temperaturi mora biti $\leq 2,0$ %. Dodatno je robusnost provjerena utjecajem promjene volumnog udjela pojedinog otapala u pokretnoj fazi (± 10 %), utjecajem promjene temperature okoline (± 10 °C), utjecajem volumena injektiranja, utjecajem protoka pokretne faze te utjecajem reagensa i kromatografskih kolona različitih proizvodnih serija.

Tablica 7. Validacijski kriteriji

Validacijski pokazatelj	Kriterij prihvatljivosti
Prikladnost kromatografskog sustava	
Vrijeme zadržavanja (t_R)	< 1
Broj teorijskih tavana (N)	> 2000
Ponovljivost injektiranja (%RSD)	$\leq 2,0 \%$
Razlučivanje (R_S)	$\geq 2,0$
Faktor asimetrije (A_f)	od 0,8 do 1,6
Površina ispod krivulje	$\leq 2,0 \%$
Selektivnost	
Relativno zadržavanje ®^*	$97,5 \% \leq r \leq 102,5 \%$
Razlučivanje (R_S)	$\geq 2,0$
Linearnost	
Radno područje $**$	min. od 50 % do $> 150 \%$
Koeficijent r_p	$0,99 \leq r_p \leq 1,00$
Preciznost	
Ponovljivost injektiranja (%RSD, $n = 9$)	$\leq 2 \%$
Ponovljivost pripreve uzorka (%RSD, $n = 6$)	$\leq 10 \%$
Srednja preciznost (%RSD, $n = 6$)	$\leq 10 \%$
Točnost	
Analitički povrat $***$	od 80 % do 110 %
Granica detekcije****	$GD = 3,3 \times \frac{s}{\text{nagib}}$
Granica određivanja*****	$GO = 10 \times \frac{s}{\text{nagib}}$
Robusnost	
Stabilnost $****$	$> 24 \text{ h}$

n broj uzoraka

S/N omjer visine kromatografskog pika i šuma osnovne linije

* omjer t_R analita ekstrahiranog iz matrice i t_R analita standardne otopine.

** u odnosu na nominalnu koncentraciju analita.

*** srednja vrijednost analitičkih povrata analita na konc. koje odgovaraju GO 100 i $> 150 \%$ nominalne koncentracije analita.

**** otopina smjese standarda i uzorka mora biti stabilna pri čuvanju na temperaturi od 2 do 8 °C i od -10 do -20 °C.

***** izračun prema jednadžbama u poglavlju 3.5.4.3.

3.6. Simulacija GID-a *in vitro*

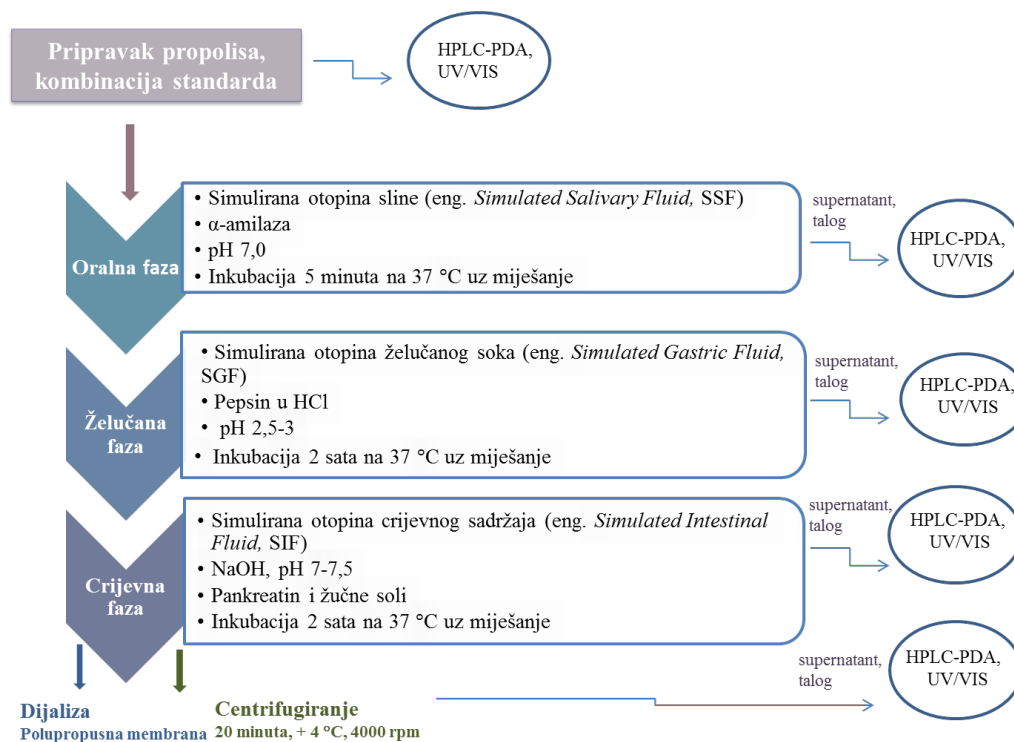
3.6.1. Protokol simulacije GID-a *in vitro*

Statički model simulirane GID *in vitro* u frakcijama prikazanim u Tablici 8. proveden je u skladu s protokolom razvijenim prema Minekus i suradnicima te unaprijeđenim prema Brodkorb i suradnicima s manjim izmjenama.^{175,187}

Tablica 8. Oznake pojedinih frakcija tijekom *in vitro* simulirane gastrointestinalne probave

Oznaka	Naziv frakcije
NU	Neprobavljeni uzorak
OF	Oralna frakcija (<i>eng. Oral Fraction, OF</i>)
GF	Želučana frakcija (<i>eng. Gastric Fraction, GF</i>)
IF-C	Crijevna frakcija nakon centrifugiranja (<i>eng. Intestinal Fraction, IF-C</i>)
Din	Otopina unutar membrane za dijalizu, predstavlja dijalizibilnu frakciju
Dout	Otopina izvan membrane za dijalizu, predstavlja nedijalizibilnu frakciju

Uzorci kompleksa EEP Vlp i HP- β -CD, EEP Zg i HP- β -CD, i EESS i HP- β -CD podvrgnuti su OF, GF i IF probave, a detaljan sastav simulirane oralne (SOT), želučane (SŽT) i crijevne tekućine (SCT) prikazan je u Tablici 9., dok je protokol izvođenja simulirane GID *in vitro* prikazan shematski na Slici 9.

Slika 9. Protokol izvođenja pokusa simulacije GID-a *in vitro*

Tablica 9. Priprava izvornih simuliranih probavnih tekućina.

Simulirana probavna tekućina *	Volumen otopine (mL)					
	KCl (37,3 g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (68 g L ⁻¹)	NaHCO ₃ (84 g L ⁻¹)	NaCl (117 g L ⁻¹)	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (30,5 g L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ CO ₃ (48 g L ⁻¹)
SOT	15,1	3,7	6,8	-	0,5	0,06
SŽT	6,9	0,9	12,5	11,8	0,4	0,5
SCT	6,8	0,8	42,5	9,6	1,1	-

* Konačni volumen svake probavne tekućine je 500 mL, koncentracije 1,25 x

Simulacija probave započeta je u ustima (OF) dodavanjem volumena 5 mL uzorka (vodena suspenzija kompleksa smjese standarda ili EEP-a sa HP- β -CD) u zatamnjenu plastičnu epruvetu za centrifugiranje volumena 50 mL te je pomiješana s 4,0 mL SOT. Nakon toga, u smjesu je dodano 0,5 mL vodene otopine α -amilaze (1500 U·mL⁻¹ u SOT), 25 μ L 0,3 mol·L⁻¹ CaCl₂ i 225 μ L destilirane vode kako bi omjer uzorka u odnosu na SOT bio 1 : 1 (V/V). Smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 5 minuta uz miješanje. Za simulaciju želučane faze (GF), u smjesu iz OF dodano je 8,0 mL SŽT, 0,667 mL otopine pepsina

(2000 U mL⁻¹ u SZT), 5 µL 0,3 mol L⁻¹ CaCl₂ i 0,448 mL destilirane vode. Smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji s mješalicom na 37 °C tijekom 2 sata uz miješanje.

Dva odvojena protokola provedena su u svrhu simulacije crijevne faze (IF):

▪ 1. MODEL (IF-C):

U GF je dodano 8,0 mL SCT, zatim 5,0 mL otopine pankreatina (800 U mL⁻¹ u SCT), 3,0 mL 160 mmol L⁻¹ žučnih soli, 40 µL 0,3 mol L⁻¹ CaCl₂, 0,15 mL 1 mol L⁻¹ NaOH i 3,16 mL destilirane vode. Otopina NaOH dodana je u smjesu zbog neutralizacije smjese na pH 7,0. Reakcijska smjesa je ponovno stavljena na miješanje u vodenu kupelj na 37 °C tijekom 2 sata.

▪ 2. MODEL (dijaliza kroz polupropusnu membranu):

U GF su dodani enzimi i reagensi u jednakim koncentracijama kao u 1. modelu, međutim, u epruvetu s GF uronjena je i polupropusna membrana za dijalizu kojoj je uloga bila simuliranje stjenke tankog crijeva. Membrana duljine 10 cm uronjena je u destiliranu vodu 30 minuta te nakon toga temeljito isprana mlazom destilirane vode. Jedan kraj membrane učvršćen je savitljivom plastičnom vrpcom te je membrana napunjena s 5 mL vodene otopine natrijevog klorida (0,9 % *m/V*) i 5 mL vodene otopine natrijevog hidrogenkarbonata (0,5 mol L⁻¹). Nakon punjenja, učvršćena je i na drugom kraju te je tako pripravljena uronjena u smjesu crijevne faze i stavljena na miješanje u vodenu kupelj na 37 °C tijekom 2 sata.

Po završetku svake faze (OF, GF, IF-C, Din i Dout) uzorci su stavljeni na ledenu kupelj 10 minuta i centrifugirani pri 4 °C 20 minuta na 4472 x *g* kako bi se odvojili topljivi od netopljivih spojeva, a zatim su alikvoti pohranjeni na -80 °C do analiza.

Koncentracija pojedinih standarda u kompleksu EESS-a i HP-β-CD-a prilikom provedbe *in vitro* simulacije probave određena je uzimajući u obzir dobivene prosječne koncentracije polifenolnih spojeva u kompleksu EEP s HP-β-CD-om (opisano u poglavlju Rezultati 4.3.2., Tablica 18).

Uzorak slijepe probe sadržavao je vodu, enzime i probavne tekućine. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu, a tijekom provedbe pokusa nisu izuzimani alikvoti iz pojedinih faza, nego je svaka faza probave provedena u odvojenim epruvetama kako bi se osigurala

homogenost uzorka tijekom svake faze. Izvorne otopine enzima pripravljane su netom prije pokusa te su držane na ledenoj kupelji do primjene. Prije analize HPLC-, alikvoti uzoraka razrijeđeni su pokretnom fazom i analizirani ili su direktno analizirani bez razrjeđivanja, ovisno o koncentraciji analita u pojedinoj fazi.

3.6.2. Analize uzoraka prije i nakon oralne, želučane i crijevne faze probave

3.6.2.1. Spektrofotometrijska analiza uzoraka prije i nakon oralne, želučane i crijevne faze probave

Uzorci kompleksa kojima je određen sadržaj TP, TFF i TFD prije i nakon *in vitro* simulacije GID-a UV/Vis spektrofotometrijskim metodama opisanim u odjeljku 3.5.3. su:

- EEP Vlp i HP- β -CD-a;
- EEP Zg i HP- β -CD-a;
- EESS-a i HP- β -CD-a.

3.6.2.2. Priprava otopina kompleksa smjese standarda polifenola u uzorcima prije i nakon simulacije GID-a *in vitro* za analizu RP-HPLC-PDA

Volumen 0,2 mL kompleksa EESS nadopunjen je do oznake volumena 10 mL pokretnom fazom. Pripravljena otopina prije analize HPLC profiltrira se kroz filter od regenerirane celuloze.

3.6.2.3. Priprava otopina uzorka Zg i Vlp propolisa prije simulacije GID-a *in vitro* u ekstraktima i kompleksima propolisa za analizu RP-HPLC-PDA

U potpoglavlju 3.5.2.2.3. opisana je priprava otopine uzoraka u ekstraktima i kompleksima Zg i Vlp propolisa prije *in vitro* simulacije GID-a.

Kompleks EEP-a i HP- β -CD uzorka Du propolisa obogaćen smjesom standarda PC, KR, GN, CA i CAPE za analizu analitičkog povrata u tri koncentracijska nivoa smjese standarda pripremljen je u koncentracijama GO, nominalna koncentracija (NK) i koncentracija > 150 % prema vrijednostima navedenim u Tablici 10. Za HPLC analizu volumen 0,2 mL kompleksa EEP-a uzorka Dub i HP- β -CD-a nadopunjen je do oznake volumena 10 mL

pokretnom fazom. Pripravljena otopina prije HPLC-analize profiltrira se kroz filter od regenerirane celuloze.

Tablica 10. Koncentracija PC, KR, GN, CA i CAPE u otopini uzorka na tri koncentracijska nivoa za određivanje točnosti metode

Parametar	γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
GO	0,7	0,3	0,9	5,5	0,4
NK	37	12	20	25	4,0
> 150 %	65	19	45	65	25

3.6.2.4. Priprava otopina standarda i uzorka Zg i Vlp propolisa nakon svake faze simulacije GID-a *in vitro* za analizu RP-HPLC-PDA

Volumen 0,2 mL uzorka nakon svake faze probave otopljen je u 2,8 mL pokretne faze do konačne koncentracije $0,067 \text{ mg mL}^{-1}$. Otopina iz Din faze analizirana je nerazrijeđena. Prije analize HPLC otopina uzorka je profiltrirana kroz filter od regenerirane celuloze

3.6.3. Izračun udjela biodostupnih polifenola

Biodostupnost je izražena kao udio polifenolnog spoja otopljenog u Din odnosno topljivoj frakciji nakon IF-C u odnosu na otopinu uzorka/standarda prije *in vitro* simulacije probave. Dijalizibilnost je izračunata kao udio polifenolnih spojeva dostupnih za apsorpciju, odnosno udio dijalizibilnih spojeva unutar membrane za dijalizu u odnosu na neprobavljeni uzorak.

$$\text{Biodostupnost (\%)} = \frac{\gamma (\text{polifenoli oslobođeni nakon IF - C ili Din})}{\gamma (\text{NU})} \times 100$$

$$\text{Dijalizibilnost (\%)} = \frac{\gamma (\text{polifenoli unutar membrane, Din})}{\gamma (\text{NU})} \times 100$$

Stabilnost polifenola tijekom GID-a je izračunavanjem udjela biodostupnosti nakon svake faze probave u odnosu na neprobavljeni uzorak prema jednadžbi:

$$\text{Stabilnost (\%)} = \frac{\gamma (\text{polifenoli u uzorku nakon svake faze probave})}{\gamma (NU)} \times 100$$

Iskoristivost je frakcija s ukupnim probavljenim polifenolima (Din+Dout), a izračunava se:

$$\text{Iskoristivost (\%)} = \frac{\gamma[(\text{polifenoli Din}) + \gamma (\text{polifenoli Dout})]}{\gamma (NU)} \times 100$$

Ostatak nakon crijevne faze je frakcija koja nije biodostupna nakon OF, GF i IF, ova frakcija dopijeva u debelo crijevo, a izračunava se:

$$\text{Ostatak nakon crijevne faze(\%)} = \frac{\gamma (\text{polifenoli u Dout frakciji})}{\gamma (NU)} \times 100$$

gdje je:

IF-C – biodostupni polifenoli nakon centrifugiranja crijevne frakcije,

Din – dijalizibilni polifenoli,

Dout – nedijalizibilni polifenoli,

Din + Dout – ukupni iskoristivi polifenoli nakon dijalize.

3.7. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati analizirani su pomoću statističkog programa Stata 13.1 (Stata Corp. USA).

Koncentracije pojedinih polifenola ekstrahiranih postupcima ekstrakcije bez nosača uspoređene su neparametrijskim Kruskal Wallisovim (KW) testom. Budući da su opažene razlike u koncentraciji bile statistički značajne, pojedinačne vrijednosti uspoređene su Dunnovim *post-hoc* statističkim testom kako bi se utvrdilo koji se postupci ekstrakcije, odnosno koncentracije polifenola, statistički razlikuju ako se usporede međusobno svaki sa svakim.

Dobivene vrijednosti koncentracija pojedinih polifenola korištenjem različitih nosača uspoređene su neparametrijskim Kruskal Wallisovim testom. Budući da su opažene razlike u koncentraciji polifenola primjenom različitih nosača bile statistički značajne, međusobno su uspoređene koncentracije Dunnovim *post-hoc* testom. Opažene razlike između dviju vrijednosti određenog analita smatrane su statistički značajnima ako je vjerojatnost pojave uočene razlike bila manje od 0,05 ($p < 0,05$).

Razlike u koncentracijama polifenola dobivenih primjenom istog nosača, ali iz propolisa različitog izvora (Zg i Vlp) statistički su uspoređene neparametrijskim Mann Whitneyevim testom.

Na isti način na koji je uspoređena uspješnost ekstrakcije, uspoređene su koncentracije u različitim fazama *in vitro* simulirane GID-a. Koncentracije u pojedinim fazama uspoređene su Kruskal Wallisovim neparametrijskim testom te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze ako je KW testom utvrđena statistički značajna razlika. Vrijednosti vjerojatnosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

§ 4. REZULTATI

4.1. Fizikalno-kemjska svojstva sirovog propolisa

Organoleptičkim ispitivanjima opažena su svojstva navedena u Tablici 11 istraživanih uzoraka sirovih propolisa (Slika 10).

A)



B)



C)



D)



E)



F)



Slika 10. Izgled sirovog propolisa prikupljanog s područja: **A)** Zagreba, **B)** Valpova, **C)** Požege, **D)** Senja, **E)** Dubrovnika i **F)** Pešćenice (vlastite fotografije)

Tablica 11. Organoleptička svojstva istraživanih uzoraka propolisa

Oznaka propolisa	Izgled i struktura	Boja	Miris
Zg	Smolasta heterogena smjesa s primjesama kore i lišća drveća	Žuto-narančasta	Intenzivan aromatični
Vlp	Smolasta heterogena smjesa s primjesama kore i lišća drveća	Žuto-narančasta	Umjeren aromatični
Pž	Rahla heterogena smjesa s primjesama kore i lišća drveća	Smeđa	Umjeren aromatični
Snj	Kompaktan uzorak, ljepljive strukture, s primjesama kore i lišća drveća	Tamnosmeđa	Slabo aromatični
Du	Kompaktan uzorak, ljepljive strukture, s primjesama kore i lišća drveća	Tamnosmeđa-crna	Slabo aromatični
Pš	Kompaktan uzorak, ljepljive strukture, s primjesama kore i lišća drveća	Smeđa	Umjeren aromatični

4.2. Razvoj i optimizacija tekućinskokromatografske metode

Modifikacija tekućinskokromatografskih uvjeta metode Escrichea i suradnika, a zatim Cunhe i suradnika te Barbarić i suradnika provedena je sa sedam kombinacija kromatografskih uvjeta (Tablica 12) u svrhu razdvajanja odabranih polifenola PC, GN, KR, CA i CAPE metodom RP-HPLC-PDA.^{73,96,97} Rezultati učinkovitosti kombinacija prikazani su u Tablici 12, a specifični kromatogrami Slikama 11 i 12. Shodno tome, najučinkovitija 7. kombinacija kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA je dodatno modificirana daljnjom kombinacijom i interakcijom eksperimentalnih modela povećanja/smanjenja udjela otapala u A odnosno B komponenti pokretne faze (Tablica 13). Prikladnost kromatografskog sustava ispitana je praćenjem kritičnih kromatografskih parametara: vrijeme zadržavanja (t_R), faktor simetrije (A_s), broj teoretskih tavana (N), razlučivanje (R_s) i faktor zadržavanja (k). Uvjet odabira konačnih kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA za daljnja istraživanja na kompleksnim uzorcima propolisa odnosio se na razlučivanje odabranih polifenola, $R_s < 2$.

Tablica 12. Utjecaj kromatografskih uvjeta na razlučivanje polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) metodom RP-HPLC-PDA

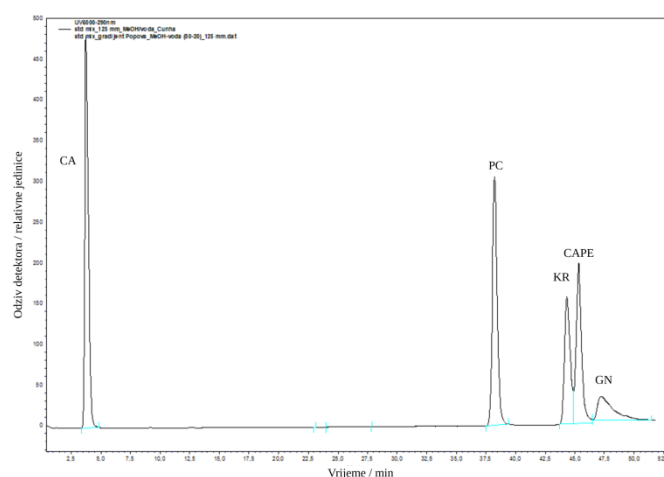
Kolona	Dimenzije	Br. mod.	Pokretna faza (A:B) [#]	A:B eluiranje (V/V)	Razlučivanje, R_s				
					CA	PC	KR	CAPE	GN
Phenomenex Lichrospher C ₁₈	250 x 4,6 mm; 5 μm	1.	5 % FK : ACN	gradijent*	0,6	0,3	1,1	-	0,9
Phenomenex Lichrospher RP-18e	125 x 4 mm; 5 μm	2.	5 % FK : ACN	gradijent*	2,8	-	2,1	0,2	0,4
		3.	5 % FK : M	35: 65; izokratno	0,9	0,8	2,7	1,6	1,7
		4.	0,1 % FK : M	35: 65; izokratno	0,9	-	1,4	-	-
Supelco Chromolith Performance RP-18e	100 x 4,6 mm; 2 μm	5.	0,1 % FK : M	35: 65; izokratno	2,2	1,5	1,3	0,7	1,1
		6.	V : M : FK**	izokratno	4,6	1,1	0,8	0,4	1,1
Agilent Zorbax Eclipse Plus C ₁₈	150 x 4,6 mm; 3,5 μm	7.	V : M : FK**	izokratno	1,3	1,4	4,4	4,4	3,6

voda (V); acetonitril (ACN); metanol (M); formijatna kiselina (FK); broj modifikacije (Br. mod.)

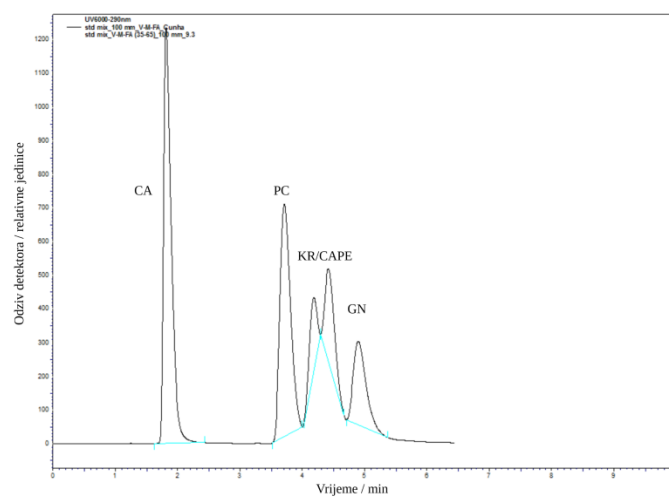
* 0–3 min 10–15 % B; 3–18 min 15–40 % B; 18–24 min 40 % B; 24–27 min 40–66 % B; 27–33 min 66–70 % B; 33–40 min 70–75 % B; 40–45 min 75–80 % B.

** A (93 V : 5 M : 2 FK) : B (3 V : 95 M : 2 FK) = 35 : 65

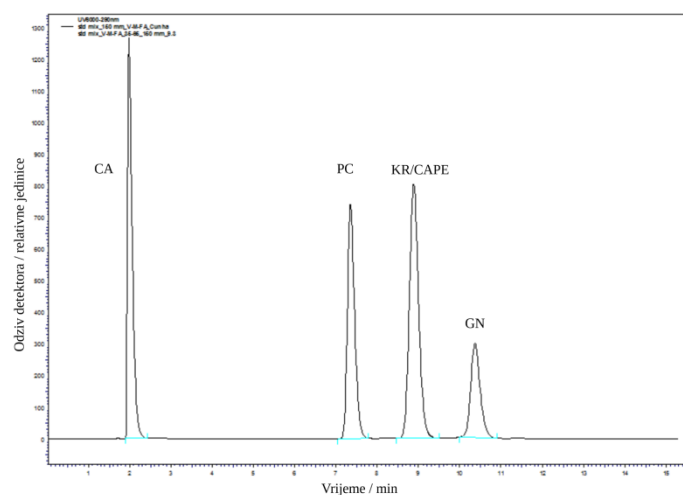
A)



B)



C)



Slika 11. Kromatogram otopine smjese standarda polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) masene koncentracije $\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ analizirane metodom RP-HPLC-PDA na valnoj duljini $\lambda = 290 \text{ nm}$ primjenom: **A)** 3. kombinacije, **B)** 6. kombinacije i **C)** 7. kombinacije kromatografskih uvjeta

Tablica 13. Kritični kromatografski parametri dodatne modifikacije 7. kombinacije kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA

Parametar	Polifenol	Kombinacija pokretne faze [#]			
		7.1. *	7.2. **	7.3. ***	7.4. ****
Vrijeme zadržavanja, t_R (min)	CA	2,2	2,2	2,2	2,3
	PC	17,3	18,2	17,4	20,7
	KR	22,0	23,2	22,4	26,5
	CAPE	24,8	26,1	25,1	30,0
	GN	27,4	28,7	27,6	33,0
Faktor simetrije, A_s	CA	2,2	1,9	1,8	1,6
	PC	1,2	1,3	1,3	1,1
	KR	1,2	1,2	1,2	1,1
	CAPE	1,1	1,2	1,2	1,1
	GN	1,1	1,3	1,2	1,1
Broj teoretskih tavana, N	CA	1074	1063	2322	9490
	PC	10222	8407	8875	17399
	KR	11663	8856	9200	17954
	CAPE	11664	9134	9120	17111
	GN	11995	8401	8158	17862
Razlučivanje, R_s	CA	-	-	-	-
	PC	32,2	29,9	32,9	50,9
	KR	6,1	5,6	6,0	8,2
	CAPE	3,2	2,8	2,7	4,1
	GN	2,5	2,2	2,2	3,1
Površina, P	CA	2283176	2223461	2030902	2985441
	PC	2240237	1929508	1400287	2898697
	KR	1617671	672484	313735	944844
	CAPE	1191903	1236381	680776	719953
	GN	1092853	842275	260208	1390170
Faktor zadržavanja, k	CA	0,5	0,5	0,5	0,5
	PC	9,8	11,2	10,6	10,7
	KR	12,5	14,5	13,9	14,1
	CAPE	14,3	16,4	15,7	15,5
	GN	15,7	18,1	17,4	17,4

ψ = voda (V) : metanol (M) : formijatna kiselina (FK)

* A (93 V : 5 M : 2 FK) : B (3 V : 95 M : 2 FK) = 45 : 55

** A (96,5 V : 2,5 M : 1 FK) : B (98 V : 2 M) = 45 : 55

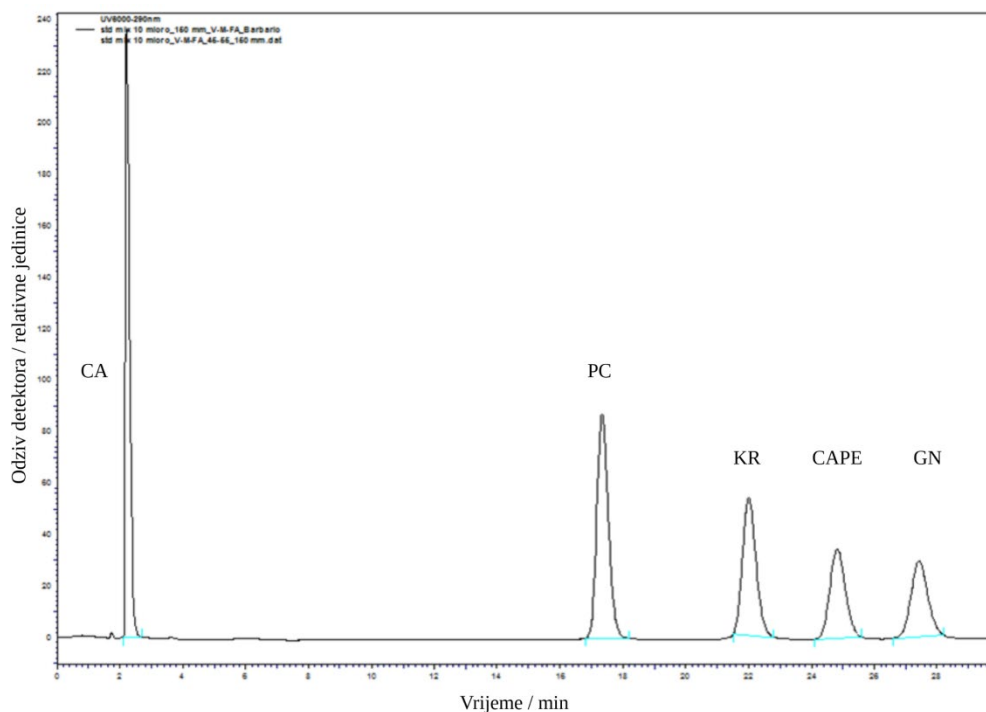
*** A (97 V : 2 M : 1 FK) : B (98 M : 2 V) = 45 : 55

**** A (97 V : 2 M : 1 FK) : B (100 M) = 45 : 55

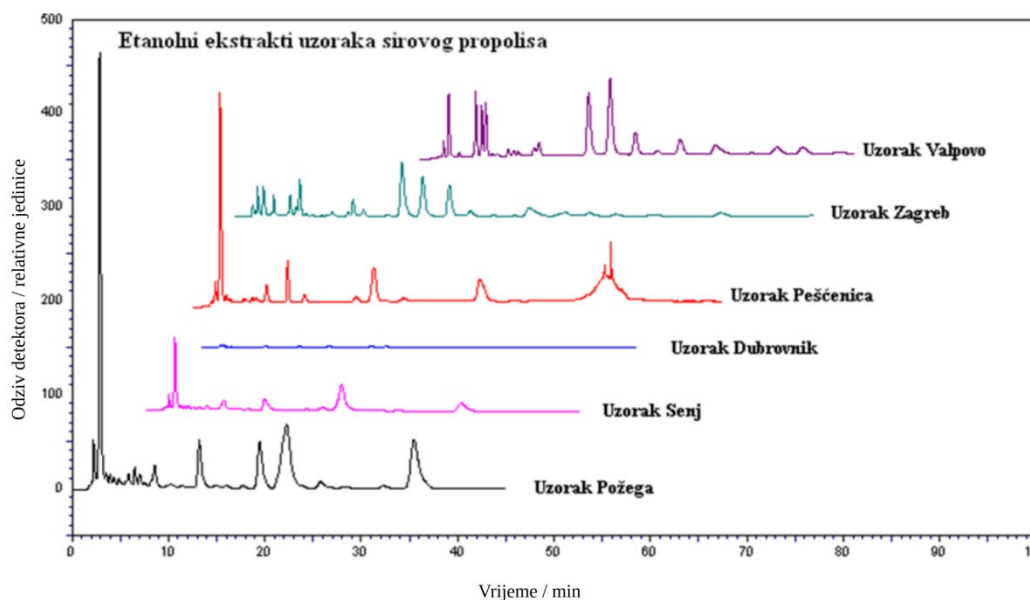
Temeljem dobivenih rezultata optimizacije za istraživanja odabranih polifenolnih sastavnica propolisa u uvjetima simulacije GID-a *in vitro* odabrana je 7.4. kombinacija kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA (Tablica 13 i Slika 12) koja je podvrgnuta daljnjem procesu

ispitivanja prikladnosti analitičkog postupka, validaciji. Navedenom metodom potvrđeni su profili uzoraka sirovih propolisa navedenih u Tablici 11.

A)



B)



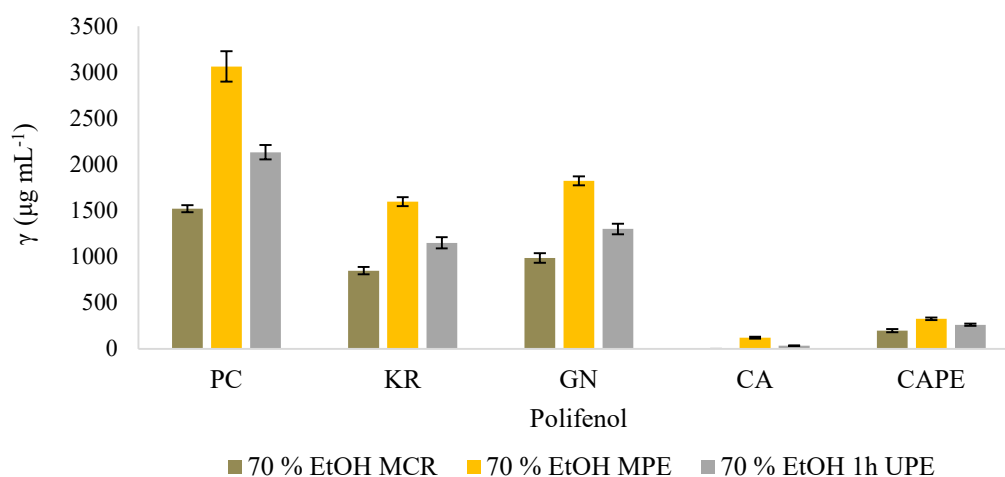
Slika 12. Kromatogrami dobiveni primjenom 7.4. kombinacije kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA [A (97 V : 2 M : 1 FK) : B (100 M) = 45 : 55] na $\lambda = 290$ nm: **A)** otopine smjese standarda polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) masene koncentracije ($\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) i **B)** etanolnih ekstrakata uzoraka sirovog propolisa s područja Republike Hrvatske

4.3. Priprava i analiza uzoraka propolisa

Optimizacija pripreme uzorka propolisa provedena je na uzorku propolisa Vlp u sklopu eksperimentalnih validacijskih pokusa metodom RP-HPLC-PDA pri definiranim kromatografskim uvjetima određivanja preciznosti metode.

