



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE’NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN
ELDE EDİLEN PROPOLİSİN SULU
EKSTRAKTININ HPLC İLE
KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE’NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN
ELDE EDİLEN PROPOLİSİN SULU
EKSTRAKTININ HPLC İLE
KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2022

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU'nun hazırladığı “Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Propolisin Sulu Ekstraktının HPLC ile Karakterizasyonu ve Antioksidan Potansiyelinin Belirlenmesi” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/02/2022



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18/02/2022

Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU

İthaf

Doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili anneme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel, akademik ve insani açıdan her daim örnek aldığım ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösterici olan ve desteğini esirgemeyen, emekleri ve yardımları için değerli danışmam hocam sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca her bakımdan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocalarım; emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül KURAL, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Bilimsel ve akademik anlamda imkanlarını, yardımlarını, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ve Doç. Dr. Selim DEMİR'e

Tez çalışmamın çeşitli kademelerinde emekleri olan Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Murat KÜÇÜK ve Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a,

Her anlamda imkanlarını, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen çok değerli Dr. Serap ÖZER YAMAN'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca her zaman yanımda hissettiğim Doç. Dr. Sema MISIR, Doç. Dr. Diler US ALTAY, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nigar BOZKUŞ, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba MAZLUM ŞEN ve Dr. İmran İNCE AKÇA'ya, Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, hayatımın her alanında sonsuz özveri ve emekleri için aileme, desteği için sevgili eşim Onur ÇAKIROĞLU'na ve hayatımdaki en büyük manevi desteğim oğlum Tuğrul Mert ÇAKIROĞLU'na en içten dileklerle teşekkür ederim.

Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Propolis

3

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

3

2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

3

2.1.3. Polifenoller (Fenolik Bileşikler)

5

2.1.3.1. Flavonoidler

6

2.1.3.2. Flavonoidlerin Antioksidan Özellikleri

11

2.1.3.3. Fenolik Asitler

13

2.1.3.4. Fenolik Asitlerin Antioksidan Özellikleri

14

2.1.3.5. Kafeoilkuinik Asitler

16

2.1.4. Propolisin Bitkisel Kaynağı

17

2.1.5. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu

20

2.1.6. Propolisin Analizinde HPLC-DAD Kullanımının Önemi

21

2.1.7. Propolisin Biyolojik Aktivitesi

23

2.1.8. Propolisin Kullanım Şekilleri ve Kullanım Alanları

23

2.1.9. Propolisin Antioksidan Aktivitesi

25

2.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

25

2.2.1. Serbest Radikaller	25
2.2.2. Serbest Radikal Türleri	27
2.2.2.1. Süperoksit Radikali	27
2.2.2.2. Hidroksil Radikali	27
2.2.2.3. Hidrojen Peroksit	28
2.2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Propolis Örneklerinin Kaynakları	33
3.2.2. Sulu Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	34
3.2.3. Sulu Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	34
3.2.3.1. Toplam Polifenol İçeriğinin Belirlenmesi	34
3.2.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	36
3.2.3.3. Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi	38
3.2.4. HPLC-DAD Analizleri	40
3.2.4.1. Standartların Hazırlanması	40
3.2.4.2. HPLC-DAD Analiz Koşullarının Belirlenmesi	40
3.2.4.3. Standartların ve Propolis Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi	42
3.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	42
4. BULGULAR	43
4.1. Sulu Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Özellikleri	43
4.2. HPLC-DAD Analizleri	47
4.2.1. Standartların HPLC-DAD ile Analizi	47
4.2.2. Sulu Propolis Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler ve miktarları	4
Tablo 2. Bitki kaynağı, coğrafik kökeni ve başlıca bileşenlerine göre en yaygın propolisi türleri	19
Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemelerinin özellikleri	31
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve kodları	32
Tablo 5. Sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi	35
Tablo 6. Sulu propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	37
Tablo 7. Sulu propolis ekstraktlarının demir indirgeyici gücünün belirlenmesi	39
Tablo 8. Çalışma için belirlenen gradient elüsyon programı	41
Tablo 9. Sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü	43
Tablo 10. Bölgelerdeki ekstraktların toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü	44
Tablo 11. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü	46
Tablo 12. Çalışmada kullanılan standartların HPLC-DAD ile maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları	47
Tablo 13. Standartların alıkonma zamanları, regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları, %BSS, LOD ve LOQ değerleri	50
Tablo 14. Sulu propolis ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları	55
Tablo 15. Bölgelerdeki ekstraktlarda bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları	56
Tablo 16. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları	58
Tablo 17. Propolisin sulu ekstraktlarının antioksidan potansiyeli ile ilgili çalışmalar	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı	6
Şekil 2.	Flavonoid sınıflarının temel kimyasal yapıları	7
Şekil 3.	Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferolün kimyasal yapıları	7
Şekil 4.	Apigenin, luteolin ve krisinin kimyasal yapıları	8
Şekil 5.	Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları	9
Şekil 6.	Kateşin, epikateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin ve epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları	9
Şekil 7.	Genistein ve daidzeinin kimyasal yapıları	10
Şekil 8.	Siyanidin, malvidin, apigenidin ve delfinidin kimyasal yapıları	10
Şekil 9.	Fenolik asitlerin temel kimyasal yapısı	13
Şekil 10.	Bazı hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları	14
Şekil 11.	Fenoksil radikallerinin konjuge rezonans stabilizasyonu	15
Şekil 12.	Klorojenik asidin kimyasal yapısı ve IUPAC numaralandırılması	16
Şekil 13.	Propolis örneklerinin toplandığı iller	33
Şekil 14.	Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan gallik asit standart grafiği	36
Şekil 15.	Toplam flavonoid içerik tayini için kullanılan kuersetin standart grafiği	37
Şekil 16.	Demir indirgeyici güç tayini için kullanılan troloks standart grafiği	39
Şekil 17.	Bölgelerdeki ekstraktların toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü	45
Şekil 18.	Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü	46
Şekil 19.	Klorojenik asidin kalibrasyon grafiği	48
Şekil 20.	Kafeik asidin kalibrasyon grafiği	49
Şekil 21.	Trans-sinnamik asidin kalibrasyon grafiği	49
Şekil 22.	Bölgelerdeki ekstraktlarda bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinnamik asit miktarları	57
Şekil 23.	Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinnamik asit miktarları	59

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Propolis örneği	4
Resim 2. Çalışmada kullanılan propolis numunelerinden bazıları	33
Resim 3. Hazırlanan sulu propolis ekstraktlarından bazılarının görünümü	34
Resim 4. Çalışmada kullanılan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit standartlarının HPLC- DAD ile belirlenen pikleri	48
Resim 5. Karabük propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	50
Resim 6. Tokat propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	51
Resim 7. Ardahan propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	51
Resim 8. Samsun propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	52
Resim 9. Hakkari propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	52
Resim 10. Trabzon propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	53
Resim 11. Bursa propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	53
Resim 12. Hatay propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	54
Resim 13. Gümüşhane propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı	54

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Al	Alüminyum
BSS	Bağıl standart sapma
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CE	Kapiller Elektroforez
Cu	Bakır
DAD	Diyod Array Dedektör
Fe	Demir
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
GA	Gallik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HPLC-DAD	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi- Diyod Array Dedektör
HPLC-MS	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HPTLC	Yüksek Basınçlı İnce Tabaka Kromatografisi
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği
I	İyot
K	Kuersetin
LOD	Tayin sınırı
LOQ	Ölçüm sınırı
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Na	Sodyum
NAC	N-Asetil sistein
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
T	Troloks

TCA	Trikloro asetik asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
Troloks	(±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit
UV	Ultraviyole
UV/Vis	Ultraviyole/Görünür
Zn	Çinko

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

Formüller

AlCl_3	Alüminyum (III) klorür
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Alüminyum nitrat nonahidrat
CH_3CN	Asetonitril
CH_3COOH	Asetik asit
CH_3OH	Metanol
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
FeCl_3	Demir (III) klorür
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HNO_2	Nitrik asit
HOCl	Hipokloröz asit
$\text{H}_3\text{P}[\text{W}_3\text{O}_{10}]_4$	Fosfotungstik asit
$\text{NO}^\cdot$	Nitrik oksit
$\text{OH}^\cdot$	Hidroksil radikali

$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
O_2	Moleküler oksijen
KCH_3COO	Potasyum asetat
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum hekzasiyanoferrat (III)
$NaCl$	Sodyum klorür
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
$NaOH$	Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
$NO_2^{\cdot}$	Nitrojen dioksit
$O^{\cdot}$	Singlet oksijen
$ONOO^{\cdot}$	Peroksinitrit
$RO_2^{\cdot}$	Peroksil radikali

ÖZET

Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Propolis Sulu Ekstraktının HPLC ile Karakterizasyonu ve Antioksidan Potansiyelinin Belirlenmesi

Fonksiyonel bir gıda olan propolis bal arılarının bitkilerin belirli kısımlarından toplayarak oluşturdukları reçineli bir maddedir. Propolisin kimyasal bileşimi toplandığı bölgenin coğrafi ve iklimsel özellikleri, bitki türleri ve yıl içerisindeki toplama zamanı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Propolisin güçlü antioksidan aktivitesi, içerisinde yer alan fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Son yıllarda apiterapide kullanımı artan propolisin su ile ekstrakte edilmesi, bireyler tarafından kolay ve emniyetli kullanılması açısından diğer çözücülere göre avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin sulu ekstraktlarının karakterizasyonu sağlanması ve antioksidan potansiyelleri belirlenerek birbirleriyle kıyaslanması amaçlandı. Bu amaçla Türkiye'nin farklı bölgelerindeki çeşitli illerden toplanan propolis örneklerinin sulu ekstraktları hazırlandı. Güçlü kromatografik araç olan HPLC-DAD ile propolis ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif analizi sağlandı. Aynı zamanda toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri gerçekleştirilerek ekstraktların antioksidan potansiyelleri birbirleriyle kıyaslandı. Bölgeler arası toplam polifenol ve flavonoid içerik ile demir indirgeyici gücü testinden elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. En yüksek toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerikleri ve demir indirgeyici gücü değerleri Doğu Anadolu bölgesinde bulundu. HPLC-DAD ile yapılan analizlerde sulu propolis ekstraktlarının tamamında diğer fenolik bileşiklere oranla yüksek oranda kafeik asit bulundu. Kimyasal bileşenler yönünden bölgeler arasında herhangi bir uyum görülmedi. En yüksek kafeik asit miktarı Doğu Anadolu bölgesinde en yüksek klorojenik ve trans-sinamik asit miktarı ise Akdeniz bölgesinde bulundu. Kafeik asit miktarı yüksek olan ekstraktlarda genellikle toplam polifenol içerik ile birlikte demir indirgeyici gücünün de yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre farklı bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin hem kimyasal bileşen yönünden hem de antioksidan özellik yönünden farklılıklar gösterdiği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Antioksidanlar, HPLC, Polifenoller, Propolis

