

Determination of Major Active Components in the Iranian (Kurdistan) Propolis Extract by HPLC

Vahid Yousefinejad ¹, Nazila Darvishi², Zakaria Vahabzadeh ³, Asrin Babahajian ⁴, Sayed Hossein Davoodi ⁵

1. Assistant Professor, liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0002-9928-938X

2. PhD of Nutrition, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel:+98-87-33247855, naziladarvishy@yahoo.com. ORCID: 0000-0003-1597-0838

3. Associate Professor of Clinical Biochemistry, liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0002-9854-9653

4. MSc of Anatomical Science, liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0003-0278-1560

5. Professor, Nutrition Department, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-21-22077474 (internal 209), hdavoodi1345@gmail.com. ORCID: 0000-0001-7834-1911

ABSTRACT

Background and Aim: Propolis, as a natural product have several biological benefits including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial as well as anticancer properties. Its application extensively depends on its composition and the concentrations of the major active components. The aim of, this study was to evaluate the concentrations of chrysin, quercetin and, caffeic acid as three active components, in the Iranian propolis using UV-HPLC method.

Materials and Methods: Three different samples of propolis were collected from Saral and Avalan regions (Kurdistan Province, Iran) in spring 2017. To separate and measure the concentrations of the three components, the samples were extracted by using an ethanolic solution (80%) and subsequently analyzed by the UV-HPLC system with an isocratic mode at a flow rate of 1ml/min for 20 min and ultraviolet detection at λ_{max} 260 or 310 nm. For evaluation of the quality control of the assay, the linearity and detection limits of the method were calculated.

Results: Chrysin was not detected in our samples. The average concentrations of quercetin and caffeic acid were 65.425 and 27.498 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Conclusion: For the first time, we reported accurately the concentrations of three active components of Iranian propolis which many of propolis's beneficial effects have been attributed to them.

Keywords: Propolis; Chrysin; Quercetin; Caffeic acid; HPLC; Iran.

Received: April 3, 2021

Accepted: Sep 13, 2021

How to cite the article: Vahid Yousefinejad, Nazila Darvishi, Zakaria Vahabzadeh, Asrin Babahajian, Sayed Hossein Davoodi. Determination of Major Active Components in the Iranian (Kurdistan) Propolis Extract by HPLC. *SJKU* 2022;27(2):38-45.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی میزان ترکیبات فعال در عصاره پروپولیس ایرانی (کردستان) با استفاده از متد کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

وحید یوسفی نژاد^۱، نازیلا درویشی^۲، ذکریا وهابزاده^۳، اسرین باباحاجیان^۴، سید حسین داوودی^۵

۱. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۹۳۸۸-۹۹۲۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۲. دکترای تخصصی تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۴۷۸۵۵ - پست الکترونیک: naziladarvishy@yahoo.com. کد ارکید: ۱۵۹۷-۰۸۳۸-۰۰۰۳-۰۰۰۰
۳. دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۹۶۵۳-۹۸۵۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۴. کارشناس ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۱۵۶۰-۰۲۷۸-۰۰۰۳-۰۰۰۰
۵. استاد، گروه تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، (نویسنده مسئول)، ایران. تلفن ثابت: (داخلی ۲۰۹) ۲۲۰۷۷۴۷۴ - پست الکترونیک: hdavoodi1345@gmail.com. کد ارکید: ۱۹۱۱-۷۸۳۴-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: پروپولیس به عنوان یک محصول طبیعی، دارای فواید بیولوژیکی متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و همچنین ضد سرطانی است. کاربرد آن به میزان زیادی به ترکیبات و مقادیر اجزای اصلی آن بستگی دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی مقادیر کریسین، کوئرستین و کافنیک اسید به عنوان سه جز اصلی فعال در پروپولیس ایرانی با استفاده از روش UV-HPLC بود.

مواد و روش‌ها: سه نمونه مختلف از پروپولیس در بهار سال ۱۳۹۶ در مناطق سارال و آوالان استان کردستان جمع‌آوری شدند. برای جداسازی و اندازه‌گیری سه ترکیب اصلی پروپولیس، نمونه‌ها با محلول اتانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شده و سپس در حالت ایزوکراتیک با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه و آشکارساز UV در طول موج ۳۱۰ nm به سیستم UV-HPLC تزریق شدند. محدوده خطی و تشخیصی برای ارزیابی و سنجش کنترل کیفیت محاسبه شدند.