4.3.1. Ekstrakcijske tehnike

U pripravi otopina uzoraka propolisa za analizu korištene su MCR, MPE i UPE ekstrakcijske tehnike. Vrijeme potrebno za provođenje MCR ekstrakcije uzorka propolisa u 70 %-tnom etanolu je znatno dulje u odnosu na tehnike UPE i MPE (Slika 14). Rezultati dobiveni tehnikom MPE ukazuju da je ta tehnika učinkovitija u odnosu na UPE i MCR, ali se u praksi pokazala vrlo nepraktičnom jer pri ekstrakciji uzoraka duljoj od 10 s dolazi do pregrijavanja otopine uzorka, dok prilikom provođenja UPE nije primijećeno zagrijavanje otopine. Tekućinskokromatografskom analizom uzoraka propolisa obrađenog tehnikom MCR kvantificirani su svi polifenoli osim CA jer rezultat izlazi iz radnog područja metode.



Slika 13. Koncentracije polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u EEP pripravljenim tehnikama MCR, MPE i UPE. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. MCR – maceracija; UPE – ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; MPE – mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija; EtOH – etanol; PEG 400 – polietilenglikol 400.

Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog (KW) neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

Dobivene koncentracije odabranih polifenola primjenom tehnika UPE, MPE i MCR ekstrakcije obrađene su Dunnovim *post-hoc* statističkim testom kojim je potvrđeno da one u 70%-tnom etanolu nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Temeljem dobivenih rezultata UPE je izabrana za provođenje daljnjih eksperimentalnih pokusa pripreve uzorka primjenom 40 %, 80 % i 90 % etanola te 20 % i 40 % PEG 400 (Tablica 14). Zbog viskozne i nehlapljive prirode PEG-a, ove ekstrakte nije bilo moguće uparavati te su analizirani direktno, bez prethodnog uparavanja.

Tablica 14. Koncentracija odabranih polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u etanolnim (EtOH) i PEG 400 ekstraktima dobivenim ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (UPE)

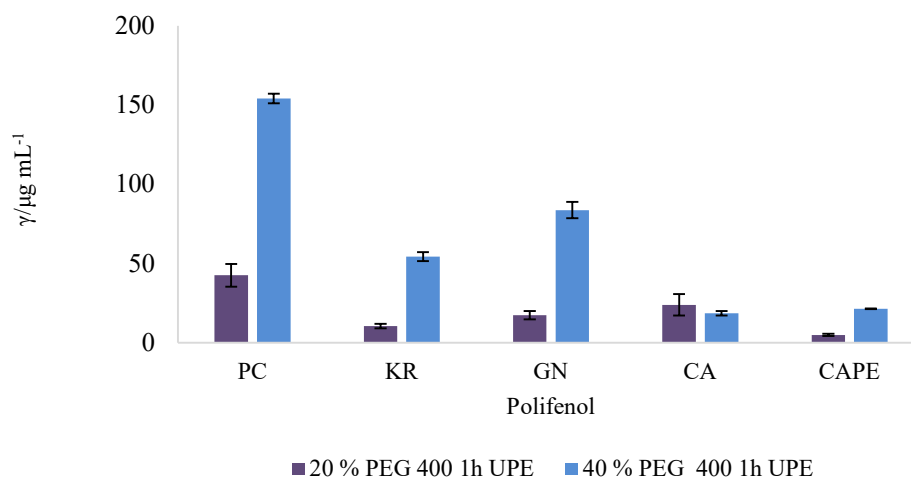
Ekstrakt	Masena koncentracija polifenola ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
40 %-tni EtOH	9,3 \pm 13,6	2,7 \pm 22,4	4,86 \pm 5,6	8,27 \pm 15,3	1,29 \pm 13,0
70 %-tni EtOH					
nakon 1 h	2132,7 \pm 3,7	1150,5 \pm 5,2	1300,6 \pm 4,4	34,2 \pm 11,2	261,5 \pm 4,8
nakon 2 h	2135,4 \pm 1,9	1166,6 \pm 2,2	1296,4 \pm 2,1	31,7 \pm 14,5	260,9 \pm 1,2
80 %-tni EtOH	1950,0 \pm 4,3	1072,6 \pm 4,5	1204,3 \pm 3,5	15,9 \pm 2,0	241,6 \pm 7,4
90 %-tni EtOH	1714,3 \pm 6,3	939,8 \pm 6,6	1061,1 \pm 4,3	- **	211,1 \pm 4,1
20 %-tni PEG 400	42,5 \pm 17,0	10,5 \pm 13,8	17,4 \pm 14,9	23,9 \pm 28,0	4,9 \pm 12,8
40 %-tni PEG 400	154,1 \pm 1,9	54,4 \pm 5,3	83,6 \pm 6,2	18,6 \pm 7,9	21,4 \pm 1,1

* Srednja vrijednost masene koncentracije \pm %RSD

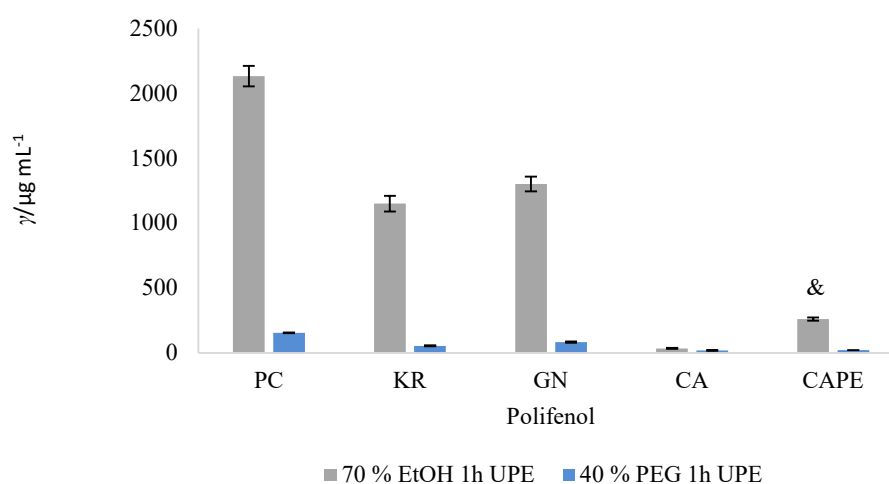
** Analiza nije provedena zbog koeluiranja sastavnica iz ekstrakta.
RSD – relativna standardna devijacija

Na Slici 14 A) prikazani su rezultati odabranih polifenola dobiveni primjenom UPE u ekstraktima s 20 % i 40 % PEG 400. Razlike u koncentracijama svih polifenola dobivene ovim načinima pripreve ekstrakata nisu statistički značajne (Dunnov *post-hoc* test; $p > 0,05$). Međutim, uočene su znatno niže koncentracije polifenola u 40 % PEG 400 ekstraktima u odnosu na 70 %-tne etanolne ekstrakte (Slika 14 B), što je i statistički potvrđeno za KR, GN i CAPE polifenole (Dunnov *post-hoc* test; $p < 0,05$).

A)



B)



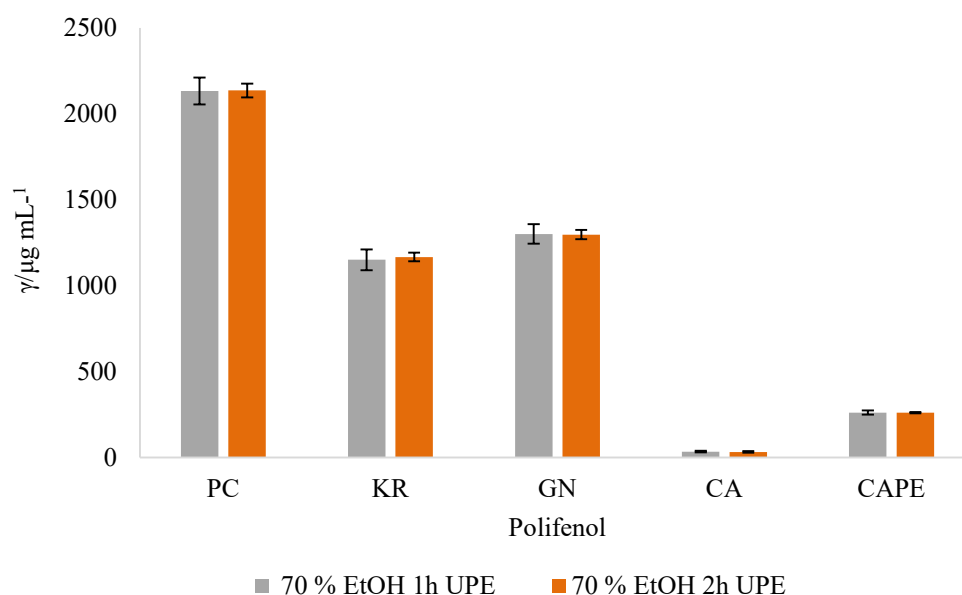
Slika 14. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u ekstraktima propolisa pripremljenim tehnikom UPE primjenom: **A)** 20 % i 40 % PEG-a 400 i **B)** 70 % etanola i 40% PEG-a 400. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. UPE – Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; EtOH – etanol; PEG 400 – polietilenglikol 400.

Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

& – statistički značajno veća koncentracija CAPE u 70 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 40 %-tni PEG 400 ekstrakt tijekom 1 sata UPE

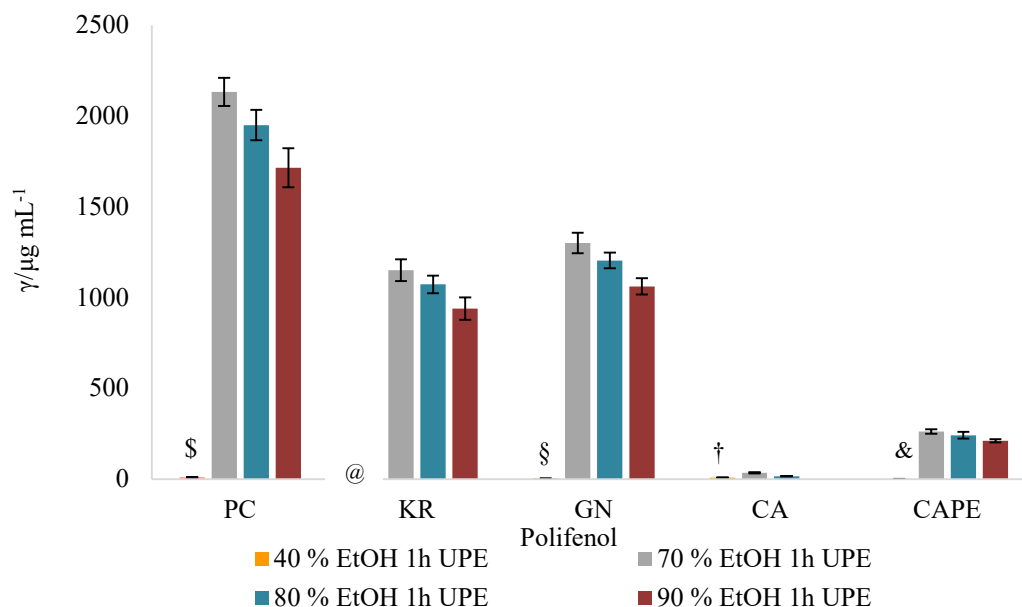
Radi utvrđivanja utjecaja duljine trajanja UPE na koncentracije analita, ispitana je UPE 70 %-tnih etanolnih uzoraka propolisa provedena tijekom 1 i 2 sata na sobnoj temperaturi, a razlike u koncentracijama odabranih polifenola prikazane su na Slici 15. Dobivene koncentracije nisu bile statistički značajne (Dunnov *post-hoc* test; $p > 0,05$). Rezultat ukazuje da UPE provedena tijekom 2 sata ne utječe na prinos ekstrakcije te je u daljnjoj pripravi ekstrakata korištena UPE koja se provodi 1 sat.

Dodatni pokusi UPE u uvjetima 1 h/sobna temperatura provedeni na ekstraktima sa 40 %, 70 %, 80 % i 90 % udjelom etanola ukazuju da se udjelom etanola nižim od 70 % znatno smanji njegova ekstrakcijska snaga (Slika 16). Obradom podataka Dunnovim *post-hoc* statističkim testom je i potvrđeno da je 40 % etanolni ekstrakt za sve polifenole statistički značajan ($p < 0,05$) u odnosu na ekstrakte ostalih udjela etanola.



Slika 15. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima propolisa (EEP) pripremljenih tehnikom UPE tijekom 1 i 2 sata na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. UPE – Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; EtOH – etanol. Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati pokusa dokazali su da je najučinkovitiji postupak pripreve uzoraka sirovog propolisa primjena 70 % etanola/UPE/1 h/sobna temperatura (Tablica 14 i Slika 16). Tim se postupkom nastavila daljnja optimizacija pripreve uzorka propolisa.



Slika 16. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u etanolnim ekstraktima propolisa (EEP) tijekom 1 sata UPE na sobnoj temperaturi. Koncentracija polifenola CA nije određena u 90 % EtOH ekstraktu zbog koeluiranja sastavnica iz ekstrakta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. UPE – Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; EtOH – etanol;

Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

\$ – statistički značajno niža koncentracija PC u 40 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 70, 80 i 90 %-tni EtOH ekstrakt; @ – statistički značajno niža koncentracija KR u 40 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 70, 80 i 90 %-tni EtOH ekstrakt; § – statistički značajno niža koncentracija GN u 40 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 70, 80 i 90 %-tni EtOH ekstrakt; † – statistički značajno niža koncentracija CA u 40 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 70, 80 i 90 %-tni EtOH ekstrakt; & – statistički značajno niža koncentracija CAPE u 40 %-tnom EtOH ekstraktu u odnosu na 70, 80 i 90 %-tni EtOH ekstrakt

4.3.2. Optimizacija priprave kompleksa propolisa liofilizacijom

Postupak sušenja zamrzavanjem, liofilizacija, je tehnika primijenjena kako bi se iz ekstrahiranih uzoraka propolisa dobio u vodi topljivi prašak. Uzorcima 70 %, 80 % i 90 % etanolnih ekstrakata propolisa uparavanjem je uklonjen etanol, a potom su obrađeni liofilizacijom (Slika 18). Dobiveni su smolasti produkti, slabo topljivi u vodi, a analize HPLC vodenih otopina tih produkata potvrdile su smanjene prinose svih polifenola osim CA (Tablica 15, Slika 18). Dunnovim *post-hoc* testom dokazana je statistički značajna razlika za CA polifenol u 70 %-tnim etanolnom ekstraktu u odnosu na 90 %-tni ekstrakt ($p < 0,05$).

Kako bi se ispitaio utjecaj UPE na poboljšanje topljivosti sastavnica, u smolasti produkt dobiven uparavanjem etanola dodana je voda, uzorak je podvrgnut UPE tijekom 2 sata, a nakon toga liofiliziran. No, iako su koncentracije odabranih polifenola bile veće nego u pripravku koji nije bio podvrgnut UPE, pripravak je i dalje slabo topljiv u vodi (Tablica 17).

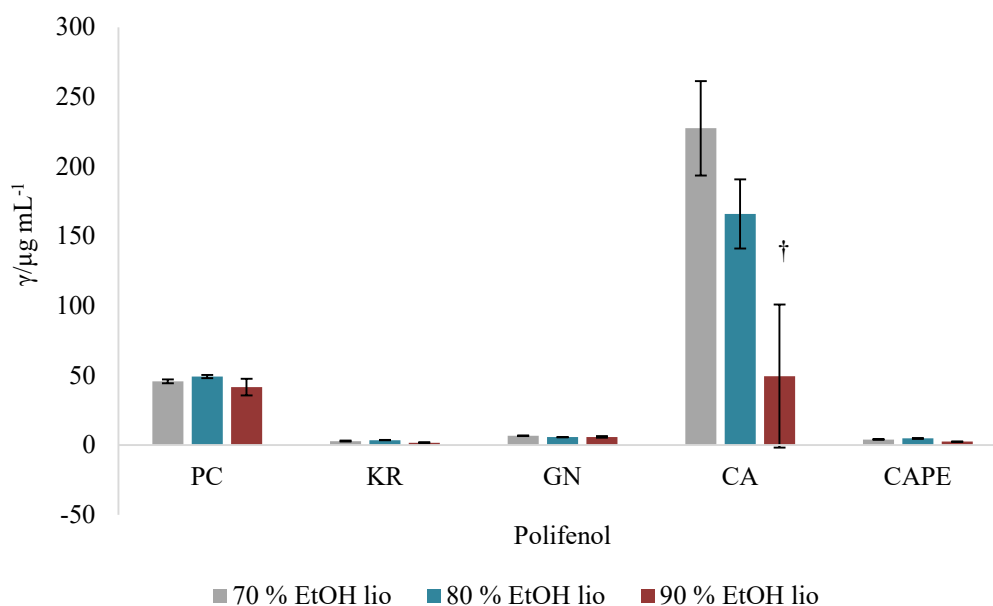


Slika 17. Liofilizirani uzorci kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) (vlastita fotografija)

Tablica 15. Koncentracije polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u liofiliziranim osušcima etanolnog ekstrakta propolisa (EEP) bez nosača

Ekstrakt	Masena koncentracija polifenola ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
70 %-tni EtOH	45,8 \pm 3,0	2,9 \pm 11,7	6,8 \pm 2,7	227,4 \pm 14,9	4,1 \pm 2,7
80 %-tni EtOH	49,3 \pm 2,4	3,6 \pm 4,1	5,7 \pm 1,7	165,9 \pm 15,0	4,8 \pm 2,9
90 %-tni EtOH	41,8 \pm 14,3	1,7 \pm 21,2	5,9 \pm 9,3	49,6 \pm 103,5	2,5 \pm 2,7

* Srednja vrijednost masene koncentracije \pm %RSD
EtOH – etanol; RSD – relativna standardna devijacija



Slika 18. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u liofiliziranim etanolnim ekstraktima uzoraka bez nosača. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$. EtOH – Etanol; lio – liofilizirani osušak.

Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$. † – statistički značajno niža koncentracija CA u liofiliziranom osušku 90 %-tnog EtOH ekstrakta u odnosu na liofilizirani osušak 70 %-tnog EtOH ekstrakta

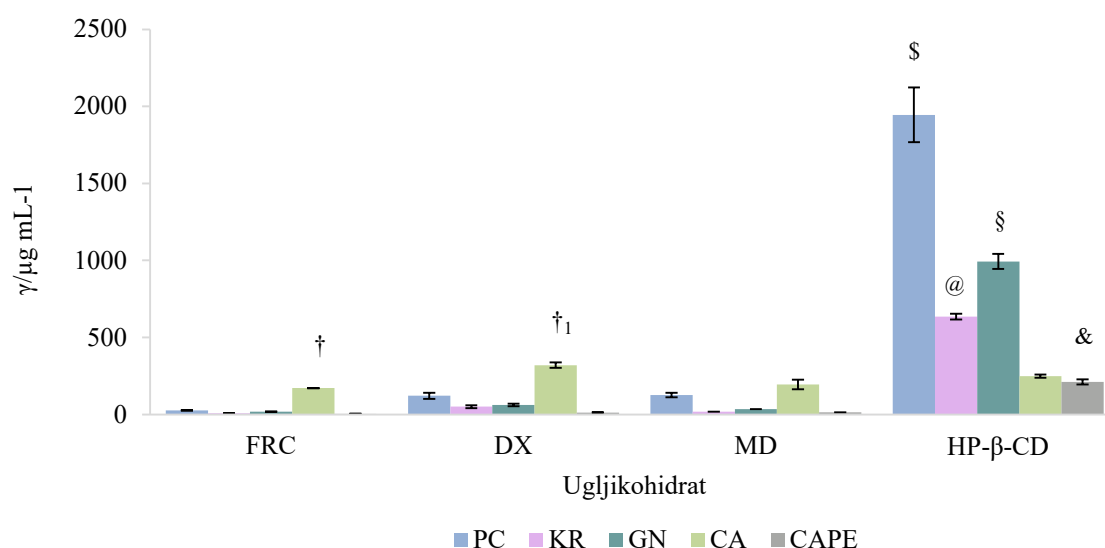
Temeljem dosadašnjih ispitivanja i spoznaja, ^{18,112,115,117} odabrani su nosači L-lizin i ugljikohidrati (fruktoza, dekstroza, maltodekstrin i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin) kao sredstva za poboljšanje topljivosti slabo polarnih molekula polifenola. Prvi pripremljen kompleks bio je kompleks EEP-a i aminokiseline L-lizin, a potom je slijedila primjena ugljikohidrata kao nosača u kompleksima EEP-a (Tablica 16; Slika 19). Liofilizat kompleksa EEP-a i HP- β -CD jedini je osušak koji je vizualno u potpunosti resuspendibilan u vodi, dok se kod ostalih liofiliziranih osušaka suspendiranih u vodi ponovno pojavljuje netopljivi smolasti produkt. Na Slici 17 prikazani su uzorci EEP-a i HP- β -CD-a dobiveni postupkom liofilizacije.

Tablica 16. Koncentracije polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u kompleksima etanolnog ekstrakta propolisa s nosačima L-lizinom (L-Lys) i ugljikohidratima fruktozom (FRC), dekstrozom (DX), maltodekstrinom (MD) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD)

Nosač	Masena koncentracija polifenola ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
L-Lys	452,9 \pm 22,2	1212,7 \pm 14,4	716,4 \pm 29,5	104,6 \pm 44,8	203,5 \pm 15,7
FRC	25,4 \pm 9,1	7,0 \pm 14,6	17,7 \pm 8,8	170,8 \pm 1,0	4,2 \pm 5,4
DX	120,8 \pm 16,8	50,2 \pm 20,0	61,9 \pm 12+3,0	319,3 \pm 5,5	12,1 \pm 11,9
MD	125,9 \pm 11,9	18,2 \pm 0,3	34,3 \pm 1,05	194,8 \pm 16,1	13,2 \pm 3,4
HP- β -CD**	1945,2 \pm 9,1	635,4 \pm 2,9	993,1 \pm 5,0	248,1 \pm 3,9	211,6 \pm 8,0

* Srednja vrijednost masene koncentracije \pm %RSD, $n = 3$; RSD – relativna standardna devijacija

** HP- β -CD koncentracije 20 mg mL⁻¹.



Slika 19. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u liofiliziranim osušcima etanolnog ekstrakta propolisa s ugljikohidratima kao nosačima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. FRC – Fruktoza; DX – Dekstroza; MD – Maltodekstrin; HP- β -CD – 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin;

Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

† – statistički značajno niža koncentracija CA u kompleksu s FRC u odnosu na kompleks s DX i HP- β -CD; †₁ – statistički značajno veća koncentracija CA u kompleksu s DX u odnosu na kompleks s MD; & – statistički značajno veća koncentracija CAPE u kompleksu s HP- β -CD-om u odnosu na komplekse s FRC i MD; § – statistički značajno veća koncentracija GN u kompleksu s HP- β -CD u odnosu na kompleks s FRC; @ – statistički značajno veća koncentracija KR u kompleksu s HP- β -CD u odnosu na kompleks s FRC; \$ – statistički značajno veća koncentracija PC u kompleksu s HP- β -CD u odnosu na komplekse s FRC, DX i MD.

Posebnost svakog nosača vidljiva je iz razlike u koncentraciji pojedinih polifenola (Tablica 16, Slika 19). Naime, koncentracija KR bila je dvostruko veća u kompleksu s L-Lys u odnosu na koncentraciju u kompleksu s HP- β -CD-om, dok je koncentracija PC pet puta manja s L-Lys u odnosu na HP- β -CD. Iako su u kompleksu s L-Lys dobivene značajno veće koncentracije polifenola nego s ostalim nosačima, ovaj kompleks nije uključen u daljnje istraživanje jer je njegova priprava pokazala velike %RSD vrijednosti za sve analite. Analiza rezultata navedenih kompleksa ukazuje na to da HP- β -CD u odnosu na ostale ugljikohidrate, najučinkovitije inkapsulira polifenole iz ekstrakta propolisa (Slika 19). Koncentracije PC, KR, GN i CAPE polifenola bile su znatno veće nego u ostalim kompleksima, izuzev CA, čija koncentracija u svim analiziranim kompleksima ne pokazuje značajnije odstupanje osim u odnosu L-Lys s DX. Najniža koncentracija CA izmjerena u propolisu Vlp iznosila je $170,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ kada je nosač bila fruktoza, a najviša $5224,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ u uzorku bez nosača.

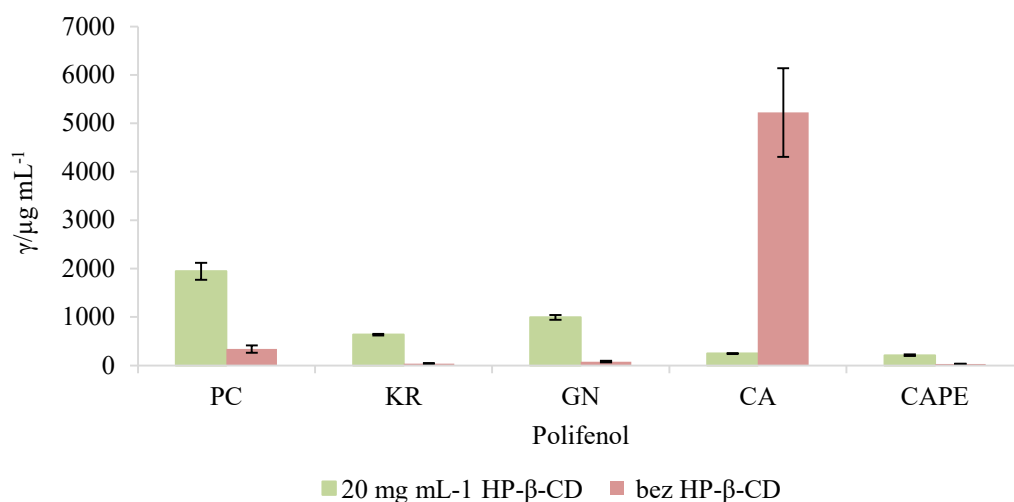
Razlike u koncentracijama polifenola inkapsuliranih s različitim ugljikohidratima su i statistički potvrđene Dunnovim *post-hoc* testom te se statističke značajnosti ($p < 0,05$) odnose za: CA – FRC u odnosu s DX i HP- β -CD te DX u odnosu s MD; CAPE – HP- β -CD u odnosu na FRC i MD; GN – FRC u odnosu na HP- β -CD; KR – FRC u odnosu na HP- β -CD; PC – FRC, DX i MD u odnosu na HP- β -CD.

Odnosi koncentracija polifenola u kompleksu EEP-a s HP- β -CD-om i u vodenom pripravku bez HP- β -CD-a prikazani su rezultatima u Tablici 17 i Slikom 20. Inkapsulacijom dolazi do znatnog povećanja koncentracija PC, KR, GN i CAPE, dok je koncentracija CA u pripravku bez nosača višestruko veća u odnosu na kompleks.

Tablica 17. Topljivost polifenola u kompleksu etanolnog ekstrakta propolisa (EEP) s dodatkom 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) i u vodenom pripravku bez dodatka HP- β -CD-a

Polifenol	Masena koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *		Stupanj povećanja topljivosti
	otopine kompleksa	vodenog pripravka	
PC	1945,2 \pm 9,1	340,5 \pm 22,2	6
KR	635,4 \pm 2,9	35,2 \pm 33,7	18
GN	993,1 \pm 5,0	78,8 \pm 20,9	13
CA	248,1 \pm 3,9	5224,7 \pm 17,5	0,1
CAPE	211,6 \pm 8,0	29,3 \pm 15,3	7

* Srednja vrijednost masene koncentracije \pm SD
SD – standardna devijacija



Slika 20. Odnos koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u kompleksu etanolnog ekstrakta propolisa s i bez nosača 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) tijekom 2 h ultrazvukom potpomognute ekstrakcije.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$. Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

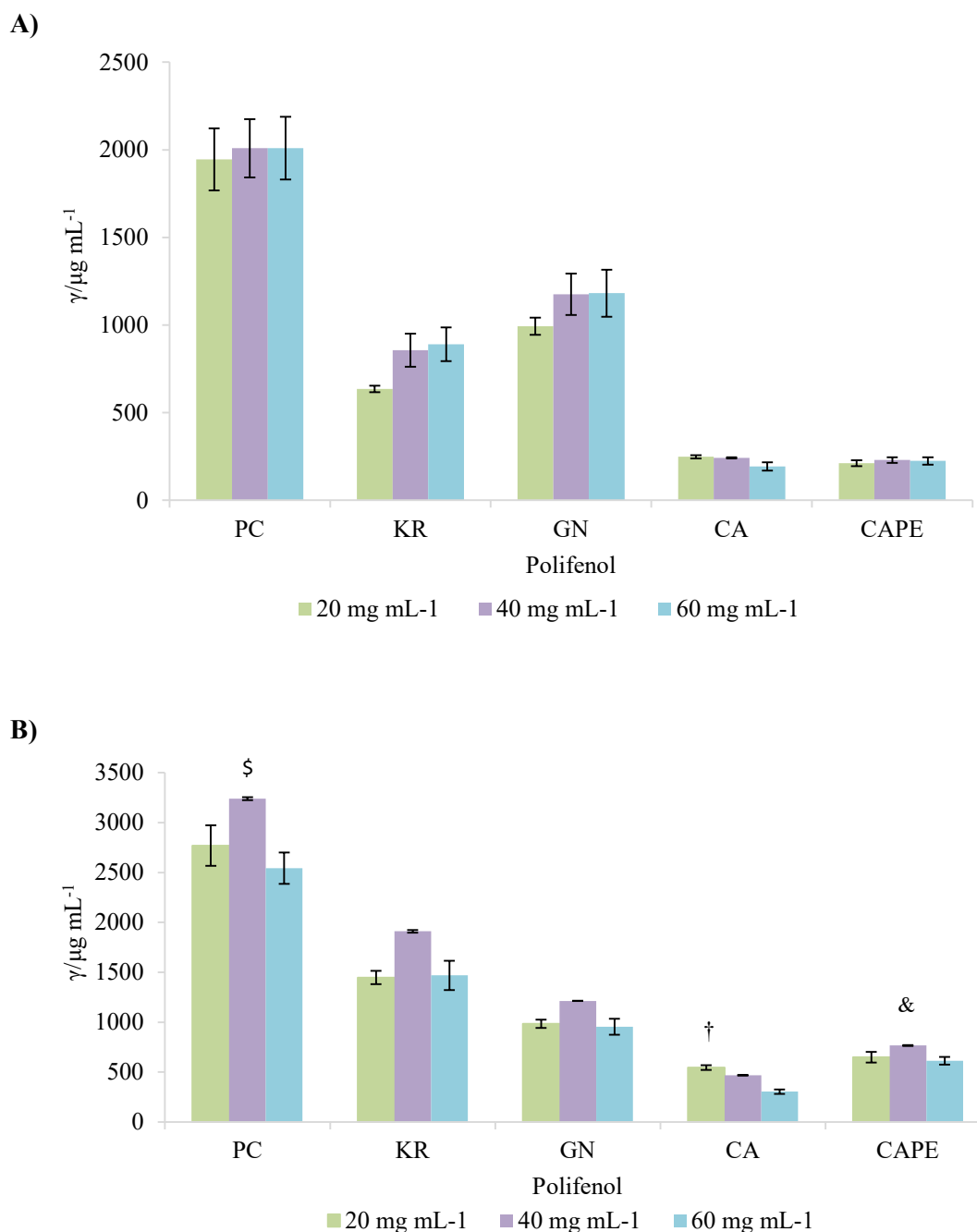
Rezultati prikazani u Tablici 18 te na Slici 21 prikazuju utjecaj količine dodanog HP- β -CD na koncentraciju PC, KR, GN, CA i CAPE.

Tablica 18. Ovisnost koncentracije polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) o koncentraciji dodanog 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) u kompleksu etanolnog ekstrakta propolisa uzorka Valpovo (Vlp), odnosno Zagreb (Zg) i HP- β -CD-a nakon 2 sata ultrazvukom potpomognute ekstrakcije

γ (HP- β -CD) (mg mL ⁻¹)	Masena koncentracija polifenola (μ g mL ⁻¹) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
Vlp propolis					
20	1945,2 \pm 9,1	635,4 \pm 2,9	993,1 \pm 5,0	248,1 \pm 3,9	211,6 \pm 8,0
40	2008,7 \pm 8,3	856,4 \pm 11,1	1175,6 \pm 10,1	242,4 \pm 1,3	229,4 \pm 7,2
60	2009,5 \pm 9,9	890,1 \pm 10,8	1181,5 \pm 11,3	192,8 \pm 12,5	224,7 \pm 9,4
Zg propolis					
20	2769,7 \pm 7,3 [†]	1447,1 \pm 4,6 [†]	984,3 \pm 4,3	545,1 \pm 4,4 [†]	648,9 \pm 8,1 [†]
40	3239,9 \pm 0,5 [†]	1911,0 \pm 0,7 [†]	1213,4 \pm 0,1	468,4 \pm 0,4 [†]	767,1 \pm 0,6 [†]
60	2542,3 \pm 6,2 [†]	1468,9 \pm 9,9 [†]	954,3 \pm 8,4 [†]	303,7 \pm 7,7 [†]	613,4 \pm 6,4 [†]

* Srednja vrijednost masene koncentracije γ (μ g mL⁻¹) \pm %RSD; RSD –relativna standardna devijacija
[†] - statistički značajno veća koncentracija polifenola u kompleksu Zg propolisa u odnosu na istu koncentraciju polifenola u kompleksu Vlp propolisa, Mann-Whitneyev test, $p < 0,05$

Razlike u koncentracijama za PC, KR, GN i CAPE između uzoraka Vlp i Zg propolisa pokazuju da primjena 20, 40 i 60 mg mL⁻¹ vodene otopine HP- β -CD-a nije statistički značajna (Tablica 18); Mann-Whitneyev test, $p > 0,05$. Iznimka je razlika između koncentracija CA dobivena korištenjem 40 i 60 mg mL⁻¹ HP- β -CD-a za koju je Dunnovim *post-hoc* testom dobivena vrijednost $p = 0,047$ (Tablica 18, Slika 21 B). U uzorku propolisa Zg najviše koncentracije dobivene su s 40 mg mL⁻¹ HP- β -CD-a, dok dodatkom 60 mg mL⁻¹ HP- β -CD-a koncentracija neznatno pada ili je vrlo slična kompleksu s 20 mg mL⁻¹ HP- β -CD-a.

