

**ODREĐIVANJE NEKIH MAKRO I MIKROELEMENTATA U PROPOLISU I NJEGOVIH ETANOLNIM I VODENIM EKSTRAKTIMA METODOM ATOMSKE APSORPCIONE SPEKTROMETRIJE**

SVETLANA KULEVANOVA

*Instituu za farmakognoziju  
Farmaceutski fakultet, Skopje*

TRAJČE STAFILOV

*Instituu za hemiju  
Prirodnomatematički fakultet, Skopje*

Izvršeno je određivanje sadržaja nekih makro i mikroelemenata u makedonskom propolisu i njegovim etanolnim i vodenim ekstraktima. Ispitana je distribucija nekih mikroelemenata u propolisu, kao i uticaj dužine ekstrakcije na sadržinu elemenata u ekstraktima. U makedonskom propolisu, Ca, Mg, K, Na, Fe i Zn su prisutni kao makroelementi, dok su Mn, Cu, Pb, Co, Cd, Cr i Ni zastupljeni u mikro količinama. U propolisovim ekstraktima, ispitivani elementi se ekstrahuju do 30% od količine koja je za svaki elemenat određena u propolisu. Najveće količine Cu, Na, K, Co, Pb, Cr i Ni se ekstrahuju u etanolnim ekstraktima propolisa, dok je za Na, Mn, Zn i Cd pogodnija vodena ekstrakcija. Maksimalna količina nikla u ekstraktima se dobija nakon jednočasovne ekstrakcije koncentrovanim etanolom, bakra i mangana nakon pet, a hroma i olova nakon deset časova.

Propolis je prirodni produkt—smola, koju pčele sakupljaju sa raznog drveća i drugog bilja, a koriste ga za zaštitu svojih košnica. Sastoji se od smole, voska, masnih materija, flavonoida, fenola, terpenoida, steroida, organskih kiselina, enzima, vitamina, minerala i drugih sastojaka (1). Predstavlja pomoćno lekovito sredstvo u profilaksi i terapiji raznih bolesti. Smatra se da propolis povećava otpornost prema infekcijama. Posедуje jako antimikrobno delovanje. Naročito se ceni u narodnoj medicini u lečenju raznih kožnih oboljenja, psorijaze, stafilokoknih infekcija, u lečenju opekotina, kod infekcija gornjih disajnih puteva, viroza i dr. (1, 2). Rezultati ispitivanja hemijskog sastava propolisa (3, 4) su doprineli da se utvrde aktivne komponente odgovorne za anti-

mikrobno i antioksidativno delovanje (5), što je sa druge strane rezultiralo i upotrebom propolisovih preparata u zvaničnoj medicini. Zadnjih godina se sa posebnom pažnjom ispituje njegova citostatska aktivnost (6, 7, 8).

Propolis se najčešće koristi u vidu etanolnog ekstrakta pripremljenog u raznim koncentracijama (10, 20, 25 ili 30%). Sadržaj pojedinih aktivnih komponenata u propolisovim ekstraktima nije dovoljno ispitan, verovatno zbog kompleksnog sastava propolisa koji doprinosi složenosti njegovih ekstrakata.

Određeni autori su potencirali važnost mineralnog sastava propolisa i povezanost prisustva određenih mikroelemenata sa određenim efektima propolisa (9). Tako je istaknuto da je biološka aktivnost mnogih mikroelemenata povezana sa njihovom sinergističkom akcijom sa enzimima i vitaminima. Prisustvo mikroelemenata u propolisu i drugim pčelinjim proizvodima, uopšte, povećava vrednost tih proizvoda zbog uticaja mikroelemenata na metaboličke i fermentativne procese u organizmu i doprinosi kojeg mikroelementi imaju u tretmanu anemija, prevenciji arterioskleroze, povećanju imuniteta, u gerontologiji i dr. Sadržina pojedinih makro i mikroelemenata u propolisovim ekstraktima je, do sada, ispitivana u etanolnim ekstraktima propolisa nemačkog i poljskog porekla (10, 11).

