



HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF PROPOLIS EXTRACT

Z. Lalić, P. Granić, M. Lovrić, N. Božina

Zagreb Clinical Hospital Centre, Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Kišpatićeva 12, Division for Pharmacokinetic and Analytical Toxicology, Šalata 2, Zagreb

Propolis, resinous (waxy and aromatic) substance collected by honeybees from various plant sources, has wide application in medicine, cosmetics, and food industry due to its versatile biological activities, including antioxidant, antimicrobial, fungicidal, antiviral, antiulcer, immunostimulating, hypotensive, and cytostatic activities. Most of the medicines and food supplements are based on the ethanolic extracts of propolis. More of the pharmacologic active compounds in propolis are flavonoid-aglicons (quercetin, naringenin, chrysin, pinocembrin, galangin). The high pressure liquid chromatography (HPLC) in the gradient mode with diode array detection is useful method for the determination of flavonoids. Flavonoids are identified by comparing their retention times and on-line ultraviolet spectra with standard values. Within day imprecision, accuracy and linearity of expected value were assessed. Coefficient of variation within-day imprecision (n=5) was 9.4%, 6.65%, and below 1% for quercetin, for naringenin and for chrysin, pinocembrin, galangin. Accuracy was determined by recovery test adding amount (10, 20 i 50 µg/ml) of flavonoids to the sample and was 91-109%. Linearity method was assessed by measuring the standards with concentrations ranging from 6.25 to 100 µg/ml, and coefficient of correlation for all flavonoids exceeded 0.9993. Based on the results presented HPLC method is a reliable and accurate tool for analysis of flavonoids in propolis extracts. Moreover, separate components can be additionally be confirmed by applying specific on-line ultraviolet spectra.

Keywords: propolis, HPLC, flavonoids

HPLC METODA ZA ANALIZU EKSTRAKTA PROPOLISA

HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF PROPOLIS EXTRACT

Z. Lalić, P. Granić, M. Lovrić, N. Božina

KBC ZAGREB, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kišpatićeva 12, Zagreb
Zavod za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju, Šalata 2, Zagreb

UVOD

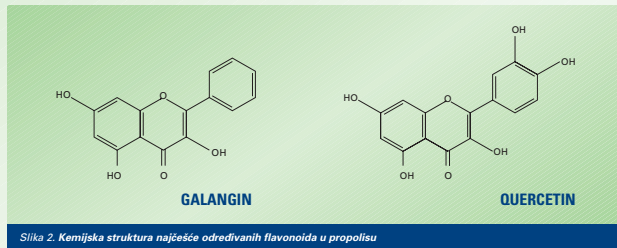
Propolis, smolasta i aromatična tvar (Slika 1.) koju pčele medarice sakupljaju s različitog bilja ima široku primjenu u medicini, kozmetici i industriji hrane zahvaljujući svojoj velikoj biološkoj aktivnosti koju uključuje antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antiflogistično, lokalno anestetiko, antioksidativno, antiulcerozno, hipotenzivno, citostatično i imunomodulacijsko djelovanje.

Mnogi medicinski preparati kao i dodaci prehrani sadrže etanolni ekstrakt propolisa kojemu se pripisuje najbolja djelotvornost zbog visokog udjela ekstrahiranih flavonoidnih komponenti. Brza i jednostavna metoda kao što je HPLC-tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti omogućuje kvantitativno određivanje velikog broja flavonoida, a uporabom *Diode Array* detektora i njihovo dodatno potvrđivanje.

Ovim radom postavljena je i validirana HPLC metoda za određivanje sljedećih flavonoida koji se nalaze u propolisu: krizina, kvercetin, naringenin, pinocembrin i galangin (Slika 2.).



Slika 1. Propolis u izvornom obliku



Slika 2. Kemijska struktura najčešće određivanih flavonoida u propolisu

MATERIJAL I METODA

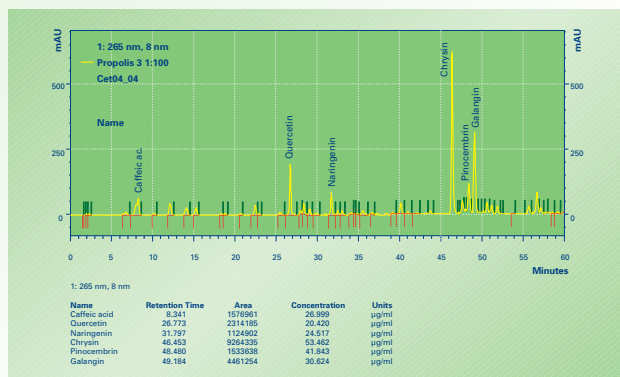
Korišteni su različiti uzorci propolisa koje tvrtka Apipharma d.o.o koristi u svom proizvodnom procesu. Uzorci su usitnjeni u tarioniku, otopljeni (10% - w/v) u 75% alkoholu, ekstrahirani na tresilici pri temperaturi 37°C, zatim dva puta filtrirani, potom razrijeđeni u omjeru 1:3, centrifugirani na 1000 g i do injektiranja čuvani na 4°C. Komercijalni proizvodi tvrtke Apipharma d.o.o. koji su ispitivani postavljenom metodom razrijeđivani su u omjeru 1 : 10 i 1 : 100.