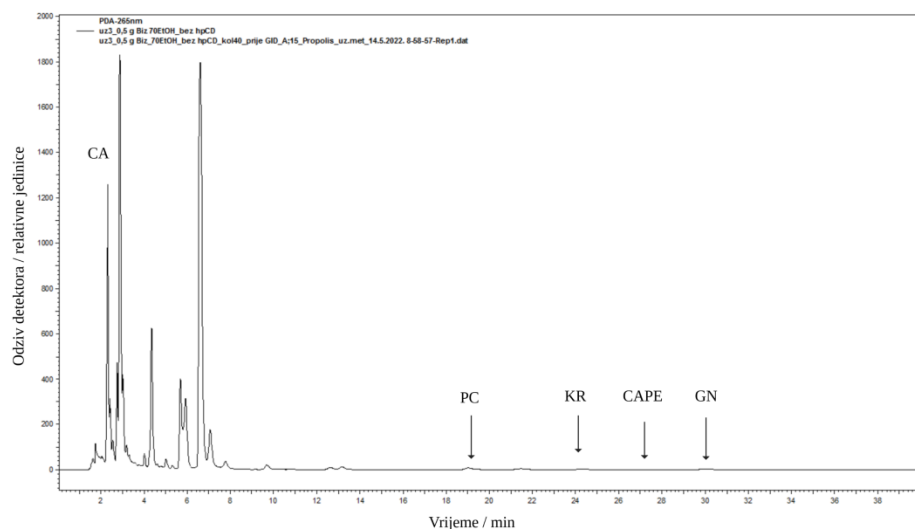


Slika 21. Ovisnost kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) o koncentraciji nosača HP- β -CD u uzorku propolisa: **A)** Valpovo (Vlp) i **B)** Zagreb (Zg). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD, $n = 3$.

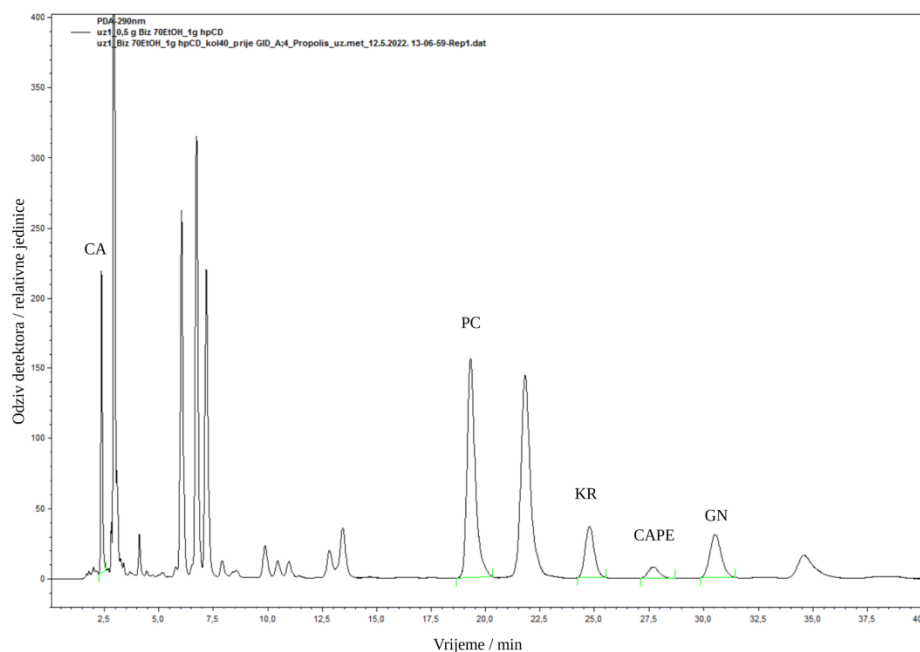
Statistička obrada podataka provedena je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$. U kompleksu propolisa Vlp nije bilo statistički značajnih razlika s obzirom na koncentraciju nosača HP- β -CD-a.

\$ – statistički značajno veća koncentracija PC u kompleksu s nosačem koncentracije 40 mg mL⁻¹ u odnosu na 60 mg mL⁻¹; # – statistički značajno veća koncentracija CA u kompleksu s nosačem koncentracije 20 mg mL⁻¹ u odnosu na 60 mg mL⁻¹; & – statistički značajno veća koncentracija CAPE u kompleksu s nosačem koncentracije 40 mg mL⁻¹ u odnosu na 60 mg mL⁻¹ CAPE

A)



B)



Slika 22. RP-HPLC-PDA kromatogram propolisa Valpovo (Vlp) u obliku: **A)** vodenog pripravka propolisa bez 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a); **B)** kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Vlp i HP- β -CD-a koncentracije 20 mg mL⁻¹. Kromatogram snimljen na valnoj duljini $\lambda = 290$ nm.

Analizama RP-HPLC-PDA ustanovljeno je da pripravak propolisa bez HP- β -CD-a sadržava znatno niže koncentracije analita polifenola nego u kompleksima s HP- β -CD-om (Slika 22 A).

Temeljem svih dobivenih rezultata izabrana je vrsta oralnog pripravka kojim će se provesti simulacija probave *in vitro*, a to je vodena suspenzija liofiliziranog osuška kompleksa etanolnog ekstrakta Vlp ili Zg propolisa i HP- β -CD koncentracije 20 mg mL⁻¹ (Slika 22 B).

4.4. Validacija metode RP-HPLC-PDA

Razvijena i optimizirana metoda validirana je u skladu sa zahtjevima smjernice Međunarodnog vijeća za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za humanu primjenu¹⁸⁸ te su pri tome upotrijebljeni uzorci propolisa Vlp, Zg i Dub odnosno njihove vodene suspenzije liofiliziranih osušaka kompleksa EEP-a i 20 mg mL⁻¹ HP-β-CD-a. Ispitani su sljedeći validacijski parametri: selektivnost, linearnost, osjetljivost, preciznost, točnost i robusnost.

Selektivnost metode RP-HPLC-PDA prikazana je reprezentativnim kromatogramima otapala, kompleksa EESS odabranih polifenola i HP-β-CD-a, kompleksa uzorka Dub i HP-β-CD-a bez ciljnih analita, kompleksa uzorka Dub i HP-β-CD-a obogaćenog analitima i kompleksa uzoraka Vlp i Zg s HP-β-CD-om (Slika 23.). Rezultati pokazuju da primijenjena kromatografska metoda ima dobru selektivnost za određivanje PC, KR, GN, CA i CAPE u uzorcima kompleksa EEP-a i HP-β-CD-a.

Srednja vrijednost površine svake krivulje eluiranja i koncentracija standarda odabranih polifenola primijenjene su za izradu kalibracijske krivulje i za određivanje linearnosti (Tablica 19; Slika 23 B). Određena je linearnost metode u rasponu nominalne koncentracije: PC (37 μg mL⁻¹) od 6,7 % do 233,3 %; KR (12 μg mL⁻¹) od 16,7 do 166,7 %; GN (20 μg mL⁻¹) od 20 do 200 %; CA (3 μg mL⁻¹) od 6,7 do 233,3 %; CAPE (4 μg mL⁻¹) od 10 do 300 %. Koeficijent korelacije u razvijenoj metodi iznosio je više od 0,99 za sve istraživane analite te je dobivena dobra korelacija među koncentracijama standarda polifenola. Osjetljivost metode izražena je određivanjem granice detekcije (GD) i granice određivanja (GO) za svaki analit, a rezultati prikazani u Tablici 19 pokazuju da je razvijena metoda HPLC osjetljiva za određivanje flavonoida i fenolnih sastavnica u uzorcima propolisa. Utjecaj matrice propolisa na linearnost testirana je analizom kalibracijskih otopina smjese standarda u uzorku kompleksa propolisa Dub i HP-β-CD-a. Rezultati pokazuju da matrica nije značajno utjecalana linearnost (Tablica 19).

Ponovljivost mjerenja utvrđena je određivanjem koncentracije smjese pojedinog standarda polifenola u pokrenoj fazi izračunom vrijednosti %RSD unutar jednog dana te tijekom više dana uzastopno, a dobivene vrijednosti bile su unutar zadanog kriterija (%RSD < 2). Ponovljivost metode provjerena je i ispitivanjem preciznosti metode određujući ponovljivosti pripreve uzorka propolisa Vlp odnosno srednju preciznost pripreve propolisa

Vlp s drugim proizvodnim serijama otapala. Utvrđeno je da se primjenom metode RP-HPLC-PDA na uzorcima kompleksa EEP i HP- β -CD postižu ponovljivi i precizni rezultati sa vrijednostima %RSD do 8,5 (Tablica 21).

Točnost metode RP-HPLC-PDA ispitana je određivanjem analitičkog povrata, a provedena je obogaćivanjem uzorka propolisa slijepe probe, odnosno uzorka Du propolisa (Slika 24) kojem je u postupku određivanja spektrofotometrijskog¹⁸³ i tekućinskromatografskog profila (Slika 24 A) utvrđeno da sadržava PC masene koncentracije 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Točnost metode izračunata je usporedbom uzorka slijepe probe cijepljenog određenom koncentracijom polifenola s poznatom (teorijskom) koncentracijom standarda polifenola i to na tri koncentracijske razine: GO, nominalnoj koncentraciji (NK) i koncentraciji višoj od 150 % NK navedenih u Tablici 22. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 14 ukazuju da su vrijednosti analitičkih povrata svih polifenola u rasponu od 80 do 110 % što zadovoljava zadani kriteriji prihvatljivosti točnosti metode. Osim validacijskih rezultata prikazani su i rezultati statističke obrade validacijskih pokazatelja metode koji zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti metode (Tablica 20).

Tablica 19. Prikaz linearnosti, osjetljivosti i utjecaja matrice kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Dubrovnik (Dub) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) u metodi RP-HPLC-PDA

Standard	Radno područje ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearnost*	GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Utjecaj matrice**
PC	2 – 70	$y = 108688x - 975,1$ $R^2 = 0,9999$	0,23	0,69	0,977
KR	2 – 20	$y = 80341x - 10111,5$ $R^2 = 0,9999$	0,10	0,32	0,987
GN	5 – 50	$y = 59477x - 55477$ $R^2 = 0,9998$	0,31	0,93	0,999
CA	2 – 70	$y = 103076x + 172530$ $R^2 = 0,9958$	1,84	5,58	0,999
CAPE	1 – 30	$y = 67299x - 15473$ $R^2 = 0,9998$	0,15	0,44	0,916

* jednadžba pravca i Pearson-ov koeficijent

** korelacijski koeficijent

GD – granica detekcije; GO – granica određivanja; PC – pinocembrin, KR – krizin, GN – galangin, CA – kavena kiselina, CAPE – feniletil ester kavene kiseline

Tablica 20. Rezultati statističke obrade validacijskih pokazatelja metode RP-HPLC-PDA za određivanje polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u kompleksu etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Valpovo (Vlp) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a)

Zahtjev	Metoda	Pokazatelj	Kriterij prihvatljivosti	Standard u kompleksu
Ponovljivost pripreve uzorka ($n = 6$)	Opisna statistika	% RSD	≤ 10	PC = 5,4 KR = 6,5 GN = 6,5 CA = 6,7 CAPE = 7,9
		$p_{\text{regresije}}$	$< 0,05$	PC = $1,3 \times 10^{-47}$ KR = $2,7 \times 10^{-44}$ GN = $1,7 \times 10^{-41}$ CA = $1,2 \times 10^{-27}$ CAPE = $1,3 \times 10^{-41}$
Kalibracija ($n = 16$)	Linearna regresija	$p_{\text{odsječka}}$	$> 0,05$	PC = 0,5 KR = 0,6 GN = 0,1 CA = 0,06 CAPE = 0,07
		Ekstremi	$\sigma < 3$	$\sigma < 3$
		% RSD	≤ 10	PC = 4,9 KR = 7,1 GN = 10,5 CA = 8,8 CAPE = 7,4
Stabilnost ($n = 3$)*	ANOVA	P_{30}	$> 0,05$	$> 0,05$

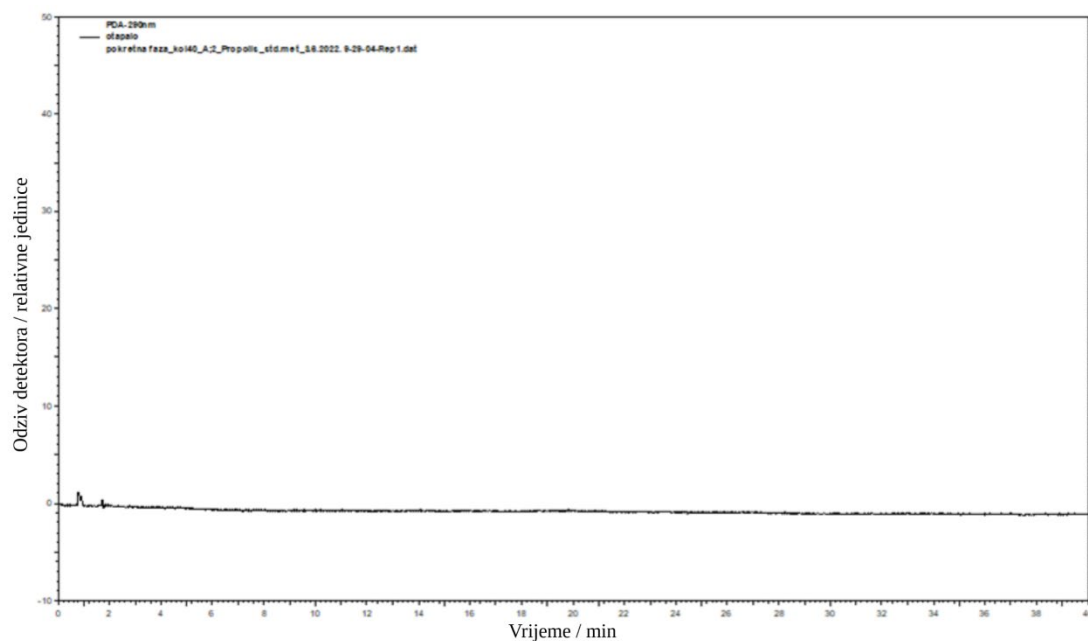
* stabilnost otopina smjese standarda nakon 30 dana u hladnjaku na temperaturi od 2 do 8 °C

Tablica 21. Preciznost metode RP-HPLC-PDA određena mjerenjem ponovljivosti pripreve: smjese standarda polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Valpovo (Vlp) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) unutar jednog dana i kompleksa EEP-a i HP- β -CD-a drugog dana

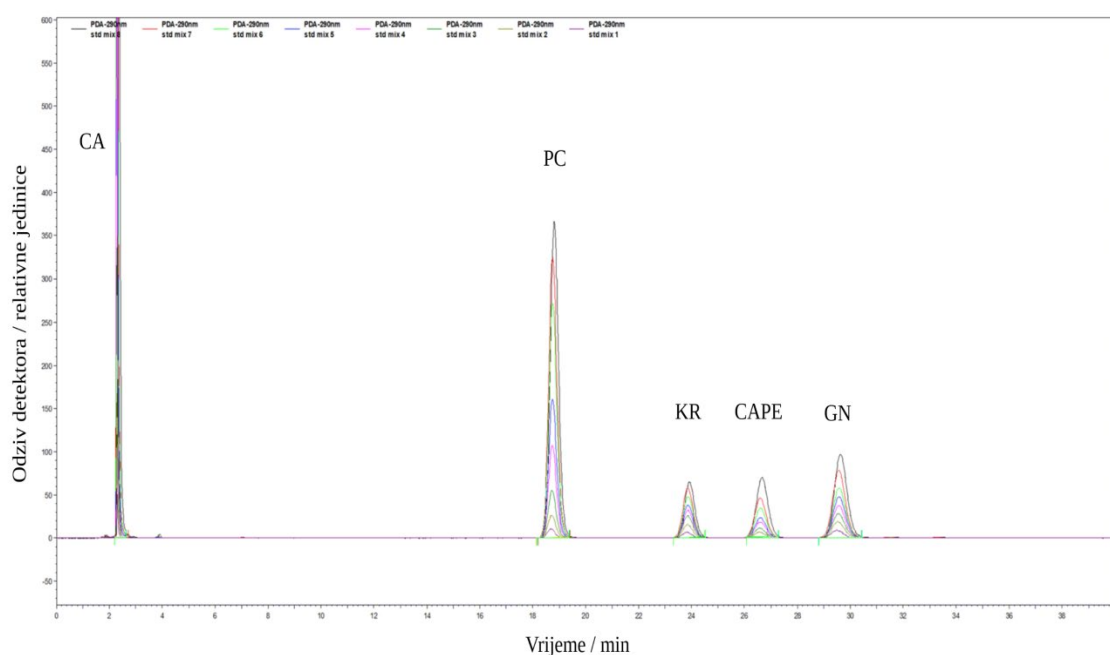
Polifenol	Ponovljivost metode ($n = 6$) *		Srednja preciznost metode ($n = 6$) *
	mjerenje standarda	priprava uzorka	
PC	$1808,7 \pm 1,0$	$1887,4 \pm 5,4$	$2112,0 \pm 4,4$
KR	$604,6 \pm 0,5$	$638,4 \pm 6,5$	$730,7 \pm 8,5$
GN	$944,1 \pm 1,0$	$1018,1 \pm 6,5$	$1133,7 \pm 5,9$
CA	$281,9 \pm 0,3$	$270,1 \pm 6,7$	$278,9 \pm 3,8$
CAPE	$197,7 \pm 3,2$	$220,0 \pm 8,0$	$242,0 \pm 1,9$

* srednja vrijednost masene koncentracije ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm %RSD; RSD – relativna standardna devijacija

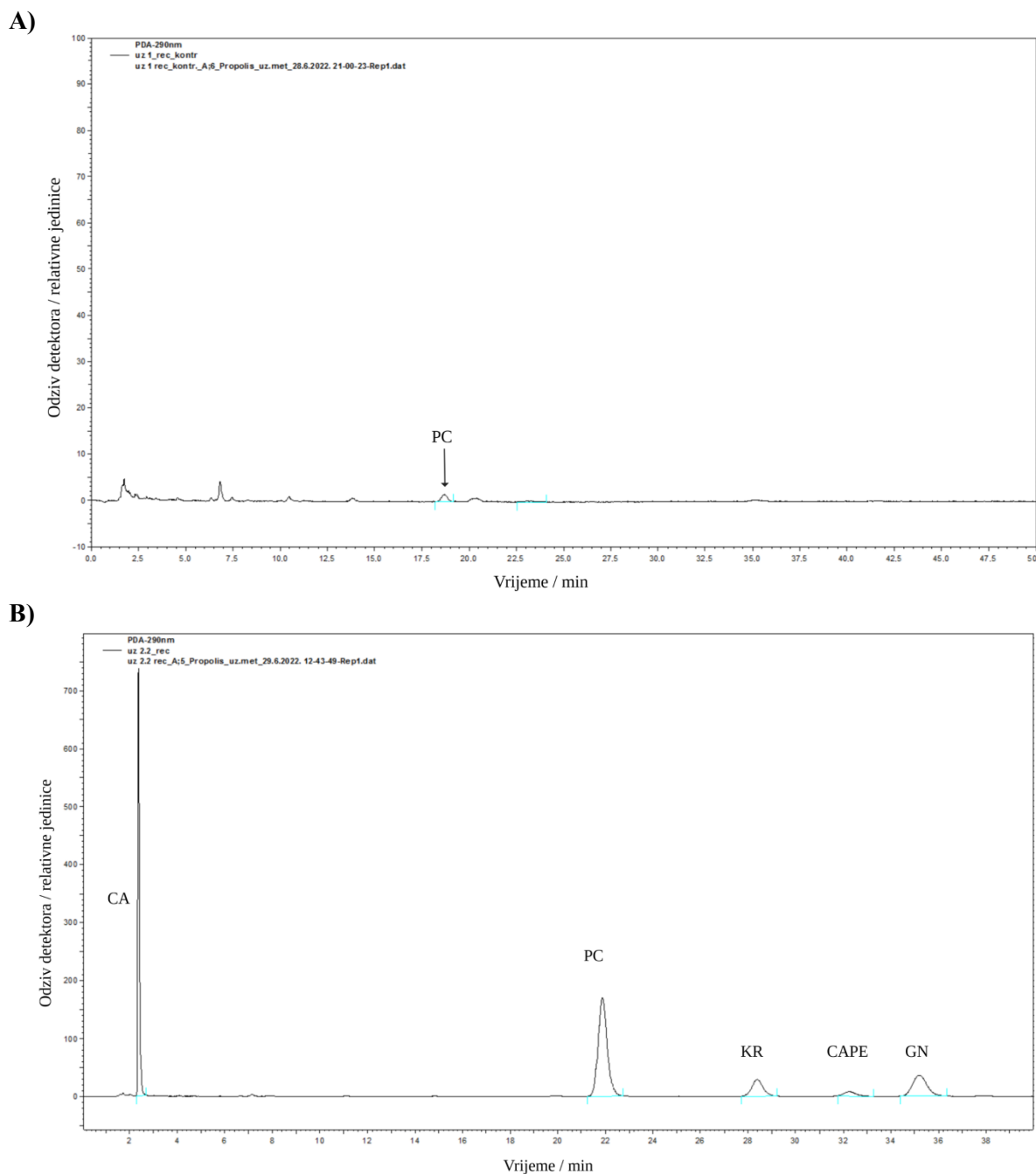
A)



B)



Slika 23. Kromatogrami metode RP-HPLC-PDA na $\lambda = 290$ nm: **A)** pokretne faze i **B)** smjese standarda polifenola u pokretnoj fazi prikazanih na osam kalibracijskih razina u rasponu masenih koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$): pinocembrina (PC) i kavene kiseline (CA) 2 – 70, krizina (KR) 2 – 20, galangina (GN) 5 – 50 i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) 1 – 30.



Slika 24. Kompleks etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Dubrovnik (Dub) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) korišten kao slijepa proba u ispitivanju točnosti metode: **A)** necijepljeni uzorak; **B)** uzorak cijepljen smjesom standarda masenih koncentracija: pinocembrina (PC) $37 \mu\text{g mL}^{-1}$, krizina (KR) $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, galangina (GN) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, kavene kiseline (CA) $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tablica 22. Točnost metode RP-HPLC-PDA ispitana analizom analitičkih povrata pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u kompleksu etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Dubrovnik (Dub) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) na tri koncentracijske razine

Polifenol	Koncentracijska razina	Masena koncentracija *		Dobivena masena koncentracija **	Analitički povrat (%)
		slijepe probe Dub propolisa	dodana u slijepu probu		
PC	GO	0,4	0,7	1,1 ± 3,3	95,9
	NK	0,4	38,8	41,2 ± 1,7	104,9
	> 150 % NK	0,4	68,3	72,4 ± 1,2	105,5
KR	GO	-	0,7	0,6 ± 2,2	81,0
	NK	-	12,8	11,9 ± 3,6	92,5
	> 150 % NK	-	20,3	19,0 ± 1,0	93,4
GN	GO	-	2,1	2,1 ± 0,7	101,4
	NK	-	20,6	21,4 ± 0,7	104,7
	> 150 % NK	-	51,5	42,8 ± 0,4	83,0
CA	GO	-	6,1	5,4 ± 1,7	85,1
	NK	-	27,3	29,6 ± 2,3	107,5
	> 150 % NK	-	70,9	70,8 ± 1,2	99,4
CAPE	GO	-	0,9	0,9 ± 2,7	92,4
	NK	-	4,2	4,2 ± 4,7	98,0
	> 150 % NK	-	31,8	34,4 ± 0,7	108,0

* srednja vrijednost masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

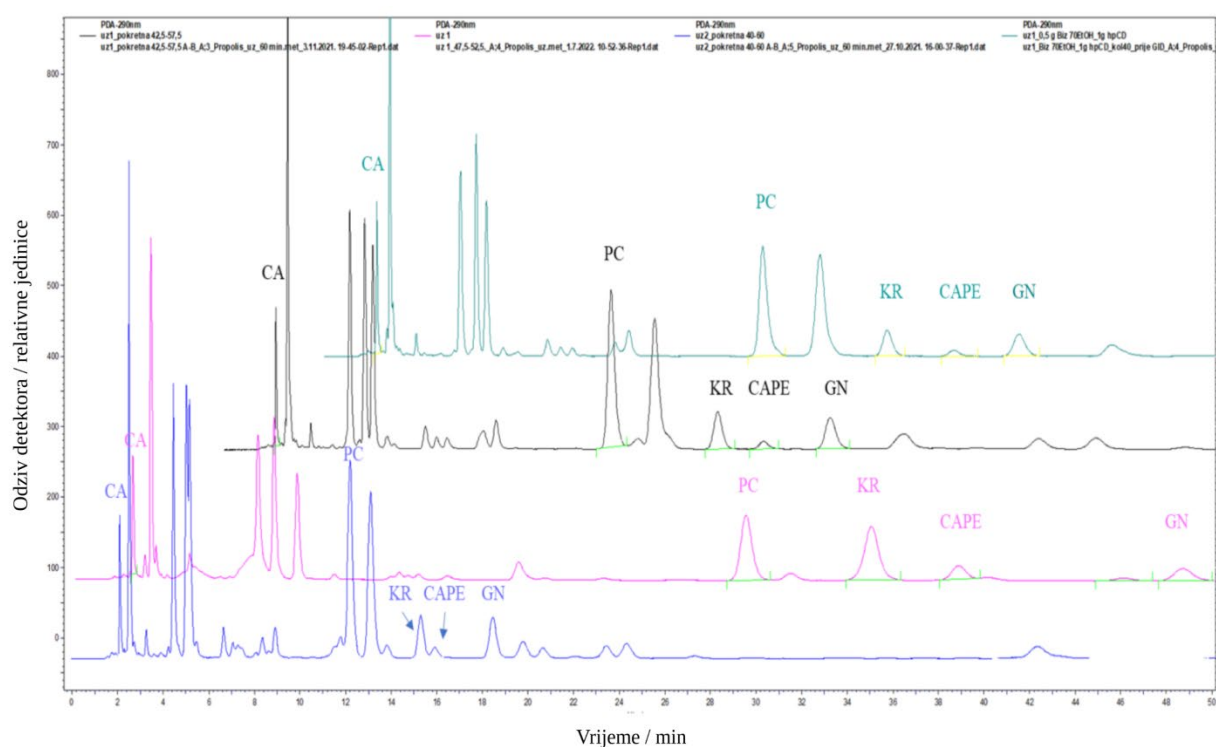
** srednje vrijednosti masene koncentracije, γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm %RSD

GO – granica određivanja; NK – nominalna koncentracija; RSD – relativna standardna devijacija

Promjenom sastava pokretne faze, odnosno smanjenjem udjela komponente A i smanjenjem udjela formijatne kiseline u eksperimentalnim pokusima ispitivanja robusnosti metode, razdvojenost i površina krivulja eluiranja te broj teoretskih tavana ne odstupa značajno od optimiziranih uvjeta, a vrijeme analize je smanjeno. Međutim, povećanje udjela formijatne kiseline u pokretnoj fazi rezultira produljenim vremenom analize uz značajno smanjenje površina krivulja eluiranja svih polifenola, a također ima i negativni utjecaj na razdvojenost KR i CAPE (Slika 25). Smanjenjem temperature injektiranja uzorka i temperature kolone za 10 % (22 °C) produljuje se vrijeme analize, dok je na višoj temperaturi (28 °C) vrijeme analize kraće. Promjena volumena injektiranja s 5 μL na 10 μL nije utjecala na vrijeme zadržavanja te faktor razlučivanja, asimetrije i zadržavanja, a visina i površina krivulja

eluiranja bile su u skladu s povećanjem volumena. Ispitivanje robusnosti definiranih kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA dodatno je provjereno primjenom različitih serija kolone te pri tome nije bilo značajnih odstupanja u rezultatima.

Robusnost metode provjerena je i ispitivanjem stabilnosti pripremljenih otopina standarda i otopina uzoraka propolisa. Usporedba rezultata svježe pripravljene otopine standarda/uzorka s onom pohranjenom na određenom temperaturnom režimu navedenom u poglavlju *Eksperimentalni dio 3.5.4.* ukazuje na stabilnost tijekom 72 sata na sobnoj temperaturi, tijekom 60 dana u hladnjaku u uvjetima od 2 do 8 °C te tijekom dva ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja unutar 14 dana. Vrijednosti % RSD su unutar zadanog kriterija (< 2).



Slika 25. Ispitivanje robusnosti metode RP-HPLC-PDA promjenom sastava pokretne faze: A = Ψ (voda, metanol, formijatna kiselina) = 97 : 2 : 1; B = metanol, 100% (■), A : B = 40 : 60 (■), A : B = 47,5 : 52,5 (■), A : B = 42,5 : 57,5 i (■) A : B = 45 : 55 u analizi kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) uzorka Valpovo (Vlp) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) pri 25 °C.

4.5. Analize oralnih, želučanih i crijevnih frakcija *in vitro* simulirane probave

4.5.1. Rezultati tekućinskokromatografskih analiza

U ovom radu simulacija probave *in vitro* provedena je s kompleksom EESS i HP- β -CD-a (std mix) te s kompleksima EEP-a uzoraka iz okolice Valpova (Vlp) i okolice Zagreba (Zg) s HP- β -CD-om, a rezultati analiza prikazani su u Tablici 23. Radi praćenja promjena u koncentracijama odabranih polifenola u svim fazama simulirane probave odnosno nakon oralne faze, želučane faze i faze u tankom crijevu provedene s dva modela (IF-C i Din), provedene su i analize neprobavljenog uzorka koji ima ulogu tkz. kontrolne skupine u pokusu simulacije probave *in vitro*. Najveće odstupanje koncentracija polifenola primjećeno je u frakciji Din, pri čemu se koncentracija svih polifenola iznimno smanjila u odnosu na ostale frakcije, što je vidljivo na Slikama 26 – 30 na kojima je prikazan utjecaj simulacije probave *in vitro* na pojedini polifenol, ovisno o modelu faze tankog crijeva [s centrifugiranjem, A) ili dijalizom kroz polupropusnu membranu, B)].

Koncentracije svih polifenola u fazi tankog crijeva (frakcija IF-C ili Din) statistički se razlikuju u odnosu na koncentraciju NU uzorka, osim polifenola KR za koji su potvrđene statistički značajne razlike ($p < 0,05$) i u frakcijama OF i GF u sva tri analizirana kompleksa (Tablica 23).

Budući da je u poglavlju 4.3.2. (Slika 22 A) ustanovljeno da vodeni pripravak propolisa bez HP- β -CD-a sadržava višestruko niže koncentracije PC, KR, GN i CAPE i da analizom svih promatranih faza probave *in vitro* nije ustanovljen rast koncentracija tj. značajnije oslobađanje polifenola, uzorci bez HP- β -CD-a izostavljeni su iz prikaza u ovom dijelu rada.

Uzorak slijepe probe za pokus *in vitro* sadržavao je vodu, enzime i probavne tekućine bez uzorka kompleksa. Analizom RP-HPLC-PDA slijepe probe u NU i u svim fazama GID-a potvrđeno je da ne postoje interferencije koje bi onemogućavale provedbu analiza odabranih polifenola.

Svi polifenoli obuhvaćeni ovim istraživanjem bili su kvalitativno i kvantitativno određeni u frakcijama iz svih faza probave *in vitro*, osim CA koji nije bio detektibilan u frakciji Din.