ABSTRACT

Characterization of Water Extract of Propolis Collected from Different Regions of Turkey by HPLC, and Determination of Antioxidant Potential

Propolis, a functional food, is a resinous substance that honey bees collect from certain parts of plants. The chemical composition of propolis depends on various factors such as the geographical and climatic characteristics of the region where it is collected, the plant species and the collection time during the year. The strong antioxidant activity of propolis is due to its phenolic compounds. Extraction of propolis with water, which has been used in apitherapy in the recent years, provides an advantage over other solvents in terms of easy and safe use by individuals. In the present study, it was aimed to characterize the water extract of propolis samples obtained from different regions of Turkey and to determine their antioxidant potentials and compare them with each other. For this purpose, water extracts of propolis samples collected from various provinces in different regions of Turkey were prepared. Qualitative and quantitative analyses of propolis extracts were achieved with HPLC-DAD, a powerful chromatographic tool. At the same time, the antioxidant potentials of the extracts were compared with each other by performing total polyphenolic content, total flavonoid content and iron reducing power tests. It was seen that the results obtained from the test of total polyphenol and flavonoid content and iron reducing power between regions were compatible with each other. The highest total polyphenolic content, total flavonoid contents and iron reducing power values were found in those of the Eastern Anatolia region. In the analyzes made with HPLC-DAD, a higher amount of caffeic acid was found in all of the water extracts of propolis compared to other phenolics. There was no agreement between the regions in terms of chemical components. The highest amount of caffeic acid was found in the Eastern Anatolia region and the highest amount of chlorogenic and trans-cinnamic acid was found in the Mediterranean region. It was observed that the total polyphenol content and the iron reducing power were high in the extracts with high caffeic acid content. According to the results obtained from the study, it was concluded that propolis samples obtained from different regions showed differences both in terms of chemical component and antioxidant properties.

Key words: Antioxidants, HPLC, Polyphenols, Propolis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fonksiyonel gıdalar içerdikleri aktif bileşenler ile hastalıkların oluşumunu önlemede ve tedaviye katkı sağlamada önemli bir rol oynamaktadırlar. Sadece besinsel özelliğinden değil, aynı zamanda belirlenen birçok fonksiyonel ve biyolojik özelliğinden dolayı propolis fonksiyonel gıdalar arasında yer almaktadır ve son yıllarda zengin içeriğinden dolayı bu doğal maddeye karşı ilgi artmaktadır (1, 2).

Propolis bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından bitkilerin tomurcukları ve eksüdalarından toplanan, arılar tarafından salgılanan enzimler, balmumu ve polenin karıştırılması ile birlikte oluşan doğal reçinemsî bir maddedir (3, 4). Propolisin kimyasal bileşimi oldukça karmaşık ve çeşitlidir (5). Dünya'nın çeşitli coğrafi ve botanik kökeninden elde edilen farklı propolis örneklerinde; esas olarak flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri bulunmuş olmakla birlikte 300'den fazla kimyasal bileşik izole edilmiştir (3, 6, 7). Propolisin bu kimyasal bileşimi koleksiyonun toplandığı bölgenin coğrafi ve iklimsel özellikleri, bitki türleri, ortama hakim olan aydınlatma, yıl içerisindeki toplama zamanı ve toplama yöntemi gibi bir sıra faktörün değişkenliği ile ilişkilidir (8, 9). Özellikle bitki kaynağına, toplandığı bölgenin coğrafi ve iklim koşullarına bağlı olmasından dolayı propolisin kimyasal kompozisyonunun standardizasyonu zordur (10).

Propolis antioksidan, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antitümöral antimikrobiyal, hepatoprotektif, antifungal, antibakteriyel ve antiviral gibi bilimsel olarak kanıtlanmış çok sayıda yararlı biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmekte ve bu sebeple Avrupa'dan Doğu Asya'ya geleneksel tıp, kozmetik ve gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır (5, 11, 12). Propolisin gösterdiği biyolojik aktiviteler içerisindeki flavonoidler, aromatik asitler ve esterleri gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (13).

Propolisteki önemli bileşenlerden flavonoidler ve fenolik asitler güçlü antioksidan özellikleriyle karakterize edilmektedirler. Bu özellikleri onların yapısal karakterleriyle yakından ilişkilidir. Propolisin içeriğindeki en önemli bileşenlerden olan fenolik asitlerin antioksidan aktivitesini serbest radikalleri süpürme, metal iyonlarını şelatlama ve oksidazları inhibe ederek enzimlerin aktivitelerini değiştirme etkisi oluşturmaktadır (14).

Ham propolis reçineli bir madde olması sebebiyle insanların tüketimi yönünden birçok çözücüye karşı avantajlı olan su ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmaktadır. Literatürde, son yıllarda propolisin sulu ekstraktının biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu bilinen kimyasal bileşiminin tespiti ve antioksidan aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen

Çalışmaların artmakta olduğu görülmektedir. Propolisin ekstrakte edilmesinde kullanılan bu çözücünün propolisin belirli bileşenlerini çözme etkisinden dolayı, diğerk çözücülere göre tespit edilen kimyasal bileşenlerde farklılıklar tespit edileceğı bilinmektedir. Propolisin karakterizasyon çalışmalarında kimyasal bileşiminin tespiti için kullanılan yöntem de oldukça önemlidir. Güçlü kromatografik araçların kullanımı, propolis gibi karmaşık karışımlardaki biyolojik aktif maddelerin belirlenmesi ve ölçümünü sağlamak için gereklidir (8). Çeşitli kromatografik araçlar arasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) şüphesiz polifenolik bileşiklerin karakterizasyonu için en yaygın ve güvenilir analitik tekniğı temsil etmektedir (15). Bu sebeple aynı anda birden fazla bileşiği analiz etme kabiliyeti olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-diyod array dedektör (HPLC-DAD) tekniğini kullanmanın çalışmanın başarısını arttıracakğı düşünülmüştür. Literatürde propolisin kimyasal bileşimini etkileyen bir diğerk önemli faktör olan coğrafik konum özelliğı dikkate alınarak Dünya'nın farklı ülkelerinde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak lkemizin doğal bitki örtüsünün zenginliğinden yola çıkıldığında, su ile ekstrakte edilmiş Türk propolisiyle ilgili bölgesel değişikliklerin göz önüne alınarak gerekleştirildiğı herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasında; Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin sulu ekstraktları hazırlanarak, HPLC-DAD yöntemi ile içeriğinde bulunan bileşenler ve bunların miktarlarının tespit edilmesi ve aynı zamanda hazırlanan propolis örneklerinin toplam polifenol, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici g tayinlerinin gerçekleştirilerek antioksidan özelliklerinin ortaya konularak birbirleriyle kıyaslanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis

Propolis, kovanların yakınındaki bitkilerin tomurcuklarından veya eksüdalarından bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve balmumu, polen ve tükürük enzimleriyle hidroliz ederek oluşturulan doğal reçinemi bir maddedir. Propolis kelimesi Yunanca'da, *pro-* için “ön ya da savunma” ve *-polis* için “şehir” kelimelerinden türetilerek “Kovanın savunulması” anlamında kullanılmaktadır (4, 16, 17).

Arılar kovanlardaki çatlakları kapatmak ve iç duvarları yumuşatarak düzeltmek için propolisi bir yapı malzemesi olarak kullanır ve kovayı savunulabilir hale getirirler (18). Buna ek olarak propolisi, kovanda harici istilacılara ve hastalıklara, ısı yalıtımına (kovan sıcaklığını belirli sıcaklıkta tutma), neme (kovana su girişini önleme) ve rüzgara karşı bir bariyer olarak da kullanılır (16, 19).

Propolis bal arılarının sözde sosyal bağışıklığının önemli bir unsurudur: Arıların sosyal bağışıklık sisteminin bir parçası olarak düşünülebilir, bu da koloniye bir bütün olarak enfeksiyonlara ve parazitlere karşı genel bir savunma sağlar (18). Propolisin arılar için önemine dikkat çeken insanlar, antik çağlardan beri bu reçinelerin faydalarından da yararlanmışlardır (20).

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin rengi arılar tarafından toplanıldığı bitki kaynağına bağlı olarak genellikle kahverengi olmakla birlikte sarı, kırmızı, yeşil veya siyah tonlarına kadar değişebilmektedir (21). İçerdiği uçucu yağlar nedeniyle ise kendisine özgü bir kokuya sahiptir (22). Propolis oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda yumuşak, esnek ve çok yapışkan bir halde bulunurken daha düşük sıcaklıklarda sert ve kırılğan bir hal alır. Erime noktası genellikle 60 °C ile 70 °C arasında değişiklik göstermekle birlikte bazı propolis türlerinde bu sıcaklık 100 °C'yi bulabilmektedir (13, 19). Resim 1’de propolis örneği gösterilmiştir.

2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin kimyasal bileşimi bitki örtüsüne, coğrafi ve ekolojik bölgeye, toplanma mevsimi, toplanma yöntemi ve toplayan arı türlerinin farklılığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (4, 17).