UVJETI ZA HPLC ANALIZU

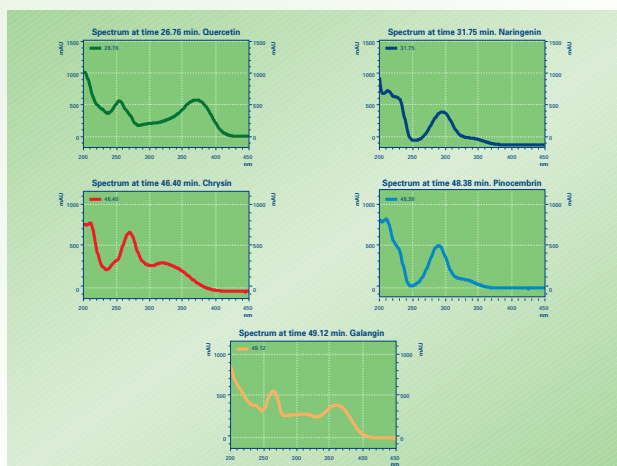
Korišten je Shimadzu HPLC sistem uz pripadajući CLASS-VP software i *Photo Diode Array Detector* s područjem mjerenja 200 - 450 nm. Kolona Symmetry C-18, 5 μm, 4.6x250 mm (Waters), s pripadajućom predkolonom grijana je na 35°C. Mobilna faza (A-30 mM NaH₂PO₄ i B-acetonitril) upotrebljena je prema sljedećem omjeru:

Gradient:	vrijeme (min.)	% B - binarni gradient
	0.01	10
	28.00	30
	70.0	55
	75.0	10

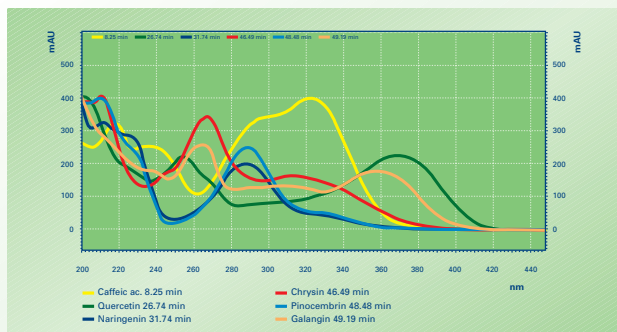
Protok na koloni bio je 1.5 ml/min. Kalibracijska krivulja s točkama 6.25; 12.5; 25.0; 50.0; 100.0 μg/ml napravljena je s odgovarajućim standardima: Caffeic acid (Sigma), Quercetin (Aldrich), Naringenin (Fluka), Pinocembrin (Sigma), Chrysin (Fluka), Galangin (Aldrich) na valnoj dužini od 265 nm. Za procjenu valjanosti metode ispitana je nepreciznost tijekom dana kao i točnost te linearnost u očekivanom rasponu.



Slika 3. Kromatogram uzorka propolisa



Slika 4. Spektri kvantificiranih flavonoida



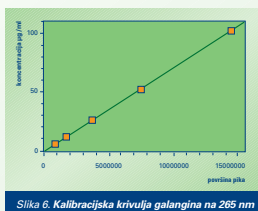
Slika 5. Spektri flavonoida - preklapanje

REZULTATI

Nepreciznost mjerenja tijekom dana (n=5) izražena preko koeficijenta varijacije iznosila je za kvercetin 9,4%; naringenin 6,65%, a za krizin, pinocembrin i galangin ispod 1%.

Točnost je određena preko testa iskorištenja (recovery test) dodatkom 10, 20 i 50 μg/ml standarda i iznosila je 92-109%.

Linearnost metode provedena je mjerenjem koncentracija standarda u rasponu od 6.25 - 100 μg/ml. Koeficijent korelacije za sve flavonoide viši je od 0,9993.



Slika 6. Kalibracijska krivulja galangina na 265 nm

ZAKLJUČCI

- Ispitana HPLC metoda pokazala je dobru nepreciznost, točnost i linearnost u širokom rasponu i stoga je pouzdana za kvantitativno mjerenje flavonoida u ekstraktu propolisa.
- Usporedbom karakterističnih UV-spektara mogu se dodatno potvrditi flavonoidne komponente i tako dati pouzdanu identifikaciju flavonoida.

HPLC metoda uz binarni gradient i *Photo Diode Array* detektor koji konstantno snima UV-spekter dobra je za identifikaciju, dodatnu potvrdu i kvantifikaciju flavonoida. To je metoda izbora za analizu najvažnijih komponenti propolisa (Pietta, 2002.)

LITERATURA

- Pietta P.G., Gardana C., Pietta A.M. (2002) Analytical methods for quality control of propolis, *Fitterapia* 73, Suppl. 1 S7-S20.
- Bankova V.S., Popov S.S., Marekov N.L. (1982) High-performance liquid chromatographic Analysis of Flavonoids from Propolis, *Journal of Chromatography* 242:135-143.
- Bruschi M.L., Franco S.L., Gremiao M.P.D. (2003) Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract, *Journal of liquid Chromatography & related technologies* Vol.26, No.14 pp.2399-2409.
- Santos F.A., Bastos E.M.A., Uzeda M., Carvalho M.A.R., Farias L.M., Moreira E.S.A., Braga F.C. (2002) Antibacterial activity of Brazilian and fractions against oral anaerobic bacteria, *Journal of Ethnopharmacology* 80 (2002):1-7.
- Pepejnjak S., Jalšenjak I., Maysiner D. (1982) Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts, *Pharmazie* 37:864-865.
- Pepejnjak S., Jalšenjak I., Maysiner D. (1985) Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*, *Pharmacy*, 40:122-123.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se tvrtki Apipharma d.o.o. na materijalnoj pomoći i uzorcima propolisa.