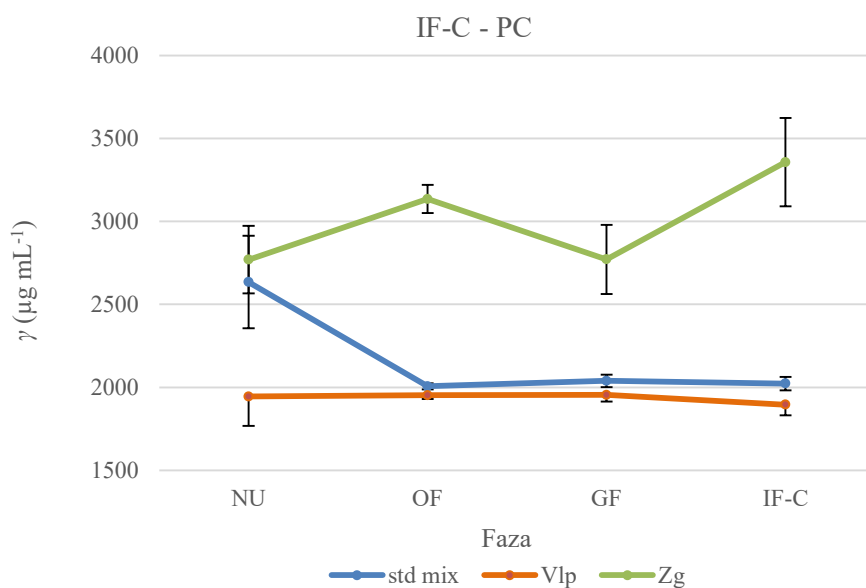
Tablica 23. Koncentracija polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u neprobavljenom uzorku (NU) te nakon oralne (OF), želučane faze (GF) te faze u tankom crijevu: s centrifugiranjem (IF-C), unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout) kompleksa smjese standarda i uzoraka propolisa podrijetlom iz Valpova (Vlp) i Zagreba (Zg)

Faza probave	Masena koncentracija polifenola ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
Smjesa standarda polifenola					
NU	2634,7 \pm 278,0	761,9 \pm 61,8	1177,7 \pm 77,5	1078,7 \pm 122,4	349,9 \pm 43,1
OF	2006,5 \pm 18,1 [†]	610,8 \pm 3,2 [†]	917,8 \pm 8,9	797,2 \pm 4,3	433,9 \pm 3,6
GF	2039,1 \pm 37,7	616,1 \pm 14,5 [†]	933,2 \pm 20,9	767,1 \pm 18,2	446,4 \pm 6,0
IF					
IF-C	2023,0 \pm 40,3 [†]	737,6 \pm 4,4	637,8 \pm 16,3 [†]	305,7 \pm 7,0 [†]	233,4 \pm 4,9
Din	234,5 \pm 5,2 [†]	74,8 \pm 2,2 [†]	9,1 \pm 0,1 [†]	-	9,0 \pm 0,1 [†]
Dout	1870,3 \pm 15,6	585,2 \pm 9,4 [†]	700,8 \pm 16,0 [†]	337,7 \pm 3,6 [†]	317,7 \pm 2,0
Vlp propolis					
NU	1945,2 \pm 177,1	635,4 \pm 18,7	993,1 \pm 49,3	264,3 \pm 9,7	211,6 \pm 16,9
OF	1952,2 \pm 22,3	476,5 \pm 26,8 [†]	896,1 \pm 46,7	311,5 \pm 11,9	213,0 \pm 1,7
GF	1954,2 \pm 38,8	463,6 \pm 7,4 [†]	880,0 \pm 68,9	321,7 \pm 28,7	208,6 \pm 17,6
IF					
IF-C	1895,9 \pm 64,1	568,7 \pm 59,8	565,2 \pm 43,8	363,9 \pm 3,3	236,1 \pm 3,4
Din	444,2 \pm 3,6 [†]	168,7 \pm 2,5 [†]	20,4 \pm 0,5 [†]	-	18,4 \pm 0,9 [†]
Dout	1704,9 \pm 9,5	604,8 \pm 6,3	835,5 \pm 13,7 [†]	158,8 \pm 9,4	190,0 \pm 1,9
Zg propolis					
NU	2769,7 \pm 203,0	1447,1 \pm 66,6	984,3 \pm 42,0	545,1 \pm 23,8	648,9 \pm 52,3
OF	3134,6 \pm 85,0	892,1 \pm 30,0 [†]	864,6 \pm 25,9	668,5 \pm 22,34	653,2 \pm 25,6
GF	2771,1 \pm 208,8	755,4 \pm 23,4 [†]	769,4 \pm 30,2	596,8 \pm 56,8	575,4 \pm 34,0
IF					
IF-C	3356,7 \pm 265,9	1113,7 \pm 76,5	551,6 \pm 34,2	479,3 \pm 18,4	674,5 \pm 21,9
Din	457,8 \pm 6,5	214,0 \pm 3,4 [†]	15,3 \pm 0,5 [†]	-	29,0 \pm 1,1 [†]
Dout	3647,1 \pm 21,5 [†]	1188,4 \pm 4,9	1059,7 \pm 14,1	466,1 \pm 19,8	756,6 \pm 8,1

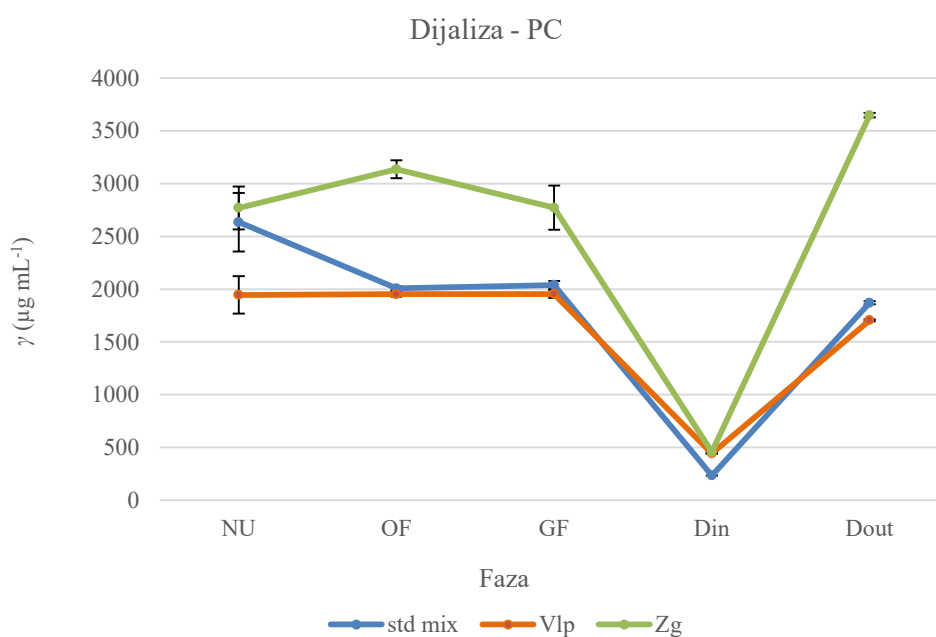
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije \pm standardna devijacija (SD); $n=3$. Statistička obrada podataka provedena je Dunnovim *post-hoc* testom, uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

† - statistički značajno različita koncentracija polifenola u određenoj fazi probave u odnosu na koncentraciju istog polifenola u NU jednog kompleksa ($p < 0,05$)

A)

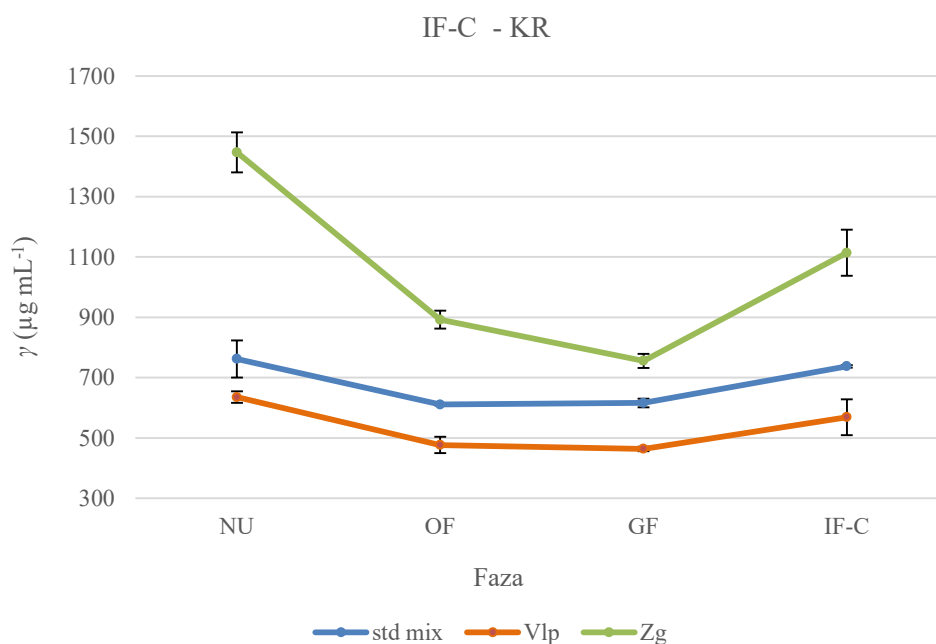


B)

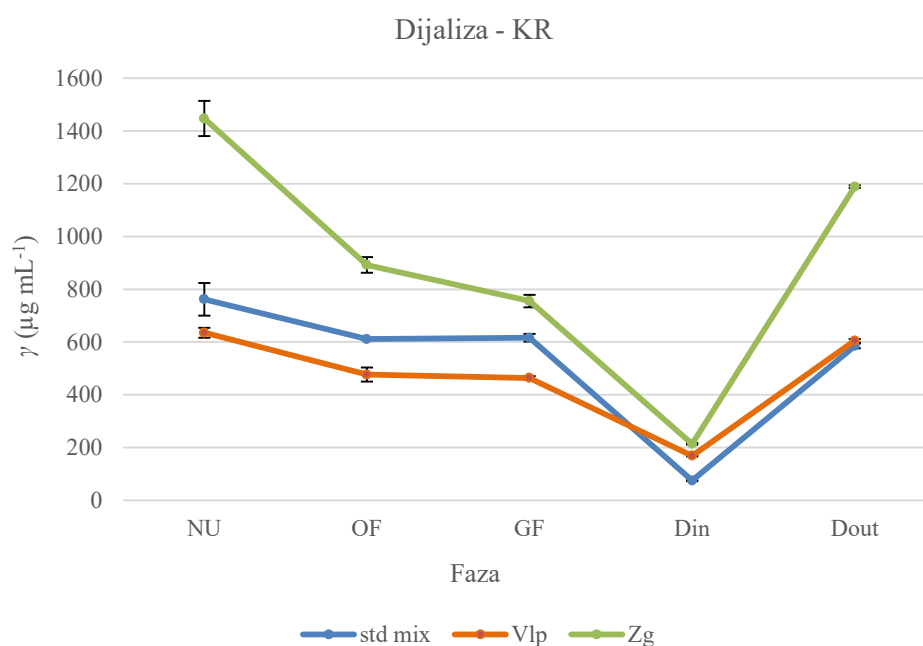


Slika 26. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na stabilnost polifenola pinocembrina (PC) u kompleksu smjese standarda i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) (std mix) te kompleksima propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s HP- β -CD-om u fazi tankog crijeva modela: **A)** s centrifugiranjem (IF-C); **B)** unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$.

A)

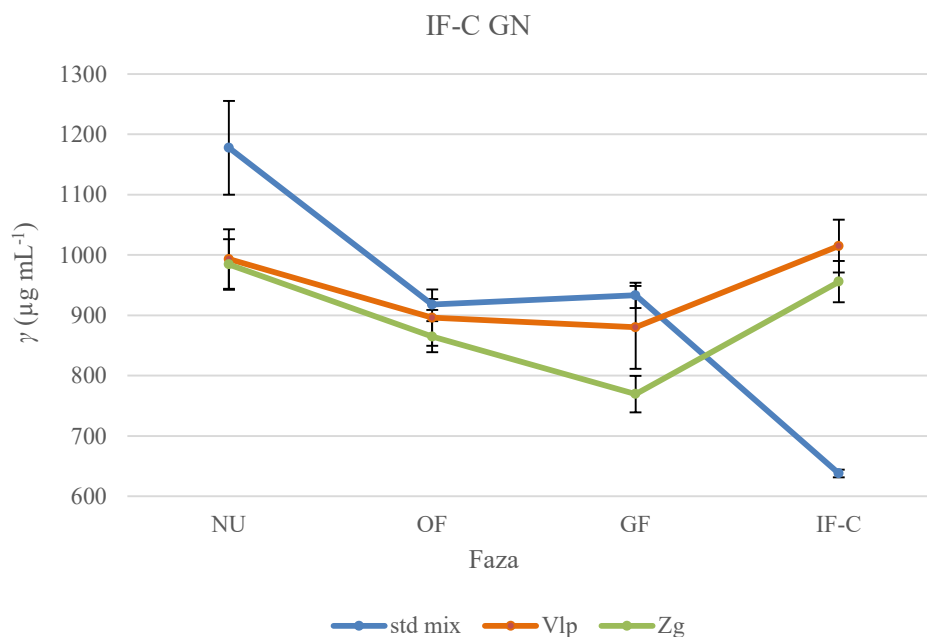


B)

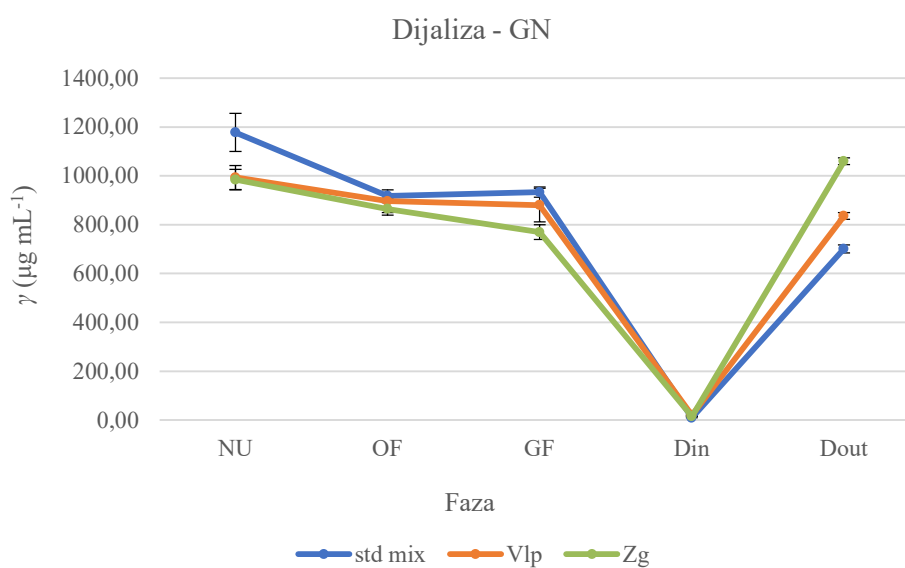


Slika 27. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na stabilnost polifenola krizina (KR) u kompleksu smjese standarda i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) (std mix) te kompleksima propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s HP- β -CD-om u fazi tankog crijeva modela: **A)** s centrifugiranjem (IF-C); **B)** unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$.

A)

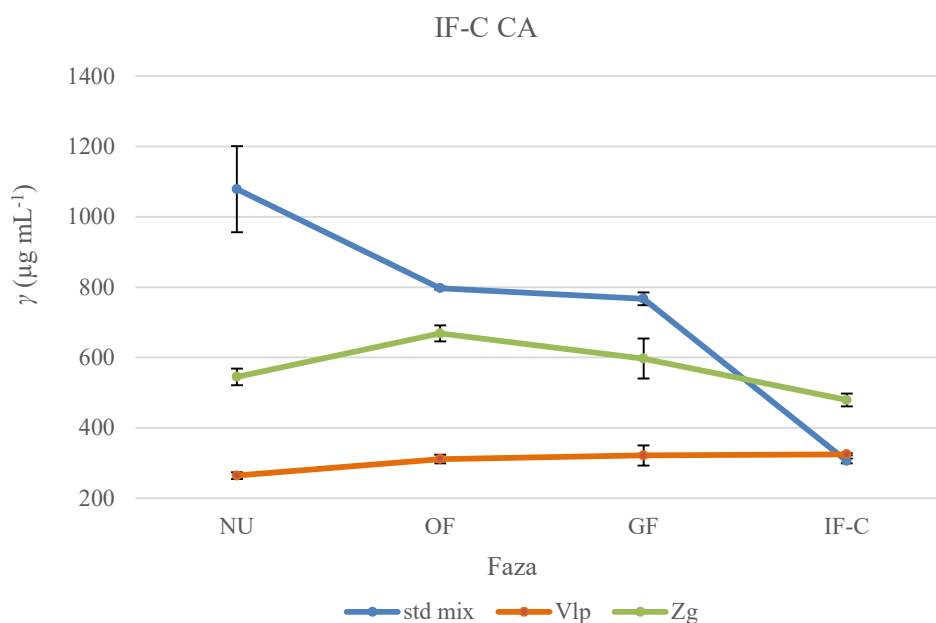


B)

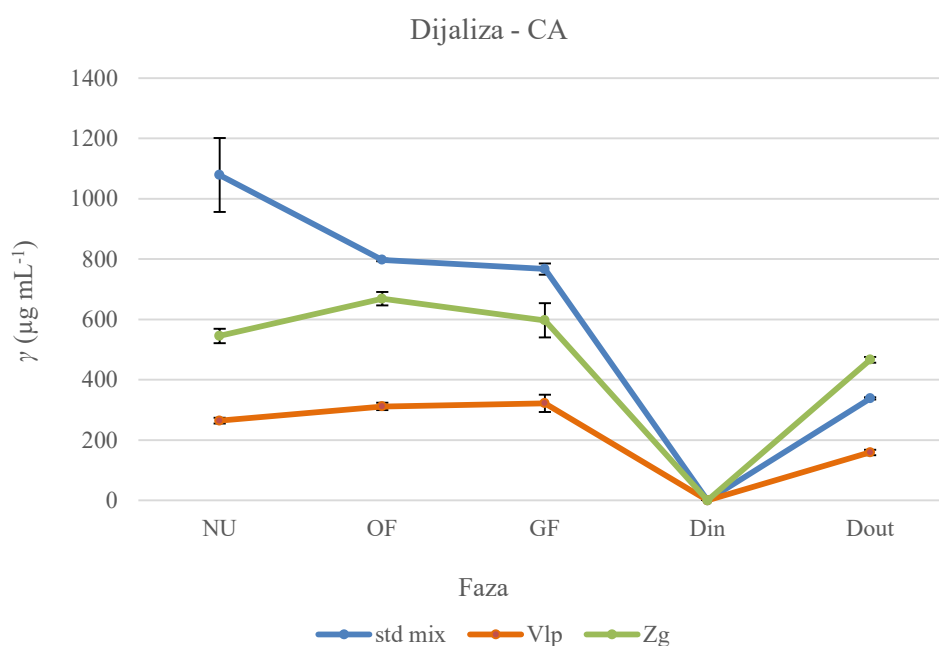


Slika 28. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na stabilnost polifenola galangina (GN) u kompleksu smjese standarda i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) (std mix) te kompleksima propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s HP- β -CD-om u fazi tankog crijeva modela: **A)** s centrifugiranjem (IF-C); **B)** unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$.

A)

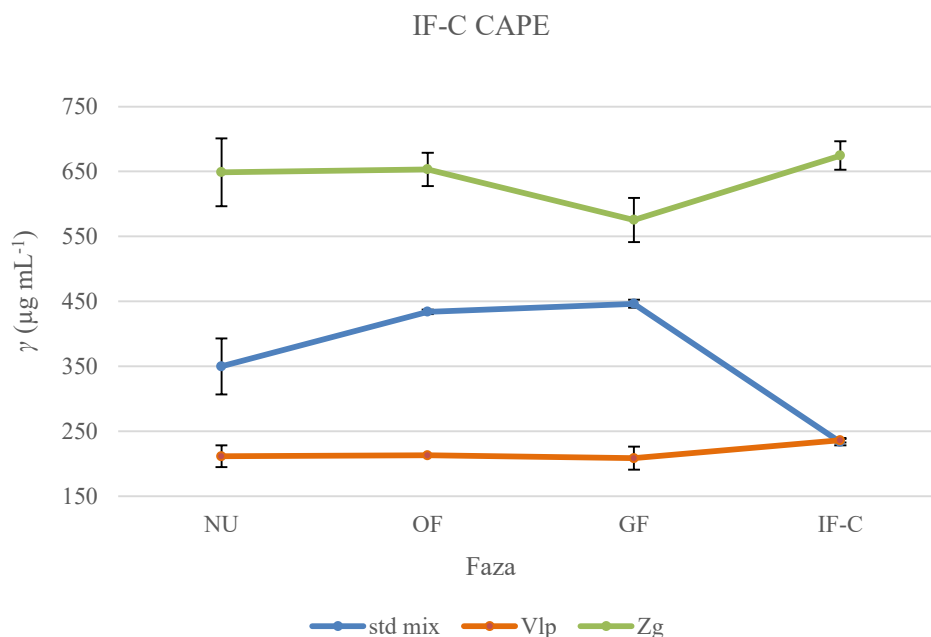


B)

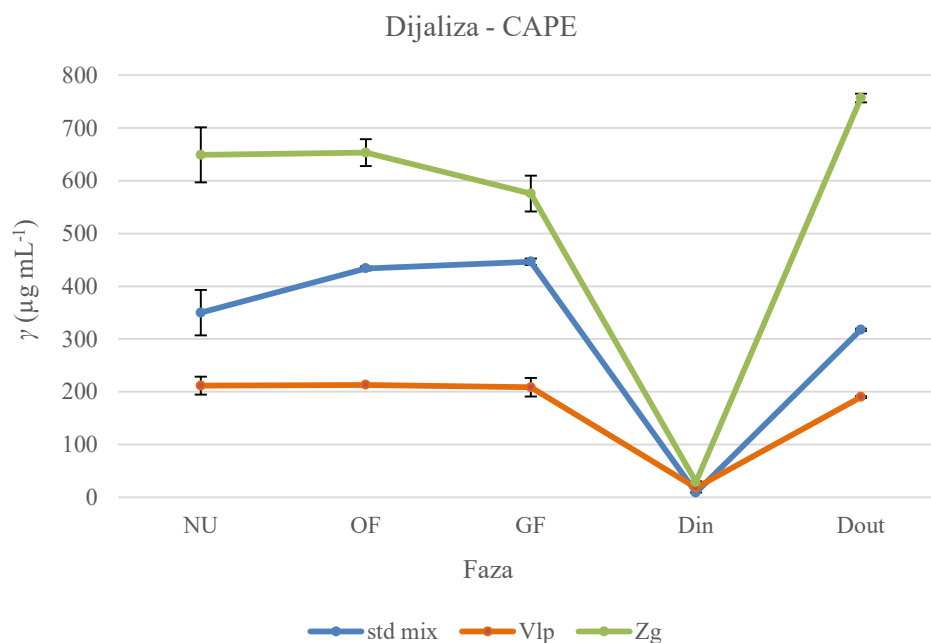


Slika 29. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na stabilnost polifenola kavene kiseline (CA) u kompleksu smjese standarda i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a) (std mix) te kompleksima propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s HP- β -CD-om u fazi tankog crijeva modela: **A)** s centrifugiranjem (IF-C); **B)** unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$.

A)



B)



Slika 30. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na stabilnost polifenola feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u kompleksu smjese standarda i 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina (HP-β-CD-a) (std mix) te kompleksima propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s HP-β-CD-om u fazi tankog crijeva modela: **A)** s centrifugiranjem (IF-C); **B)** unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost masene koncentracije γ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm standardna devijacija (SD), $n = 3$.

Stabilnost polifenola nakon svake faze GID-a prikazana je u Tablici 24, a izračunata je prema jednadžbi opisanoj u dijelu 3. Eksperimentalni dio Potpoglavlje 3.6.3. Nakon OF, spojevi PC, KR, GN, CA i CAPE u uzorku Vlp pokazali su vrlo veliku stabilnost ($90,4 \pm 7,0$ % za GN do $119,6 \pm 18,6$ % za CA), te se u odnosu na početni neprobavljeni uzorak nisu statistički razlikovale, osim KR čija je stabilnost nakon OF iznosila $75,1 \pm 6,9$ % te je bila statistički značajna u podnosu na NU ($p = 0,0282$). U uzorku Zg došlo je do smanjenja koncentracija flavona KR za 38,3 % i flavonola GN za 12,0 %, dok su se koncentracije PC, CA i CAPE nakon OF povećale. Nadalje, u uzorku Zg propolisu primijećena veća nestabilnost nakon OF, a statistički značajno smanjenje koncentracije ($p = 0,0150$) utvrđeno je za analit KR čija je stabilnost bila $61,7 \pm 2,6$ %. U uzorcima standarda primijećen je trend opadanja koncentracija za PC, KR, GN i CA (stabilnost je u rasponu 73,9 – 80,2 %), samo je CAPE pokazao porast ($125,1 \pm 10,9$ %), no razlika u odnosu na početni uzorak nije statistički značajna ($p > 0,05$).

Kompleksi uzoraka Vlp i Zg, kao i smjese standarda pokazali su relativno visoku želučanu (gastroičnu) stabilnost (od 72 do 129 %) za PC, GN, CA i CAPE te se njihove koncentracije u odnosu na OF nisu statistički značajno mijenjale u odnosu na OF ($p > 0,05$), no KR je pokazao statistički značajno smanjenje koncentracije u odnosu na NU za sva tri analizirana kompleksa ($p < 0,05$). Najniža gastroična stabilnost izmjerena je za polifenol KR u uzorku Zg ($52,2 \pm 6,8$ %), dok je najveće oslobađanje iz matrice u GF pokazao CAPE u uzorku std mix ($128,9 \pm 16,4$ %).

Koncentracija KR u IF-C je u odnosu na GF porasla za oba uzorka i standard, a promjena nije statistički značajna ($p > 0,05$). Polifenol KR je uz PC u IF-C pokazao veliku stabilnost ($77,23 \pm 8,87 - 97,21 \pm 7,43$ %).

Uspoređujući razlike u gastroičnoj stabilnosti između standarda i uzoraka i gledajući odnos između OF i GF, ne postoje značajnije promjene u koncentracijama PC, GN, CA i CAPE, dok je KR pokazao veću nestabilnost, te posljedično statistički značajne razlike između GF i NU za uzorak kompleksa Zg propolisa $p = 0,0029$, a za kompleks Vlp propolisa $p = 0,0150$.

Stabilnost polifenola u oba modela faze tankog crijeva (IF-C i Din+Dout) bila je visoka i usporediva, osim za polifenol CA koji odstupa u uzorku Vlp pri čemu je u frakciji IF-C dobivena dvostruko veća biodostupnost u odnosu na Din+Dout.

Tablica 24. Stabilnost polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) nakon oralne (OF) i želučane faze (GF) te faze probave u tankom crijevu (IF-C i Din+Dout) u odnosu na neprobavljeni uzorak kompleksa smjese standarda i uzoraka propolisa podrijetlom iz Valpova (Vlp) i Zagreba (Zg)

Faza probave	Stabilnost polifenola (%) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
Smjesa standarda polifenola					
OF	76,6 ± 7,3	80,5 ± 6,1	78,1 ± 4,8	74,5 ± 7,7	125,1 ± 13,5
GF	78,0 ± 8,9	81,3 ± 7,8	79,5 ± 5,4	71,8 ± 9,0	128,9 ± 16,4
IF					
IF-C	77,3 ± 7,2	97,2 ± 7,4	54,3 ± 4,1	28,5 ± 2,5	67,4 ± 88
Din+Dout	80,4 ± 7,8	87,0 ± 6,4	60,4 ± 3,8	31,5 ± 3,2	94,2 ± 10,8
Vlp propolis					
OF	100,9 ± 9,2	75,1 ± 5,2	90,4 ± 7,0	119,6 ± 18,6	101,1 ± 8,8
GF	101,0 ± 9,0	73,0 ± 3,0	89,0 ± 11,0	124,2 ± 26,1	99,4 ± 15,9
IF					
IF-C	98,2 ± 11,6	89,4 ± 8,2	102,3 ± 4,6	125,0 ± 25,4	112,0 ± 8,3
Din+Dout	111,1 ± 9,4	121,7 ± 2,4	86,36 ± 5,4	60,7 ± 7,4	99,0 ± 8,4
Zg propolis					
OF	113,7 ± 11,3	61,7 ± 2,6	88,0 ± 6,3	122,7 ± 2,0	101,3 ± 12,3
GF	100,8 ± 15,1	52,3 ± 3,5	78,3 ± 5,1	109,8 ± 14,0	89,4 ± 12,7
IF					
IF-C	121,6 ± 13,0	77,2 ± 8,9	97,4 ± 10,8	88,2 ± 15,1	104,2 ± 5,4
Din+Dout	148,8 ± 11,8	97,1 ± 4,9	109,4 ± 5,6	85,5 ± 0,1	121,6 ± 9,9

* Srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD); $n=3$

U Tablici 25 prikazana je procjena biodostupnosti PC, KR, GN, CA i CAPE određena na temelju IF-C i Din u odnosu na NU, iskoristivost polifenola nakon crijevne faze s dijalizom (Din+Dout/NU) te udio ostatka polifenola u frakciji izvan membrane za dijalizu (Dout/NU), izračunate prema jednadžbama opisanim u dijelu 3. Eksperimentalni dio Potpoglavlje 3.6.3. U modelu simulacije probave *in vitro* IF-C dobivene su znatno više vrijednosti biodostupnih polifenola u odnosu na vrijednosti u modelu s polupropusnom membranom. Svi analizirani polifenoli u uzorcima Zg i Vlp u modelu IF-C pokazali su vrlo veliku biodostupnost (od 80 do 120%), dok su polifenoli u smjesi standarda pokazali znatno nižu biodostupnost (od 28,5 % do 97,2 %).

Uspoređujući udio biodostupnih polifenola nakon prolaska kroz polupropusnu membranu, u odnosu na fazu tankog crijeva s centrifugiranjem, rezultati prikazani u Tablici 25 i na Slikama 31 i 32 pokazuju da su u ovoj frakciji dobivene vrlo niske koncentracije polifenola, a najveći udio biodostupnih polifenola u frakciji Din izmjeren je za PC i KR. Vrijednosti koncentracija CA u dijalizatu unutar polupropusne membrane (Din) bile su izvan mjernog područja metode te su označene nulom.

Na Slici 33. uspoređena je biodostupnost A) PC, B) KR, C) GN, D) CA i E) CAPE u modelu crijevne faze s centrifugiranjem (IF-C) prema modelu s polupropusnom membranom (Din), a razlike u udjelu biodostupnih polifenola između ova dva modela statističkom obradom pokazale su statističku značajnost ($p < 0,05$).

U kompleksima uzoraka Zg i Vlp u IF-C frakciji dobivena je veća biodostupnost polifenola u odnosu na kompleks sa smjesom standarda, a statističkom obradom podataka utvrđeno je da je biodostupnost svih polifenola u uzorku Zg u odnosu na smjesu standarda bila statistički značajno veća ($p < 0,05$), dok je u uzorku Vlp biodostupnost GN, CA i CAPE bila statistički značajno veća, međutim udio biodostupnosti PC i KR u IF-C nije bio statistički značajan u odnosu na Din.

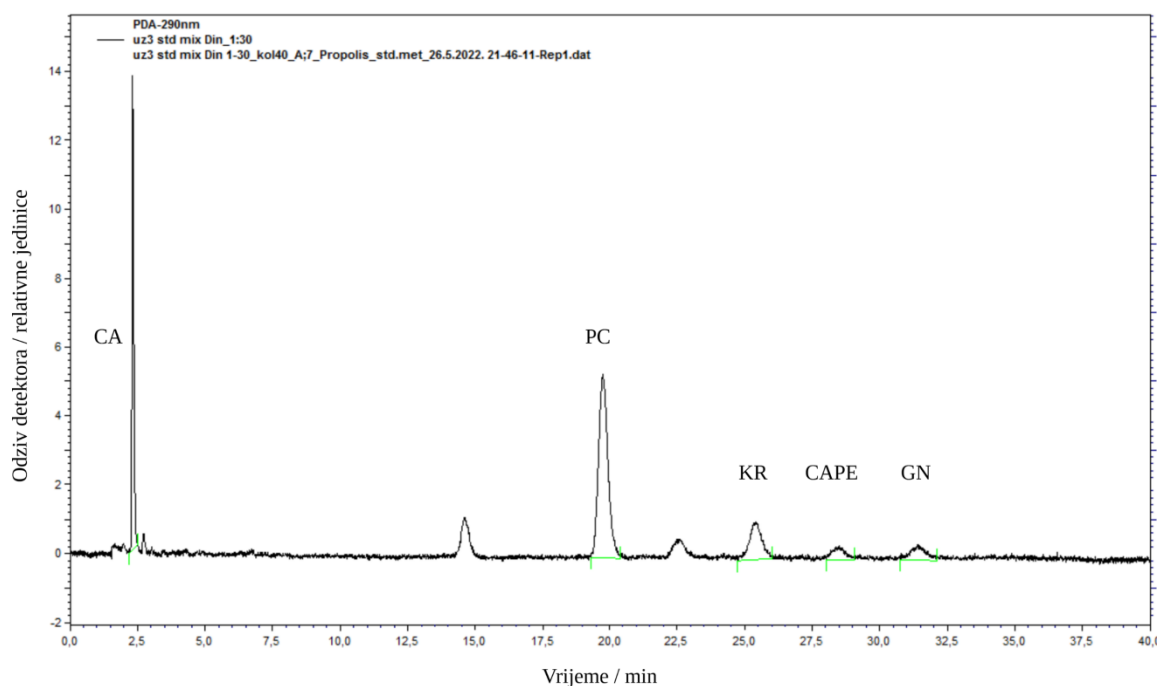
Iskoristivost polifenola nakon faze tankog crijeva s dijalizom (zbroj frakcije Din i Dout) bila je visoka, s obzirom da je udio ostatka polifenola u frakciji izvan membrane (Dout) visok i iznosi za sve polifenole više od 50 %, osim CA koja u globalu ima niže vrijednosti u fazi tankog crijeva.