Resim 1. Propolis örneği

Her ne kadar bileşimleri farklılıklar gösterse de propolis örneklerinin çoğu genel kimyasal yapılarında önemli benzerlikler paylaşmaktadır. Ham propolis genellikle yaklaşık %50 reçine ve balsam, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik bileşiklerden oluşur (22). Tablo 1’de propoliste bulunan başlıca bileşenler ve miktarları verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler ve miktarları (Cuesta’dan, 23)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler	45-55
	Fenolik asitler ve esterleri	
	Terpenler	
Mum ve yağ asitleri	Arılar veya bitki kaynaklı mum, Bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25-35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler	
	Eser elementler	
Diğer maddeler	Laktonlar	5
	Kinonlar	
	Steroidler	
	Şekerler	

Propolis, en heterojen doğal maddelerden biridir ve halihazırda 300'den fazla molekülden oluştuğu, üzerinde yapılan pek çok çalışma ile tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (24). Propolis reçinesini oluşturan ana kimyasal gruplar polifenoller olarak adlandırılan flavonoidleri, fenolik asitleri veya bunların esterlerini içermektedir. Bu bileşikler dışında genel olarak propolis içerisinde terpenler, naftalin ve stilben türevlerine ek olarak proteinler, aminoasitler, steroidler, alkoller ve şeker gibi çeşitli bileşenler sıralanabilir (17).

Propoliste başlıca magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe) ve alüminyum (Al) olmak üzere yaklaşık 30 element keşfedilmiştir. Ayrıca B grubu vitaminlerinin yanı sıra C, D, E vitaminleri ile birlikte provitamin-A (β -karoten) ve bir dizi yağ asidi içerir. Tüm bunlara ek olarak propolisin yapısında süksinat dehidrojenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi bazı enzimler de izole edilmiştir (22, 25).

2.1.3. Polifenoller (Fenolik Bileşikler)

Polifenoller, bitkilerde yaygın olarak dağılan geniş bir bileşik sınıfıdır (26). Büyüme, metabolizmayı düzenleme, ultraviyole (UV) radyasyonuna ve çeşitli patojenlere karşı korunma gibi aktivitelerde farklı rollere sahip bitki ikincil metabolitleridirler. Çeşitli bitki türlerinde 8000'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır (27, 28).

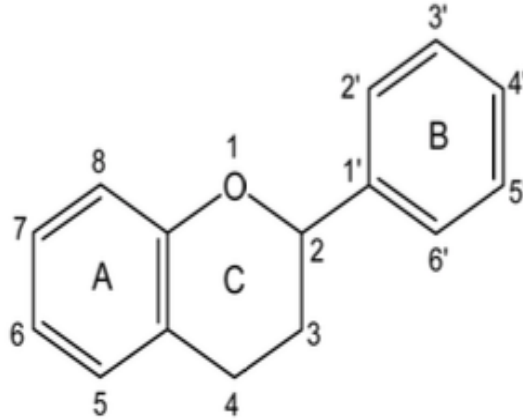
Polifenoller, bir veya daha fazla hidroksil fonksiyonel grubu eklenmiş en az bir aromatik halkaya sahip bileşikler olarak tanımlanırlar. Kimyasal yapıları dayanarak, doğal polifenoller flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar, stilbenler ve diğer polifenoller dahil olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılırlar. Fenolik asitler ve flavonoidler en yaygın polifenol sınıflarıdır ve tüm polifenollerin sırasıyla yaklaşık %30 ve %60'ını oluştururlar (29). Fenolik asitler esas olarak hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit olmak üzere iki gruba ayrılırlar. En çok çalışılan polifenol grubu olan flavonoidler ise altı alt sınıfa ayrılırlar ve bunlar flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller, antosiyanidinler ve izoflavonlardır (30).

Polifenoller, oksidatif strese karşı koruma, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara, diyabete, astıma ve hatta yaşlanmaya karşı koruma dahil olmak üzere potansiyel sağlık yararlarını araştıran çok sayıda çalışmaya tabi tutulmuştur (27). Flavonoidler ve fenolik bileşikler propolisin önemli bileşenleridir ve bu bileşenlerin oksidatif süreçte serbest radikalleri ortadan kaldırma yetenekleri kanıtlanmıştır (31).

2.1.3.1.Flavonoidler

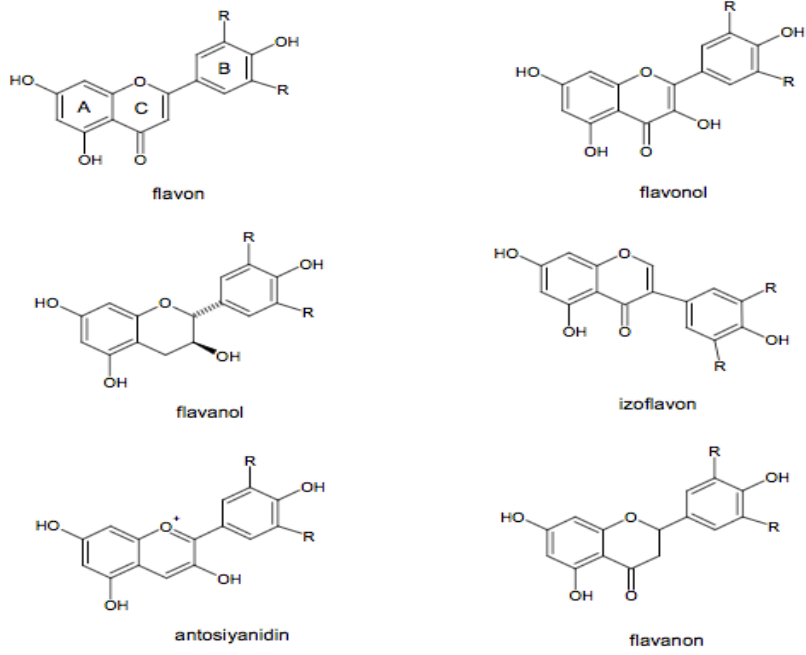
Önemli bir doğal ürün sınıfı olan flavonoidler, bitki krallığında yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerdir. Varlığı eski zamanlardan beri bilinen flavonoidlerin kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri ilk olarak 20. yüzyılın başlarında bildirilmiş olup günümüzde yapısal olarak tanımlanmış 6000'den fazla flavonoid çeşidi vardır (32-34).

Flavonoidler, oksijenli bir heterosiklik ve 2 fenolik halkadan oluşan bir yapıdır (28). Üç karbon atomundan oluşan doğrusal bir zincir (C6-C3-C6) ile değiştirilen iki halka tarafından oluşturulur ve bu yapı genellikle A, B ve C olarak adlandırılan 15 karbon atomlu 2-fenil benzopiran (difenilpropan) yapısında üç halka oluşturmak için kendini yeniden düzenler (35). Yapı karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla olacak şekilde numaralandırılır (36). Şekil 1'de flavonoidlerin temel kimyasal yapısı gösterilmiştir.



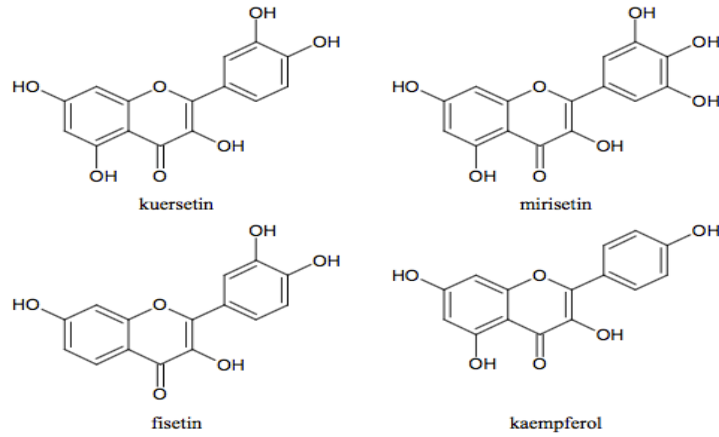
Şekil 1. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı (Stalikaş'tan, 37)

Flavonoidlerde sınıflandırma C halkasının yapısına dayanırken, çeşitlilik hidroksilasyon ve müteakip hidroksil gruplarının metilasyonu ve glikozidasyonundan gelir (38). Flavonoidler en az iki fenolik gruba (-OH) sahiptir ve şekerlerle ilişkili olduklarında glikozitler, yapılarında şeker olmadığında ise aglikon olarak adlandırılırlar (35). Bitkilerde genellikle glikozile halde bulunurlar, yaprak, çiçek ve meyvelerdeki mavi, kırmızı, sarı ve turuncu parlak tonların oluşmasından sorumludurlar (39). Flavonoid sınıflarının temel kimyasal yapıları Şekil 2'de verilmiştir.