یافته‌ها: کریسین در نمونه‌های پروپولیس ما شناسایی نشد. مقادیر متوسط کوئرستین و کافنیک اسید به ترتیب (۶۵/۴۲۵) (μg/g) و (۲۷/۴۹۸) (μg/g) گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه برای اولین بار مقادیر کمی دو ترکیب اصلی فعال پروپولیس ایرانی را که بسیاری از اثرات مفید پروپولیس به آن‌ها نسبت داده شده، با دقت بالایی گزارش نمود.

کلمات کلیدی: پروپولیس، کریسین، کوئرستین، کافنیک اسید، متد کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، ایران

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۵/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۲

مقدمه

پروپولیس مخلوطی شبیه رزین است که توسط زنبورهای عسل از جوانه ها و پوسته گیاهان جمع آوری شده و پس از انتقال آن‌ها به کندو تغییراتی روی آن‌ها ایجاد نموده و با ترشحات بزاق و موم خود ترکیب می‌نمایند و جهت درزگیری و پر کردن شکاف‌های کندو مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروپولیس ترکیب شیمیایی پیچیده‌ای دارد و اجزای تشکیل دهنده آن در مناطق مختلف با هم تفاوت‌های زیادی دارند که این امر عمدتاً به دلیل متفاوت بودن منابع گیاهی که زنبور عسل از آن‌ها تغذیه می‌کند و همچنین شرایط جغرافیایی و آب‌وهوا است. ترکیبات اصلی و فعال پروپولیس شامل موم، بالزام، روغن‌های اساسی (۱۰٪)، گرده (۵٪)، فلاونوئیدها و فنل کربوکسیلیک اسیدها می‌باشند (۱).

ثابت شده است که پروپولیس به عنوان یک محصول طبیعی، دارای فواید بیولوژیکی متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، آنتی میکروبیال، ضد انگلی و همچنین خواص ضد سرطانی است (۲). به عنوان مثال، فلاونوئیدها (مانند گالاتین) و فنل کربوکسیلیک اسیدها (مانند دی فنیل هیدروکسی سینامیک اسید) ترکیبات طبیعی (آنتی بیوتیک) با خواص ضد میکروبی هستند. از گذشته‌های دور تاکنون، پروپولیس در طب سنتی سراسر جهان در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته شده است (۳).

خواص آنتی‌اکسیدانی پروپولیس عمدتاً به وجود فلاونوئیدها در آن نسبت داده می‌شود که به صورت مشتقات متصل به قند در آن موجود می‌باشند. کریسین که به نام ۵،۷-دهیدروکسی فلاون نیز شناخته شده است، یک فلاون است که در عسل، پروپولیس و سایر منابع گیاهی یافت می‌شود. به طور معمول، پروپولیس مقدار بیشتری کریسین نسبت به عسل دارد. کوئرستین نیز عضو دیگری از گروه فلاونوئیدی پلی فنل‌ها است. این ماده در محصولات مختلف از جمله بسیاری از میوه‌ها، غلات، سبزی‌ها، عسل، پروپولیس و غیره

یافت می‌شود. گلیکوزیدهای کوئرستین عمده‌ترین بخش فلاونوئیدها در پروپولیس را تشکیل می‌دهند. کافنیک اسید یا ۳، ۴- دی هیدروکسی-سینامیک اسید از مشتقات پلی فنولیک، یکی دیگر از اجزای فعال است که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطان و آنتی‌ویروسی آن به خوبی اثبات شده است و به طور طبیعی در گیاهان مختلف یافت می‌شود. کافنیک اسید به صورت کافنیک اسید فیتل استر (CAPE) یکی دیگر از ترکیبات فعال موجود در پروپولیس است (۴).

هرکدام از خواص دارویی بالقوه پروپولیس ممکن است از محصول یک کندو تا کندویی دیگر و یا نمونه محصول یک کندو در دو زمان مختلف متفاوت باشد، زیرا همان‌طور که قبلاً ذکر شد، زمان و منطقه جمع‌آوری پروپولیس به شدت بر روی ترکیبات آن تأثیر می‌گذارد (۴)؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی مقادیر کریسین، کوئرستین و کافنیک اسید به عنوان سه جزء اصلی و فعال مربوط به خواص دارویی این محصول در پروپولیس جمع‌آوری شده در استان کردستان (منطقه‌ای در شمال غرب ایران) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (UV-HPLC) است.