Tablica 25. Procjena biodostupnosti, udjela iskoristivosti i udjela ostatka polifenola pinocembrina (PC), krizina (KR), galangina (GN), kavene kiseline (CA) i feniletilestera kavene kiseline (CAPE) u fazi tankog crijeva

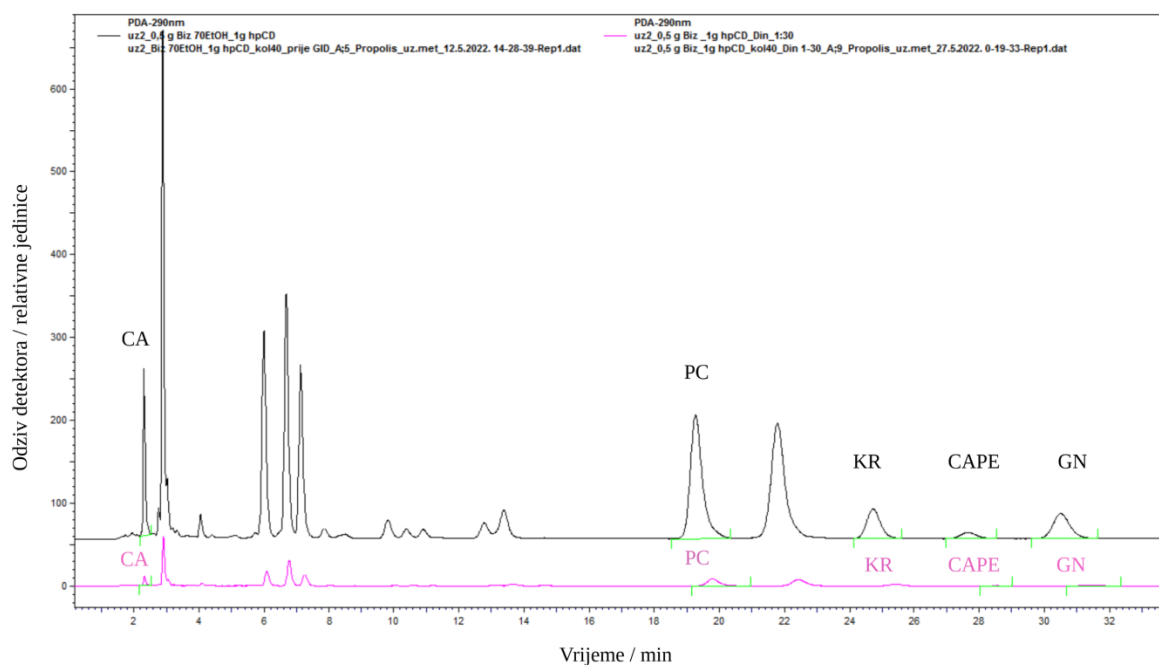
Parametar	Prinos polifenola (%) *				
	PC	KR	GN	CA	CAPE
Smjesa standarda polifenola					
Biodostupnost					
IF-C/NU	77,3 ± 7,2	97,2 ± 7,4	54,3 ± 4,1	28,5 ± 2,5	67,4 ± 8,8
Din/NU	8,9 ± 0,8	9,8 ± 0,5	0,8 ± 0,1	-	2,6 ± 0,3
Iskoristivost					
Din+Dout/NU	80,4 ± 7,8	87,0 ± 6,4	60,4 ± 3,8	31,5 ± 3,2	94,2 ± 10,8
Udio ostatka					
Dout/NU	71,5 ± 7,0	77,1 ± 5,9	59,7 ± 3,8	31,5 ± 3,2	91,6 ± 10,5
Vlp propolis					
Biodostupnost					
IF-C/NU	98,2 ± 11,6	89,4 ± 8,2	102,3 ± 4,6	124,9 ± 25,4	112,0 ± 8,3
Din/NU	22,9 ± 1,9	26,5 ± 0,4	2,1 ± 0,1	-	8,8 ± 1,1
Iskoristivost					
Din+Dout/NU	111,1 ± 9,4	121,8 ± 2,4	86,4 ± 5,4	60,7 ± 7,4	99,0 ± 8,4
Udio ostatka					
Dout/NU	88,1 ± 7,5	95,2 ± 2,0	84,3 ± 5,2	60,7 ± 7,4	90,2 ± 7,3
Zg propolis					
Biodostupnost					
IF-C/NU	121,6 ± 13,0	77,2 ± 8,9	97,4 ± 10,8	88,2 ± 15,1	104,2 ± 5,4
Din/NU	16,6 ± 1,5	14,8 ± 0,8	1,5 ± 0,1	-	4,5 ± 0,4
Iskoristivost					
Din+Dout/NU	148,8 ± 11,8	97,1 ± 4,9	109,4 ± 5,6	85,5 ± 0,1	121,6 ± 9,9
Udio ostatka					
Dout/NU	132,2 ± 10,3	82,2 ± 4,1	107,8 ± 5,6	85,5 ± 0,1	117,1 ± 9,5

NU – neprobavljeni uzorak; IF-C – frakcija faze tankog crijeva nakon centrifugiranja; Din – frakcija tankog crijeva unutar polupropusne membrane; Dout – frakcija tankog crijeva izvan polupropusne membrane

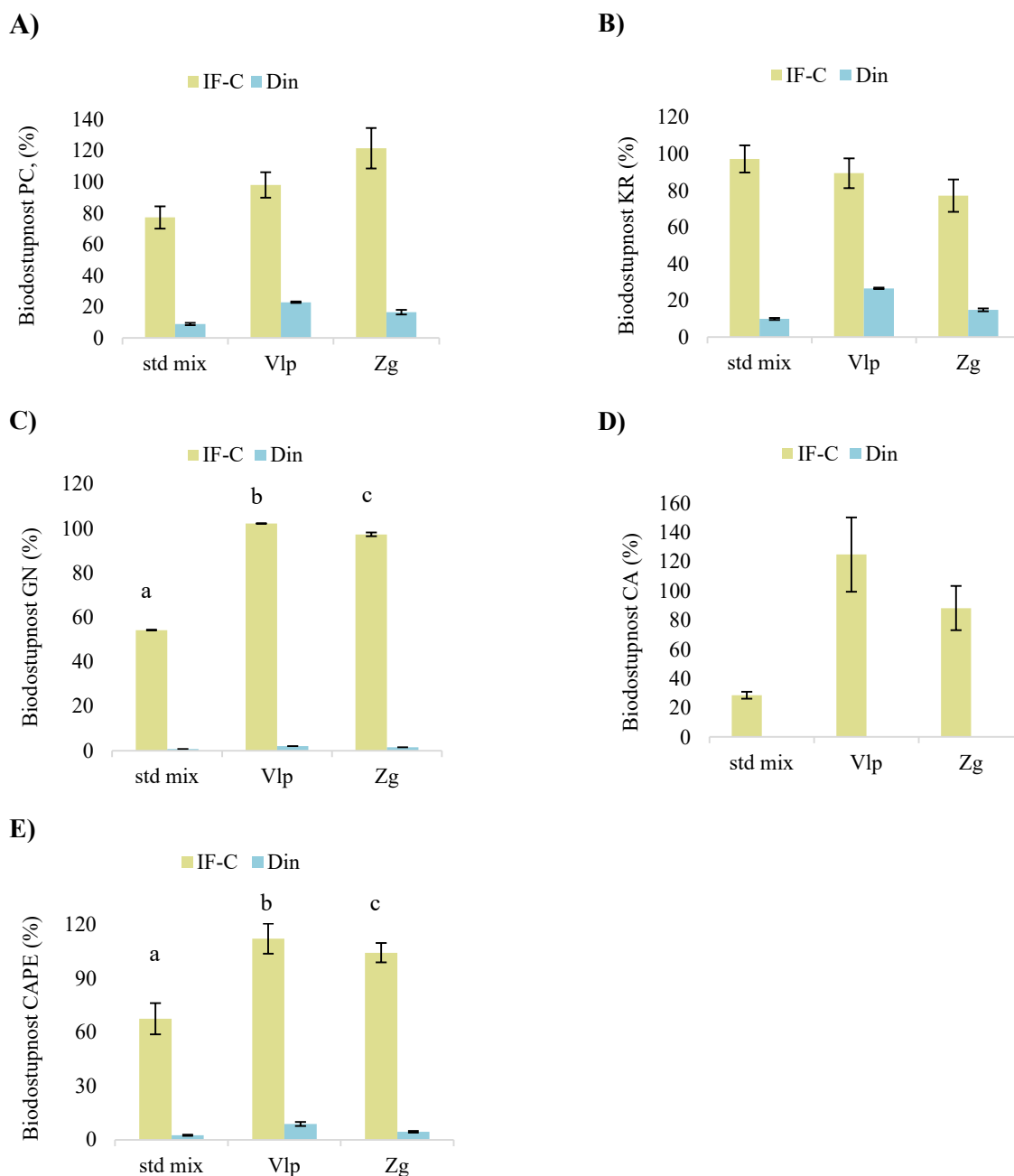
* Srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD); $n=3$



Slika 31. RP-HPLC-PDA kromatogram kompleksa etanolnog ekstrakta smjese standarda i HP- β -CD (std mix) nakon dijalize kroz polupropusnu membranu u frakciji tankog crijeva unutar polupropusne membrane (Din)



Slika 32. Izgled kromatograma kompleksa etanolnog ekstrakta propolisa (EEP-a) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD-a): kao neprobavljeni uzorak (■); nakon dijalize kroz polupropusnu membranu u frakciji tankog crijeva unutar polupropusne membrane Din (■)



Slika 33. Biodostupnost polifenola **A)** pinocembrina (PC), **B)** krizina (KR), **C)** galangina (GN), **D)** kavene kiseline (CA) i **E)** feniletilestera kavene kiseline (CAPE) nakon faze tankog crijeva provedene na modelu s centrifugiranjem (IF-C) i na modelu dijalize kroz polupropusnu membranu (Din) u kompleksu: smjese standarda (std mix), etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD-om). Statistička značajnost ispitana je pomoću Kruskal Wallisovog (KW) neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze, uz $p < 0,05$.

a – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na Din u uzorku std mix;

b – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na Din u uzorku Vlp;

c – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na Din u uzorku Zg, $p < 0,05$.

4.5.2. Rezultati spektrofotometrijskih analiza

Sadržaj ukupnih fenola (TP) kompleksa EEP-a i HP- β -CD-a te EESS-a i HP- β -CD-a u neprobavljenom uzorku, NU i frakcijama iz OF, GF, IF-C, Din i Dout faza probave određen Folin-Ciocalteuovom metodom prikazan je na Slici 34 A i Tablici 26, a izračunat je koristeći smjesu standarda PC i GN u omjeru 2 : 1 (*m/m*).

Sadržaj TP-a u analiziranim NU uzorcima bio je $15477,22 \pm 10,50 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ za uzorak Vlp, a $20104,91 \pm 13,75 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ za uzorak Zg. Tijekom simulacije probave *in vitro* analizirani uzorci pokazali su povećanje sadržaja TP u odnosu na NU i to za oba modela crijevne faze te je izračunom dobiven udio biodostupnosti ukupnih fenola (Slika 35 A), koji je u frakciji IF-C za sva tri kompleksa bio iznad 100 %. U frakciji Din najveći udio biodostupnih polifenola bio je u kompleksu smjese standarda, a razlike između IF-C i Din u svim analiziranim uzorcima bile su statistički značajne ($p < 0,05$).

Sadržaj ukupnih flavona i flavonola, TFF-a, izračunat je primjenom QC. U uzorku NU kompleksa Zg sadržaj TFF-a bio je $4626,10 \pm 12,12 \mu\text{g QC mL}^{-1}$, u uzorku Vlp $3795,19 \pm 20 \mu\text{g QC mL}^{-1}$, a u uzorku smjese standarda $1457,34 \pm 8,41 \mu\text{g QC mL}^{-1}$. Tijekom GID sadržaj TFF bio je u blagom padu za uzorke kompleksa Zg i Vlp, a stagnirao je za smjesu standarda. Statistički značajna razlika između udjela biodostupnih TFF u frakciji IF-C u odnosu na Din potvrđena je u uzorku Zg ($p < 0,05$), koja je prikazana na Slici 35 B.

Sadržaj ukupnih flavanona i dihidroflavonola, TFD-a, određen je tepljem reakcije s DNPH reagensom koristeći PC za izražavanje rezultata. Tijekom GID *in vitro* došlo je do višestrukog povećanja u sadržaju TFD-a i u uzorcima i smjesi standarda. Iznimka u dobivenim rezultatima je sadržaj TFD-a u frakciji Din smjese standarda pri čemu je sadržaj bio iznimno mali što je statističkom obradom i potvrđeno (Tablica 28, Slika 34 C).

Uzorak kompleksa std mix je smjesa odabranih standarda PC, KR, GN, CA i CAPE, a ovim metodama odziv mogu dati svi spojevi odgovarajuće fenolne strukture prisutni u uzorku propolisa, a koji nisu prisutni u navedenom kompleksu, početni NU uzorak i uzorci iz probave imali su znatno niže početne vrijednosti sadržaja TP-a i TFF-a u odnosu na uzorke kompleksa Vlp i Zg propolisa s HP- β -CD-om.

Tablica 26. Ukupni fenoli određeni Folin-Ciocalteuovom metodom u neprobavljenom uzorku (NU) i nakon oralne (OF) i želučane faze (GF) te faze u tankom crijevu frakcija s centrifugiranjem (IF-C), frakcija unutar polupropusne membrane (Din) i frakcija izvan polupropusne membrane (Dout) u kompleksu smjese standarda, etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

Faza probave	Ukupni fenoli * u kompleksu		
	Smjese standarda polifenola	Vlp propolisa	Zg propolisa
NU	6102,7 \pm 4,0 ^a	15477,2 \pm 10,5 ^{ab}	20104,9 \pm 13,7 ^b
OF	6927,1 \pm 7,9 ^a	14789,6 \pm 21,0 ^{ab}	19733,5 \pm 34,6 ^b
GF	7458,0 \pm 99,1 ^a	18747,7 \pm 69,2 ^{ab}	20553,0 \pm 31,7 ^b
IF			
IF-C	8263,1 \pm 55,0 ^a	22466,9 \pm 322,2 ^{ab}	26004,1 \pm 208,2 ^b
Din	6118,8 \pm 110,0 ^a	12973,3 \pm 84,0 ^b	10920,6 \pm 138,4 ^{ab}
Dout	9289,5 \pm 259,8 ^a	21587,2 \pm 247,9 ^{ab}	29669,6 \pm 84,0 ^b

* Rezultat iskazan kao srednja vrijednost $\mu\text{g PC} : \text{GN mL}^{-1}$ kompleksa \pm standardna devijacija (SD); $n = 3$. Statistička značajnost ispitana je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze, uz $p < 0,05$.

a, b – različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između uzoraka smjese standarda i uzoraka propolisa Vlp i Zg u istoj fazi probave

Tablica 27. Ukupni flavoni i flavonoli određeni određeni metodom AlCl_3 u neprobavljenom uzorku (NU) i nakon oralne (OF) i želučane faze (GF) te faze u tankom crijevu frakcija s centrifugiranjem (IF-C), frakcija unutar polupropusne membrane (Din) i frakcija izvan polupropusne membrane (Dout) u kompleksu smjese standarda, etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

Faza probave	Ukupni flavoni i flavonoli * u kompleksu		
	Smjese standarda polifenola	Vlp propolisa	Zg propolisa
NU	1457,3 \pm 8,4 ^a	3795,2 \pm 20,7 ^{ab}	4626,1 \pm 12,1 ^b
OF	1675,7 \pm 4,7 ^a	3464,1 \pm 24,7 ^{ab}	4132,1 \pm 39,9 ^b
GF	1746,2 \pm 90,0 ^a	3927,8 \pm 74,1 ^b	2715,8 \pm 16,2 ^{ab}
IF			
IF-C	1262,2 \pm 56,0 ^a	2479,6 \pm 145,7 ^{ab}	4160,3 \pm 81,3 ^b
Din	1036,0 \pm 233,1 ^{ab}	1897,8 \pm 98,7 ^a	421,9 \pm 116,5 ^b
Dout	1553,1 \pm 85,5 ^a	4612,8 \pm 178,0 ^b	3858,6 \pm 37,3 ^{ab}

* Rezultat iskazan kao srednja vrijednost $\mu\text{g QC mL}^{-1}$ kompleksa \pm standardna devijacija (SD); $n = 3$. Statistička značajnost ispitana je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze, uz $p < 0,05$.

a, b – različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između uzoraka smjese standarda i uzoraka propolisa Vlp i Zg u istoj fazi probave

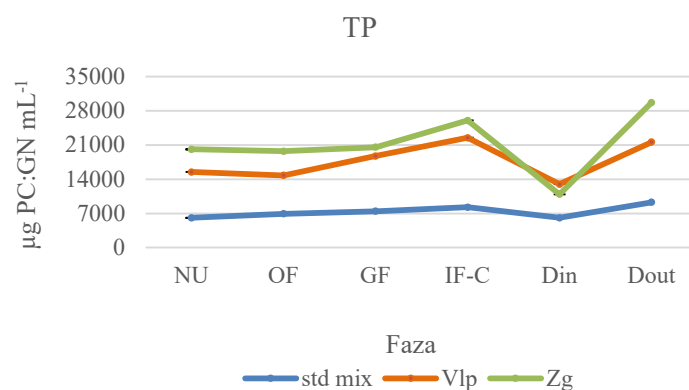
Tablica 28. Ukupni flavanoni/dihidroflavonoli određeni metodom DNP u neprobavljenom uzorku (NU) i nakon oralne (OF) i želučane faze (GF) te faze u tankom crijevu frakcija s centrifugiranjem (IF-C), frakcija unutar polupropusne membrane (Din) i frakcija izvan polupropusne membrane (Dout) u kompleksu smjese standarda, etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i propolisa Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

Faza probave	Ukupni flavanoni/dihidroflavonoli * u kompleksu		
	Smjese standarda polifenola	Vlp propolisa	Zg propolisa
NU	427,0 \pm 4,8 ^a	479,8 \pm 8,8 ^{ab}	480,6 \pm 1,5 ^b
OF	1060,2 \pm 11,0 ^a	643,1 \pm 21,3 ^b	685,2 \pm 14,0 ^{ab}
GF	2245,5 \pm 53,0 ^a	1899,7 \pm 34,0 ^{ab}	1318,1 \pm 95,5 ^b
IF			
IF-C	2360,2 \pm 32,3 ^a	4609,2 \pm 40,9 ^b	3101,8 \pm 82,6 ^{ab}
Din	17,2 \pm 34,1 ^a	3412,7 \pm 83,4 ^b	3035,1 \pm 68,2 ^{ab}
Dout	3083,3 \pm 75,6 ^a	1507,9 \pm 27,8 ^b	2704,45 \pm 48,6 ^{ab}

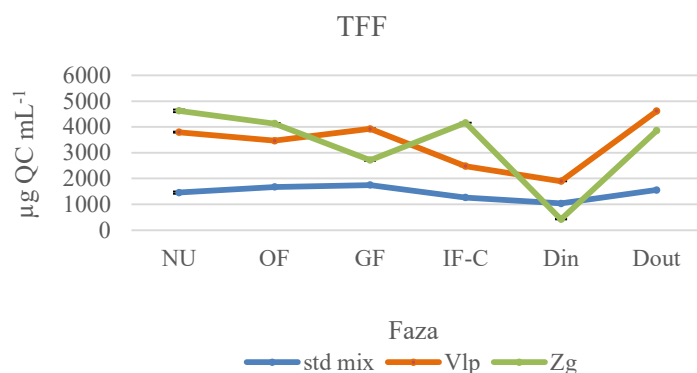
* Rezultat iskazan kao srednja vrijednost $\mu\text{g PC mL}^{-1}$ kompleksa \pm standardna devijacija (SD); $n=3$
 Statistička značajnost ispitana je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze, uz $p < 0,05$.

a, b – različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između smjese standarda i uzoraka propolisa Vlp i Zg u istoj fazi probave

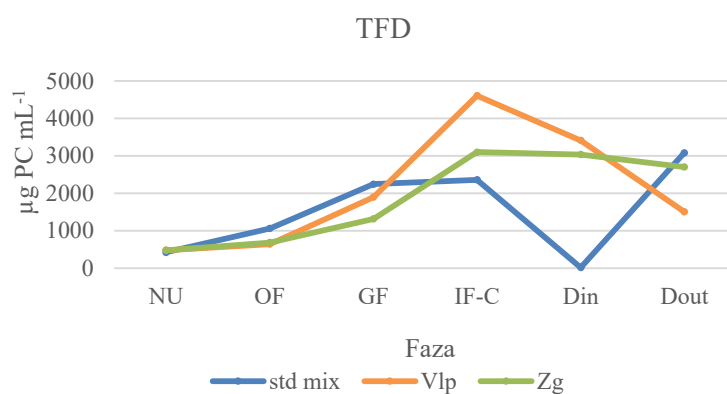
A)



B)



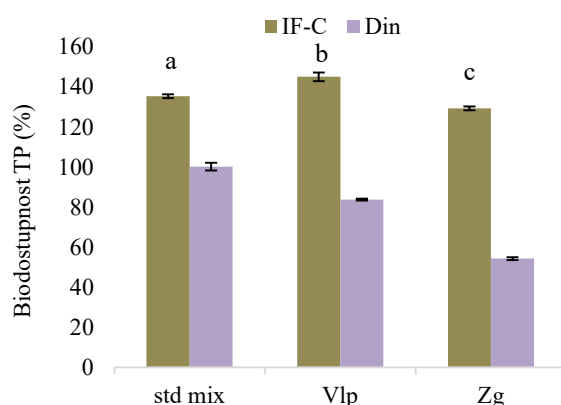
C)



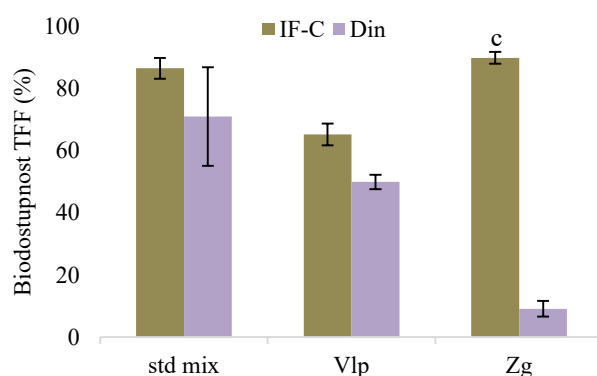
Slika 34. Utjecaj simulacije probave *in vitro* na **A)** ukupne fenole (TP), **B)** ukupne flavone i flavonole (TFF) i **C)** ukupne flavanone/dihidroflavonole (TFD) u neprobavljenom uzorku i nakon oralne (OF) i želučane faze (GF) te faze u tankom crijevu nakon centrifugiranja (IF-C) i unutar polupropusne membrane (Din) i izvan polupropusne membrane (Dout) u kompleksu: smjese standarda (std mix), etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD-om).

Rezultati za TP izraženi su kao $\mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$; za TFF $\mu\text{g QC mL}^{-1}$; za TFD $\mu\text{g PC mL}^{-1}$

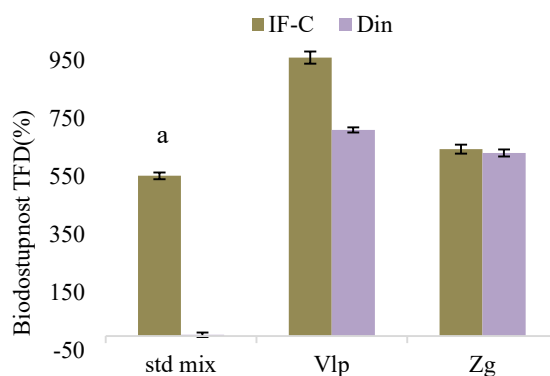
A)



B)



C)



Slika 35. Biodostupnost **A)** ukupnih fenola (TP), **B)** ukupnih flavona i flavonola (TFF), **C)** ukupnih flavanona/dihidroflavonola (TFD) nakon faze tankog crijeva provedene na modelu s centrifugiranjem (IF-C) i na modelu dijalize kroz polupropusnu membranu (Din) u kompleksu: smjese standarda (std mix), etanolnog ekstrakta propolisa Valpovo (Vlp) i Zagreb (Zg) s 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD-om).

Statistička značajnost ispitana je pomoću Kruskal Wallisovog neparametrijskog testa te Dunnovim *post-hoc* testom međusobne faze, uz $p < 0,05$.

a – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na frakciju Din u uzorku std mix;

b – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na frakciju Din u uzorku Vlp;

c – statistički značajno veća koncentracija u frakciji IF-C u odnosu na frakciju Din u uzorku Zg.

§ 5. RASPRAVA

Fizikalne karakteristike hrvatskog propolisa, pokazale su velike razlike koje su se očitovale i u kemijskoj raznolikosti među analiziranim uzorcima istraživanim u ovom radu. Raznolikost biljnih izvora i klimatski uvjeti karakteristični za određeno geografsko područje, sezona sakupljanja propolisa, tehnike i metode ekstrakcija polifenolnih sastavnica iz propolisa te načini prikaza rezultata, razlozi su zbog kojih je vrlo teško usporediti dobivene rezultate s rezultatima dosad objavljenih studija. Naime, koncentracijske razine ukupnih polifenola u različitim uzorcima propolisa iz različitih studija usporedive su samo ako se za njihovu karakterizaciju koristi isti standard. Međutim, i u tom slučaju bitnu ulogu ima vrsta istraživanog uzorka, odnosno tip propolisa. Objavljena istraživanja,^{12,93,189} ali i rezultati preliminarnog istraživanja,¹⁸³ potvrdili su da su uzorci iz kontinentalnog umjerenog područja bogatiji polifenolima od uzoraka s jadranske obale. Nadalje, odabrano je istraživanje pet polifenolih spojeva, PC, KR, GN, CA i CAPE u uzorcima propolisa zbog njihove učestalosti u sastavu različitih tipova propolisa, ali i specifičnih te dokazanih medicinskih učinaka.^{73,93,140,190}

Temeljem istraživanja Perak Junaković i suradnika kojim je dobiven znatno niži sadržaj TFF-a u EEP-ima uzoraka propolisa iz Senja i Dubrovnika (22 mg QC g⁻¹ balzama i 7 mg QC g⁻¹ balzama) u usporedbi s kontinentalnim uzorcima propolisa (222 mg QC g⁻¹ balzama u uzorku Zg i 165 mg QC g⁻¹ balzama u uzorku Vlp) ustanovljeno je da vegetacija brdskog terena i utjecaj mediteranske regije imaju veliki utjecaj na kemijski sastav.¹⁸³ U uzorcima propolisa iz Zagreba i Valpova utvrđen je i najveći sadržaj TFD-a 169 mg PC g⁻¹ balzama i 140 mg PC g⁻¹ balzama.

Srednje vrijednosti rezultata spektrofotometrijskih analiza EEP-a za TP-e u istom istraživanju iznosile su od 0,07 do 336,5 mg GA g⁻¹ balzama, a za TFF od 6,7 do 222,2 mg QC g⁻¹ balzama te se mogu usporediti s prethodnim istraživanjem Pavlovića i suradnika u kojem je sadržaj TP-a bio između: 236 i 242 mg GA g⁻¹; sadržaj TFF-a: do 26 do 32,14 mg QC g⁻¹, a u studiji Juga i suradnika sadržaj TP-a između 206 i 220 mg GA g⁻¹, dok je sadržaj TFF-a bio od 116 do 119 mg g⁻¹.^{191,192} Nastavno na način prikazivanja rezultata, preliminarni rezultati izraženi kao % mg PC:GN g⁻¹ balzama (TP: 0,3 – 67 %;

TFFs: 0,5 - 18,3 %; TFD: 8,9 - 16,9 %) usporedivi su s rezultatima objavljenim u studijama Popove i suradnika.^{80,135}

Za istraživanja stabilnosti, biodostupnosti i dijalizibilnosti odabranih polifenola (PC, GN, KR, CA i CAPE) u uvjetima simulacije GID-a *in vitro* odabrani su uzorci kontinentalnog tipa propolisa s područja Zagrebačke i Osječko-Baranjske županije. Početni kriterij za odabir navedenih uzoraka bili su ranije navedeni preliminarni rezultati spektrofotometrijskih analiza sastava EEP-a uzoraka propolisa s područja kontinentalnih i jadranskih regija Hrvatske kojima je potvrđeno da su kontinentalni uzorci propolisa bogatiji polifenolima, bez obzira na standard korišten za izračun sadržaja. Osim toga, tekućinskokromatografskom analizom EEP-a istih uzoraka [Slika 12 B)] ustanovljeno je da uzorci Zg i Vlp, za razliku od ostalih uzoraka, sadržavaju svih pet unaprijed odabranih polifenola te se pouzdanije može potkrijepiti pretpostavka ovog istraživanja da će zbog sličnog sastava i biodostupnost između ova dva uzorka biti slična.

Oba odabrana propolisa pripadaju euroazijskoj-sjevernoameričkoj regiji šumskih zajednica, koja obuhvaća velika šumska područja Europe, Azije i Sjeverne Amerike. U Republici Hrvatskoj ovo područje obuhvaća dio sjeverno od Karlovca, prvenstveno savsko-dravsko međurječje, a prostire se u rasponu nadmorskih visina od 80 do 150 m. Najznačajnije šumske zajednice ovog nizinskog pojasa su one hrasta lužnjaka (*Quercus robur*), poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia*), crne johe (*Alnus glutinosa*), običnog graba (*Carpinus betulus*), bijele i crne topole (*Populus alba* i *Populus nigra*), breze (*Betula spp.*) te raznih vrsta vrba (*Salix spp.*), s kojih pčele skupljaju smolu i balzamske tvari.¹⁹³

5.1. Istraživanja PC, GN, KR, CA i CAPE u ekstraktima kontinentalnog tipa propolisa

Ključni korak ovog istraživanja bio je razvoj i optimizacija metode za analizu polifenolnih spojeva propolisa. Stoga je odabrana tekućinskokromatografska metoda visoke djelotvornosti obratnih faza, s obzirom da je ovom instrumentalnom tehnikom moguće analizirati i polarne i nepolarne analite. Propolis je kompleksni uzorak i sadržava mnogo polifenolnih spojeva, a osobito veliki izazov u razvoju i optimizaciji metode HPLC bio je postići pouzdanost analize odabranih polifenola PC, KR, GN, CA i CAPE zbog njihove slične, slabo polarne kemijske strukture. Usredotočenost u razvoju metode RP-HPLC-PDA najvećim je dijelom bila na izboru kromatografske kolone, sastavu pokretne faze i temperaturi analize (Tablica 12). Kolone s obratnom nepokretnom fazom oktadecilsilikagel (C_{18}) karakterizira dobra stabilnost u širokom rasponu vrijednosti pH te su u prijašnjim istraživanjima često korištene za analizu polifenolnih spojeva u propolisu, medu, peludu pa i matičnoj mliječi.^{148,194,195} Pokretna faza u tekućinskokromatografskim analizama ekstrakata i pripravaka propolisa najčešće je smjesa vode i organskog otapala uz dodatak aditiva za prilagodbu i održavanje pH te za postizanje oštine krivulja eluiranja poput formijatne, acetatne, fosforne kiseline ili amonijevog acetata. Nerijetko su korištene dulje kromatografske kolone (> 150 mm) čijom se primjenom znatno produljuje vrijeme analize, dok primjenom kraćih kolona (< 150 mm) nije moguće u potpunosti razdvojiti sve spojeve te zadovoljiti kriterij razlučivanja ciljnih analita ($R_s > 2$).

Razvoj i uspostavljanje metode RP-HPLC-PDA razvijene u ovom istraživanju započeo je modifikacijom uvjeta metode objavljene u radu Escriche i suradnika primjenjujući 0,5 % *V/V* vodenu otopinu formijatne kiseline i acetonitril u A odnosno B komponenti pokretne faze.⁹⁶ Analize su provedene na duljoj (250 mm), ali i kraćoj koloni (125 mm) budući da su slični uvjeti korišteni u studiji Cunhe i suradnika za analizu polifenola u brazilskom propolisu.⁹⁷ Međutim, s navedenim uvjetima (Tablica 12, modifikacije 1. i 2.) nisu dobiveni zadovoljavajući rezultati u pogledu razlučivanja odabranih polifenola. Zamjena acetonitrila metanolom u B komponenti pokretne faze rezultirala je relativno dobrim razdvajanjem ciljanih analita, kraćim vremenom analize uz primjenu izokratnog umjesto gradijentnog eluiranja (Tablica 12, modifikacija 3.; Slika 12 A). Međutim, razlučivanje svih ciljnih analita nije bilo zadovoljavajuće ($R_s < 2$).

Daljnjom optimizacijom kromatografskih uvjeta (Tablica 12, modifikacije 4., 5. i 6.; Slika 12 B), koja je uključivala smanjenje udjela formijatne kiseline u pokretnoj fazi te primjenu 100 mm kolone sa sitnijim punjenjem čvrste faze (2 μm), utvrđeno je da takva kolona nije pogodna za analizu odabranih polifenola s obzirom na kompleksnost uzoraka u daljnjim istraživanjima. Međutim, dodatna izmjena udjela formijatne kiseline u pokretnoj fazi te primjena 150 mm kolone s punilom veličine čestica 3,5 μm (Tablica 12, modifikacija 7.; Slika 12 C) zadovoljila je glavni uvjet, dobro razlučivanje svih pet odabranih polifenola. Najučinkovitija 7. kombinacija kromatografskih uvjeta metode RP-HPLC-PDA je u svrhu dokazivanja prikladnosti kromatografskog sustava podvrgnuta dodatnim eksperimentalnim testiranjima utjecaja pH vrijednosti pokretne faze na kritične kromatografske parametre (t_R , A_s , N , R_s i k). U tu svrhu su provedene daljnje modifikacije komponenti A i B pokretne faze (Tablica 13), a dobiveni rezultati ukazali su da je 1,0 % V/V udio formijatne kiseline u komponenti A odnosno metanol u komponenti B pokretne faze najbolji izbor za analizu svih pet odabranih polifenola u standardnim otopinama i etanolnim ekstraktima propolisa (Slika 12 A i B).

Složeni sastav propolisa zahtijeva pročišćavanje uzoraka te izolaciju ciljnih spojeva raznim ekstrakcijskim tehnikama prije kvalitativne i kvantitativne analize.¹⁹⁶ Rezultati dobiveni primjenom optimiziranih i validiranih spektrofotometrijskih metoda UV-VIS za određivanje glavnih skupina polifenola (TP, TFF i TFD) u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima uzoraka propolisa te primjena tehnike UPE kod pripreme ovih složenih uzoraka,¹⁸³ bili su osnova za daljnja istraživanja usmjerena na dobivanje vodenog ekstrakta propolisa prikladnog za oralnu primjenu s dobrom biodostupnošću odabranih polifenola u svim fazama simulacije GID-a *in vitro*.

Iako su nedavne studije izvijestile o nižim ili približno jednakim prinosima ekstrakcije MCR u usporedbi s UPE,^{96,99} u ovom istraživanju radi usporedbe rezultata, u pripravi uzorka primijenjena je tehnika MCR, UPE i MPE (Slika 14.). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija omogućuje da se uzorak pročisti od voska primjenom taloženja, odnosno zamrzavanjem ekstrakta i centrifugiranjem na niskoj temperaturi. Za razliku od UPE, MPE se pokazala vrlo nepraktičnom tehnikom jer dovodi do zagrijavanja ekstrakta čime se pospješuje otapanje voska, ali i degradacija polifenolne frakcije.¹⁸³

Sastojci propolisa najviše su topljivi u etanolu, međutim etanol često nije pogodan izbor za primjenu u djece, starijih osoba, osoba s alergijama, u trudnica i dojilja, ali niti u

veterinarskoj medicini. Vodeći se primjenom netoksičnih otapala u pripravcima propolisa te spoznajama dosadašnjih istraživanja da se ekstrakcijska snaga vode povećava dodatkom 20 % PEG 400, ^{110,111} istraživanja su bila usmjerena na pripravu vodenog ekstrakta propolisa. Treba istaknuti zanimljivo istraživanje Šuran i suradnika u kojem je kao ekstrakcijsko otapalo uzoraka sirovog propolisa korišten bezvodni PEG 400 i 96 % etanol. Rezultati tog istraživanja pokazali su da iako su koncentracije ispitivanih polifenola u PEG 400 ekstraktima bile niže nego u etanolnim ekstraktima, razlike u koncentracijama ukupnih fenola između navedena dva ekstraktanta nisu bile statistički značajne. ⁷ Naši rezultati idu u prilog ovoj studiji, jer su dobivene koncentracije analiziranih odabranih polifenola znatno više povećanjem udjela PEG-a (Tablica 14).

Najzastupljeniji polifenol u istraživanim etanolnim i PEG ekstraktima bio je PC u 40 %-tnom etanolnom i u 70 %-tnom etanolnom ekstraktu, te GN u uzorcima sa 70 %-tnim i 80 %-tnim etanolom (Slika 14 i 15). U uzorcima Vlp propolisa koncentracije CA kreću se u rasponu od 8,3 do 34,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Za usporedbu, u radu Pellatija i suradnika koncentracija CA određena metodom HPLC-DAD bila je u rasponu od 20 do 1190 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u uzorcima kontinentalnog tipa propolisa iz Italije, što potvrđuje geografsku specifičnost svakog pojedinog uzorka kontinentalnog tipa propolisa. ¹⁴⁰ CAPE kao jedan od najvažnijih polifenolnih spojeva povezanih s antioksidacijskom aktivnošću propolisa, u našim je uzorcima detektiran i kvantificiran u koncentracijama od 1,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u 40 %-tnom etanolu do 261,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u 70 %-tnom etanolu. Vrijednosti %RSD pojedinih rezultata pri određivanju sadržaja polifenola tijekom istraživanja često su iznosile više od 10 % (Tablice 14, 15, 16, 17 i 18). To je bilo očekivano budući da je ponovljivost pripreve uzorka kritični korak metode zbog kompleksnosti i heterogenosti propolisa te uloge određenih faktora u postupcima pripreve ekstrakata (ekstrakcijska tehnika, otapalo, nosač, koncentracija, vrijeme trajanja postupka). U prilog tome ide i mogućnost usporedbe dobivenih rezultata za KR, GN i CAPE (Tablica 15) s rezultatima studije Jerkovića i suradnika u kojoj su analizom etanolnih ekstrakata uzoraka propolisa s područja kontinentalne i primorske regije Republike Hrvatske primjenom metode HPLC-DAD dobivene vrijednosti za KR od 990 do 1355 mg L^{-1} , za GN od 1170 do mg L^{-1} te za CAPE od 263 do 486 mg L^{-1} . ¹²

Pokusi koji su provedeni u ovom istraživanju ukazali su da je najučinkovitiji postupak pripreve uzoraka sirovog propolisa primjena 70 %-tnog etanola/UPE/1 h/sobna temperatura (Tablica 15 i Slika 12).