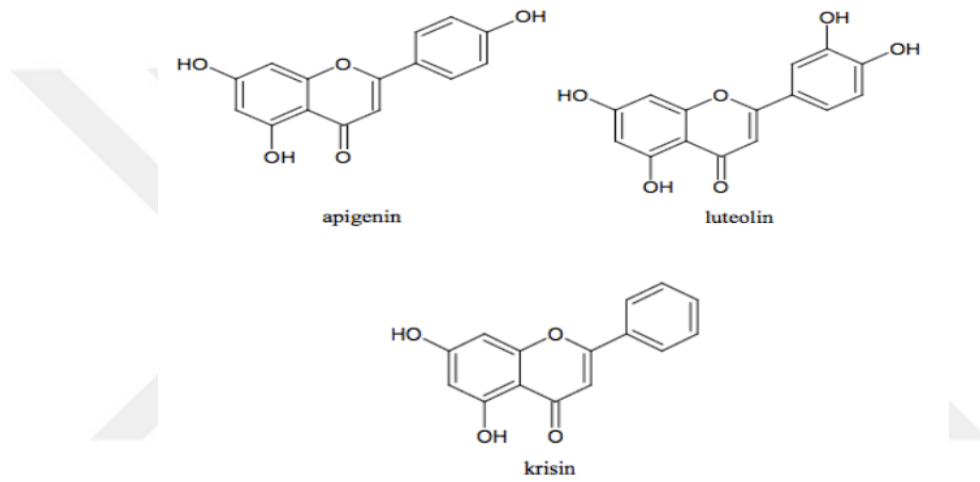
Şekil 2. Flavonoid sınıflarının temel kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

Gıdalardaki flavonoller nispeten düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve C halkasının 3. pozisyonunda glikozile olabilen bir hidroksil grubuna sahiptirler (27, 34). Flavonoller metilasyon ve hidroksilasyon modellerinde çok çeşitlidir ve farklı glikozilasyon modelleri göz önüne alındığında, meyve ve sebzelerdeki en yaygın ve en büyük flavonoid alt grubudur (34). Ana temsilcileri birçok bitkisel gıda bulunan kuersetin ve kaempferol iken mirisetin, galangin, rutin, fisetin ve isorhamnetin önemli flavonoller arasına yer almaktadır (41). Soğan, kıvırcık lahana, pırasa, brokoli ve yaban mersini zengin flavonol kaynaklarıdır (27). Şekil 3'te önemli flavonollerden bazıları gösterilmiştir.



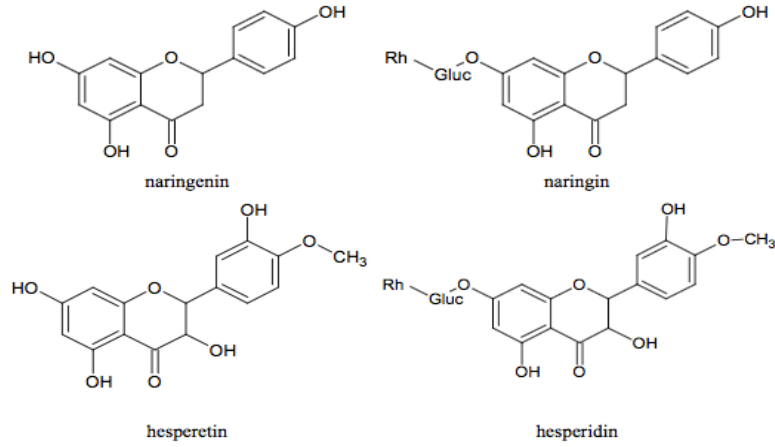
Şekil 3. Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferolün kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

Flavonlar, 2-fenil-1-benzopiran-4-on omurgaya sahip flavonoid ailesinin önemli bir sınıfını oluşturur (32). Flavonlar, C2 ve C3 arasında bir çift bağın varlığı ve B halkasının C2' ye bağlanması ve C4 konumunda bir keto grubu ile karakterize edilirler (41, 42). Flavonlar çoğu glikozitler olarak ortaya çıkar ve çiçek, yaprak ve meyvelerde yaygın olarak bulunmaktadır (34). Apigenin, krisin ve luteolin önemli flavonlardır (41). Meyve kabukları, kereviz, maydanoz, kırmızı biber, papatya, nane ve domates kabuğu zengin flavon kaynaklarıdır (43). Önemli flavonlardan apigenin, luteolin ve krisinin kimyasal yapıları Şekil 4'te gösterilmiştir.



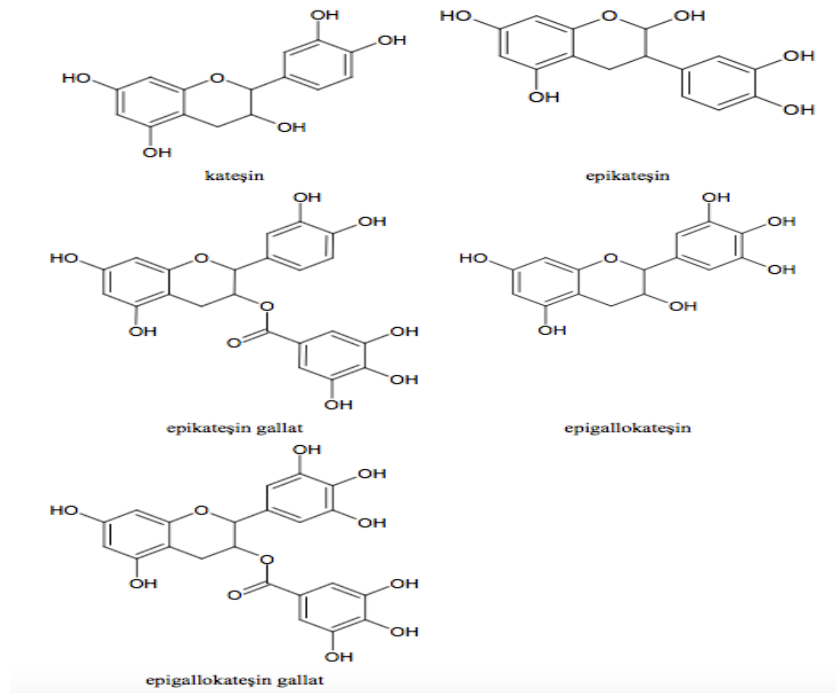
Şekil 4. Apigenin, luteolin ve krisinin kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

Flavanonlar, C halkasını doydurur; bu nedenle, flavonların aksine, 2 ve 3 konumları arasındaki çift bağ doymuştur ve bu, flavonoidlerin iki alt grubu arasındaki tek yapısal farktır. Bitki türüne bağlı olarak, bitkisel kısımlardan üretken organlara kadar tüm bitki kısımlarında, yer üstünde ve altında flavanonlar bulunabilir. Flavanonlar arasında, naringenin ve hesperetin aglikonları ve glikozidleri gıdalardaki yüksek prevalansları nedeniyle özellikle ilgi çekicidir. Naringin, narenciye meyvelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken düşük konsantrasyonda domates ve ürünlerinde bulunan bir flavanondur. Glukoz kısmı nedeniyle acı bir tada sahiptir. Çeşitlerine bağlı olarak farklı naringin içerikleri sunan greylift ve ekşi portakaldaki ana flavonoiddir. Hesperetin ve glikozidi olan hesperidin esas olarak limon, ekşi limon, tatlı portakal ve mandalina gibi narenciye türlerinde yüksek oranda bulunur (44). Şekil 5'te naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 5. Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

Flavanoller hidroksil grubu her zaman C halkasının 3 pozisyonuna bağlı olduğu için flavan-3-ollere de atıfta bulunmakla birlikte flavonoid alt sınıfları arasında en karmaşık yapılara sahip olanlardır. Birçok flavonoidin aksine C2 ve C3 arasında çift bağı yoktur (29, 34). Flavanoller doğada geniş bir dağılıma sahip olan basit monomerleri (kateşinler), oligomerleri ve polimerleri içermekte ve bunların son ikisi proantosiyanidinler veya tanenler olarak bilinmektedirler (29). En önemli flavanollerin kimyasal yapıları Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Kateşin, epikateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin ve epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

İzoflavonoidler, aromatik B halkasının, C halkasındaki 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşan flavonoidlerin bir alt grubudur (41). Östrojene yapısal benzerlikler nedeniyle izoflavonidler, fitokimyasalların bir başka önemli sınıfı olan fitoöstrojen olarak sınıflandırılmışlardır. Ağırlıklı olarak soya fasulyesi ve diğer baklagil bitkilerinde bulunurlar (34). Genistein ve daidzein, bu alt sınıfın temsili üyeleridir ve Şekil 7’de kimyasal yapıları verilmiştir (29).



The image displays the chemical structures of four flavonoid compounds, arranged in a 2x2 grid. Each structure is a flavan-3-ol derivative, consisting of a flavan-3-ol core (a benzopyran with a hydroxyl group at position 3) and a phenyl ring at position 4. The phenyl ring is substituted with various hydroxyl and methoxy groups.

- siyanidin**: The phenyl ring at position 4 is substituted with a hydroxyl group at position 1 and a methoxy group at position 2. The flavan-3-ol core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 8.
- malvidin**: The phenyl ring at position 4 is substituted with a methoxy group at position 1, a hydroxyl group at position 2, and a methoxy group at position 3. The flavan-3-ol core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 8.
- apigenidin**: The phenyl ring at position 4 is substituted with a hydroxyl group at position 1. The flavan-3-ol core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 8.
- delphinidin**: The phenyl ring at position 4 is substituted with hydroxyl groups at positions 1, 2, and 3. The flavan-3-ol core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 8.

10

Doğada tüm bu flavonoid bileşikleri, bitkilerden elde edilen ürünlerdir ve bitkinin çeşitli kısımlarında bulunmakla birlikte insan organizmasında sentezlenememektedirler (34, 45). Polifenolik bitki sekonder metabolitlerinin en geniş ve yaygın grubu olup bitkilerde biyolojik süreçte önemli roller üstlenirler (34). Flavonoidler sebze ve meyve gibi birçok bitkisel gıda ve sıklıkla tüketilen çay ve meyve suyu gibi içeceklerde yer aldığından günlük insan diyetinde önemli miktarlarda bulunmaktadır (46). İnsan beslenmesinin önemli bir bölümünü oluşturmaya ve geleneksel bitki tıbbında binlerce yıldır kullanılmasına rağmen flavonoidlerin sağlık üzerine olası etkileri son yıllarda büyük ilgi odağı olmuştur (47).

Flavonoidler, sağlığı geliştiren geniş bir etki yelpazesıyla ilişkilidir. Çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşendirler ve bu durum flavonoidlerin çeşitli biyolojik özelliklerine atfedilir (34). Flavonoidler, çok sayıda akut ve kronik insan hastalıklarında olası yararlı etkilerini değerlendirmek için çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışmada kullanılmıştır (41). Bu çalışmalarda flavonoidlerin antiviral, antibakteriyel, anti-inflamatuvar, antikanser ve nörotoprotektif fonksiyonlar gibi bir dizi biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (32). Bununla birlikte, en çok ilgi, serbest radikal oluşumunu azaltma ve serbest radikalleri temizleme yeteneklerinden dolayı flavonoidlerin antioksidan aktivitesine gösterilmiştir (34).