Produžavajući ispitivanja makro (12) i mikroelemenata (13) u propolisu makedonskog porekla, cilj ovog rada je ispitivanje sadržaja određenih makro i mikroelemenata u etanolnim i vodenim ekstraktima propolisa i uticaja dužine ekstrakcije na sadržinu pojedinih elemenata.

## EKSPERIMENTALNI DEO

Uzorci propolisa su sakupljeni u okolini Skopja—uzorak A i Kumanova—uzorak B. Homogenizacija je izvršena mlevenjem uzoraka u laboratorijskom mlinu i mešanjem dobijenog praškastog produkta u tarioniku. Ovako pripremljeni uzorci su čuvani u plastičnim kesama, u frižideru.

### Mineralizacija propolisa

Primenjena su dva postupka mineralizacije—vlažni i suvi, koji su izvedeni na prethodno opisani način (13).

### Određivanje distribucije Cu, Mn, Pb, Ni i Cr

Određena količina propolisa (uzorak B) je zagrevana u porcelanskoj zdeli, na vodenom kupatilu na temperaturi od 50°C, 30 min. Rastopljeni vosak i masne materije su separirane jednostavnim dekantiranjem. Dobijene frakcije „čistog propolisa“ i „voska“ su ispitane na sadržinu Cu, Mn, Pb, Ni i Cr.

Mineralizacija je izvršena suvim postupkom na način kako je postupljeno i sa uzorcima propolisa.

### Priprema ekstrakata

Ekstrakti propolisa su pripremljeni sa 96% etanolom, 70% etanolom i vodom. 10 g propolisa (uzorak A) je mešano sa 100 ml ekstraktivnog sredstva u erlenmajeru sa šli-

fom na magnetnoj mešalici u trajanju od četiri časa. Nakon toga je izvršeno filtriranje u odmerni sud od 100 ml i dopunjeno je do marke odgovarajućim solventom.

Ekstrakti „čistog propolisa“ su pripremljeni mešanjem 5g uzorka sa 50 ml 96% etanola na isti način kako je gore opisano. Vreme ekstrakcije je menjano od 1, 2, 5 i 10 časova do 10 dana.

Ekstrakti od „voska“ su pripremljeni u trajanju od jednog časa.

#### Mineralizacija ekstrakata

Ekstrakti propolisa su upareni do suva, a potom mineralizovani vlažnim postupkom, na način kako je postupljeno i sa uzorcima propolisa. Za određivanje Ca, Mg, Na, K, Fe i Zn upareno je i mineralizovano po 1 ml od svakog ekstrakta, a dobijeni mineralni ostatak je rastvoren u 100 ml 4% rastvora azotne kiseline. Za određivanje Cu i Mn dobijeni mineralni ostatak nakon mineralizacije 1 ml ekstrakta je rastvoren u 10 ml 4% rastvora azotne kiseline, a za određivanje Pb, Cd, Co, Ni i Cr ostatak od mineralizacije 50 ml ekstrakta je rastvoren u 10 ml 4% rastvora azotne kiseline.

Dobijeni rastvori su upotrebljeni za direktno čitanje koncentracije ispitivanih elemenata metodom plamene atomske apsorpcione spektrometrije (AAS).

U ekstraktima, pripremljenim od „čistog propolisa“ i „voska“, koncentracija Cu, Mn, Pb, Ni i Cr je određena direktno, bez prethodnog mineraliziranja, metodom elektrotermičke atomske apsorpcione spektrometrije (ETAAS).

#### Određivanje elemenata

Za određivanje makro i mikroelemenata u propolisu i propolisovim ekstraktima, korišćen je atomski apsorpcioni spektrofotometar Perkin-Elmer Model 370. Kao gas za sagorevanje upotrebljena je smeša acetilen-vazduh. Instrumentalni parametri za određivanje Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn, Pb, Cd, Co, Ni i Cr su prikazani u tabeli I.