Imajući u vidu dokazanu biološku aktivnost u vodi topljivog derivata propolisa u kojem je ekstrakt propolisa kompleksiran s L-lizinom postupkom liofilizacije i njegovu topljivost u vodi¹⁹ te brojna istraživanja inkapsulacije ugljikohidratima,^{117,122,123,124,125} L-lizin te ugljikohidrati fruktoza, dekstroza, maltodekstrin i HP- β -CD prepoznati su kao sredstva koja bi mogla poboljšati topljivost slabo polarnih molekula polifenola. Kompleksi EEP-a s L-Lys, FRC, DX i MD nisu se u ovom istraživanju pokazali učinkovitim u postupku dobivanja u potpunosti topljivog liofiliziranog osuška (Tablica 16). Međutim, prinosi odabranih polifenola dobiveni analizom kompleksa EEP s HP- β -CD pokazuju da HP- β -CD, u odnosu na L-lizin i ostale ugljikohidrate, najučinkovitije inkapsulira polifenole iz ekstrakta propolisa (Slika 19).

Uz postizanje dobrih prinosa odabranih polifenola ekstrakcijom iz uzorka sirovog propolisa, jedan od ciljeva optimizacije postupka pripreme uzorka bila je priprava ekstrakata s minimalnim utroškom otapala i upotrebom netoksičnih kemikalija. Za razliku od kompleksa s L-Lys, priprava kompleksa s HP- β -CD-om ne uključuje upotrebu nepolarnih organskih otapala poput n-heksana, etilacetata, dietiletera i sl. Nadalje, HP- β -CD je dokazano neškodljiva tvar¹¹⁵ i kao takva pogodna za upotrebu u pripravcima za oralnu primjenu. Uloga HP- β -CD kao i specifičnost 20 mg mL⁻¹ vodene otopine HP- β -CD u inkapsulaciji odabranih polifenola potvrđena je u ovom radu dobivanjem najvećih prinosa polifenola te brzom i dobrom topljivošću liofilizata u vodi (Tablica 16 i 18, Slika 19 i 21). Međutim, rezultati ukazuju na jedan izuzetak, a to je CA koja u pripravku bez HP- β -CD-a ima više od 20 puta veću koncentraciju u odnosu na kompleks s HP- β -CD-om (Tablica 17). Ovaj rezultat ne potkrijepljuje rezultate iz rada¹²⁵, u kojem se vrijednost koncentracije CA u kompleksu brazilskog zelenog propolisa s HP- β -CD (42 μ g mL⁻¹) i u vodenom pripravku bez HP- β -CD (52 μ g mL⁻¹) nije značajnije promijenila. Spomenuta usporedba s CA samo potvrđuje činjenicu da je teško uspoređivati rezultate različitih studija zbog ovisnosti sastava propolisa o vegetaciji određenog geografskog područja te klimatskim zonama. Treba naglasiti da je bez obzira na CA, kompleksiranjem EEP-a s HP- β -CD postignuta ekstrakcija ostalih slabije polarnih spojeva odnosno PC, KR, GN i CAPE, odnosno da je dobiven kompleks pogodan za provedbu istraživanja odabranih polifenola propolisa u uvjetima simulirane GID *in vitro* čime je zadovoljen jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja. Osim navedenoga, prednost pripreme kompleksa s HP- β -CD-om je što je HP- β -CD prikrio gorki okus i intenzivan miris propolisa, a time je obrada propolisa na opisani način prihvatljivija za oralnu primjenu od alkoholne

otopine propolisa te istraživanja provedena u ovom radu mogu imati i znanstveni značaj za istraživanja *in vivo* u životinja i ljudi.

Validacijska procjena metode RP-HPLC-PDA optimizirane za određivanje odabranih polifenola PC, GN, KR, CA i CAPE u pripravcima propolisa provedena je kako bi se ispitala prikladnost i izdržljivost analitičke metode. Linearnom regresijom masenih koncentracija odabranih polifenola u određenom ekstraktu propolisa i omjera površina kromatografskog pika svakog pojedinog ciljnog analita potvrđeni su visoki stupnjevi linearnosti, $R_p > 0,99$ i $p_{\text{regresije}} < 0,001$, dokazano je da nema ekstremnih odstupanja te da odsječak na y-osi nije statistički značajan, $p_{\text{odsječak}} > 0,05$ (Tablica 20). Statistička usporedba kalibratora standardnih otopina analita sa standardnim otopinama analita obogaćenog uzorka Du propolisa (Tablica 20) ukazuje da nema značajnog utjecaja matrice (ANOVA, $p > 0,05$). Rezultati ponovljivosti, srednje ponovljivosti i ponovljivosti pripreve uzoraka propolisa (Tablica 21) dokazuju preciznost metode, a dobra selektivnost potvrđena je reprezentativnim kromatogramima kompleksa EESS polifenola i HP- β -CD-a, cijepljenog i necijepljenog kompleksa uzorka Du i HP- β -CD te kompleksa uzoraka Vlp i Zg propolisa s HP- β -CD (Slike 22 – 24). Vrednovanjem osjetljivosti metode RP-HPLC-PDA dobiveni su visoki analitički povrati te niske granice detekcije i određivanja svakog pojedinog polifenola (Tablica 22, Slika 24). Rasponi granica detekcije i određivanja odabranih polifenola potvrđeni ovom metodom usporedivi su sa rasponima navedenim u studijama Pellatija i suradnika (GD od 1,6 do 4,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GO od 2,6 do 7,7 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ i Seraglia i suradnika (GD od 0,03 do 1,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GO od 0,20 do 3,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$).^{9,140} Vrijednosti analitičkih povrata (od 81 % do 108 %) s vrijednostima navedenim u studiji Luo i suradnika pri ispitivanju polifenola u dodatcima prehrani bogatim propolisom (od 84 % do 119 %).¹⁹⁷ Sve te usporedbe sa sličnim analitičkim metodama i dobiveni validacijski rezultati, upućuju da je optimizacijom metode RP-HPLC-PDA postignut značajni doprinos u osjetljivosti i pouzdanosti metode u svrhu njene namjene, istovremenog određivanja pet odabranih polifenola u etanolnim i vodenim ekstraktima te u pripravcima kompleksa propolisa.

5.2. Biodostupnost odabranih polifenola u uvjetima *in vitro* simulirane GID

5.2.1. Biodostupnost odabranih polifenola iz kontinentalnog tipa propolisa

Istraživanjem biodostupnosti tijekom simulacije probave *in vitro* obuhvaćena su dva kontinentalna uzorka propolisa, iz okolice Valpova (Vlp) i okolice Zagreba (Zg) u obliku oralnog pripravka, vodene suspenzije liofiliziranog osuška kompleksa 70 %-tnog etanolnog ekstrakta propolisa i vodene otopine 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina koncentracije 20 mg mL⁻¹, iz razloga kako bi se utvrdilo koliki utjecaj ima podrijetlo (izvor) propolisa na stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost pojedinačnih polifenola. Pokusi su provedeni i na vodenoj suspenziji liofiliziranog osuška kompleksa 70 %-tnog etanolnog ekstrakta smjese standarda odabranih polifenola i vodene otopine 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina koncentracije 20 mg mL⁻¹, kako bi se ispitao utjecaj sinergije svih analiziranih polifenola bez matrice propolisa, odnosno oslobađanje ili zadržavanje spojeva unutar matrice uzorka u usporedbi sa smjesom standarda bez kompleksne matrice prolaskom kroz GID.

Kako bi određeni spoj imao dobru bioraspoloživost, mora imati dobru biodostupnost u crijevu, a s obzirom da je apsorpcija polifenola niska (od 2 do 20 %) ⁰, nužna su istraživanja utjecaja probave na njihovu stabilnost za daljnje razumijevanje apsorpcije i metabolizma. S obzirom da prema trenutno dostupnim objavljenim istraživanjima ne postoji studija kojom je istraživana stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost PC, KR, GN, CA i CAPE u kompleksu EEP-a i HP- β -CD-a, naši su rezultati uspoređeni sa sličnim studijama u kojima su istraživani polifenoli u različitim ekstraktima propolisa, meda, peluda, ljekovitog bilja ili hrane.

Kako bi metoda *in vitro* opisana ovom studijom bila široko primjenjiva i na ljudski i na životinjski organizam, uvjeti i protokol metode odabrani su na temelju standardizirane metode COST INFOGEST. ¹⁸⁷ Enzimi korišteni u metodi opisani su upotrebljavajući sustavnu nomenklaturu i razvrstavanje enzima prema zahtjevima Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (eng. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB), a opisana metoda dopušta nabavu enzima od prikladnih dobavljača (α -amilaza EC 3.2.1.1, pepsin, svinjski EC 3.4.23.1, pankreatin, iz svinjske gušterače EC 232-468-9, goveđa žuč, suha nefrakcionirana EC 232-369-0). Enzim lipaza je prema standardiziranoj metodi predviđen za probavu *in vitro* u različitim matricama hrane, no s obzirom da probavom

in vitro u ovom istraživanju nije obuhvaćena probava masti, a osim toga nije široko dostupan, u ovom istraživanju je izostavljen, iako bi bilo zanimljivo istražiti i njegov utjecaj.

U mnogim dosadašnjim istraživanjima biodostupnosti simulacijom probave *in vitro* oralna faza nije uključena, kako zbog neutralnog pH, tako i zbog kratkog zadržavanja hrane u ovoj fazi te nije očekivano da će doći do značajnijeg otapanja spojeva iz hrane.^{9,176,177,181,182,198} Međutim, zahtjev standardizirane metode u radu Brodkorb i suradnika je da je bitno uključiti i ovu fazu, bez obzira radi li se o tekućem ili krutom uzorku koji se probavlja, stoga je sastavni dio ovog istraživanja.¹⁸⁷

Jednokratna doza kompleksa propolisa Vlp i Zg za GID *in vitro* u NU određena je temeljem dostupnih podataka o preporučenom dnevnom unosu ekstrakta propolisa u komercijalnim pripravcima za oralnu primjenu. Koncentracije polifenola u NU kompleksa EESS-a pripravljene su na način da odgovaraju približnim vrijednostima koncentracija u EEP-ima kako bi se pratila biodostupnost polifenola bez utjecaja matrice.

Simulacijom probave *in vitro* u različitoj hrani ili biljnim ekstraktima ustanovljeno je nekoliko modela simulacije biodostupnog udjela polifenola na razini faze tankog crijeva. Među njima se ističe model s filtracijom, kojim se odvajaju topljivi spojevi što ovu frakciju čini dostupnom za apsorpciju.¹⁹⁹ Za razliku od filtracije, uobičajeni su i modeli s centrifugiranjem i dijalizom, koji su primjenjeni u ovom istraživanju. U modelu s centrifugiranjem (IF-C), uzorak iz crijevnog faze je centrifugiran te je odvojen nadtalog koji predstavlja topljive spojeve (koji potencijalno mogu biti apsorbirani) od taloga s netopljivim, tj. neapsorbirajućim spojevima. U modelu s dijalizom, dijalizibilni udio (Din) predstavlja količinu uzorka koja je prošla kroz polupropusnu membranu i dostupna je za apsorpciju iz tankog crijeva, tj. bioraspoloživa je, dok s druge strane udio izvan membrane (Dout) čini količinu uzorka koji se probavlja dalje u debelom crijevu.

Svi polifenoli pokazali su vrlo veliku stabilnost, (od 75 % do 123 %) nakon OF i GF, osim polifenola KR koji je imao statistički značajno niže koncentracije u odnosu na NU, i u kompleksima uzoraka i smjese standarda (Tablica 24). Ukupno gledano, istraživani polifenoli u kompleksu EEP-a i HP- β -CD, tako i u kompleksu EESS-a sa HP- β -CD-om pokazali su i veliku intestinalnu stabilnost. Rezultati pokazuju da promjene u koncentracijama polifenola, kompleksiranih s HP- β -CD-om, u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava (OF, GF i IF-C) nisu statistički značajne te analizirani polifenoli u tanko crijevo uglavnom dospijevaju u nepromijenjenom obliku. Ipak, u fazi IF-C kompleksa smjese standarda opažene su razlike u

koncentraciji polifenola PC, GN i CA u odnosu na NU (Tablica 23) koje su i statistički značajne ($p < 0,05$).

Tijekom simulacije probave *in vitro* provedene ovim istraživanjem PC je pokazao najveću gastrointestinalnu stabilnost, jer se koncentracija ovog polifenola tijekom OF, GF i IF-C u sva tri uzorka nije znatno mijenjala (Tablica 24), no rezultat za uzorak Zg treba uzeti s rezervom jer je analizom frakcija GF, IF-C, Din i Dout na vremenu zadržavanja PC izašao dvostruki pik, koji se ne pojavljuje u uzorku Vlp i std mix u jednakim uvjetima. Moguće je da se hidrolizom u želučanim uvjetima oslobodio novi spoj jednake polarnosti kao i PC te je na istom vremenu zadržavanja (t_R) eluirao s kolone. Iz toga razloga koncentracija PC u uzorku Zg u želučanoj i crijevnoj fazi s oba modela nije usporediva, ali otvara mogućnost detaljnijeg istraživanja drugim metodama i tehnikama. Međutim, s druge strane navedeni rezultat dodatno potvrđuje mnogobrojne dosadašnje studije o raznolikosti i kompleksnosti sastava uzoraka propolisa, koliko je nepredvidiva analiza uzoraka propolisa u ovim uvjetima pri čemu iz neutralnog pH oralne faze, uzorak prolazi jako kisele uvjete u GF, a nakon toga se pH drastično promijeni na blago lužnati, stoga je moguće da je tijekom ovih faza oslobođen spoj koji u NU uzorku nije prisutan, a nije prisutan niti u uzorku Vlp tijekom svih faza GID i bitno ga je spomenuti.

Flavonol galangin je u modelu pokusa IF-C pokazao izrazitu stabilnost (vrijednosti oko 100 %) u uzorcima Zg i Vlp, te je koncentracija GN u IF-C za oba uzorka porasla u odnosu na GF, dok je uzorak sa smjesom standarda pokazao smanjenje u koncentraciji nakon IF-C, u odnosu na NU ($p = 0,0015$). Promatrajući model s dijalizom, koncentracija GN u Dout fazi ostala je na razini GF za sva tri uzorka, dok je koncentracija u Din vrlo niska te biodostupnost, odnosno dijalizibilnost GN iznosi (između 0,8 i 2 %).

Za CA je u uzorku std mix izmjerena najniža koncentracija, a stabilnost joj je nakon IF-C iznosila 28, %, a nakon Dout 31 % pri čemu je pokazala najveću nestabilnost od svih analiziranih polifenola. Međutim, u uzorcima propolisa Vlp i Zg CA je pokazala veću stabilnost te gledajući koncentracije IF-C i Dout u odnosu na NU, nije bilo statistički značajnih razlika ($p > 0,05$). U frakciji Din nije bilo moguće odrediti njenu koncentraciju, te su za prikaz u Tablicama 23 i 24 te na Slikama 29 B i 33 vrijednosti za koncentraciju CA označene s nulom.

Kod CAPE, kao derivata kavene kiseline veće hidrofobnosti, primijećen je stabilan profil nakon faze u tankom crijevu te se koncentracija CAPE se u odnosu na NU tek neznatno

mijenjala ($p > 0,05$). Rezultati za CAPE (Tablica 25) pokazali su da je biodostupnost u smjesi standarda, poput CA, znatno niža nego u uzorcima i iznosi 67 % dok je u uzorcima Zg i Vlp izmjerena biodostupnost CAPE više od 100 % (104 %, i 112 %.)

Koncentracija KR u fazi IF-C se u odnosu na NU nije statistički značajnije mijenjala ($p > 0,05$) za sva tri uzorka, stoga je temeljem dobivenih rezultata utvrđeno da su lipofilniji spojevi poput flavanona PC i flavona KR imali najbolji profil biodostupnosti tj. oslobađanja iz matrice u oba modela, što je u skladu s objavljenim studijama.^{154,163}

Ciklodekstrini (CD) stvaraju inkluzijske komplekse s lipofilnim molekulama bez nastajanja kovalentnih veza, a molekule unutar šupljine su u dinamičkoj ravnoteži sa slobodnim molekulama u otopini, te je utvrđeno da je kompleks EEP-a i HP- β -CD-a stabilan na uvjete OF i da u ovoj fazi neće doći do hidrolize α -amilazom. S obzirom na to da su molekule polifenola stabilne u kiselim uvjetima, promatrajući GF, kompleks je pokazao stabilnost, odnosno razlike u koncentracijama svih analita u GF u odnosu na OF se nisu statistički značajnije promijenile ($p > 0,05$). U crijevnoj fazi polifenoli su ostali stabilni te nije došlo do razgradnje zbog utjecaja blago lužnatog pH oko 7,5-8,0 što pokazuje da molekule polifenola u kompleksu tijekom sve tri faze GID-a imaju kontinuiranu stabilnost.

Unatoč relativno visokim vrijednostima biodostupnih polifenola nakon IF-C, njihova dijalizibilnost kroz polupropusnu membranu (u frakciji Din) pokazala se vrlo niska, a veliki udio biodostupnih polifenola dobiven je u frakciji Dout. Razmatrajući dobivene i objavljene rezultate za model s dijalizom, potrebno ih je vrlo oprezno proučavati s obzirom da mnogi parametri poput dimenzija molekule, stupnja polimerizacije, prisutnosti šećera u molekuli, veličina pora membrane i sl. mogu promijeniti količinu spojeva dostupnih za prolazak kroz membranu, stoga je moguće da će se ovi neapsorbirani spojevi probavljati i metabolizirati crijevnom mikroflorom i tako povećati bioraspoloživost i bioaktivnost. Prolazak kroz biološke membrane omogućen je samo otopljenim molekulama, a u ovom radu sve ispitivane molekule bile su slabo topljive u vodi s topljivošću manjom od 1 mg mL^{-1} te je za poboljšanje topljivosti istraživanih polifenola odabran upravo oligosaharid HP- β -CD. Usprkos poboljšanoj topljivosti ciljnih molekula formiranjem kompleksa s HP- β -CD-om, nastali kompleks u primjenjenim uvjetima nije bio pogodan za prolazak kroz polupropusnu membranu. Vezano uz navedeno, potrebno je uzeti u obzir i fizikalno-kemijska i biološka svojstva ciklodekstrina. Naime, zbog cikličke strukture, CD su otporniji na enzimsku i neenzimsku hidrolizu u odnosu na linearne dekstrine, međutim hidroliza α -amilazom iz sline

se brže odvija ukoliko je CD u slobodnom obliku u odnosu na kompleks, te ovisi o veličini šupljine. Osim toga, ciklodekstrini kao hidrofilne molekule, s topljivošću u vodi većom od 600 mg mL^{-1} , velike molekulske mase (oko 1000 - 2000 Da) s brojnim H-vezama kao donorima i akceptorima nisu pogodni za apsorpciju iz probavnog sustava u krvotok, a bioraspoloživost im je ispod 4 %.^{115,116} Temeljem navedenoga, ciljne molekule moraju biti oslobođene iz kompleksa prije apsorpcije, a glavni poznati mehanizam otpuštanja ciljne molekule iz otopljenih kompleksa je razrjeđenje vodene otopine kompleksa. No s druge strane, razrjeđenje otopine kompleksa može biti vrlo ograničavajuće u slučaju oralne primjene kompleksa zbog količina CD-a većih nego li su potrebne za otapanje ciljne molekule te je daljnje istraživanje potrebno usmjeriti na najpovoljniju količinu CD-a kako bi se dobio optimalan odnos količina uzorak/CD prikladan za oralnu primjenu.^{200,201}

U uvjetima *in vitro* polupropusna membrana za dijalizu radi na principu propuštanja molekula na temelju njihove veličine, a ne hidrofilnosti/lipofilnosti. S obzirom na to da hidrofilne molekule HP- β -CD-a vežu (kompleksiraju) molekule polifenola različitom jačinom, ovisno o strukturi i polarnosti molekula, potencijalno je moguće da su pojedine molekule snažnije vezane s HP- β -CD-om te se teže otpuštaju i zbog veličine ne uspijevaju proći kroz membranu, dok su slabije vezane molekule lakše otpuštene i jednostavnije prolaze kroz membranu.

Iako su dobivene vrijednosti za biodostupnost polifenola u frakciji Din vrlo niske, ipak se može primijetiti jednaki trend kao u prvom modelu te je udio biodostupnih polifenola najveći za polifenole PC (od 9 % do 22 %) i KR (od 10 % do 26 %). Biodostupnost GN i CAPE u frakciji Din bila je jako niska, a vrijednosti koncentracija CA u dijalizatu (Din) bile su izvan mjernog područja metode. Gayoso i suradnici izvijestili su da su u njihovoj studiji također dobivene vrlo niske koncentracije analiziranih fenolnih kiselina u dijalizatu nakon dijalize kroz polupropusnu membranu, među kojima je bila i CA.²⁰² Pretpostavka je da je niska biodostupnost, odnosno dijalizibilnost CA u Din zbog moguće konjugacije s probavnim enzimima, čime se molekulska masa značajno poveća te molekula više ne uspijeva proći kroz membranu.¹⁷⁶

Ukupni iskoristivi polifenoli određeni temeljem zboja frakcija Din i Dout uspoređivi su s biodostupnim polifenolima nakon faze IF-C (Tablica 25), što upućuje na to da je s oba modela udio polifenola, koji je potencijalno bioraspoloživ, sličan

Našim istraživanjem pokazano je da su ispitivani polifenolni spojevi u kompleksu propolis-HP- β -CD stabilni, odnosno da tijekom prolaska kroz GIT ne dolazi do gubitka polifenola u uzorcima Zg i Vlp, dok su rezultati za stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost u smjesi standarda pokazali da, iako nema utjecaja mogućih interferencija zbog kompleksne matrice, tijekom faza GID-a postoji određeni gubitak u odnosu na NU. Ustanovljeno je da je matrica propolisa imala snažan utjecaj na stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost polifenola, jer je „ponašanje“ polifenola prolaskom kroz GIT u kompleksu sa smjesom standarda i s uzorcima različito, odnosno u kompleksima uzorka propolisa i ciklodekstrina biodostupnost je za sve analizirane polifenole bila znatno veća u odnosu na kompleks smjese standarda, bez obzira na istraživani model crijevne faze. Ovime je potvrđena prethodno postavljena hipoteza da će matrica propolisa imati veliki utjecaj na oslobađanje polifenolnih spojeva, u ovom slučaju matrica je imala vrlo povoljan utjecaj na stabilnost, a time i na biodostupnost polifenola. Osim toga, ova spoznaja može značiti i da je priprava kompleksa uspješno provedena, da je postignuta zadovoljavajuća topljivost u probavnim tekućinama te da nema drugih interferencija koje bi ometale prolazak kroz GIT.

Proučavanje i usporedba stabilnosti smjese standarda u odnosu na kompleksne uzorke poput propolisa s jedne strane može rezultirati preciznijim rezultatima s obzirom na to da se pristupa jednostavnijim modelom uzorka (bez matrice), a pri tome se izbjegnu interferencije zbog različitih faktora koji se mogu naći pri istraživanjima s uzorkom. S obzirom na to da je biodostupnost polifenola dobivena za oba uzorka propolisa slična, a s druge strane u odnosu na smjesu standarda različita, potvrđena je pouzdanost provedbe pokusa temeljem dobivenih i statistički obrađenih rezultata.

Usporedbom biodostupnosti polifenola u uzorcima propolisa različitog podrijetla u fazi tankog crijeva IF-C, ne postoje statistički značajne razlike između propolisa Vlp i propolisa Zg ($p > 0,05$). Za razliku od IF-C, u modelu crijevne faze s dijalizom, u frakciji Din, razlike u biodostupnosti svih analiziranih polifenola između propolisa Zg i propolisa Vlp su statistički značajne ($p < 0,05$). Slijedom dobivenih podataka dokazano je da različita lokacija istog geografskog područja uzorka sirovog propolisa ne utječe na biodostupnost istraživanih polifenola u modelu faze tankog crijeva s centrifugiranjem, međutim lokacija je imala značajni utjecaj na biodostupnost nakon dijalize.

U literaturi, među mnogim studijama u kojima je proučavana biodostupnost polifenolnih spojeva temeljem simulirane probave *in vitro*, postoje značajne razlike u

parametrima poput žvakanja, mehaničkih pokreta tijekom želučane faze, pH vrijednosti pojedine faze i utjecaja enzima u razgradnji matrice i dijalizibilnosti polifenola što uvelike utječe na oslobađanje polifenola iz matrice, a što posljedično otežava usporedbu rezultata među studijama. Osim toga, ne postoji jednoznačnost u mjernim jedinicama korištenim za izražavanje rezultata, što doprinosi heterogenosti prikazanih rezultata. Uz navedeno, u određenim slučajevima modelom probave *in vitro* nije moguće u potpunosti predvidjeti biodostupnost pojedinih polifenola, zbog odsutnosti faze fermentacije u debelom crijevu gdje polifenoli najvećim dijelom metaboliziraju.²⁰² U našem istraživanju ključni faktori kod određivanja biodostupnosti polifenola pokazali su se model i protokol simulirane probave *in vitro* te način prikazivanja rezultata.

Općenito gledajući, ciklodekstrini povećavaju topljivost slabo topljivih spojeva u vodi, međutim utjecaj na njihovu sposobnost prolaska kroz biološke membrane može biti vrlo promjenjiv, stoga se može zaključiti da ciklodekstrini, a u ovom slučaju HP- β -CD, i poboljšavaju oralnu biodostupnost, ali je u nekim slučajevima i ograničavaju.

Novorazvijenom metodom RP-HPLC-PDA s izokratnim eluiranjem, koja uključuje kolonu C₁₈ dimenzija 150 x 4,6 mm; 3 μ m, primjenom nosača HP- β -CD-a te načinom pripreme uzorka koji uključuje liofilizaciju, u ovom je istraživanju potvrđena bolja biodostupnost u modelu GID-a *in vitro* s centrifugiranjem u odnosu na model difuzije. Međutim, budući da slična istraživanja nisu provedena, ovakav originalni pokus nije moguće usporediti s rezultatima drugih, ali su svi dobiveni rezultati vjerodostojni budući da su dobiveni suvremenim, pouzdanim, validiranim postupcima i obrađeni prihvatljivim statističkim metodama. Ovo istraživanje daje nove spoznaje koje se mogu proširiti daljnjim istraživanjima poput istraživanja biodostupnosti polifenola optimizacijom količine ciklodekstrina i omjera propolis/ciklodekstrin, probavom koja uključuje i sastojke hrane te određivanjem biodostupnosti i u debelom crijevu.

5.2.2. Biodostupnost glavnih skupina polifenola iz kontinentalnog tipa propolisa

Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da biološka aktivnost propolisa uvelike ovisi o sinergiji njegovih sastavnica, a u ovom istraživanju je osim pojedinačnih sastavnica, ispitan i utjecaj simulirane probave *in vitro* na stabilnost, biodostupnost i dijalizibilnost glavnih skupina polifenola u kompleksima uzoraka propolisa s područja Zagreba (Zg) i Valpova (Vlp) s HP- β -CD-om te u kompleksu smjese standarda i HP- β -CD-a (std mix). Uzorak std mix je smjesa odabranih standarda, koncentracijski pripravljena i prilagođena koncentracijama istraživanih analita u uzorcima kompleksa EEP-a i HP- β -CD-a, stoga nije za očekivati da će se sadržaj ukupnih polifenola u NU uzorku std mix moći usporediti s kompleksima uzoraka propolisa, jer je sastav propolisa puno složeniji te sadržava i druge fenole, odnosno flavone, flavonole, flavanone i dihidroflavonole koji također daju odziv ovim metodama, čime je u uzorcima Vlp i Zg dobiven veći sadržaj. Međutim, uzorak std mix poslužio je za usporedbu odnosa koncentracija polifenola iz GID faza u odnosu na NU te procjenu utjecaja matrice na TP, TFF i TFD.

Sadržaj TP-a inkluzijskog kompleksa etanolnog ekstrakta uzoraka kontinentalnog propolisa i vodene otopine HP- β -CD-a za uzorak Vlp $15477,22 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ i uzorak Zg $20104 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ dobiven u ovom radu usporediv je s rezultatima za TP u etanolnim ekstraktima propolisa Vlp i Zg ($21223,91 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$ i $21715,81 \mu\text{g PC:GN mL}^{-1}$) dobivenim u radu Perak Junaković i suradnika i etanolnim ekstraktima uzoraka sirovog propolisa iz okolice Siska u radu Šuran i suradnika u kojem je dobiven sadržaj ukupnih fenola $15920 \mu\text{g GA mL}^{-1}$.^{1,7,183} S obzirom na navedeno, inkapsulacijom s HP- β -CD-om nije došlo do gubitka analita, a HP- β -CD je učinkovito ekstrahirao analite te je postupak pripreve kompleksa osigurao visoki sadržaj ukupnih polifenola u krajnjem produktu, liofiliziranom osušku, otopljenom u vodi.

Analizom ukupnih fenola u frakcijama GID-a dobiveni rezultati pokazuju da su ukupni fenoli tijekom GID-a stabilni, a povećanje sadržaja nakon faze tankog crijeva u odnosu na NU, upućuje na visoku biodostupnost, odnosno da su polifenoli učinkovito otpušteni iz matrice. Udio biodostupnih TP u frakciji Din bio je statistički značajno niži u odnosu na IF-C ($p < 0,05$) za sva tri kompleksa. Za razliku od frakcije Din kod određivanja pojedinačnih polifenola metodom HPLC, u kojoj je dijalizibilnost polifenola bila najviše

26 % (za KR u kompleksu propolisa Vlp), dijalizibilnost TP-a bila je od 54 % u kompleksu Zg do 100 % u smjesi standarda.

Analizom sadržaja ukupnih flavona i flavonola primjećena je veća nestabilnost tijekom GF GID-a, sa statističkom značajnosti u uzorku Zg i std mix ($p < 0,05$), međutim u odnosu na NU nije bilo statistički značajnih razlika ($p > 0,05$), čime je dokazana stabilnost TFF-a tijekom GID. Udio biodostupnih TFF-a u sva tri kompleksa bio je visok i iznosio je od 65 % do 90 % promatrajući model s centrifugiranjem. U modelu s dijalizom dobivena je statistički značajno niža vrijednost biodostupnih TFF-a u uzorku Zg ($p < 0,05$).

Sadržaj TFD-a u uzorcima NU bio je vrlo sličan za sva tri uzorka te nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Dok nakon OF u kompleksima uzoraka Zg i Vlp sadržaj TFD-a tek neznatno poraste, u uzorku std mix sadržaj se poveća sa $426,96 \mu\text{g PC mL}^{-1}$ na $1060,17 \mu\text{g PC mL}^{-1}$. Nakon GF koncentracije TFD-a u odnosu na početni NU uzorak znatno porastu, te u ovim kiselim želučanim uvjetima dolazi do povećanog oslobađanja flavanona i dihidroflavonola iz matrice propolisa. Crijevna faza IF-C pokazala je daljnje povećanje koncentracije TFD-a za komplekse, međutim u uzorku std mix u ovoj frakciji dolazi do stagnacije (vrlo neznatno povećanje u koncentraciji u odnosu na GF). Crijevna frakcija Din u uzorku std mix pokazuje vrlo niske koncentracije tj. nisku dijalizibilnost TFD-a, no u kompleksima je situacija obrnuta, te je za uzorke Zg i Vlp sadržaj TFD-a u IF-C i Din vrlo sličan, a osim toga nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Osim što su koncentracije TFD-a u frakciji Din visoke, frakcija Dout također sadržava veliki udio biodostupnih spojeva. Naime, s obzirom da je u frakciji Din uzorka std mix detektirano vrlo malo TFD-a, koncentracija u frakciji Dout pokazuje da je većina flavanona i dihidroflavonola u ovom istraživanju ostala izvan membrane za dijalizu, nije došlo do prolaska kroz membranu.

Povećanje udjela biodostupnih TP-a i TFD-a tijekom GF i IF-C, u odnosu na NU, upućuje na uspješno oslobađanje polifenola iz matrice prolaskom kroz GIT. U studiji Ozdala i suradnika u kojoj je istraživana biodostupnost ukupnih fenola (TP) i ukupnih flavonoida (TF) sirovog (nativnog) propolisa također je potvrđeno povećanje u sadržaju TP-a i TF-a tijekom GF i IF, međutim u odnosu na rezultate za TP i TF u EEP-u neprobavljenog uzorka, biodostupnost je bila niska, stoga je studijom zaključeno da je za povećanje biodostupnosti polifenola uzorak propolisa učinkovitije pripravljati u obliku ekstrakata.¹⁴⁸

U našem istraživanju dokazano je da je, osim učinkovite pripreve uzoraka propolisa u obliku ekstrakta, kompleksiranjem EEP-a i nosača HP- β -CD-a dobiven stabilan kompleks otporan na kiselinsko-bazne uvjete GID-a, interakcije s enzimima i ostalim sastojcima probavnih tekućina.

§ 6. ZAKLJUČAK

1. Optimalni uvjeti tekućinskokromatografske metode namijenjene za istovremeno određivanje pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline (metoda RP-HPLC-PDA) uključuju primjenu kolone s obratnom nepokretnom fazom oktadecilsilikagel dimenzija 150 x 4,6 mm i punilom veličine čestica 3,5 μm s izokratnim eluiranjem ciljnih analita pokretnom fazom koja sadržava volumni udio od 45 % komponente A (smjesa vode u 97 %-tnom, metanola u 2 %-tnom i formijatne kiseline u 1 %-tnom volumnom udjelu) i 55 % komponente B (metanol) uz detekciju na 290 nm detektorom s nizom fotodioda.
2. Najučinkovitiji postupak pripreve uzoraka sirovog propolisa za liofilizaciju razvijen u ovom istraživanju je ekstrakcija 70 %-tnim etanolom potpomognuta ultrazvukom u uvjetima sobne temperature i jednosatnog trajanja ekstrakcije.
3. Ugljikohidrat, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin koncentracije 20 mg mL⁻¹ pokazao se u ovom istraživanju kao najučinkovitije sredstvo za poboljšanje topljivosti pinocembrina, galangina, krizina i feniletil estera kavene kiseline u vodenoj suspenziji liofiliziranog osuška dok je topljivost kavene kiseline bila višestruko veća bez ciklodestrina.
4. Tekućinskokromatografskim analizama odabranih polifenola i spektrofotometrijskim analizama glavnih skupina polifenola potvrđena je učinkovitost liofiliziranog osuška kompleksa 70 %-tnog etanolnog ekstrakta propolisa i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina koncentracije 20 mg mL⁻¹ u odnosu na 70 %-tni etanolni ekstrakt propolisa.
5. Vodena suspenzija liofiliziranog osuška kompleksa 70 %-tnog etanolnog ekstrakta propolisa i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina koncentracije 20 mg mL⁻¹ pogodan je za istraživanja *in vitro* i *in vivo* i kandidat je za oralne farmaceutske pripravke jer ne sadržava alkohol i toksične tvari.