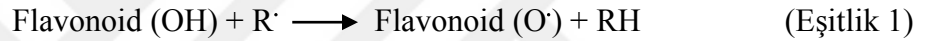
2.1.3.2. Flavonoidlerin Antioksidan Özellikleri

Flavonoidler insan vücudunda bir dizi koruyucu işlevi yerine getirirler. En önemli biyolojik özellikleri ise antioksidan olarak görev yapmalarıdır (34). Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu; aterosklerozis, kanser ve kronik inflamasyon gibi hastalıkların önemli etkenleridir (48). Flavonoidlerin birçok biyolojik aktivite ve hastalıklara karşı koruyucu etkileri oksidatif stresi ve buna bağlı olarak oksidatif hasarı azaltma yeteneklerinden kaynaklanır (46).

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri hem *in vitro* hem *in vivo* olarak detaylıca araştırılmıştır. Çalışmalarda flavonoidlerin reaktif oksijen türlerini azaltma, metal şelatlama, α - tokoferil radikallerini ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu azaltma veya engelleme gibi pek çok özelliği belirlenmiştir (49). Birçok flavonoid bileşiği, organizmada fizyolojik işlevlerinin yanı sıra oksijen metabolizmasında önemli bir rol oynayan, özellikle Fe ve Cu olmak üzere, geçiş metal iyonlarını etkili bir şekilde kenetlemektedir (25). Flavonoidler bu işlevi taşıdıkları hidroksil ve karboksil gruplarıyla yerine getirirler ve böylece serbest radikal

oluşum reaksiyonlarını ve lipidlerin oksidasyonunu önleyip antioksidan etki oluştururlar (33, 34).

Flavonoidler, serbest radikallerin üretimi üzerindeki inhibitör etkileri ve reaktif oksijen türevi radikalleri (ROS), reaktif azot türlerini (RNS) ve diğer reaktif türleri süpürücü aktiviteleri nedeniyle antioksidan etkiye sahiptir (33). Serbest radikallerin neden olduğu hasarı çeşitli şekillerde önleyebilirler ve bunun bir yolu da serbest radikallerin doğrudan atılmasıdır. Flavonoidler, radikaller tarafından oksitlenir ve daha kararlı, daha az reaktif bir radikal ile sonuçlanır. Başka bir deyişle, flavonoidler, radikalın reaktif bileşiği ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder. Flavonoidlerin hidroksil grubunun yüksek reaktivitesinden dolayı, “Eşitlik 1” de açıklandığı gibi radikaller etkisiz hale getirilir (49, 34). Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerini yakalaması aşağıdaki mekanizmayla gerçekleşmektedir (50).



Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, kimyasal yapılarından, yapılar içindeki özel ikame modellerinden ve hidrojen veren moleküller olarak hareket etmelerini sağlayan fenolik hidrojenlerden kaynaklanır (33). Flavonoidlerde fenol gruplarının varlığı onlara antiradikal aktiviteyi daha çok kazandırır çünkü süpürme sırasında oluşan radikaller rezonans stabilize edilir (51).

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri yapılarında bulunan şu bileşiklerden kaynaklanmaktadır:

- B halkasındaki *orto*-dihidroksi (katekol, radikal hedef yeri) grubu, önemli ölçüde ROS ve RNS süpürme yeteneği gösterir ve oluşturulan fenoksil radikalının yüksek stabilitesini sağlar. B halkasındaki hidroksil grupları, radikaller için elektron vericileridir.

- C2 ve C3 arasındaki çift bağ ve C halkasında 4-okso grubunun varlığı, B halkasında bir elektronun yer değiştirmesinin nedenidir. Antioksidan özellik, aromatik halkanın bir elektronunun yerinden çıkmasından kaynaklanır. Bileşiklerin serbest radikallerle reaksiyonu sırasında aromatik halka rezonansının etkisiyle fenoksil radikalleri oluşur ve stabilize olur.

- A ve C halkasında 4-okso gruplarının varlığında C3 ve C5 karbonuna yakın hidroksil grupları, maksimum serbest radikal süpürücü etkileri üretir (25).

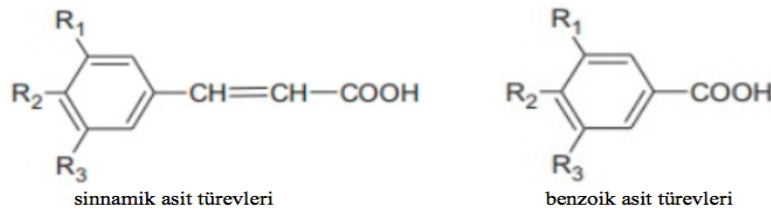
Bu her üç grubu taşıyan flavonoidler maksimum antioksidan aktivite gösterirken, daha az grup taşıyanların ise antioksidan özelliği daha zayıf olduğu belirtilmektedir (52).

Glikozilasyon, flavonoidlerin antioksidan yeteneklerini azaltır. Aglikon yapıdaki flavonoidler, glikosidik bağlantılı formlarından daha güçlü antioksidanlardır. Flavonoidlerdeki antioksidan özelliğin azalmasının bir diğer sebebi de muhtemelen sterik engellenmenin bir sonucu olarak flavonoiddeki C3 pozisyonunda metoksil gruplarının varlığı olabilmektedir (25). Tüm bunlar göz önüne alınarak yapılan pek çok çalışma, propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan flavonoidlerin ve fenollerin insan vücudundaki serbest radikalleri temizleyebileceğini göstermektedir (31).

2.1.3.3. Fenolik Asitler

Benzen halkaları üzerindeki hidrojen atomlarının bir karboksilik asit grubu ve en az bir hidroksil ile yer değiştirmesiyle oluşan bir bileşikler sınıfı olan fenolik asitler, bitkilerde, bitki besinlerinde ve insan metabolitlerinde yaygın olarak bulunur (53). Fenolik asitler, serbest, konjuge veya çözünmez bağlı formlarda bulunurlar (54). Gıdaların tipik duyusal özelliklerine katkıda bulunan, renk, çekingenlik, burukluk ve sertlik veren aromatik ikincil metabolitlerdir. Flavonoidlerin aksine, serbest fenolik asitler yüksek biyoyararlanıma ve suda iyi çözünürlüğe sahiptir (53, 55).

Fenolik asitler esas olarak iki alt gruba ayrılır: hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler. Sınıflandırma iki farklı karbon çerçevesi ve aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının konumuna ve sayısına bağlıdır (55). Şekil 9'da fenolik asitlerin temel kimyasal yapısı gösterilmiştir.

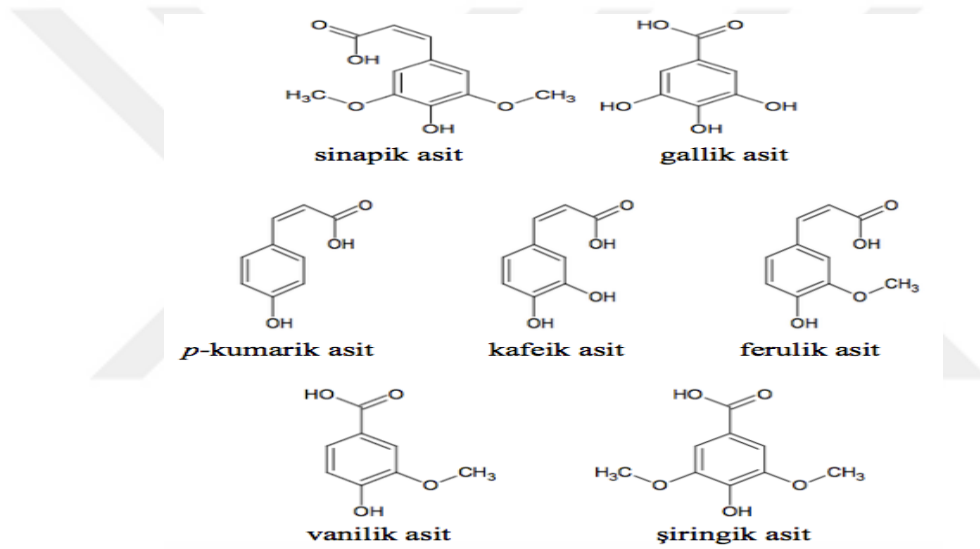


Şekil 9. Fenolik asitlerin temel kimyasal yapısı (Calinoiu'dan, 54)

Hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁ yapısına sahip benzoik asit türevleridir. Gallik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, ellagik asit, siringik asit ve vanilik asit, aromatik halkanın modifikasyonuna bağlı olarak kendi aralarında farklılık gösteren başlıca hidroksibenzoik

asitlerdir. Yenilebilir meyve ve sebzeler genellikle çok düşük konsantrasyonlarda hidroksibenzoik asit içerirler (54, 55).

Hidroksisinnamik asitler, C6-C3 yapısı çerçevesine sahip sinnamik asitlerin türevleridir. Hidroksisinnamik asitler genellikle çeşitli konjuge formlarda (esterleri) bulunurlar. Ferulik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit ve sinapik asit en çok öne çıkan hidroksisinnamik asit türevleridirler. Doğada birçok meyve ve sebze yaygın olarak bulunan kafeik asit kuinik asit ile birlikte esterleşerek klorojenik asidi oluşturmak için bir araya gelir (55, 56). Bazı hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Bazı hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları (Öztürk'ten, 40)

Genel sağlık iyileştirmesine katkıda bulunan fenolik asitler aynı zamanda oksidatif hasar hastalıklarına karşı koruma, çeşitli kanser türlerinin önlenme, anti-inflamatuvar, immünomodülatör, antialerjik, antiaterojenik, antitrombotik, kardiyoprotektif ve antidiyabetik aktivite sergilemektedirler (57).