مواد و روش‌ها

مواد و معرف‌های شیمیایی مواد و معرف‌های شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل گرید تحلیلی برای استاندارد سازی کریسین (Analytical standard, 95082 Supelco,) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, کوئرستین (≥95% (HPLC), Q4951, Sigma-Aldrich) (Chemie GmbH و کافنیک اسید (≥98.0% (HPLC), C0625, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, متانول (HPLC grade, Merck,) (Germany HPLC grade, Merck,) استونیتریل (HPLC grade, Merck,) (Germany HPLC grade, Merck,) استون (HPLC grade, Merck,)

محلول فیلتر شده سرنگ ۰/۴۵ میکرومتر به یک حلقه ثابت ۲۰ میکرولیتر از سیستم HPLC تزریق شد. تجهیزات HPLC و نحوه کروماتوگرافی دستگاه HPLC مورد استفاده برای اندازه گیری اجزای فعال پروپولیس شامل پمپ K-1001 (KNAUER, Germany)، آشکار UV ساز K-2600 (KNAUER, Germany)، محفظه اختلاط دینامیک و یک رایانه شخصی بود. ستون ODS (C18, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m) به عنوان ستون تحلیلی برای جداسازی کروماتوگرافی استفاده شد. فاز متحرک مخلوطی از استونیتریل، آب و متانول (۲۷:۲۷:۴۶) بود که در حالت ایزوکراتیک با جریان سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه تحویل داده می شود. دمای ستون روی ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. حجم تزریق یک حلقه ثابت ۲۰ میکرولیتر بود که به طور کامل با هر کدام از محلول های استاندارد یا نمونه ها پر می شد. برای تحلیل کمی، طول موج ۳۱۰ نانومتر برای کریسین و کافئیک اسید و ۲۶۰ نانومتر برای کوئرستین توسط آشکارساز UV تنظیم شد.

نتایج

برای شناسایی کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین در نمونه های پروپولیس، زمان بازداری (RT; Retention time) هر پیک در کروماتوگرام های نمونه با RT مناسب کروماتوگرام های استاندارد مقایسه شد. کروماتوگرام های سه محلول استاندارد و نمونه پروپولیس ایرانی در شکل ۱ ارائه شده است.

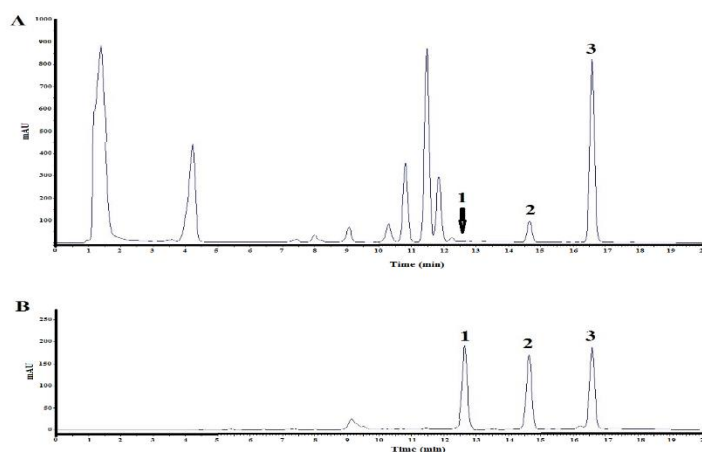
(Germany) اتیل استات (HPLC grade, Merck) و اتیل الکل (Germany pharmaceutical grade, Merck, Germany) بود. از دستگاه آب خالص ساز (Merck, Millipore) برای تولید آب فوق العاده خالص استفاده شد.

آماده سازی منحنی کالیبراسیون

برای تهیه منحنی کالیبراسیون، ۰/۰۱ گرم از پودر استاندارد خالص کریسین، کوئرستین و کافئیک اسید به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر متانول حل شدند تا محلول های موجود تولید شوند. این محلول ها به مدت یک ماه در فریزر قابل نگهداری می باشند. سپس هشت رقت سریال از هر محلول استوک تازه در محدوده ۱۰-۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شدند و در نهایت برای اجرای منحنی های کالیبراسیون، در حالت های مختلف به سیستم HPLC تزریق شدند. برای محاسبه حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) از غلظت هایی که نسبت سیگنال به نویز برای آن ها به ترتیب ۳ یا ۱۰ بود، استفاده شد.