Tabela I. Instr. param. za određivanje Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn, Pb, Cd, Co, Ni i Cr metodom AAS  
Table I. Instrum. param. for Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn, Pb, Cd, Co, Ni and Cr determination by AAS

Element	Talasna dužina [nm] Wavelength [nm]	Procep [nm] Slit [nm]	Struja lampe [mA] Lamp current [mA]
Ca	422.7	0.7	15
Mg	285.0	0.7	6
K	766.5	2.0	12
Na	589.0	0.7	8
Fe	248.3	2.0	30
Zn	213.9	0.7	15
Cu	324.7	0.7	15
Mn	279.5	0.7	10
Pb	383.3	0.7	10
Cd	228.8	0.7	4
Co	240.7	0.2	30
Ni	232.0	0.7	25
Cr	357.9	0.2	10

Elementi Cu, Mn, Pb, Ni i Cr su određeni u propolisu B i ekstraktima od „čistog propolisa“ i „voska“ primenom elektrotermičke atomske apsorpcione spektrometrije (ETAAS), korišćenjem atomskog apsorpcionog spektrofotometra Perkin-Elmer Model 303 opremljenog sa deuterijumovim *background* korektorom i grafitnom peći HGA-72. Instrumentalni parametri za određivanje Cu, Mn, Pb, Ni i Cr su dati u tabeli II.

Tabela II. Instrumentalni parametri za određivanje Cu, Mn, Pb, Ni i Cr metodom ETAAS  
Table II. Instrumental parameters for Cu, Mn, Pb, Ni and Cr determination by ETAAS

Parametri Parameters	Cu	Mn	Pb	Ni	Cr
Talasna dužina, nm Wavelength, nm	324.7	279.5	383.3	232.0	358.0
Procep, nm Slit, nm	0.7	0.7	0.7	0.7	0.2
Struja lampe, mA Lamp current, mA	15	10	10	25	10
Sušenje, Dry					
Temperatura, °C Temperature, °C	120	120	120	120	120
Vreme, s Time, s	30	30	30	30	30
Vremenski razmak, s Time ramp, s	2	2	2	2	2
Žarenje, Char					
Temperatura, °C Temperature, °C	1100	1300	550	900	1300
Vreme, s Time, s	30	30	30	30	30
Vremenski razmak, s Time ramp, s	1	1	1	1	1
Atomizacija, Atomize					
Temperatura, °C Temperature, °C	2500	2500	2100	2400	2400
Vreme, s Time, s	5	5	5	5	5
Vremenski razmak, s Time ramp, s	0	0	0	0	0
Čišćenje, Cleaning					
Temperatura, °C Temperature, °C	2700	2700	2700	2700	2700
Vreme, s Time, s	5	3	3	3	3
Vremenski razmak, s Time ramp, s	1	1	1	1	1
Gas	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon

## REZULTATI I DISKUSIJA

Makroelementi Ca, Mg, K, Na, Fe i Zn su u ispitivanom uzorku propolisa A prisutni u sledećim količinama: 2.076,6 za Ca; 348,0 za Mg; 602,0 za K; 280,0 za Na; 580,6 za Fe, i 544,7 za Zn,  $\mu\text{g/g}$ . Elementi Cu, Mn, Pb, Cd, Co, Ni i Cr spadaju u grupu mikroelemenata i u ispitivanom uzorku propolisa prisutni su u sledećim količinama: 11,1 za Cu; 24,0 za Mn; 8,8 za Pb; 0,4 za Cd; 0,7 za Co; 2,0 za Ni, i 6,6 za Cr,  $\mu\text{g/g}$  (tabela III).