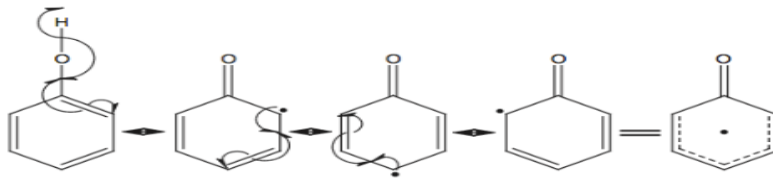
2.1.3.4. Fenolik Asitlerin Antioksidan Özellikleri

Fenolik asitler, tıpta ve sağlıklı gıdalarda potansiyel uygulamaları olan serbest radikal kaynaklı vücut hasarını ve kronik hastalıkları giderebilen mükemmel doğal antioksidanlar olarak kabul edilir (53). Doğrudan antioksidanlar olarak bilinmesinin yanı sıra; endojen koruyucu enzimleri indükleyerek dolaylı antioksidan aktivite ve sinyal

yollarında pozitif düzenleyici etkiler gösterirler. Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi için çeşitli mekanizmalar bilinmesine rağmen, hidrojen atomu bağış yoluyla radikal temizlemenin ana yöntem olduğuna inanılmaktadır (55).

Fenolik asitlerin antioksidan yetenek merkezi fenolik hidroksildir, bu nedenle fenolik hidroksillerin sayısı ve konumu, antioksidan aktiviteleri ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca metoksi ve karboksilik asit grupları da fenolik asidin antioksidan özelliği üzerinde önemli etkilere sahiptir (53). Fenolik asitlerde aromatik halka üzerindeki gruplar, yapının stabilizasyonunu etkiler ve sonuç olarak radikal söndürme kabiliyetini etkiler. Bu nedenle, farklı fenolik asitler farklı antioksidan aktiviteye sahiptirler (55).

Şekil 11, fenoksil radikallerinin konjuge rezonans stabilizasyonunun bir gösterimidir. Fenoksil-radikal elektronu başlangıçta yüksek oranda elektronegatif oksijen atomunda bulunmasına rağmen, elektronun lokalize olması ve aromatik halka boyunca paylaşılması muhtemeldir. Hidrojen atomu, “Eşitlik 2” de antioksidan bileşiğin reaktan hidroksi ikame edicisine ne kadar zayıf tutulursa, serbest radikal substratlarla hidrojen atom transferi reaksiyonlarına o kadar olası ve daha hızlı katılacaktır. Bu nedenle, bir antioksidan türünün gereken bağ ayrışma entalpisi ne kadar büyükse, hidrojen atom transfer mekanizması aracılığıyla serbest radikal söndürme reaksiyonlarına katılmada daha az aktif bir fenol bileşiği olacaktır (58).



Şekil 11. Fenoksil radikallerinin konjuge rezonans stabilizasyonu (Craft'tan, 58)

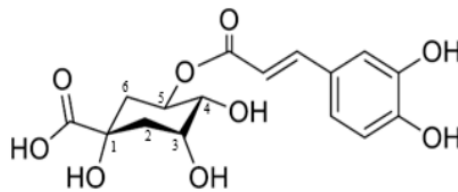
Monohidroksi asitler etkili hidroksil radikal süpürücülerdir. Ayrıca, halkada ilave metoksi grubunun varlığıyla birlikte bir hidroksil grubu ile asitli ortamda antioksidan aktivite artar. *Orto* pozisyonunda bir alkil veya metoksi grubunun varlığı da fenolik asitlerin stabilitesini ve antioksidan özelliklerini artırır.

Benzoik asidin dihidroksi türevleri, hidroksil grupları 3. ve 5. pozisyonlarda görüldüğünde en güçlü antioksidan özellikleri gösterir. Benzoik asit türevleri arasında 3, 4 ve 5. pozisyonlarında üç hidroksil grubu içeren gallik asit, çok iyi antioksidan özellikle karakterize edilir. Aromatik halkadaki ek hidroksil gruplarının antioksidan aktivitenin artması üzerindeki etkisi sinnamik asit durumunda da gözlemlenebilir. Bu nedenle kafeik asitin, kumarik asitten daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmektedir.

Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesinin gücü aynı zamanda karboksil grubunun konumuna bağlıdır. Grubun hidroksibenzoikasitlerin bağışlayıcı özellikleri üzerinde olumsuz bir etkisi vardır. Etilen grubu içeren bir yan zincire sahip olan hidroksisinnamik asitler ise hidrojen bağışlama konusunda daha büyük bir yetenek sergiler ve bu şekilde oluşturulan radikal daha stabildir. Bu nedenle, sinnamik asit türevleri, benzoik asit türevlerinden daha iyi antioksidan özellikler gösterir (25).

2.1.3.5. Kafeoilkuinik Asitler

Klorojenik asitler bitkiler tarafından üretilen ve sinnamik asit türevlerinin (kafeik, ferulik ve *p*-kumarik asitler dahil olmak üzere) kuinik asit ile esterleştirilmesiyle sentezlenen fenolik bileşikler grubudur. Klorojenik asitler terimi, bu sınıftaki ilk bileşik olan klorojenik asitten kaynaklanmaktadır (59). Bununla birlikte, klorojenik asitler terimi, kumaroil kuinik asitler, feruloil-, kafeoil- ve dikafeoil- de dahil olmak üzere kuinik asit ile birlikte tüm hidroksil sinnamik esterleri ifade eder. Ayrıca, her bir alt grup için birkaç izomerik klorojenik asitler formu vardır. Klorojenik asit kimyasal yapısı nedeniyle Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) mevcut numaralandırma kurallarına göre, 5-O-kafeoilkuinik asit olarak adlandırılmalıdır ancak, hala birçok araştırmacı IUPAC'dan önce terminoloji olan 3-O-kafeoilkuinik asidi kullanmaktadır (60). Klorojenik asidin kimyasal yapısı ve mevcut IUPAC numaralandırması Şekil 12'de gösterilmektedir.



Şekil 12. Klorojenik asidin kimyasal yapısı ve IUPAC numaralandırılması (Santana Galvez'den, 61)

Klorojenik asit, bitkilerde yaygın olarak dağılan insan beslenmesindeki ana polifenollerden biridir. Klorojenik asitlerin ana kaynaklarından bazıları tartışmasız dünyadaki popüler olarak tüketilen kahve, çay gibi içecekler ile kakao, elma ve armut gibi yiyeceklerdir. Birçok sağlığı geliştirici özelliğe sahip olduğundan klorojenik asit üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (59, 60). Yapılan bu çalışmalarda klorojenik asidin güçlü antioksidan özelliği başta olmak üzere anti-inflamatuvar, antikanser, antidiyabetik, antihipertansif ve antinörodejeneratif gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (59, 61, 62).

Klorojenik asitlerin antioksidan etkisi çeşitli bitki ekstraktlarında bildirilmiştir (60). Klorojenik asitler potansiyel sağlık yararları, serbest radikalleri azaltmak ve oksidasyon reaksiyonlarını engellemek için hidrojen atomları vermesinin bir sonucudur. Serbest radikalleri azaltmak ve oksidasyon reaksiyonlarını engellemek için hidrojen atomları verdikten sonra, klorojenik asitler ilgili fenoksil radikallerine oksitlenir ve bu fenoksil radikalleri, rezonans stabilizasyonu ile hızlı bir şekilde stabilize edilir (63).

2.1.4. Propolis Bitkisel Kaynağı

Bilimsel çalışmalar, propolis bileşenlerinin üç farklı kaynaktan geldiğini göstermektedir. Bunlar balmumu ve tükürük gibi hayvansal, çeşitli ağaçların tomurcuklarından salgılanan reçineler gibi bitkisel ve propolis üretimi sırasında tesadüfen ortaya çıkan polen, nektar ve bal gibi maddelerdir (21).

Propolisin üretiminde arılar için mevcut olan malzemeler; yaprak ve yaprak tomurcukları, reçine, zambak, vb. gibi bitkiler tarafından aktif olarak salgılanan maddeler ve bitkilerdeki yaralardan atılan maddelerdir (64). Bal arıları oportünisttir (koşullardan kendi çıkarlarına göre yararlanan), böylece ihtiyaçlarını mevcut kaynaklardan toplar (kovanın yakınındaki bitki örtüsünden) ve reçineyi oluştururlar; dolayısıyla propolisin kimyasal bileşimi esas olarak bu fitocoğrafik özellikler ile belirlenir (17, 65). Propolisin kavak (*Populus* spp.), huş (*Betula* spp.), çam (*Pinus* spp.), meşe (*Quercus* spp.), karaağaç (*Ulmus* spp.), kızılğöbe (*Alnus* spp.) ve söğüt (*Salix* spp.) gibi çeşitli bitkisel kaynaklardan toplandığı bildirilmiştir (66, 67).

Birçok çalışma, kovanın etrafındaki bitkilere, hasat alanının coğrafyasına ve iklim koşullarına göre farklı kimyasal bileşime sahip dünyadaki farklı propolis türlerini ortaya çıkarmıştır. Farklı kavak türlerinin tomurcuk eksüdatları, esas olarak Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika dahil olmak üzere ılıman bölgedeki ana propolis kaynağıdır ve bu nedenle ılıman

bölge propolisi genellikle kavak (poplar) propolis olarak adlandırılır. Kavak propolis aynı zamanda Çin ve Yeni Zelanda'nın tropikal olmayan bölgelerinde de bulunabilmektedir (16). Bu bölgelerdeki propolis örnekleri benzer kimyasal bileşim göstermekle birlikte biyolojik olarak aktif bileşikler olan flavonoidler, fenolik asitler ve bunların esterleri dahil polifenollerle karakterize edilirler (67, 68). Kavak tipi propolis içindeki fenolik asitler, türevleri ile birlikte esas olarak benzoik ve sinnamik asit ile temsil edilir (14). Türkiye, Bulgaristan, Yunanistan ve Cezayir'den farklı propolis örneklerinin kimyasal bileşimi esas olarak flavonoidler, kafeik ve ferulik asitlerin esterlerini içerdiği ve bunun da ana kaynaklarının kavak tomurcukları olduğunu belirtilmektedir (67).