6. Sveobuhvatnim validacijskim vrednovanjem novorazvijene metode RP-HPLC-PDA, uzimajući u obzir i kompleksnost te učinkovitost postupaka priprava uzoraka sirovog propolisa, dokazana je pouzdanost metode za kvantitativno i kvalitativno istovremeno određivanje pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline u etanolnim i vodenim ekstraktima te pripravcima kompleksa propolisa i nosača.
7. Novorazvijena metoda RP-HPLC-PDA primjenjiva je za određivanja odabranih polifenola propolisa u oralnim, želučanim i crijevnim frakcijama simulirane probave *in vitro*.
8. Tekućinskokromatografskim analizama frakcija simulirane probave *in vitro* potvrđeno je da nije došlo do razgradnje pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline niti u jednom istraživanom segmentu simulirane probave.
9. Stabilizirajući utjecaj matrice propolisa dokazan je tekućinskokromatografskom analitičkom potvrdom veće stabilnosti, odnosno biodostupnosti, pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline u kompleksima uzoraka propolisa i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina u odnosu na kompleks smjese standarda odabranih polifenola i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina.
10. Pinocembrinu i krizinu, tvarima s najvećom lipofilnošću u odnosu na promatrane polifenole, potvrđen je najbolji profil biodostupnosti i dijalizibilnosti u odnosu na druge istraživane sastavnice.
11. Spektrofotometrijskim analizama određivanja sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavona i flavonola kao i ukupnih flavanona i dihidroflavonola potvrđena je stabilnost i visoka biodostupnost ovih glavnih skupina polifenola u simuliranoj probavi *in vitro*.

12. Tekućinskokromatografskom analizom potvrđeno je da je simulacijom probave *in vitro* provedenom centrifugiranjem u fazi simulirane probave u tankom crijevu postignuta znatno veća biodostupnost pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline u odnosu na model s dijalizom.

13. Istraživanja simulirane probave *in vitro* polifenola provedena na dva različita uzorka kontinentalnog propolisa dokazala su da nema značajne razlike u biodostupnosti pinocembrina, galangina, krizina, kavene kiseline i feniletil estera kavene kiseline s obzirom na lokaciju geografskog izvora propolisa.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratica	Engleski	Hrvatski
HP- β -CD	<i>2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin</i>	2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin
CA	<i>Caffeic Acid</i>	Kavena kiselina
CAPE	<i>Caffeic Acid Phenylethyl Ester</i>	Feniletil ester kavene kiseline
D _{in}	-	Otopina unutar membrane za dijalizu
D _{out}	-	Otopina izvan membrane za dijalizu
EEP	<i>Ethanolic Extract of Propolis</i>	Etanolni ekstrakt propolisa
EESS	-	Etanolni ekstrakt smjese standarda
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	Kemijska ionizacija elektroraspršenjem
GA	<i>Gallic Acid</i>	Galna kiselina
GC	<i>Gas Chromatography</i>	Plinska kromatografija
GD	-	Granica detekcije
GF	<i>Gastric Fraction</i>	Želučana frakcija
GN	<i>Galangin</i>	Galangin
GO	-	Granica određivanja
IF-C	<i>Intestinal Fraction after Centrifugation</i>	Crijevna frakcija nakon centrifugiranja
KR	<i>Chrisin</i>	Krizin
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Tekućinska kromatografija
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>	Tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa
MAE	<i>Microwave-Assisted Extraction</i>	Ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima
MPE	-	Ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima
NU	-	Neprobavljeni uzorak
OF	<i>Oral Fraction</i>	Oralna frakcija
PC	<i>Pinocembrin</i>	Pinocembrin
QC	<i>Quercetin</i>	Kvercetin
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obratnih faza
std mix		Kompleks etanolnog ekstrakta smjese standarda i HP- β -CD-a
TP	<i>Total Phenolics</i>	Ukupni fenoli
TFF	<i>Total Flavones and Flavonols</i>	Ukupni flavoni i flavonoli
TFD	<i>Total Favanones/dihydroflavonols</i>	Ukupni flavanoni/dihidroflavonoli
UAE	-	Ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom
UPE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>	Ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom
UV-DAD	<i>Ultraviolet Diode Array Detector</i>	UV-detektor s nizom fotodioda
UV-PDA	<i>Ultraviolet-Photodiode Array</i>	UV-detektor s nizom fotodioda
UV-Vis spectrophotometry	<i>Ultraviolet-Visible spectrophotometry</i>	UV-Vis spektrofotometrija

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. A. Bertelli, M. Biagi, M. Corsini, G. Bains, G. Cappellucci i E. Miraldi, Polyphenols: From Theory to Practice, *Foods* **10** (2021) 2595.
2. S. Kumar i A. K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview, *Sci. World J.* **2013** (2013) 162750.
3. T. Wang, L. Qing i B. Kai-shun, Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate, *Asian J. Pharm.* **13** (2017) 12-23.
4. Q. Zhang, B. Xing, M. Sun, B. Zhou, G. Ren i P. Qin, Changes in bio-accessibility, polyphenol profile and antioxidants of quinoa and djulis sprouts during in vitro simulated gastrointestinal digestion, *Food Sci. Nutr.* **8** (2020) 4232-4241.
5. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy i L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (2004) 727–747.
6. V. Curti, V. Zaccaria, A. J. Tsetegho Sokeng, M. Dacrema, I. Masiello, Mascar, G. A. o, D'Antona, M. Daglia, Bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1-14.
7. J. Šuran, I. Cepanec, T. Mašek, K. Starčević, I. Tlak Gajger, M. Vranješ, B. Radić, S. Radić, I. Kosalec i J. Vlainić, Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity, *Antioxidants* **10** (2021) 978.
8. B. Yesiltas, E. Capanoglu, E. Firatligil-Durmus, A. E. Sunay, T. Samanci i D. Boyacioglu, Investigating the in-vitro bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion System, *J. Apic. Res.* **53** (2014) 101-108.
9. S. K. T. Seraglio, A. C. Valese, H. Daguer, G. Bergamo, M. S. Azevedo, P. Nehring, L. V. Gonzaga, R. Fett i A. C. O. Costa, Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys, *Food Res. Int.* **99** (2017) 670-678.

10. T. Farooqui i A. Farooqui, Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review, *Curr. Nutr. Food* **6** (2010) 186-199.
11. Y. Ishida, R. Gao, N. Shah et al. 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** (2018) 867–873.
12. I. Jerković, Z. Marijanović, P. M. Kus i C. I. G. Tuberoso, Comprehensive study of mediterranean (Croatian) propolis peculiarity: headspace, volatiles, anti-Varroa-treatment residue, phenolics and antioxidant properties, *Chem. Biodivers.* **13** (2016) 210-218.
13. A. Quatrin, C. Rampelotto, R. Pauletto, L. Maurer, S. Nichelle, B. Klein, R. Rodrigues, M. Maróstica Jr, B. Fonseca, C. Menezes, R. Mello, E. Rodrigues, V. Bochi, T. Emanuelli, Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation, *J. Funct. Foods* **65** (2019) 103714.
14. P. W. G. Smith i A. R. Tatchell (ur.), *Aromatic Chemistry*, Pergamon, 1969, str. 79-104.
15. M. R. Segura Campos (ur.), *Bioactive Compounds*, Woodhead Publishing, 2019, str. 33-50.
16. J. B. Harborne i C. A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochem.* **55** (2000) 481–504.
17. G. R. Beecher, Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake, *J. Nutr.* **3** (2003) 3248-3254.
18. N. Oršolić, L. Šver, S. Terzić, I. Bašić, Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity, *Vet. Res. Commun.* **29** (2005) 575-593.
19. N. Oršolić, I. Bašić Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages, *J. Ethnopharmacol.* **102** (2005) 37-45.
20. W. Y. Huang, Y.Z. Cai, Y. Zhang, Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, *Nutr. Cancer* **62** (2010) 1–20.

21. A. Toiu, A. Mocan, L. Vlase, A. E. Pârvu, D. C. Vodnar, A. M. Gheldiu, C. Moldovan i I. Oniga, Phytochemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and in Vivo Antiinflammatory Activity of Traditionally Used Romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) Benth. ("Nobleman's Beard" - Barba Împăratului), *Front. Pharmacol.* **9** (2018) 7.
22. T. Mašek, N. Perin, L. Racané, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak, M. Perić, M. Matijašić, D. Verbanac, B. Radić, J. Šuran i K. Starčević, Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Different Extracts of Poplar Type Propolis, *Croat. Chem. Acta* **91** (2018) 81-88.
23. N. Oršolić, I. Landeka Jurčević, D. Đikić, D. Rogić, D. Odeh, V. Balta, E. Perak Junaković, S. Terzić i D. Jutrić, Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice, *Antioxidants* **8** (2019) 1-22.
24. A. Scalbert, I. T. Johnson i M. Saltmarsh, Polyphenols: antioxidants and beyond, *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (2005) 215–217,
25. D. M. Kasote, S. S. Katyare, M. V. Hegde i H. Bae, Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications, *Int. J. Biol. Sci.* **11** (2015) 982-991.
26. R. Tsao, Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients.* **2** (2010) 1231–1246.
27. L. Marin, E. M. Miguelez, C. J. Villar i F. Lombo, Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties, *Biomed. Res. Int.* **2015** (2015) 905215.
28. S. P. Kazazić Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **55** (2004) 279-290.
29. R. F. De Souza, E. M. Sussuchi i W. F. De Giovani, Synthesis, electrochemical, spectral and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions, *Synth. React. Inorg. Met-Org Chem.* **33** (2004) 1125-1144.
30. M. Symonowicz i M. Kolanek, Flavonoids and their properties to form chelate complexes, *Food Sci. Biotechnol.* **76** (2012) 35-41.
31. K. B. Pandey i S. I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2** (2009) 270-278.

32. E. Middleton Jr, C. Kandaswami i T. C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacol. Rev.* **52** (2000) 673-751.
33. M. R. De Oliveira, G. C. Ferreira, F. B. Brasil i A. Peres, Pinocembrin suppresses H₂O₂ -induced mitochondrial dysfunction by a mechanism dependent on the Nrf2/HO-1 axis in SH-SY5Y cells, *Mol. Neurobiol.* **55** (2018) 989–1003.
34. B. Pei i J. Sun, Pinocembrin alleviates cognition deficits by inhibiting inflammation in diabetic mice, *J. Neuroimmunol.* **314** (2018) 42–49.
35. R. Tundis, L. Frattaruolo, G. Carullo, B. Armentano, M. Badolato, M. R. Loizzo, F. Aiello i A. R. Cappello, An ancient remedial repurposing: Synthesis of new pinocembrin fatty acid acyl derivatives as potential antimicrobial/anti-inflammatory agents, *Nat. Prod. Res.* **6** (2018) 1–7.
36. L. Estevinho, A. P. Pereira, L. Moreira, L. G. Dias, E. Pereira, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food Chem. Toxicol.* **46** (2008) 3774–3779.
37. S. Y. Zhou, S. X. Ma, H. L. Cheng, L. J. Yang, W. Chen, Y. Q. Yin i Y. M. Shi, Host–guest interaction between pinocembrin and cyclodextrins: Characterization, solubilization and stability, *J. Mol. Struct.* **1058** (2014) 181–188.
38. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, i B. van de Putte, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices in The Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992) 2379–2383,
39. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman i M. B. Katan, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 1242–1246.
40. J. Xiao, S. Sarker, Y. Asakawa (ur.), *Handbook of Dietary Phytochemicals*, Springer, Singapore, 2020, str. 1-40.
41. J. J. Lee, J. H. Lee, N. H. Yim, et al., Application of galangin, an active component of *Alpinia officinarum* Hance (Zingiberaceae), for use in drug-eluting stents, *Sci. Rep.* **7** (2017) 8207.

42. S. Pepeljnjak i I. Kosalec, Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol. Lett.* **240** (2004) 111–116.
43. J. Ouyang, F. Sun, W. Feng, Y. Xie, L. Ren, Y. Chen, Antimicrobial activity of galangin and its effects on murein hydrolases of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) Strain Mu50, *Chemotherapy* **63** (2018) 20-28.
44. Z. Sheng, B. Ai, L. Zheng, X. Zheng, Z. Xu, Y. Shen, Z. Jin, Inhibitory activities of kaempferol, galangin, carnosic acid and polydatin against glycation and α -amylase and α -glucosidase enzymes, *Int. J. Food Sci.* **53** (2017).
45. D. Singh, A. Saini, R. Singh, et al., Galangin, as a potential anticancer agent. *Rev. Bras. Farmacogn.* **32** (2022) 331–343.
46. Y. C Jung, M. E. Kim, J. H. Yoon, P. R. Park, H. Y. Youn, H. W. Lee, J. S. Lee. Anti-inflammatory effects of galangin on lipopolysaccharide-activated macrophages via ERK and NF- κ B pathway regulation, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **36** (2014) 426-32.
47. S. Kumar i K. R. Alagawadi, Anti-obesity effects of galangin, a pancreatic lipase inhibitor in cafeteria diet fed female rats, *Pharm Biol.* **51** (2013) 607-13.
48. G. - L. Chen, S. - G. Chen, Y. - Q. Xie, F. Chen, Y. - Y. Zhao, C. - X. Luo i Y. - Q. Gao, Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 eadible flowers subjected to *in vitro* digestion, *J. Funct. Food* **17** (2015) 243-259.
49. F. H. Balam, Z. S. Ahmadi i A. Ghorbani, Inhibitory effect of chrysin on estrogen biosynthesis by suppression of enzyme aromatase (CYP19): A systematic review, *Heliyon* **6** (2020) e03557.
50. Y. Bae, S. Lee i S. H. Kim, Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **254** (2011) 56-64.
51. B. Yang, J. Huang, T. Xiang, X. Yin, X. Luo, J. Huang, F. Luo, H. Li, H. Li i G. Ren, Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway, *J. Appl. Toxicol.* **34** (2014) 105-12.

52. R. Mani i V. Natesan, Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action, *Phytochemistry* **145** (2018) 187-196.
53. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovanni i R. Masella, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann. Ist. Super.Sanita.* **43** (2007) 348-361.
54. U. Vrhovsek, A. Rigo, D. Tonon i F. Mattivi, Quantitation of polyphenols in different apple varieties, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 6532-6538.
55. N. Shiomi i V. Waisundara (ur.), *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, IntechOpen, London, 2017.
56. H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang i S. M. Lim, Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food Nutr. Res.* **61** (2017) 1361779.
57. N. Kumar i N. Goel, Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnol. Rep. (Amst)* **24** (2019) e00370.
58. S. Venkata, F. ZEEShan, A. K. Luqman, H. Saif, Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids, *Adv. Pharmacol. Sci.* **2015** (2015) 823539.
59. J. Chen, J. Yang, L. Ma, J. Li, N. Shahzad i C. K. Kim, Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids, *Sci. Rep.* **10** (2020) 2611.
60. S. E. Owumi, C. E. Irozuru, U.O. Arunsi, H. O. Faleke i A. K. Oyelere, Caffeic acid mitigates aflatoxin B1-mediated toxicity in the male rat reproductive system by modulating inflammatory and apoptotic responses, testicular function, and the redox-regulatory systems, *J. Food Biochem.* **46** (2022) e14090.
61. N. Oršolić i I. Bašić (ur.), *Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine*, Kerala: Transworld Research Network, 2008, str. 337-376.
62. M. F. Tolba, S. S. Azab, A. E. Khalifa, S. Z. Abdel-Rahman i A. B. Abdel-Naim, Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective and cardioprotective effects, *IUBMB* **65** (2013) 699-709.

63. M. F. Tolba, H. A. Omar, S. S. Azab, A. E. Khalifa, A. B. Abdel-Naim i S. Z. Abdel-Rahman, Caffeic Acid Phenethyl Ester: A review of its antioxidant activity, Protective effects against Ischemia-reperfusion injury and drug adverse reactions, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56** (2016) 2183–2190.
64. P. Zhang, Y. Tang, N.-G. Li, Y. Zhu i J.-A. Duan, Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives, *Molecules* **19** (2014) 16458-16476.
65. L. Lv, H. Cui, Z. Ma, X. Liu i L. Yang, Recent progresses in the pharmacological activities of caffeic acid phenethyl ester, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **394** (2021) 1327-1339.
66. E. L. Ghisalberti, Propolis: A Review, *Bee World*, **60** (1979) 59-84.
67. S. Bogdanov i V. Bankova u S. Bogdanov (ur.): *The propolis book*, 2017, Muehlethurnen, Švicarska.
68. V. R Pasupuleti, L. Sammugam, N. Ramesh, S.H. Gan. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017** (2017) 1259510.
69. M. L. Castro, J. A. Cury, P. L. Rosalen, S. M. Alencar, M. Ikegaki, S. Duarte i H. Koo, *Quim. Nova.* **30** (2007) 1512.
70. T. Jurikova, J. Mlček, J. Sochor i A. Hegedusova, Polyphenols and their Mechanism of Action in Allergic Immune Response, *Glob. J. Allergy* **1** (2015) 37-39.
71. H. Hanieh, V. I. Hairul Islam, S. Saravanan, M. Chellappandian, K. Ragul, A. Durga, K. Venugopal, V. Senthilkumar, P. Senthilkumar i K. Thirugnanasambantham, Pinocembrin, a novel histidine decarboxylase inhibitor with anti-allergic potential in *in vitro*, *Eur. J. Pharmacol.* **814** (2017) 178-186.
72. I. Tlak Gajger, I. Pavlović, M. Bojić, I. Kosalec, S. Srećec, T. Vlainić, J. Vlainić, The Components Responsible for the Antimicrobial Activity of Propolis from Continental and Mediterranean Regions in Croatia, *Czech J. Food Sci.* **35** (2017) 376-385.
73. M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić, M. Baus Lončar, A. Smolčić-Bubalo, Ž. Debeljak i M. Šarić-Medić, Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.* **135** (2011) 772-778.

74. S. I. Falcão, C. Freire i M. Vilas-Boas, A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90** (2013) 1729-1741.
75. A. C. de Groot, Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects, *Dermatitis* **6** (2013) 263-282.
76. J. M. Sforcin i V. Bankova, Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* **133** (2011) 253-260.
77. S. Huang, C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li i F. L. Hu, Recent advances in the chemical composition of propolis, *Molecules* **19** (2014) 19610-19632.
78. A. Salatino, C. C. Fernandes-Silva, A. A. Righi i M. L. F. Salatino, Propolis research and the chemistry of plant products, *Nat. Prod. Rep.* **28** (2011) 925.
79. V. Bankova, M. Popova, S. Bogdanov i A. G. Sabatini, Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results, *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **57** (2002) 530-533.
80. M. Popova, B. Trusheva i V. Bankova, Content of biologically active compounds in Bulgarian propolis: a basis for its standardization, *Bulg. Chem. Commun.* **49** (2017) 115-120.
81. M. Popova, B. Trusheva, S. Cutajar, D. Antonova, D. Mifsud i C. Farrugia, Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis, *Nat. Prod. Commun.* **7** (2012) 569-570.
82. K. Graikou, M. Popova, O. Gortzi, V. Bankova i I. Chinou, Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?, *LWT* **65** (2016) 261-267.
83. V. Bankova, D. Bertelli, R. Borba, B. J. Conti, I. B. da Silva Cunha, C. Danert, M. Nogueira Eberlin, S. I. Falcão, M. I. Isla, M. I. Nieva Moreno, G. Papotti, M. Popova, K. Basso Santiago, A. Salas, A. C. H. Frankland Sawaya, N. Vilczaki Schwab, J. M. Sforcin, M. Simone-Finstrom, M. Spivak, B. Trusheva, M. Vilas-Boas, M. Wilson i C. Zampini, Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. U: Dietemann, V., Ellis, J. D., Neumann, P. (ur.), The COLOSS BEEBOOK, Volume III: Standard methods for *Apis mellifera* hive product research, *J. Apic. Res.* **56** (2016) 3.

84. L. Saftić, Ž. Peršurić, E. Fornal, T. Pavlešić i S. Kraljević Pavelić, Targeted and untargeted LC-MS polyphenolic profiling and chemometric analysis of propolis from different regions of Croatia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **165** (2019) 162-172.
85. S. El-Guendouz, L. Badiaa i M. Miguel, Insight on Propolis from Mediterranean Countries: Chemical Composition, Biological Activities and Application Fields. *Chem. Biodivers.* **16** (2019).
86. J. B. Daleprane i D. S. Abdalla, Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013** (2013) 1–8.
87. I. Przybyłek i T.M. Karpiński, Antibacterial Properties of Propolis, *Molecules* **24** (2019) 2047.
88. T. G. do Nascimento, R. E. dos Santos Arruda, E. T. da Cruz Almeida, J. M. dos Santos Oliveira, I. D. Basílio-Júnior, I. C. C. de Moraes Porto, A. R. Sabino, J. Tonholo, A. Gray, R. E. Ebel, et al., Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study, *Sci. Rep.* **9** (2019) 18293.
89. A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada i G. Swierczek-Zieba, Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis, *Molecules.* **19** (2013) 78–101.
90. M. Popova, V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marcazzan i S. Bogdanov, Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis, *Phytochem. Anal.* **15** (2004) 235-240.
91. I. Kosalec, M. Bakmaz, S. Pepeljnjak i S. Vladimir-Knezević, Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia, *Acta Pharm.* **54** (2004) 65-72.
92. P. Ristivojević, J. Trifković, U. Gašić, F. Andrić, N. Nedić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS) Study of phenolic profile of serbian poplar type propolis, *Phytochem. Anal.* **26** (2015) 127-36.
93. I. Kosalec, M. Bakmaz i S. Pepeljnjak, Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm.* **53** (2003) 275-285.

94. M. Medić-Šarić, V. Rastija i M.Bojić, Recent advances in the application of high-performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis, *J. AOAC Int.* **94** (2011).
95. S. Sobočanec, V. Šverko, T. Balog, A. Šarić, G. Rusak, S. Likić, B. Kušić, V. Katalinić, S. Radić i T. Marotti, 'Oxidant/ antioxidant properties of Croatian native propolis', *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 8018–8026.
96. I. Escriche i M. Juan-Borras, Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis, *Int. Food Res. J.* **106** (2018) 834-841.
97. I. B. S. Cunha, A. C. H. F. Sawaya, F. M. Caetano, M. T. Shimizu, M. C. Marcucci, F. T. Drezza, G. S. Povia i P. de O. Carvalho, Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts, *J. Braz. Chem. Soc.* **15** (2004) 964-970.
98. M. Blekić, A. Režek Jambrak i F. Chemat, Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (2011) 32-47.
99. B. Trusheva, D. Trunkova i V. Bankova, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chem. Cent. J.* **1** (2007) 1-13.
100. X. Guo, B. Chen, L. Luo, X. Zhang, X. Dai i S. Gong, Chemical composition and antioxidant activities of water extracts of chinese propolis, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 12610-12616.
101. M. Yasar, Y. Savranlar, H. Karaman, M. Sagit, S. Silici i I. Ozcan, Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis, *Am. J. Otolaryngol.* **37** (2016) 287– 293.
102. V. Zaccaria, V. Curti, A. Di Lorenzo, A. Baldi, C. Maccario, S. Sommati, R. Mocchi i M. Daglia, Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation, *Nutrients* **9** (2017) 1-17.
103. F. Galeotti, F. Maccari, A. Fachini i N. Volpi, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products, *Foods* **7** (2018) 41.
104. R. P. Dantas Silva, B. A. Machado, G. A. Barreto, S. S. Costa, L. N. Andrade, R. G. Amaral, A. A. Carvalho, F. F. Padilha, J. D. Barbosa, M. A. Umsza-Guez, Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts, *PLoS One.* **12** (2017) e0172585.

105. T. L. C. Oldoni, et al., Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected *BEESS Apis mellifera*, *J. Braz. Chem. Soc.* **26** (2015) 2054-2062.
106. A. Smolčić-Bubalo, Nove metode u istraživanju hrvatskog propolisa, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagrebu, 2007.
107. A. dos Santos Pereira, B. Bicalho i F. R. de Aquino Neto, Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*, *Apidologie* **34** (2003) 291-298.
108. I. C. de Mendonça, I. C. Porto, T. G. do Nascimento, et al., Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells, *BMC Complement. Altern Med.* **15** (2015) 357.
109. P. M. Kustiawan, A. Aziz, V. N. Yuliawan, Antioxidant and Antibacterial Activity of Various Fractions of *Heterotrigona itama* Propolis Found in Kutai Kartanegara, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **10** (2022) 531-4.
110. L. Kubiliene, V. Laugaliene, A. Pavilonis, A. Maruska, D. Majiene, K. Barcauskaite, R. Kubilius, G. Kasparaviciene i A. Savickas, Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities, *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **15** (2015) 156.
111. L. Kubiliene, A. Jekabsone, M. Zilius, S. Trumbeckaite, D. Simanaviciute, R. Gerbutaviciene i D. Majiene, Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties, *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **18** (2018) 165.
112. D. Christina, H. Hermansyah, W. Anondho, E. Rohmatin, M. Sahlan, D. Pratami, A. Mun'im, Selection of propolis *Tetragonula* sp. extract solvent with flavonoids and polyphenols concentration and antioxidant activity parameters, *AIP Conference Proceedings.* **1933** (2018) 030020.
113. S. Sareen, G. Mathew i L. Joseph, Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion, *Int. J. Pharm. Investig.* **2** (2012) 12-17.
114. N. Zuidam i V. Nedovic (ur.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer, New York, 2010.
115. P. Jansook, N. Ogawa i T. Loftsson, Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* **535** (2018) 272-284.

116. T. Loftsson, M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes, *J. Pharm. Pharmacol.* **68** (2016) 544-555.
117. L. Šturm, I. G. Osojnik Črnivec, K. Istenič, A. Ota, P. Megušar, A. Slukan, M. Humar, S. Levic, V. Nedović, R. Kopinč, M. Deželak, A. Pereyra Gonzales, N. Poklar Ulrih, Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials, *Food Bioprod. Process.* **116** (2019) 196-211.
118. M. Jug, Ciklodekstrini u mukoadhezivnim mikročesticama lorazepam i risperidona, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
119. K. H. Frömming i J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1994, str. 1-32.
120. S. B. Carneiro, F. Í. Costa Duarte, L. Heimfarth, et al., Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 642.
121. L. Szente i J. Szejtli, Wettability of cyclodextrin complexes, *Acta Pharm. Hung.* **57** (1987) 73-6.
122. G. Coneac et al., Propolis extract/beta-cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physico-chemical and multivariate analyses, *J. Agroaliment. Processes Technol.*, **14** (2008) 58 – 70.
123. N. Kalogeropoulos, S. Konteles, I. Mourtzinis, E. Troullidou, A. Chiou i V. T. Karathanos. Encapsulation of complex extracts in beta-cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract, *J. Microencapsul.* **26** (2009) 603-13.
124. A. M. Nafady, M. A. El-Shanawany, M. H. Mohamed, H. A. Hassanean, T. Nohara, H. Yoshimitsu, M. Ono, H. Sugimoto, S. Doi, K. Sasaki, H. Kuroda, Cyclodextrin-enclosed substances of Brazilian propolis., *Chem. Pharm. Bull.* **51** (2003) 984-5.
125. B. A. Rocha, P. C. Pires Bueno, M. M. de Oliveira Lima Leite Vaz, A. Piacezzi Nascimento, N. Ursoli Ferreira, G. de Padua Moreno, M. Rezende Rodrigues, A. R. de Mello Costa-Machado, E. Aparecida Barizon, J. Costa Limpa Campos, P. Francielli de Oliveira, N. de Oliveira Acesio, S. de Paula Lima Martins, D. Crispim Tavarase, A. Aparecida Berretta, Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy and Safety Characterisation, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **11** (2013) 670451.

126. Z.-Y. Zhu, Y. Luo, Y. Liu, X.-T. Wang, F. Liu, M.-Z. Guo, Z. Wang, A.-J. Liu, Y.-M. Zhang, Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin and its biological activities, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **31** (2016) 176-186,
127. Z. S. Abbas, G. M. Sulaiman, M. S. Jabir, S. A. A. Mohammed, R. A. Khan, H. A. Mohammed i A. Al-Subaiyel, Galangin/ β -cyclodextrin inclusion complex as a drug-delivery system for improved solubility and biocompatibility in breast cancer treatment, *Molecules* **27** (2022) 4521.
128. D. Bisht i Z. Iqbal, Lyophilization - process and optimization for pharmaceuticals, *International Journal of Drug Regulatory Affairs.* **3** (2018) 30-40.
129. H. Kawasaki, T. Shimanouchi i Y. Kimura, Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *J. Chem.* **2019** (2019) 9502856.
130. Y. Wang i D. W. Grainger, Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **151-152** (2019) 56-71.
131. I. Kosalec, S. Pepeljnjak, M. Bakmaz, S. Vladimir-Knezevic, Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product, *Acta Pharm.* **55** (2006) 423-30.
132. G. M. Boyraci, M. Er Kemal, A. Degirmenci, Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of Turkish propolis extracts prepared with various solvents, *JAN* **2** (2019) 7-11.
133. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-raventós, Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Meth. Enzymol.* **299** (1999) 152-178.
134. S. M. Cottica, H. Sabik, D. Bélanger, H. J. Giroux, J. V. Visentainer, M. Britten, Use of propolis extracts as antioxidant in dairy beverages enriched with conjugated linoleic acid, *Eur. Food Res. Technol.* **241** (2015) 543-551.
135. M. P. Popova, V. S. Bankova, S. Bogdanov, I. Tsvetkova, C. Naydenski, G. L. Marcazzan i A.-G. Sabatini, Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin, *Apidologie.* **38** (2007) 306-311.
136. N. Ibrahim, A. J. Zakaria, Z. Ismail i K. S. Mohd, Antibacterial and Phenolic Content of Propolis Produced by Two Malaysian Stingless BEESS, *Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica*, *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **8** (2016) 156-161.

137. U. K. Hussein, N. E. Y. Hassan, M. E. A. Elhalwagy, A. R. Zaki, H. O. Abubakr, K. C. Nagulapalli Venkata, K. Y. Jang i A. Bishayee, Ginger and Propolis Exert Neuroprotective Effects against Monosodium Glutamate-Induced Neurotoxicity in Rats, *Molecules* **22** (2017) 2-24.
138. C. Schineider Machado, D. Finger, M. L. Felsner i Y. Reyes Torres, In house validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of specific bioactive compounds in southern Brazilian propolis, *J. Apic. Res.* **58** (2019) 104-113
139. L. Saftić, Ž. Peršurić Kraljević i S. Pavelić, LC-QQQ and LC-QTOF MS methods for comprehensive detection of potential allergens in various propolis extracts, *Eur. Food Res. Technol.* **245** (2019) 1981–1995.
140. F. Pellati, G. Orlandini, D. Pinetti i S. Benvenuti, HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 934-948.
141. W. Ye, W. Sun, R. Chen, Z. Wang, X. Cui, H. Zhang, S. Qian, Q. Zheng, Y. Zhou, J. Wan, J. Xu, X. Wang, Y. Zhou, Pharmacokinetics in rat plasma and tissue distribution in mice of galangin determined by UHPLC-MS/MS, *Acta Chromatogr.* **31** (2017) 1-6.
142. X. Zeng, W. Su, Y. Zheng, Y. He, Y. He, H. Rao, W. Peng i H. Yao, Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Naringin in Aged Rats, *Front. Pharmacol.* **10** (2019) 1-12.
143. P. G. Pietta, C. Gardana i A. M. Pietta, Analytical methods for quality control of propolis, *Fitoterapia* **73** (2002) 7-20.
144. M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J. P. Pérez, T. Borges i F. J. García Montelongo, Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 249-257.
145. F. Cuyckens i M. Claeys, Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002) 2341-2348.

146. C. Repolles, J. M. Herrero-Martinez i C. Rafols, Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column, *J. Chromatogr. A* **1131** (2006) 51-57.
147. L. Yang, Q.-H. Yan, J.-Y. Ma, Q. Wang, J.-W. Zhang i G.-X. Xi, High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in propolis, *Trop. J. Pharm. Res.* **12** (2013) 771-776.
148. T. Ozdal, F. Duygu Ceylan, N. Eroglu, M. Kaplan, E. O. Olgun i E. Capanoglu, Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis, *Int. Food Res. J.* **122** (2019) 528-536.
149. M. Medić-Šarić, M. Bojić, V. Rastija i J. Cvek, Polyphenols in Propolis and Wine, *Food Technol. Biotechnol.* **51** (2013) 159–170.
150. J. M. Carbonell-Capella, M. Buniowska, F. J. Barba, M. J. Esteve i A. Frigola, Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13** (2014) 155-171.
151. A. R. Rechner, M.A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, S. K. Srail, K. P. Moore i C. A. Rice-Evans, Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radic. Biol. Med.* **36** (2004) 212-25.
152. F. Shahidi i H. Peng, Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *J. Food Bioact.* **4** (2018) 11–68.
153. P. C. H. Hollman, M. N. C. P. Buijsman, Y. van Gameren, P. J. Cnossen, J. H. M. de Vries i M. B. Katan, The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man, *Free Radic. Res.* **31** (1999) 569-573.
154. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert i C. Remesy, Bioavailability and bioefficiency of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* **81** (2005) 230-242.
155. M. Porrini, P. Riso, Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **18** (2008) 647–650.
156. Z. K. Zhou, Y. Zhang, P. Y. Zheng, X. S. Chen i Y. Yang, Starch structure modulates metabolic activity and gut microbiota profile, *Anaerobe* **24** (2013a) 71–78.