Tabela III. Sadržine makro i mikroelemenata u propolisu i propolisovim ekstraktima, određene atomskom apsorpcionom spektrometrijom  
Table III. Contents of macro and microelements in propolis and propolis extracts, determined by atomic absorption spectrometry

Elementat Element	Propolis Propolis	Ekstrakt 1 Extract 1		Ekstrakt 2 Extract 2		Ekstrakt 3 Extract 3	
		$\mu\text{g/cm}^3$	% extr.*	$\mu\text{g/cm}^3$	% extr.*	$\mu\text{g/cm}^3$	% extr.*
Ca	2076.6	14.1	6.8	18.3	8.8	13.3	6.4
Mg	348.0	3.6	10.3	2.2	6.3	3.0	8.6
K	602.7	7.9	13.1	16.6	27.5	7.3	12.1
Na	280.0	7.7	27.5	4.6	16.4	7.3	26.1
Fe	580.6	12.1	20.8	1.4	2.4	6.6	1.0
Zn	544.7	3.3	6.1	1.5	2.8	3.4	6.2
Mn	24.0	0.4	16.7	...	...	0.5	20.8
Cu	11.1	0.3	27.0	0.3	27.0	0.1	9.0
Pb	8.8	0.02	2.3	0.2	22.7	0.06	6.8
Cr	6.6	0.05	7.6	0.04	6.1	0.02	3.0
Cd	0.4	0.007**	17.5	0.003**	7.5	0.01**	25.0
Co	0.7	0.009**	12.8	0.006**	8.6	0.006**	8.6
Ni	2.0	0.05	25.0	0.03	15.0	0.04	20.0

\* količina elementa koja je ekstrahovana izražena kao procenat od količine koja je određena u propolisu  
the amount of element in the extract counted as % of that element in propolis

\*\* određeno sa ETAAS: 1, 2 i 3—ekstrakti pripremljeni sa 96% etanolom, 70% etanolom i vodom  
determined by ETAAS: 1, 2 and 3—extraction with 96% ethanol, 70% ethanol and water

Rezultati određivanja distribucije nekih mikroelemenata pokazuju da se Cu, Mn, Pb, Ni i Cr velikim delom (97,6–99,8% od količine koja je određena u propolisu) nalaze u „čistom“ propolisu, dok se u „vosku“ nalaze uglavnom tragovi ovih elemenata (0,2–2,4%) (tabela IV). Ovako mala količina mikroelemenata u frakciji „voska“ može da se objasni time što, verovatno jednostavnim dekantiranjem rastopljenog voska i masnih materija nismo uspeli potpuno razdvojiti ove dve frakcije. Tako smo dobili da je „vosak“ prisutan u količini od 10,56% (tabela IV), a u literaturi podaci govore o većoj zastupljenosti ovih materija (1). Sa druge strane, dobro je poznato da se minerali u vosku i masnim materijama obično nalaze u vrlo malim količinama, pa su dobijene vrednosti očekivane. Razdvajanje propolisa na opisani način je jednostavno, a primenjeno je u cilju proveravanja količine ispitivanih mikroelemenata koja se odvajanjem voska može zanemariti. Ukoliko se razdvoje vosak i masne materije proces mineralizacije postaje jednostavniji i kraći.

Tabela IV. Distribucija Cr, Mn, Ni, Cu i Pb u propolisu određena ETAAS

Table IV. Distribution Cr, Mn, Ni, Cu and Pb in propolis determined by ETAAS

Frakcija Fraction	Cr [%]	Mn	Ni	Cu	Pb	
„Čist propolis“ „Pure propolis“	89,44	2,69	4,86	1,63	23,02	4,90
„Vosak“ „Wax“	10,56	0,03	0,16	0,20	1,41	1,03
Propolis Propolis	100,00	2,41	4,37	1,48	20,72	4,49