Huş tipi propolis özellikle Rusya'da bulunur ve ana bitki kaynağı *Betula verrucosa*'dır. Ana biyolojik aktif bileşikleri kavakta bulunanlardan farklı flavonlar ve flavonollerdir (16, 67). Tropikal bölgelerdeki propolis bileşenleri ise bitki örtüsündeki farklılık nedeniyle ılıman bölgelerdekilerden farklıdır (69). Bu bölgeden elde edilen propolisler ağırlıklı olarak prenile *p*-kumarik asit türevleri, flavonoidler, benzofenonlar, lignanlar ve terpenler içerir (70). *Clusia* spp.'nin Küba ve Venezuela bulunan *Clusia* propolisinin baskın kaynakları olduğu bildirilmiştir. Bu bitkiler, poliprenillenmiş benzofenonlar açısından zengindir (16).

Brezilya'da, botanik kökenlerine, fiziksel özelliklerine, kimyasal özelliklerine ve coğrafi konumlarına göre pek çok propolis türü tanımlanır ve sınıflandırılır (13). Brezilya yeşil propolisi en çok incelenen propolistir ve Brezilya'ya özgü bir bitki olan *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) en önemli botanik kaynağıdır. Brezilya yeşil propolisi esas olarak prenile fenilpropanoidler, triterpenler, diterpenler, klorojenik ve kafeoilkuinik asitler bakımından zengindir. Bir başka tür olan kahverengi propolis ise *Copaifera* türlerinden gelir (16, 17). Botanik kaynağı oldukça değişken olan kahverengi propolis örnekleri başlıca flavonoid ve terpenleri içermekle birlikte yapısında asetofenonlar ve klorojenik asit gibi bileşenler de bulunmaktadır (70, 71). Kırmızı propolis ise son zamanlarda kuzeydoğu Brezilya'da, Küba ve Meksika bildirilmiştir. Bu bölgelerdeki arılar *Dalbergia ecastophyllum* (L.) *Taub* bitkisinin yüzeyinde ve dal ağzında kırmızı reçineli sızıntıları toplar. Farklı bir bitki türü kullanıldığı için bu propolis türü o bölgedeki diğer propolis türlerinden farklı bileşim gösterir. Bu propolis örneği, izoflavonoidler, prenile edilmiş benzofenonlar ve naftokinon epoksit içermektedir (13, 16, 17, 70).

Pasifik Okyanusu bulunan Okinawa ili, Tayvan ve Endonezya'dan elde edilen propolis örneklerinin Avrupa ve Brezilya gibi diğer bölgelerde görülmeyen C-prenil-flavanonlar açısından zengin olduğu ve bunun sebebinin ise o bölgelerde yaygın olarak dağılmış *Macaranga tanarius* tropikal ağaçtan kaynaklandığı bilinmektedir (16, 72).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise Akdeniz bölgesinde yeni bir tür propolis ortaya çıkmıştır. Akdeniz propolisi olarak adlandırılan ve bitki kaynağının *Cupressaceae* ailesine ait olduğu Sicilya, Girit, Yunanistan ve Malta'dan gelen bu propolis türleri ana bileşenler olarak diterpenleri sunmaktadır (16).

Aşağıdaki Tablo 2'de bitki kaynağı, coğrafi kökeni ve başlıca bileşenlerine göre en yaygın propolis türleri verilmiştir.

Tablo 2. Bitki kaynağı, coğrafi kökeni ve başlıca bileşenlerine göre en yaygın propolis türleri (Sforcin'den, 73)

Propolis Tipi	Bitki Kaynağı	Coğrafi Kökeni	Başlıca Bileşenler
Kavak tipi	<i>Populus</i> spp.	Avrupa, Asya'nın tropik olmayan bölgeleri, Çin, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika	Flavonlar ve flavanonlar, fenolik asitler ve esterlerini içeren polifenoller
Huş tipi	<i>Betula verrucosa</i>	Rusya	Flavonlar ve flavonoller
Kahverengi tip	<i>Copaifera</i>	Brezilya	Flavonoidler ve terpenler
Yeşil tip	<i>Baccharis</i> spp.	Brezilya	Prenillenmiş fenilpropanoidler, diterpenler, triterpenoidler, klorojenik ve benzoik asitler
Kırmızı tip	<i>Dalbergia</i> spp.	Brezilya, Meksika, Küba	İzoflavonoidler, prenillenmiş benzofenonlar ve naftakinon epoksit
Clusia tipi	<i>Clusia</i> spp.	Küba ve Venezuela	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik tipi	<i>Macaranga tanarius</i>	Pasifik Bölgesi (Endonezya, Tayvan ve Okinawa)	Prenillenmiş flavanonlar
Akdeniz tipi	<i>Cupressaceae</i> ailesi	Yunanistan, Girit, Sicilya, Malta	Diterpenler

Propolisin çeşitli faktörlere bağlı olan kimyasal bileşimi çok değişken olup bu durum tıbbi kullanım ve standardizasyon için problem oluşturur. Propolisin evrensel standardizasyonu zor ve karmaşıktır. Bitki kaynağının bileşimi propolisin bileşimini belirlediği için propolis kompozisyonunun ve botanik kökeninin ayrıntılı bir araştırması zorunludur (4, 67). Bu sebeple Dünya'nın farklı bölgelerinden propolis örneklerin karşılaştırıldığı çeşitli türde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kökenlerden gelen propolisin farklı kimyasal bileşime sahip olup farklı biyolojik aktivitelere yol açabildiği, ancak aynı tür biyolojik aktivite de sergileyebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle son yıllarda propolisin çeşitli biyolojik özelliklerini araştırmak ve karşılaştırmalar yapmak için gerçekleştirilen hemen hemen her çalışma, kullanılan propolis örneklerinin karakterizasyonunu içermektedir. Bununla birlikte, propolisin sağlık sistemine kabul edilebilmesi için standardizasyona ve bunun sağlanabilmesi için de tüm dünyada uygulanabilecek bazı yöntemlerle kimyasal analizlere ihtiyacı vardır (21).

2.1.5. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu

Propolis reçineli bir maddedir ve odun, balmumu, polen ve hatta ölü arılar gibi safsızlıklar içerir. Bu nedenle propolis hammadde olarak kullanılamaz ve çözücülerle ekstraksiyon ile saflaştırılmalıdır. Bu işlem sırasında inert materyali çıkarmalı ve polifenolik fraksiyonu korumalıdır (73, 74).

Propolis örneklerinin seçilmesi kadar önemli olan bir adım da ekstraksiyon işlemidir. Propolisin ekstrakte edilmesi ve ekstrakt içindeki konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan yöntem de önemlidir. Propolis örnekleri çeşitli ekstraksiyon metodları ile hazırlanmaktadır. Çalışmalarda kullanılan bazı metodların yüksek ekstraksiyon verimi sağladığı, kısa zaman dilimleri ve daha az emek gerektirdiği belirtilmektedir (67).

Ekstraksiyonu etkileyen önemli parametrelerden biri uygun çözücünün seçilmesidir. Biyolojik deneylerde kullanılan ekstraktlardaki yaygın çözücüler farklı konsantrasyonlarda etanol, metanol ve sudur. Ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücüler propolisin aktivitesini etkileyebilir, çünkü farklı çözücüler farklı bileşikleri çözer ve çıkarır. Biyolojik olarak aktif bileşenler (polifenolik bileşenler; fenolik asit ve flavonoidler) bakımından zengin propolis ekstraktları elde etmek için etanol ile ekstraksiyon özellikle uygundur (75). Propolisin bileşimindeki çoğu madde lipofilik özellikte olduğundan ve lipofilik bileşikler etanol içerisinde çözünür durumda bulunduğu için propolisin ekstrakte edilmesinde etanol yaygın kullanılan çözücüdür (76). Bununla birlikte propolisin özellikle su başta olmak üzere

metanol, aseton, kloroform ve propilenglikol gibi farklı çözücülerle ekstraksiyonu ile de flavonoidler ve fenolik asitlerin elde edildikleri bilinmektedir (77). Çözücünün seçimi, ekstraktın nihai kullanımına bağlıdır. Tıbbi ve gıda teknolojisi işlemleri neredeyse her zaman etanol veya sulu ekstraktlarla gerçekleştirilir. Bunun yanısıra glikol ekstreleri, su bazlı emülsiyonlarda çözünmeyi iyileştiren birçok kozmetik uygulama için kullanılabilir (65, 67).

Literatürdeki çalışmaların çoğunda polifenollerin ağırlıklı olarak bulunduğu etanolik propolis ekstraktları kullanılmasına rağmen, sulu propolis ekstraktlarıyla da yapılan çalışmaların son zamanlarda arttığı gözlenmektedir (78). Etanolün suya kıyasla propolis bileşenlerinin büyük kısmını çözmesi bu çözücüyü daha avantajlı hale getirdiği düşünülmese de etanol ile hazırlanan ekstraktların hoş olmayan tat ve aromatik kokusu, bazı kişilerde alkol intoleransı yapabilmesi, yüksek alkol kullanımının toksik etkileri gibi bazı dezavantajları söz konusudur (76). Üstelik normal insan fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan laboratuvar çalışmalarında sulu ekstraktın hücrelerde herhangi olumsuz bir etki göstermediği ancak etanolü ekstraktın ise hücre siklusunda değişikliğe sebep olduğu gösterilmiş ve apiterapi uygulamalarında normal hücrelere sitotoksik etki göstermeyen ekstraktların kullanılması gerektiği belirtilmiştir (79).