استخراج و تهیه نمونه

ابتدا ۱۰ گرم از ۳ نمونه پروپولیس که در سال ۲۰۱۷ از مناطق اطراف سنج (استان کردستان، ایران) جمع آوری گردیده بود، به قطعات کوچک برش داده شدند و سپس در ۱۰۰ میلی لیتر محلول اتانولیک (۸۰٪ اتانول) همگن شدند. پس از آن، مخلوط به مدت ۴۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد گرم شد. سپس محلول خنک و با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد. در مرحله بعد، از ۲۵ میلی لیتر اتیل استات برای استخراج فلاونوئیدها و کافئیک اسید استفاده شد. سپس حلال اتیل استات با تبخیر در دستگاه روتاری در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد خارج شد و مواد باقیمانده با ۱۰ میلی لیتر متانول بازسازی شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از



شکل ۱: کروماتوگرام های نمونه پروپولیس و محلول های استاندارد. A: کروماتوگرام های نمونه پروپولیس ایرانی. B: کروماتوگرام های محلول استاندارد. پیک ۱: کریسین (RT: 12.680 min)، پیک ۲: کافئیک اسید (RT: 14.633 min)، پیک ۳: کوئرستین (RT: 16.583 min). کریسین در نمونه ها یافت نشد.

مقدار کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین در نمونه های پروپولیس بر اساس سطح زیر پیک برای هر آنالیت با استفاده از منحنی کالیبراسیون به دست آمده از استانداردهای مربوطه انجام شد. دامنه خطی و حد تشخیص برای کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین نیز در جدول ۱ نشان داده شده است.

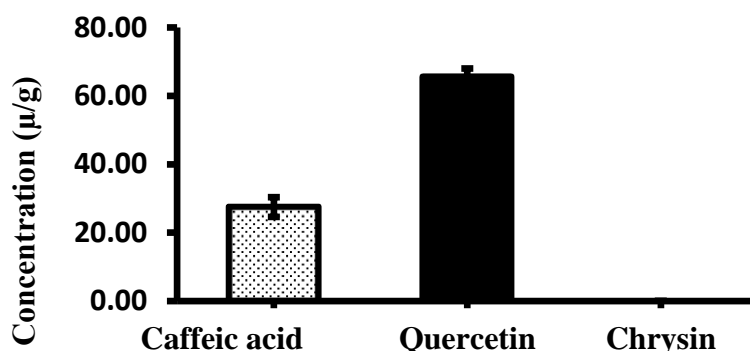
جدول ۱. دامنه خطی و حد تشخیصی کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین

LOQ	LOD	Correlation coefficient (r ²)	Calibration equation (Y=a + bX)	ترکیبات
۰/۸۳ (میکروگرم در میلی لیتر)	۰/۲۵ (میکروگرم در میلی لیتر)	۰/۹۷۵۶	Y=۰/۰۰۰۱۳۴۱۶۲ X+۲۷/۷۰۴۰	کافئیک اسید
۰/۲۹	۰/۰۹	۰/۹۹۹۷	Y=۰/۰۰۰۲۱۶۵۱ X+۵/۲۳۲۳۲	کوئرستین
۰/۵۹	۰/۱۸	۰/۹۷۸۴	Y=۱/۸۸۰۲۵ e +۰/۱۴۴۲۷۲	کریسین

Y: سطح زیر پیک، X: غلظت (میکروگرم در میلی لیتر) هر کدام از آنالیت ها.
LOD: حد تشخیص، LOQ: حد تعیین مقدار

کوئرستین و کافئیک اسید به ترتیب ۶۵/۴۲۵ و ۲۷/۴۹۸ میکروگرم در گرم بود.

نتایج میزان سه ماده اصلی فعال استخراج شده از نمونه پروپولیس در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج کریسین در نمونه های ما یافت نشد. مقادیر متوسط



شکل ۲: غلظت کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین در پروپولیس ایرانی.

بحث

امروزه به دلیل خواص درمانی اثبات شده پروپولیس، استفاده از آن در ترکیب بسیاری از داروها و محصولات بهداشتی و غذایی مورد استقبال زیادی قرار گرفته است. خواص پروپولیس و کاربرد آن به میزان زیادی به ترکیب و مقدار اجزای اصلی تشکیل دهنده آن بستگی دارد. پروپولیس به دلیل تنوع موجود در منابع مورد استفاده توسط زنبور عسل، از نظر ترکیب و مقدار مواد مؤثره به طور بالقوه بسیار متغیر است؛ بنابراین، لازم است قبل از اینکه برای اهداف درمانی در نظر گرفته شود، مقدار ترکیبات فعال آن که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدالتهابی و همچنین ضد سرطانی است، تعیین شود (۱).