	Cr [%]	Mn [%]	Ni [%]	Cu [%]	Pb [%]
„Čist propolis“ „Pure propolis“	99,8	99,5	98,5	99,4	97,6
„Vosak“ „Wax“	0,2	0,5	1,5	0,6	2,4

w—masena koncentracija

w—mass concentration

Rezultati određivanja makro i mikroelemenata u propolisovim ekstraktima pokazuju iznenađujuće nizak stepen koji je za svaki ispitivani element ispod 30% od količine koja je za ispitivane elemente određena u propolisu (tabela III). U ekstraktima koji su pripremljeni sa 96% etanolom elementi Na, Mg, Fe, Cu, Cr, Co i Ni se ekstrahuju u količinama od 7,6 do 27,5%. Kalijum i olovo se bolje ekstrahuju sa 70% etanolom (27,5 i 22,7%), dok se najveće količine Mn i Cd ekstrahuju sa vodom (20,8 i 25,0%). Koncentracije ispitivanih elemenata u ekstraktima koje su prikazane u  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  su, kao što se iz tabele III vidi, veoma niske. Ukoliko bismo etanolni ili vodeni ekstrakt propolisa koristili kao mineralni proizvod, ekstrakcija elemenata bi morala biti veća. U našem radu smo najbolje rezultate dobili primenom 96% etanola. Zato smo u cilju poboljšanja stepena ekstraktivnosti ispitali kako na ekstrakciju određenih mikroelemenata utiče vreme ekstrakcije. Iz rezultata prikazanih u tabeli V vidi se da se već posle jednog sata ekstrahuje maksimalna količina nikla, koja se ne menja ni nakon deset dana, a predstavlja samo 14,11% od količine koja je za Ni određena u „čistom propolisu“. Mn i Cu dostižu maksimum ekstrakcije nakon pet, a olovo i hrom nakon deset časova. U oba slučaja maksimalne količine koje se ekstrahuju su niske i za Cr iznose 5,39%, za Cu 9,94%, za Mn 13,2%, a za Pb 22,24%.

Upoređujući dobijene rezultate sa rezultatima iz literature (10, 11), primećuju se određene razlike. Scheller i sar. (10) su spektralnom analizom odredili da se u etanolnom ekstraktu propolisa elementi Cd, Mn, Pb, Ni, Zn i Cr nalaze u koncentraciji od 0,001%, za Fe oko 0,005%, a za Mn, Ca i Na između 0,01 i 0,07%. U odnosu na naše

Tabela V. Sadržaj Cr, Mn, Ni, Cu i Pb u ekstraktima pripremljenim od „čistog propolisa“/„voska“.  
odreden ETAAS

Table V. Contents of Cr, Mn, Ni, Cu and Pb in extracts prepared from "pure propolis"/"wax",  
determined by ETAAS

Element Element	EKSTRAKTI EXTRACTS					
	od „čistog propolisa“ from "pure propolis"					od „voska“ from "wax"
	1 h	2 h	5 h	10 h	10 dana 10 days	1 h
Cr [ $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ ]	1,30	1,40	1,45	1,50	1,50	0,10
% ekstrakcije % of extraction	4,72	5,05	5,39	5,72	5,72	26,60
Mn [ $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ ]	4,10	4,60	6,40	6,40	6,40	0,40
% ekstrakcije % of extraction	8,44	9,46	13,20	13,20	13,20	24,40
Ni [ $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ ]	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	1,00
% ekstrakcije % of extraction	14,10	14,10	14,10	14,10	14,10	50,00
Cu [ $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ ]	15,60	20,70	23,40	23,40	23,40	6,60
% ekstrakcije % of extraction	6,78	8,98	9,94	9,94	9,94	57,90
Pb [ $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ ]	...	9,00	9,60	10,90	10,90	1,20
% ekstrakcije % of extraction	...	18,37	19,59	22,24	22,24	11,56

rezultate vrednosti za koncentracije ovih elemenata prema Schelleru i sar. (10) su daleko veće i ukazuju na veću ekstraktivnost elemenata, iako u radu nije opisana procedura izrade ispitivanog etanolnog ekstrakta. U etanolnim ekstraktima pripremljenim od uzoraka nemačkog i poljskog propolisa Scheller i sar. (11) su neutronskom aktivacionom i X-ray protonskom aktivacionom analizom odredili Na, Fe, Zn, Cr, Co, Ag, Rb, Br, Se, Hg i Cs. Prikazani rezultati se dosta razlikuju od naših, verovatno zbog razlika u sastavu propolisa, u različitim procedurama pripreme ekstrakata, različitoj osetljivosti primenjenih analitičkih metoda i dr.