157. L. Zhou, et al. Oral absorption of flavonoids and analysis of their metabolism characteristics and law, *Chin. Tradit. Herbal Drugs*. **44** (2013b) 2313-2320.
158. K. Wang, X. Jin, Y. Chen, Z. Song, X. Jiang, F. Hu, M. A. Conlon, D. L. Topping, Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling, *Nutrients* **8** (2016) 1-12.
159. J. Viskupičova M. Ondrejovič i E. Šturdik, Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J. Food Nutr. Res.* **47** (2008) 151-162.
160. B. Gullon, M. E. Pintado, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez i M. Viuda-Martos, In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability, *Journal of functional foods*. **19** (2015) 617-628.
161. B. Gullon, M. E. Pintado, X. Barber, J. Fernandez-Lopez, J. A. Perez-Alvarez, M. Viuda-Martos, Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co.products during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion, *Food Res. Int.* **78** (2015) 169-176.
162. T. Ozdal, D. A. Sela, J. Xiao, D. Boyacioglu, F. Chen i E. Capanoglu, The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility, *Nutrients* **8** (2016) 78.
163. E. Brglez Mojzer, M. Knez Hrnčič, M. Škerget, Ž. Knez i U. Bren, Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects, *Molecules* **21** (2016) 901.
164. C. Gardana, P. Simonetti, C. Berti i P. Pietta, Evaluation of propolis polyphenols absorption in humans by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** (2007) 3849–3854.
165. M. F. Andreasen, P. A. Kroon, G. Williamson, M.-T. Garcia-Conesa, Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 5679-5684.
166. M. P. Gonthier, C. Remesy, A. Scalbert, V. Cheynier, J. M. Souquet, K. Poutanen i A. M. Aura, Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota *in vitro*, *Biomed. Pharmacother.* **60** (2006) 536-540.

167. N. Celli, B. Mariani, L. K. Dragani, S. Murzilli, C. Rossi, D. Rotilio, Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the determination of caffeic acid phenethyl ester in rat plasma and urine, *J. Chromatogr. B* **810** (2004) 129-136.
168. N. Celli, L. K. Dragani, S. Murzilli, T. Pagliani, A. Poggi, *In Vitro* and *in Vivo* Stability of Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Bioactive Compound of Propolis, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 3398-3407.
169. F. Chen, Y. F. Tan, H. L. Li, Z. M. Qin, H. D. Cai, W. Y. Lai, X. P. Zhang, Y.H. Li, W. W. Guan, Y. B. Li iJ.Q. Zhang, Differential systemic exposure to galangin after oral and intravenous administration to rats, *Chem. Cent. J.* **9** (2015) 14.
170. W.-W. Guo, F. Qiu, X.-Q. Chen, Y.-Y. Ba, X. Wang i X. Wu, In-vivo absorption of pinocembrin-7-O-b-D-gucoside in rats and its in-vitro biotransformation, *Sci. Rep.* **6** (2016) 29340.
171. C. H. Yen, H. F. Chiu, C. H. Wu, Y. Y. Lu, Y. C. Han, Y. C. Shen, K. Venkatakrisnan i C. K. Wang, Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion, *LWT* **84** (2017) 281-289.
172. K. H. Yildirim, E. Canbay, Ş. Öztürk, O. Aldemir i Y. E. Sözmen Biotransformation of propolis phenols by *L. plantarum* as a strategy for reduction of allergens, *Food Sci. Biotechnol.* **27** (2018) 1727-1733.
173. S. C. de Aguiar, E. Marostegan de Paula, E. H. Yoshimura, W. Barbacena Rosa dos Santos, E. Machado, V. Ma Velandia, G. Tadeu dos Santos i L. M. Zeoula, Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows, *Rev. Bras. de Zootec.* **43** (2014) 197-206.
174. A. Mackie, A. I. Mulet-Cabero, A. Torcello-Gómez, Simulating human digestion: developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods, *Food Funct.* **11** (2020) 9397-9431.

175. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. Wickham, W. Weitschies, A. Brodkorb, A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus, *Food Funct.* **5** (2014) 1113.
176. J. Bouayed, L. Hoffmann, T. Bohn, Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake, *Food Chem.* **128** (2011) 14-21.
177. J. Bouayed, H. Deußer, L. Hoffmann, T. Bohn, Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns, *Food Chem.* **131** (2012) 1466–1472.
178. R. Lucas-Gonzalez, S. Navarro-Coves, J. A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, L. A. Muñoz i M. Viuda-Martos, Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stunz) during *in vitro* gastrointestinal digestion, *Ind. Crops Prod.* **94** (2016) 774-782.
179. J. Ištuk i L. Jakobek, Determination of polyphenols bioaccessibility by *in vitro* gastrointestinal digestion of apple peel, *Hrana u zdravlju i bolesti : znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, **10** (2021) 45-52.
180. K. Ozkan, N. Sagcan, G. Ozulku, O. Sagdic, O. Toker, Muz i N. Mustafa, Bioactive and bioaccessibility characteristics of honeybee pollens collected from different regions of Turkey, *J. Food Meas.* **12** (2018) 581–587.
181. D. Cianciosi, T. Y. Forbes-Hernández, F. Giampieri, J. Zhang, J. Ansary, M. Pacetti, J. L. Quiles, J. Simal-Gandara i M. Battino, Effect of *In vitro* Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Manuka Honey. *eFood* **1** (2020) 85-93.
182. K. Radić, B. Jurišić Dukovski i D. Vitali Čepo, Influence of Pomace Matrix and Cyclodextrin Encapsulation on Olive Pomace Polyphenols' Bioaccessibility and Intestinal Permeability, *Nutrients* **12** (2020) 669.

183. E. Perak Junaković, K. Šandor, A. Vujnović, N. Oršolić, M. Andrišić, I. Žarković, K. Vretenar Špigelski, D. Fajdić, S. Sinković i S. Terzić, Spectrophotometric determination of main polyphenol groups in propolis samples from different regions of Croatia, *Vet. Arhiv* (prihvaćen za objavljivanje) *
184. N. D. Ivanovska, V. B. Dimov, V. S. Bankova, S. S. Popov, Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo, *J. Ethnopharmacol.* **47** (1995) 145-147.
185. EURACHEM vodič (2014) <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides> (pristupljeno 08.lipnja, 2021.).
186. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002), https://s27415.pcdn.co/wpcontent/uploads/2020/01/64ER207/Validation_Methods/dAOAC_Guidelines_For_Single_Laboratory_Validation_Dietary_Supplements_and_Botanicals.pdf, (preuzeto 04.05.2022.).
187. A. Brodkorb, L. Egger, M. Alming, P. Alvito, R. Assunção, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carrière, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, M. Minekus, R. Portmann, C. N. Santos, I. Souchon, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies, I. Recio, INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nat. Protoc.* **14** (2019) 991-1014.
188. ICH 1996, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (pristupljeno 22.07.2021. god.).
189. L. Svečnjak, Z. Marijanović, P. Okińczyc, P. Marek Kuś, I. Jerković, Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay, *Antioxidants* **9** (2020) 337.
190. J. Zhou, Y. Li, J. Zhao, X. Xue, L. Wu, F. Chen, Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints, *Food Chem.* **108** (2008) 749-59.

191. R. Pavlovic, G. Borgonovo, V. Leoni, L. Giupponi, G. Ceciliani, S. Sala, A. Bassoli, A. Giorgi, Effectiveness of Different Analytical Methods for the Characterization of Propolis: A Case of Study in Northern Italy, *Molecules* **25** (2020) 504.
192. M. Jug, M. Zovko Končić i I. Kosalec, Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures, *LWT* **57** (2014) 530-537.
193. Z. Franić, Apišumarstvo – pčelarstvo i šumarstvo, *Šumar. List.* **3-4**, (2019) 171-178.
194. V. Aylanc, A. Tomás, P. Russo-Almeida, S.I. Falcão i M. Vilas-Boas, Assessment of Bioactive Compounds under Simulated Gastrointestinal Digestion of Bee Pollen and Bee Bread: Bioaccessibility and Antioxidant Activity, *Antioxidants* **10** (2021) 651.
195. A. N. Dundar, A. Cinar, S. Altuntas, N. Ulubayram, G. Taner, A.F. Dagdelen, H. Demircan, i R.A. Oral, The role of microencapsulation in maintaining biological activity of royal jelly: comparison with biological activity and bioaccessibility of microencapsulated, fresh and lyophilized forms during storage, *J. Sci. Food Agric.* **102** (2022) 5502-5511.
196. J. Šuran, I. Capanec, T. Mašek, B. Radić, S. Radić, I. Tlak Gajger i J. Vlainić, Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies, *Molecules* **26** (2021) 2930.
197. C. Luo, X. Zou, Y. Li, C. Sun, Y. Jiang i Z. Wu, Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection, *Food Chem.* **127** (2011) 314-320.
198. X. Chen, J. Xiong, L. He, Y. Zhang, X. Li, L. Zhang i F. Wang, Effects of In Vitro Digestion on the Content and Biological Activity of Polyphenols from *Acacia mearnsii* Bark, *Molecules* **23** (2018) 1804.
199. R. Pinacho, R. Cavero, I. Astiasarán, D. Ansorena i M. Calvo, Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct. Foods.* **19** (2015) 49-62.
200. E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares i M. Henriques, Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **101** (2014) 121-35.
201. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook i T. Loftsson, Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes, *Molecules.* **23** (2018) 1161.

202. Gayoso, A.-S. Claerbout, M. Calvo, R. Cavero, I. Astiasarán i D. Ansorena, Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models, *J. Funct. Foods.* **26** (2016) 428-438.
203. T. Bohn, F. Carriere, L. Day, A. Deglaire, L. Egger, D. Freitas, M. Golding, S. Le Feunteun, A. Macierzanka, O. Menard, B. Miralles, A. Moscovici, R. Portmann, I. Recio, D. Rémond, V. Santé-Lhoutelier, T. J. Wooster, U. Lesmes, A. R. Mackie, D. Dupont, Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58** (2017) 2239-2261.

§ 9. DODATAK

Dodatak 9.1. Primjena RP-HPLC-PDA metode za određivanje koncentracija PC, KR, GN, CA i CAPE u frakcijama iz *in vitro* simulirane probave

Tablica D1. Smanjenje/povećanje biodostupnih polifenola nakon svake faze GID u odnosu na NU za a) PC, b) KR, c) GN, d) CA i e) CAPE

a)

PC	Std mix, %	Vlp, %	Zg, %
OF	-23,34	+0,91	+13,72
GF	-21,98	+1,00	+0,79
IF-C	-22,72	-1,84	+21,65
Din	-91,05	-77,05	-83,40
Dout	-28,52	-11,90	+32,18
Din+Dout	-19,57	+11,06	+48,78

b)

KR	Std mix, %	Vlp, %	Zg, %
OF	-19,50	+24,94	-38,30
GF	-18,72	+26,98	+47,69
IF-C	-2,79	-10,55	+22,77
Din	-90,15	-73,45	-85,18
Dout	-22,89	-4,78	+17,75
Din+Dout	-13,04	+21,77	+2,93

c)

GN	Std mix, %	Vlp, %	Zg, %
OF	-21,86	-9,60	-11,98
GF	-20,53	-11,04	-21,71
IF-C	-45,68	+2,26	-2,62
Din	-99,22	-97,94	-98,45
Dout	-40,34	-15,70	+7,82
Din+Dout	-39,56	-13,64	+9,37

d)

CA	Std mix, %	Vlp, %	Zg, %
OF	-25,52	+19,58	+22,69
GF	-28,21	+24,18	+9,85
IF-C	-71,47	+24,86	-11,79
Din	-100,00	-100,00	-100,00
Dout	-68,45	-39,28	-14,48
Din+Dout	-68,45	-39,28	-14,48

e)

CAPE	Std mix, %	Vlp, %	Zg, %
OF	+25,11	+1,13	+1,32
GF	+28,92	-0,55	-10,64
IF-C	-32,57	+12,04	+4,16
Din	-97,43	-91,22	-95,50
Dout	-8,36	-9,82	+17,11
Din+Dout	-5,79	-1,04	+21,61

Dodatak 9.2. Statistička obrada rezultata pripreve uzoraka primjenom različitih postupaka i uvjeta ekstrakcije

Tablica D2. Koncentracije polifenola u ekstraktima propolisa dobivene primjenom različitih postupaka i uvjeta ekstrakcije. Opažene razlike u koncentraciji polifenola dobivenih različitim postupcima ekstrakcije statistički se razlikuju. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, $n = 3$.

Broj postupka	Postupak i uvjeti ekstrakcije	$\gamma / \mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SD}$				
		PC	KR	GN	CA	CAPE
1.	MCR 70% EtOH	1521,78 \pm 37,63	848,52 \pm 39,19	985,44 \pm 51,28	-	198,67 \pm 16,32
2.	UPE 70% EtOH 1 h	2125,12 \pm 56,7	1149,13 \pm 42,65	1300,1 \pm 40,46	33,88 \pm 2,77	262,05 \pm 8,9
3.	UPE 70% EtOH 2 h	2135,37 \pm 40,66	1166,63 \pm 25,52	1296,42 \pm 26,93	31,74 \pm 4,58	260,77 \pm 3,29
4.	UPE 40% EtOH 1 h	9,26 \pm 1,25	2,71 \pm 0,6	4,86 \pm 0,27	8,27 \pm 1,26	1,29 \pm 0,16
5.	UPE 80% EtOH 1 h	1949,733 \pm 59,32	1070,82 \pm 34,64	1203,25 \pm 30,11	11,63 \pm 4,15	241,46 \pm 12,67
6.	UPE 90% EtOH 1 h	1701,62 \pm 79,07	937,62 \pm 43,87	1066,43 \pm 33,28	-	210,72 \pm 6,13
7.	MPE 70% EtOH	3062,28 \pm 165,4	1596,32 \pm 48,13	1822,51 \pm 48,61	326,74 \pm 12,49	122,46 \pm 11,3
8.	MPE 20% PEG 400	95,48 \pm 2,42	148,44 \pm 25,77	123,05 \pm 5,16	9,20 \pm 0,15	221,35 \pm 3,80
9.	MPE 40% PEG 400	206,04 \pm 16,76	511,79 \pm 39,48	663,46 \pm 8,92	13,44 \pm 3,00	854,19 \pm 51,15
10.	UPE 20% PEG 400 1 h	42,55 \pm 7,24	10,51 \pm 1,45	17,45 \pm 2,60	23,94 \pm 6,70	4,95 \pm 0,64
11.	UPE 40% PEG 400 1 h	154,09 \pm 2,99	54,36 \pm 2,87	83,65 \pm 5,16	18,63 \pm 1,48	21,37 \pm 0,23
12.	UPE 70% EtOH 1 h lio	45,79 \pm 1,37	2,95 \pm 0,35	6,82 \pm 0,19	227,42 \pm 33,79	4,06 \pm 0,11
13.	UPE 80% EtOH 1 h lio	49,28 \pm 1,16	3,62 \pm 0,15	5,75 \pm 0,10	165,88 \pm 24,81	4,83 \pm 0,14
14.	UPE 90% EtOH 1 h lio	41,76 \pm 5,99	1,75 \pm 0,37	5,88 \pm 0,54	49,57 \pm 51,30	2,54 \pm 0,07
<i>p</i> -vrijednost		0,0001	0,0001	0,0001	0,0007	0,0001

Dodatak 9.3 Statistička obrada rezultata dobivenih pripremom uzoraka korištenjem nosača

Tablica D3. Koncentracija polifenola (γ / $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SD}$) vezanih za različite nosače u propolisu podrijetlom iz dva područja: Valpovo i Zagreb

Izvor	Nosač	γ / $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SD}$				
		PC	KR	GN	CA	CAPE
Valpovo	L-Lys	864,47±208,51	2313,07±377,54	1367,75±427,61	199,96±92,97	388,20±68,66
	FRC	25,40±2,32	7,03±1,03	17,66±1,55	170,83±1,73	4,23±0,23
	DX	121,26±14,37	49,96±7,10	64,45±7,22	319,27±17,67	13,30±1,73
	MD	126,66±10,66	18,31±0,21	34,18±0,39	199,62±23,68	13,15±0,32
	20 mg mL ⁻¹ HP- β -CD	1945,18±177,07	635,38±18,74	993,11±49,29	264,31±37,61	211,56±16,88
	40 mg mL ⁻¹ HP- β -CD	2008,71±166,28	856,45±95,19	1175,58±118,47	242,38±3,14	229,36±16,55
	60 mg mL ⁻¹ HP- β -CD	2009,53±178,60	890,09±96,17	1181,54±134,00	192,84±24,02	224,66±21,03
	bez nosača	340,54±75,64	35,21±11,87	78,79±16,47	5224,71±915,01	29,36±4,49
	<i>p-vrijednost</i>	0,0031	0,0022	0,0035	0,0104	0,0031
	Zagreb	20 mg mL ⁻¹ HP- β -CD	2769,69±203,00	1447,08±66,65	984,29±41,98	545,08±23,78
40 mg mL ⁻¹ HP- β -CD		3239,93±14,88	1911,03±12,56	1213,37±1,39	468,42±2,05	767,06±4,26
60 mg mL ⁻¹ HP- β -CD		2542,28±156,97	1468,85±146,21	954,32±80,63	303,74±23,35	613,38±39,49
bez nosača		418,20±21,17	98,27±10,56	78,32±3,88	6668,63±718,20	88,53±11,48
<i>p-vrijednost</i>		0,0188	0,0249	0,0249	0,0156	0,0237

Koncentracije polifenola variraju ovisno o korištenom nosaču, a opažene razlike statistički su značajne neovisno o kojoj komponenti polifenola se radi ili o području s kojeg propolis dolazi.

Dodatak 9.4. Statistička obrada rezultata dobivenih analizom frakcija pojedinih faza *in vitro* simulirane probave

Tablica D4. Koncentracija polifenola PC u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

PC	Valpovo		Zagreb		Std mix		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	1945,18 ^a	177,07	2769,69 ^b	203,00	2634,74 ^{ab}	277,97	0,0509
OF	1952,22 ^a	22,32	3134,65 ^b	84,97	2006,46 ^{ab}	18,09	0,0273
GF	1954,18 ^a	38,82	2771,11 ^b	208,80	2039,07 ^{ab}	37,67	0,0273
IF-C	1895,91 ^a	64,10	3356,66 ^b	265,92	2023,05 ^{ab}	40,29	0,0273
Din	444,25 ^{ab}	3,65	457,80 ^a	6,52	234,50 ^b	5,29	0,0273
Dout	1704,90 ^a	9,51	3647,15 ^b	21,50	1870,35 ^{ab}	15,64	0,0273
Din+Dout	2149,16 ^{ab}	13,15	4104,96 ^a	24,23	2104,85 ^b	20,74	0,0273
<i>p</i>	0,0122		0,0044		0,0051		

Opazene razlike koncentracije polifenola PC statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u koncentraciji polifenola PC u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

Tablica D5. Koncentracija polifenola KR u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

KR	Valpovo		Zagreb		Std mix		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	635,38 ^a	18,74	1447,08 ^b	66,65	761,91 ^{ab}	61,80	0,0273
OF	476,53 ^a	26,80	892,06 ^b	30,00	610,84 ^{ab}	3,18	0,0273
GF	463,63 ^a	7,38	755,42 ^b	23,42	616,11 ^{ab}	14,46	0,0273
IF-C	568,74 ^a	59,79	1113,72 ^b	76,47	737,58 ^{ab}	4,38	0,0273
Din	168,67 ^{ab}	2,52	214,09 ^a	3,35	74,80 ^b	2,17	0,0273
Dout	604,77 ^a	6,28	1188,37 ^{ab}	4,89	585,16 ^b	9,44	0,0273
Din+Dout	773,43 ^{ab}	8,28	1402,46 ^a	7,91	659,97 ^b	9,74	0,0273
<i>p</i>	0,0046		0,0040		0,0041		

Opazene razlike koncentracije polifenola KR statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u koncentraciji polifenola KR u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

Tablica D6. Koncentracija polifenola GN u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

GN	Valpovo		Zagreb		Std mix		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	993,11 ^a	49,29	984,29 ^a	41,98	1177,71 ^b	77,52	0,0665
OF	896,14	46,66	864,62	25,95	917,84	8,87	0,2521
GF	879,97 ^{ab}	68,95	769,42 ^a	30,23	933,21 ^b	20,88	0,0509
IF-C	1014,82 ^a	49,57	955,75 ^{ab}	71,89	637,79 ^b	16,30	0,0509
Din	20,42 ^a	0,51	15,26 ^{ab}	0,49	9,14 ^b	0,05	0,0273
Dout	835,48 ^{ab}	13,72	1059,71 ^a	14,10	700,81 ^b	15,99	0,0273
Din+Dout	855,90 ^{ab}	14,21	1074,97 ^a	13,67	709,96 ^b	15,99	0,0273
<i>p</i>	0,0098		0,0044		0,0039		

Opazene razlike koncentracije polifenola GN statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u koncentraciji polifenola GN u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID, $p < 0,05$.

Tablica D7. Koncentracija polifenola CA u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

CA	Valpovo		Zagreb		Std mix		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	264,31 ^a	37,61	545,08 ^{ab}	23,78	1078,72 ^b	122,37	0,0273
OF	311,46 ^a	11,89	668,52 ^{ab}	22,37	797,18 ^b	4,34	0,0273
GF	321,72 ^a	28,66	596,82 ^{ab}	56,76	767,08 ^b	18,22	0,0273
IF-C	325,09 ^a	39,41	479,30 ^b	68,87	305,72 ^a	6,98	0,0273
Din	
Dout	158,85 ^a	9,36	466,14 ^b	19,83	337,75 ^{ab}	3,64	0,0273
Din+Dout	158,85 ^a	9,36	466,14 ^b	19,83	337,75 ^{ab}	3,64	0,0273
<i>p</i>	0,0239		0,0175		0,0064	0,0064	

Opazene razlike koncentracije polifenola CA statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u koncentraciji polifenola CA u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

Tablica D8. Koncentracija polifenola CAPE u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

CAPE	Valpovo		Zagreb		Std mix		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	211,56 ^a	16,88	648,89 ^b	52,28	349,94 ^{ab}	43,15	0,0273
OF	212,96 ^a	1,70	653,17 ^b	25,65	433,89 ^{ab}	3,64	0,0273
GF	208,62 ^a	17,58	575,43 ^b	34,02	446,42 ^{ab}	6,04	0,0273
IF-C	236,09 ^{ab}	3,39	674,53 ^a	38,00	233,45 ^b	4,91	0,0509
Din	18,44 ^{ab}	0,90	29,03 ^a	1,12	8,91 ^b	0,12	0,0273
Dout	189,97 ^a	1,92	756,65 ^b	8,16	317,68 ^{ab}	2,02	0,0273
Din+Dout	227,06 ^a	18,48	604,46 ^b	34,30	455,33 ^{ab}	5,97	0,0273
<i>p</i>	0,0179		0,0106		0,0038		

Opazene razlike koncentracije polifenola CAPE statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u koncentraciji polifenola CAPE u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

Dodatak 9.5. Statistička obrada rezultata dobivenih spektrofotometrijskom analizom frakcija pojedinih faza *in vitro* simulirane probave

Tablica D9. Sadržaj TFF-a u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

TFF	Std mix		Valpovo		Zagreb		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	1457,33 ^a	8,41	3795,20 ^{ab}	20,73	4626,10 ^b	12,12	0,0273
OF	1675,71 ^a	4,66	3464,12 ^{ab}	24,68	4132,08 ^b	39,86	0,0265
GF	1746,17 ¹	89,98	3927,81 ^b	74,05	2715,78 ^{ab}	16,16	0,0273
IF-C	1262,21 ^a	55,98	2479,62 ^{ab}	145,74	4160,29 ^b	81,34	0,0265
Din	1035,96 ^{ab}	233,07	1897,85 ^a	98,74	421,87 ^b	116,53	0,0273
Dout	1553,09 ^a	85,52	4612,78 ^b	178,01	3858,63 ^{ab}	37,32	0,0265
<i>p</i>	0,0067		0,0054		0,0065		

Opažene razlike koncentracije polifenola TFF statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u sadržaju TFF-a u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID, $p < 0,05$.

Tablica D10. Sadržaj TP-a u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

TP	Std mix		Valpovo		Zagreb		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	6102,72 ^a	3,97	15477,22 ^{ab}	10,49	20104,91 ^b	13,74	0,0265
OF	6927,14 ^a	7,93	14789,62 ^{ab}	20,99	19733,45 ^b	34,59	0,0265
IF-C	8263,13 ^a	54,98	22466,92 ^{ab}	322,16	26004,12 ^b	208,16	0,0273
GF	7458,00 ^a	99,12	18747,72 ^{ab}	69,18	20552,97 ^b	31,74	0,0265
Din	6118,82 ^a	109,96	12973,29 ^b	83,98	10920,62 ^{ab}	138,36	0,0273
Dout	9289,47 ^a	259,83	21587,2 ^{ab}	247,92	29669,61 ^b	83,98	0,0273
<i>p</i>	0,0063		0,0054		0,0053		

Opažene razlike koncentracije polifenola TP statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u sadržaju TP-a u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

Tablica D11. Sadržaj TFD-a u odnosu na fazu GID-a i podrijetlo uzorka

TFD	Std mix		Valpovo		Zagreb		<i>p</i>
	SV	SD	SV	SD	SV	SD	
NU	426,96	4,83	479,85	8,81	480,61	1,50	0,0608
OF	1060,17 ^a	10,96	643,13 ^b	21,34	685,21 ^{ab}	14,03	0,0273
GF	2245,45 ^a	53,01	1899,69 ^{ab}	33,97	1318,11 ^b	95,55	0,0273
IF-C	2360,21 ^a	32,27	4609,20 ^b	40,94	3101,79 ^{ab}	82,56	0,0273
Din	28,98 ^a	18,69	3412,68 ^b	83,39	3035,06 ^{ab}	68,24	0,0273
Dout	3083,59 ^a	75,62	1507,93 ^b	27,80	2704,46 ^{ab}	48,64	0,0273
<i>p</i>	0,0054		0,0054		0,0064		

Opažene razlike koncentracije polifenola TFD statistički se razlikuju između pojedinih faza GID-a u svim pretraženim uzorcima. a, b – različito slovo označava statistički značajne razlike u sadržaju TFD-a u uzorcima različitog podrijetla u istoj fazi GID-a, $p < 0,05$.

§ 10. ŽIVOTOPIS

Eleonora Perak Junaković, mag. chem. rođena je u Osijeku 23. kolovoza, 1986. godine. Maturirala je 2005. godine Opću gimnaziju u Srednjoj školi Valpovo u Valpovu. Iste godine upisala je preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Na diplomskom studiju odabire istraživačke smjerove Analitička kemija i Biokemija te diplomira 29. rujna, 2010. godine. Diplomski rad „Adaptacija na oksidacijski stres kod kvasca s višestruko nezasićenim masnim kiselinama“ izradila je na Zavodu za molekularnu medicinu u Laboratoriju za oksidacijski stres pri Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Čipak-Gašparović. Na diplomskom studiju istraživačkog smjera bila je među deset najuspješnijih studenata za 2010. godinu. Poslijediplomski doktorski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2012. godine. U Laboratoriju za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka (VMP-a), Hrvatskog veterinarskog instituta bila je od studenog 2010. godine do prosinca 2011. godine zaposlena kao stručni suradnik, a potom od siječnja 2012. godine kao znanstveni novak na radnom mjestu asistenta u sklopu istraživačkog projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja (MZO) „Učinci i sudbina veterinarskih lijekova i vakcina u organizmu životinja“. Trenutno je zaposlena u istom Laboratoriju na radnom mjestu stručnog savjetnika u sustavu znanosti.

Područje njenog znanstveno-stručnog rada, djelovanja i odgovornosti vezani su za kontrolu kvalitete VMP-a, procjenu analitičkog djela dokumentacije VMP-a u svrhu dobivanja odobrenja za stavljanje VMP-a u promet u Republici Hrvatskoj te održavanje akreditacije u Laboratoriju sukladno Normi HR EN ISO/IEC 17025. Sudjelovala je na brojnim edukacijama u Hrvatskoj i inozemstvu na kojima je usavršavala svoje znanje iz područja analitičkih metoda tekućinske kromatografije te kontrole kvalitete i procjene dokumentacije VMP-a. Voditeljica je manjeg istraživačkog projekta naslova „Ekološki prihvatljive (U)HPLC-DAD metode za istovremeno određivanje kortizola i kortizona u serumu zamorčadi“ te je jedna od glavnih istraživačica na projektu naslova „*In vitro* inhibicija rasta najznačajnijih patogenih vrsta mikobakterija propolisom“ odobrenima odlukom Povjerenstva za procjenu pristiglih zahtjeva za namjensko institucijsko financiranje znanstvene djelatnosti sredstvima MZO-a u 2021. godini.

Koautorica je na sedam znanstvenih radova te jednog znanstvenog rada prihvaćenog za objavljivanje koje citira baza *Web of Science*, šest znanstvenih radova u ostalim bazama, četiri stručna rada i jednog priopćenja na međunarodnom znanstvenom skupu (popis radova priložen je u Životopisu).

Radovi u časopisima

Znanstveni radovi u časopisima, baza *WoS*

1. M. Andrišić, I. Žarković, K. Šandor, A. Vujnović, E. Perak Junaković, K. Bendelja, A. Savić Mlakar, N. Oršolić, L. Šver, M. Benić, S. Terzić, Effects of immunostimulators of microbial origin on T cells of pigs vaccinated with attenuated vaccine against Aujeszky's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **243** (2022) 110365.
2. N. Oršolić, I. Landeka Jurčević, D. Đikić, D. Rogić, D. Odeh, V. Balta, E. Perak Junaković, S. Terzić, D. Jutrić, Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants* **8** (2019) 1-22. *
3. L. Andrišić, E. J. Collinson, O. Tehlivets, E. Perak, T. Žarković, I. W. Dawes, N. Žarković, A. Čipak Gasparović, Transcriptional and antioxidative responses to endogenous polyunsaturated fatty acid accumulation in yeast. *Mol. Cell. Biochem.* **399** (2014) 27-37.
4. J. Pleadin, A. Vulić, S. Terzić, N. Vahčić, K. Šandor, E. Perak, Comparison of accumulation of clenbuterol and salbutamol residues in animal internal tissues, non-pigmented eyes and hair. *J. Anal. Toxicol.* **38** (2014) 681-685.
5. J. Pleadin, A. Vulić, N. Perši, S. Terzić, M. Andrišić, I. Žarković, K. Šandor, Eleonora Perak, Željko Mihaljević, Accumulation of ractopamine residues in hair and ocular tissues of animals during and after treatment. *J. Anal. Toxicol.*, **37** (2013) 117-121.
6. J. Pleadin, A. Vulić, N. Perši, S. Terzić, M. Andrišić, I. Žarković, K. Šandor, E. Perak, Comparison of ractopamine residue depletion from internal tissues. *Immunopharm. Immunot.* **35** (2013) 88-92.
7. K. Šandor, S. Terzić, I. Žarković, M. Andrišić, E. Perak, In-use stability of enrofloxacin solution for injection in multi- dose container. *Acta Vet. (Beograd).* **62** (2012) 213-225.

Rad u postupku objavljivanja

1. E. Perak Junaković, K. Šandor, A. Vujnović, N. Oršolić, M. Andrišić, I. Žarković, K. Vretenar Špigelski, D. Fajdić, S. Sinković, S. Terzić, Spectrophotometric determination of main polyphenol groups in propolis samples from different regions of Croatia. *Vet. Arhiv* (09.05.2022. prihvaćen za objavljivanje, broj rada: VA.1619) *

Znanstveni radovi u ostalim bazama

1. K. Šandor, E. Perak Junaković, M. Andrišić, I. Žarković, M. Benić, Ž. Mihaljević i S. Terzić, Analysis of florfenicol in pig plasma using a validated PPT-HPLC-DAD method. *Vet. Stn.* **53** (2023) 265-277.
2. I. Žarković, M. Andrišić, K. Šandor, A. Vujnović, E. Perak Junaković, B. Šeol Martinec, M. Šperanda, H. Valpotić, A. Jungić, M. Benić, L. Cvetnić, S. Terzić, Influence of immunomodulators of viral or bacterial origin and vaccine against Aujeszky's disease on the proportion of peripheral blood B cells in growing pigs. *Vet. Stn.* **52** (2021) 251-259.
3. S. Terzić, K. Šandor, M. Andrišić, I. Žarković, A. Vujnović, E. Perak Junaković, K. Vretenar Špigelski, S. Sinković, M. Peh nec, D. Fajdić, Konvencija Vijeća Europe o krivotvorenju farmaceutskih proizvoda i sličnim kažnjivim djelima koja uključuju prijetnje javnom zdravlju. *Vet. Stn.* **51** (2020) 1-4.
4. M. Andrišić, I. Žarković, K. Šandor, A. Vujnović, E. Perak Junaković, H. Valpotić, K. Bendelja, Ž. Cvetić, F. Božić, S. Terzić, Phenotype analysis of CD3+CD16+ lymphocytes in the peripheral blood of pigs. *Vet. Stn.* **51** (2020) 117-128.
5. K. Šandor, M. Andrišić, I. Žarković, E. Perak Junaković, A. Vujnović, S. Terzić, Development of an SPE-HPLC-DAD method for the experimental study of florfenicol and florfenicol amine in pig cerebrospinal fluid. *Vet. Stn.* **51** (2020) 129-138.
6. E. Perak Junaković, K. Šandor, A. Vujnović, K. Vretenar Špigelski, S. Sinković, M. Andrišić, I. Žarković, M. Peh nec, D. Fajdić, S. Terzić, Određivanje antimikrobnih lijekova u otpadnim vodama. *Vet. Stn.* **50** (2019) 445-454.

Stručni radovi

1. K. Vretenar Špigelski, K. Šandor, S. Terzić, D. Fajdić, I. Žarković, S. Sinković, A. Vujnović, E. Perak Junaković, Mineralna ulja u ulozi adjuvansa u veterinarskim cjepivima. *Vet. Stn.* **52** (2021) 579-586.
2. S. Terzić, M. Andrišić, I. Žarković, A. Vujnović, E. Perak Junaković, K. Vretenar Špigelski, S. Sinković, M. Pehnc, D. Fajdić, K. Šandor, Mogućnost primjeneneodobrenih veterinarsko-medicinskih proizvoda (off - label use). *Vet. Stn.* **51** (2020) 455-461.
3. S. Terzić, K. Šandor, M. Andrišić, I. Žarković, E. Perak, Krivotvoreni veterinarsko-medicinski proizvodi : potencijalna opasnost. *Vet. Stn.* **42** (2011) 175-180.
4. I. Žarković, M. Andrišić, K. Šandor, E. Perak, S. Terzić, Kontrola kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda u HVI-u. *Vet. Stn.* **3** (2011) 263-268.

Priopćenja znanstvenim skupovima

J. Pleadin, A. Vulić, N. Perši, S. Terzić, M. Andrišić, I. Žarković, K. Šandor, E. Perak, Comparison of ractopamine accumulation in tissues on days after treatment. Abstracts of the Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2012) (Eds. W. Dekant, V. Kehrer i Y. Li) *Toxicology Letters* 211 (2012) 1-216, P12: Food Safeta. Stockholm: Elsevier, 2012, str. 53-54.