



## HPLC METODA ZA ANALIZU EKSTRAKTA PROPOLISA

**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

Propolis, smolasta i aromatična tvar koju pčele medarice sakupljaju s različitog bilja ima široku primjenu u medicini, kozmetici i industriji hrane zahvaljujući velikoj biološkoj aktivnosti koja uključuje antioksidativni, antimikrobni, fungicidni, antiviralni, antiulcerozni, hipotenzivni, citostatični i posebno imunostimulacijski učinak. Mnogi medicinski preparati kao i dodaci prehrani sadrže etanolni ekstrakt propolisa. Najveći udio farmakološki aktivnih sastojaka u propolisu čine flavonoid-aglikoni od kojih smo određivali: kvercetin, naringenin, krizin, pinocembrin i galangin. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz gradijent i *diode array* detektor dobra je metoda za mjerenje flavonoida u ekstraktu propolisa. Identifikacija flavonoida provedena je usporedbom retenciskog vremena i UV spektra odgovarajućeg standarda. Za procjenu valjanosti metode ispitana je nepreciznost tijekom dana, točnost i linearnost u očekivanom rasponu. 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, i koeficijent korelacije za sve flavonoide viši je od 0,9993. Ispitana HPLC metoda pouzdana je za kvantitativno mjerenje flavonoidnih komponenti propolisa, a primjenom karakterističnih UV–spektara mogu se dodatno potvrditi pojedine komponente.

*Ključne riječi: propolis, HPLC, flavonoidi*

# 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

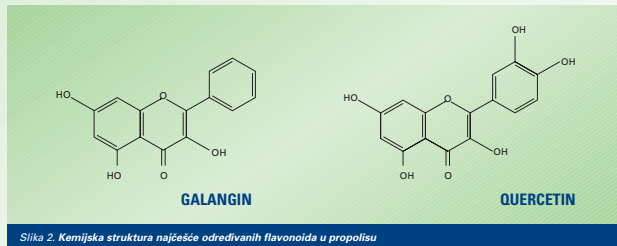
Propolis, smolasta i aromatična tvar (Slika 1.) koju pčele medarice sakupljaju s različitog bilja ima široku primjenu u medicini, kozmetici i industriji hrane zahvaljujući svojoj velikoj biološkoj aktivnosti koju uključuje antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antiflogistično, lokalno anestetiko, 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 galangina (Slika 2.).



Slika 1. Propolis u izvornom obliku



Slika 2. Kemijska struktura najčešće određivanih flavonoida u propolisu

### MATERIJAL I METODA

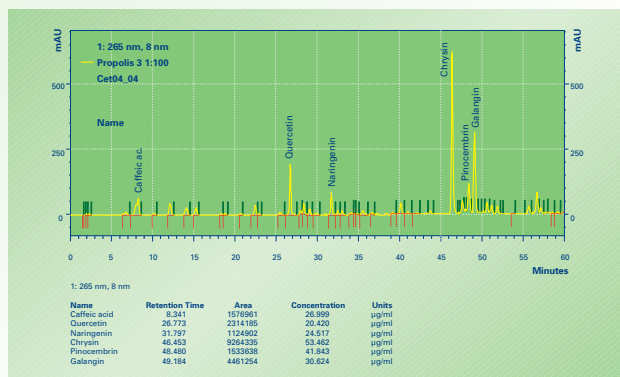
Korišteni su različiti uzorci propolisa koje tvrtka Apipharma d.o.o koristi u svom proizvodnom procesu. Uzorci su usitnjeni u tarioniku, otopljeni (10% - w/v) u 75% alkoholu, ekstrahirani na tresilici pri temperaturi 37°C, zatim dva puta filtrirani, potom razrijeđeni u omjeru 1:3, centrifugirani na 1000 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

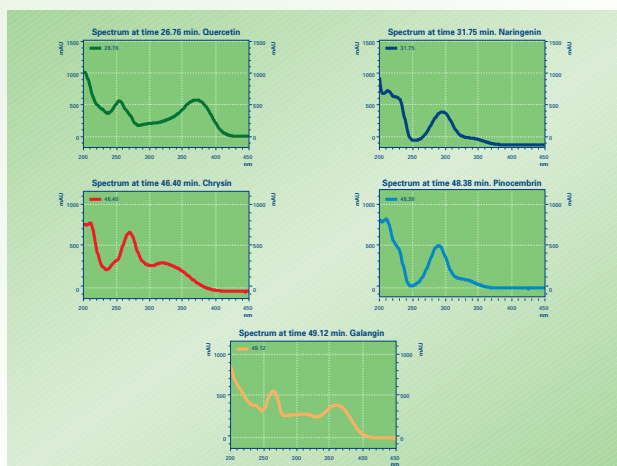
Korišten je Shimadzu HPLC sistem uz pripadajući CLASS-VP software i *Photo Diode Array Detector* s područjem mjerenja 200 - 450 nm. Kolona Symmetry C-18, 5 μm, 4.6x250 mm (Waters), s pripadajućom predkolonom grijana je na 35°C. Mobilna faza (A-30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i B-acetonitril) upotrebljena je prema sljedećem omjeru:

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

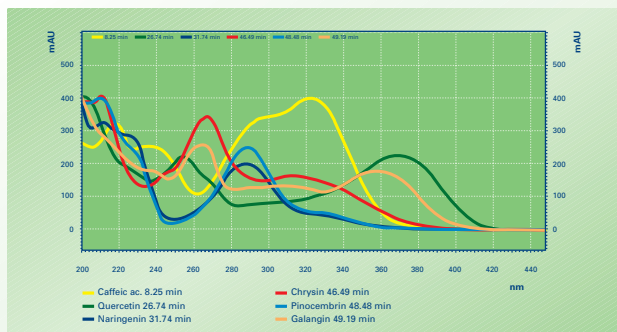
Protok na koloni bio je 1.5 ml/min. Kalibracijska krivulja s točkama 6.25; 12.5; 25.0; 50.0; 100.0 μg/ml napravljena je s odgovarajućim standardima: Caffeic acid (Sigma), Quercetin (Aldrich), Naringenin (Fluka), Pinocembrin (Sigma), Chrysin (Fluka), Galangin (Aldrich) na valnoj dužini od 265 nm. Za procjenu 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



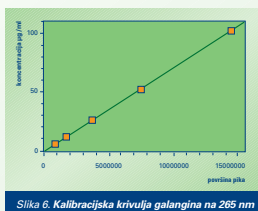
Slika 5. Spektri flavonoida - preklapanje

### 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., Jalšnjak I., Maysiner D. (1982) Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts, *Pharmazie* 37:864-865.
- Pepejnjak S., Jalšnjak 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.