#### DETERMINATION OF SOME MACRO AND MICROELEMENTS IN PROPOLIS AND ITS ETHANOL AND WATER EXTRACTS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Svetlana Kulevanova<sup>1</sup>, Trajče Stačilov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, Faculty of Science, Skopje, Macedonia

## Summary

Contents of some macro and microelements in Macedonian propolis and its ethanol and water extracts were determined by atomic absorption spectrometry. A distribution of Cu, Mn, Cr, Ni and Pb in propolis was examined as well as the influence of the duration of extraction of the contents of these microelements in propolis ethanol extracts. In Macedonian propolis Ca, Mg, K, Na, Fe and Zn are present as macro while Mn, Cu, Pb, Co, Cd, Ni and Cr are present as microelements. The amounts of the examined elements that were achieved in propolis extracts were under 30% of their contents in propolis. Largest amounts of Cu, Na, K, Co, Pb, Cr and Ni were extracted (27.0, 27.5, 27.5, 12.8, 22.7, 7.6 and 25.0% of their contents in propolis, respectively) in the propolis extracts prepared with 96% or 70% ethanol, while the best extractions of Na, Mn, Zn and Cd were in propolis water extract (26.1, 20.8, 6.2 and 25.0% of their contents in propolis, respectively). Maximum extraction for Ni was obtained after 1 hour, for Mn and Cu after 5 hours and for Cr and Pb after 10 hours.

## LITERATURA

1. S. Skenderov, C. Ivanov. in Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje, Nolit. Beograd 1986. 106
2. D. A. Kravchuk. Propolis, Zdorovia. Kiev 1982. 82
3. A. Derevici. A. Popescu. N. Popescu. in Propolis. Apimondia, Bucharest 1978. 74
4. S. E. Palmbakha. S. A. Popravko. in Propolis. Apimondia. Bucharest 1978. 27
5. U. N. Ushakalova. T. P. Murykhnich. in Propolis. Apimondia. Bucharest 1978. 71
6. B. Hladon. W. Bylka. M. Ellanain-Wojtaszek. P. Szafarek. A. Chodera. Z. Kowalewski. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 30 (1980) 1847
7. J. Ban, S. Popović, D. Maysinger. *Acta Pharm. Yugosl.* 33 (1983) 245
8. Z. Kleinrok. Z. Borzecki. S. Scheller. W. Matuga. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 28 (1978) 291
9. B. Okhotski. in Propolis. Apimondia. Bucharest 1978. 39
10. S. Scheller. J. Szaflarski. J. Tustanowski. E. Nolewajka. A. Stojko. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 27 (1977) 889
11. S. Scheller. M. Czuderna, W. Krol, J. Konecki. Z. Czuba, J. Gabrys. M. Glowacka. J. Shani. *Z. Naturforsch.* 44c (1989) 170
12. S. Kulevanova. T. Stafilov, V. Nikolovska, K. Dorevski. T. Ristov. *Arh. farm.* 44 (1994) 356
13. T. Stafilov, S. Kulevanova. (rad pripremljen za publikovanje)

DETERMINATION OF SOME MACRO AND MICROELEMENTS  
IN PROPOLIS AND ITS ETHANOL AND WATER EXTRACTS  
BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Svetlana Kulevanova, Tase Stafilov  
Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia  
Institute of Chemistry, Faculty of Science, Skopje, Macedonia