در مطالعه حاضر، مقادیر سه فلاونوئید اصلی و یا ترکیبات فنلی پروپولیس شامل کریسین، کافئیک اسید و کوئرستین را در عصاره اتانولی پروپولیس که در بهار سال ۱۳۹۶ در منطقه سارال و آوالان، استان کردستان، ایران جمع‌آوری شده، با دقت بالایی اندازه‌گیری کردیم. بر اساس تحقیقاتی که نویسندگان این مطالعه انجام دادند، از روش UV-HPLC تاکنون برای اندازه‌گیری سه ترکیب ذکر

شده در نمونه‌های پروپولیس در این منطقه استفاده نشده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کوئرستین و کریسین به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را در ترکیب پروپولیس این منطقه داشتند. در مطالعه Markham و همکاران نیز، مقادیر کریسین و کریسین ۷ میلی اتر ۲/۲۲ – ۳/۱۴ برابر کمتر از سایر فلاونوئیدها (از جمله کوئرستین) در نمونه‌های پروپولیس جمع‌آوری شده از نیوزیلند بود (۵).

همچنین در نمونه‌های عصاره پروپولیس یونان و قبرس، کوئرستین به میزان قابل توجهی بیشتر از سایر ترکیبات بود (۶). نتایج مشابهی نیز توسط Tosi و همکاران (۷) و Thirugnanasampandan و همکاران به دست آمد (۸). محتوای کافئیک اسید نمونه پروپولیس خام رومانی نیز در محدوده یافته‌های ما گزارش شده است (۹). کوئرستین و کافئیک اسید از ترکیبات اصلی فعال در پروپولیس هستند که تصور می‌شود مسئول خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچ، ضد سرطان و ضد التهابی پروپولیس هستند (۱۰).

از پروپولیس جمع‌آوری شده در مناطق کردستان، قبلاً به عنوان ماده نگهدارنده برای جلوگیری از فاسد شدن فیله‌های

ماهی قزل‌آلا، پیشگیری از رشد قارچ‌های پوستی و غیر پوستی و همچنین جهت بهبود زخم استفاده شده است که ممکن است دلیل مؤثر بودن آن مقادیر بالای کوئرستین و کافنیک اسید در آن بوده باشد (۱۱،۱۲).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر برای اولین بار، مقادیر کمی دو ترکیب فعال اصلی پروپولیس ایرانی را که بسیاری از اثرات مفید پروپولیس به آن‌ها نسبت داده می‌شوند، تعیین شدند.

منابع

- Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 2014; 19(12):19610-32.
- Biscaia D, Ferreira S R S. Propolis extracts obtained by low-pressure methods and supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids*. 2009;51(1); 17-23.
- Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilionis A, Maruska A, Majiene K, et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern. Med*. 2015; 15:156.
- Rocha BA, Bueno PCP, Vaz MM de OLL, Nascimento AP, Ferreira NU, Moreno G de P, et al. Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation. *Evid.-Based Complementary Altern Med*. 2013; 2013:670451.
- Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*. 1996; 42(1):205-11.
- Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis I. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem*. 2009; 116:452-61.
- Tosi E, Re E, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem*. 2007; 104:1025-29.
- Thirugnanasampandan R, Raveendran SB, Jayakumar R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(8):651-54.
- Croci AN, Cioroiu B, Lazar D, Corciova A, Ivanescu B, Lazar MI. HPLC evaluation of phenolic and polyphenolic acids from propolis. *Farmacina*. 2009;57(1):52-7.
- Omene C, Kalac M, Wu J, Marchi E, Frenkel K, O'Conno OA. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci Ther*. 2013; 5(10): 334-42.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان به دلیل همکاری و حمایت‌های مالی از این طرح (با شماره ثبت IR.MUK.REC.1395/198) را اعلام می‌دارند.

11. Adnani A, Darvishi Sh, Mohammadi Kh. Effect of Kurdistan Propolis Extract on Biochemical and Microbiological Characteristics of rainbow trout fillet. *Iran. J Fish Sci* .2017, 25(4). 41-52.
12. Onagh A, Tokmechi A, Adibhesami M, Ebrahimzadeh S. Effects of ethanolic extracts of propolis produced from South of Western Azerbaijan against the growth of dermatophytes and non-dermatophytes fungi and Analysis of its Compound by GC-MS. *Urmia Medical Journal*. 2011;21(3):206-14.