Propolisin sulu ekstraktındaki bileşenlerin etanolik ekstrakta göre daha yüksek antioksidan aktiviteye ve bazı enzimlere karşı yüksek inhibitör/aktivatör etkisine sahip olduğu belirtilmektedir. Su ile ekstrakte edilmiş çeşitli propolis örneklerinin sinamik asit ve türevleri (*p*-kumarik asit, artemisin C, drupanin, bakkarin) ve kafeoilkuinik asit türevlerini (klorojenik asit; dikafeoilkuinik asit; 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit; 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit; 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit; 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit) içerdiği tespit edilmiştir (80-82). Türk propolisinin sulu ekstraktıyla yapılan çalışmalarda ise fazla miktarda kafeik asitin yanı sıra trans-sinamik asit, klorojenik asit ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit içerdiği tespit edilmiştir (78). Propolisin sulu ekstraktıyla ilgili yapılan çalışmalarda anti-inflamatuvar, hepatoprotektif etki, yara iyileştirici ve trombosit agregasyonunun inhibisyonu etkinliği de belirlenmiştir (83, 67).

2.1.6. Propolisin Analizinde HPLC-DAD Kullanımının Önemi

Güçlü kromatografik araçların kullanımı, propolis gibi karmaşık karışımlardaki biyolojik aktif maddelerinin belirlenmesi ve ölçümünü sağlamak için gereklidir (8). Literatürde propolisin kompleks kimyasal bileşimini analiz etmek için HPLC, yüksek

performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Çok gelişmiş tekniklerin olduğu günümüz çağında propolisin standardizasyonu karşısında özellikle HPLC-DAD, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) gibi çok yüksek ayırma verimliliği olan tekniklerin daha uygun teknikler olduğu belirtilmektedir. Bu teknikler, bilinmeyen interferansların varlığında bile ilgili birkaç bileşeni doğrudan ve aynı anda nicelleştirmeye izin veren önemli avantaja sahiptirler.

Tüm bu metodlar arasında farklı dedektörlerle birleştirilmiş HPLC şüphesiz polifenolik bileşiklerin karakterizasyonu için mükemmel ayırma kabiliyeti ile en yaygın kullanılan ayırma tekniği olarak kabul edilir (84). Bu teknik, çeşitli polarite, moleküler kütle, uçuculuk ve termal hassasiyete sahip bileşikler gibi çok sayıda bileşik türü için geçerlidir (85). Bununla birlikte, geleneksel HPLC yönteminin seçiciliği, polifenollerin yapısal benzerliği ve propolis matrisinin yüksek karmaşıklığı nedeniyle, yüksek verimli kolonlarla veya daha uzun elüsyon süresiyle bile bileşiklerin ayrılması zorluğu gibi bazı dezavantajları vardır.

Karmaşık numunelerde ilgili birden fazla analitin aynı anda nicelleştirilmesinde büyük başarı sağlayan HPLC-DAD, nispeten polar doğası bulunan propolisin fenolik bileşiklerinin ayrılması ve miktar tayini için yaygın olarak kullanılan favori yöntemlerden birisidir (73). HPLC analizlerinde uzun yıllardan beri UV dedektörler kullanılmaktadır. Günümüzde ise DAD en sık kullanılan UV/Vis (ultraviyole/görünür) bölge dedektör tiplerinden biri olmuştur. DAD ile birleştirilmiş HPLC, analitleri kromatogramdaki tepe noktalarına ayırabilir. Kantitatif bilgiye ilaveten kalitatif bilgi de sunması sebebiyle DAD pik tanımlanmasında güvenilir şekilde kullanılmaktadır. DAD'ın, UV dedektörüne göre çeşitli üstünlükleri vardır. Ancak en önemlisi tüm dalga boylarını aynı anda ölçmesi ve tasarımıdaki farklılık sayesinde analizlerde eş zamanlı olarak örnekteki UV-Vis absorpsiyonuna sahip bileşenlerin UV-Vis spektrumlarının da elde edilebilmesidir (85). Bu özellik, özellikle bir numunede farklı polifenol grupları karıştırıldığında, ayırma sisteminin performansını önemli ölçüde artırır. Uygun dalga boyları seçildiğinde (örneğin maksimum absorpsiyonda), tüm gruplar en yüksek hassasiyetle tespit edilebilir. Algılama dalga boyunun uygun bir seçimi, çözülmemiş veya zayıf çözülmüş bir tepe noktasının

nicelleştirilmesini de mümkün kılabilir. Bununla birlikte, numuneler çok benzer bileşikler içerdiğinde, spektruma dayalı geleneksel yaklaşımların kullanımı genellikle sınırlıdır (86).

2.1.7. Propolisin Biyolojik Aktivitesi

Propolis çok eski yıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (16). Propolis ve bileşenlerinin antioksidan, anti-inflamatuvar, immünomodülatör, antikanser, antimikrobiyal, sitotoksik, hepatoprotektif, nöroprotektif, antifungal, antibakteriyel, antiviral ve antiülser gibi bilimsel olarak kanıtlanmış çok sayıda yararlı biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmekte ve bu sebeple Avrupa'dan Doğu Asya'ya geleneksel tıp, kozmetik ve gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır (11, 12, 19, 45).

Literatürde propolisin gösterdiği biyolojik aktivitelerin, içerisindeki flavonoidler, terpenoidler, aromatik asitler ve esterleri gibi bileşiklerden kaynaklandığı belirtilmektedir (13). Çeşitli etkenler propolisteki biyolojik olarak potansiyel etkilerinden sorumlu olan aktif ana bileşenleri ve bunların aktivitesini değiştirir. Çalışmalarda çeşitli coğrafik ve botanik kökenlerden incelenen propolis örneklerinin bileşen içeriğindeki farklılıklar doğrulanmıştır. Bu kimyasal bileşimdeki farklılık propolis örneklerinin farklı biyolojik aktivite göstermelerine sebep olabilmektedir. Aynı zamanda yine bu çalışmalarda farklı bileşenlere sahip propolis örneklerinin birçok benzer biyolojik aktivite göstermekte olduğu da görülmüştür (18).

2.1.8. Propolisin Kullanım Şekilleri ve Kullanım Alanları

Antik çağlardan beri, insanlık propolisi biyolojik ve farmakolojik özellikleri nedeniyle farklı alanlarda kullanmaktadır. Propolisin yüksek tıbbi aktivitesi ve terapötik etkinliği, geleneksel tıbbi uygulamada geniş kullanım alanına katkıda bulunmuştur (14). Mısırlılar, propolisin çürüme önleyici özelliklerini kabul edip kadvralarını mumyalamak için kullanmışlardır. Tıbbi özelliklerini ilk tanıyanlar ise Romalılar ve Yunan doktorlar olmuştur. Antik Yunanistanda propolis, çeşitli enfeksiyonlar için dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılmıştır. Propolisin kullanımı Orta Çağ'da Arap doktorlar arasında sürdürülmüştür. Savaş alanında askerlerin yaralarının tedavisinde merhem veya krem olarak kullanılmıştır. Propolis kullanımı daha sonra zamanla geliştirilmiştir. Günümüzde propolis ile ilgili araştırmaların geliştirilmesi temel olarak kimya ve kimyasal bileşiminin analiz edilmesine izin veren analitik yöntemlerin geliştirilmesi ile ilişkili olup kimyasal bileşimi 19. ve 20. yüzyıllarda belirlenmiştir (13, 17).

Modern bilim, propolisin insan sağlığı üzerinde büyük etkisi olan sayısız yararlı biyolojik özelliğini keşfetti. Günümüzde propolis antioksidan, anti-inflamatuvar, antiobezite ve antitümör gibi birçok biyolojik özellik nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde çok sayıda uygulamaya sahiptir (3, 18, 24, 87). Propolisin biyolojik aktivitesinin tanınmasının bir sonucu olarak, potansiyel uygulamasıyla ilgili araştırmalara önemli bir odaklanma olmuştur. Bu araştırmaların sonucu olarak propolis içeren önemli sayıda ürün geliştirilmiş ve ticarileştirilmiştir. Tüm bu ürünlere tüketicilerin ilgisi ve talebi gün geçtikçe artmış ve propolis dünya çapında büyük bir popülerlik kazanmıştır (18, 19).

Geniş kullanım alanı bulunan propolis ham olarak nadiren kullanılır, ancak çeşitli ekstraksiyonlar ile elde edilen propolis ekstraktları tıbbi, diyet ve kozmetik gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Popüler bir fonksiyonel gıda olan propolisi, insan tüketimi ürünlerinde, ekstrakt olarak, kapsül formunda, ağız yıkama solüsyonları, şekerler, kremler, boğaz pastilleri, sabun ve tozlar gibi farklı sunumlarda ticari olarak bulunan ve mum içermeyen saflaştırılmış pekçok üründe görmekteyiz (4, 19, 24). Propolisin mevcut uygulamalarında sıklıkla karşımıza çıkan formları ise üst solunum yolu enfeksiyonları ve grip benzeri enfeksiyonlar için tezgahüstü preparatların yanı sıra yara iyileşmesinde faydalı dermatolojik preparatları içerir (74).

Propolisin doku yenilenmesini uyardığını gösteren çalışmaların yanı sıra yanık ve postoperatif yara komplikasyonlarının tedavisindeki başarısı da pek çok çalışmayla açıklanmıştır (67). Bu nedenle propolis biyo-kozmetik bir bileşen olarak alkollü ve hidroalkolik özleri, vazelin, zeytinyağı veya lanolin içeren merhemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (3).

Diş hekimliğindeki ana endişelerden biri çeşitli diş hastalıkları ile ilişkili bakteriyel enfeksiyonlardır. Bu nedenle ağız hijyeni, dişleri sağlıklı tutmak ve bakteriyel enfeksiyonları azaltmak için son derece önemlidir. Hastalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda propolisin antibakteriyel, antiseptik ve yara iyileştirici potansiyeli hakkında olumlu veriler yayınlanmakta ve bu nedenle propolis, ağız enfeksiyonlarının tedavisi için de büyük ilgi görmektedir (67, 88).

Son zamanlarda, veterinerlik tıbbı alanı da göz önüne alındığında, propolisin hayvanlar üzerinde birçok farklı uygulamada kullanıldığını görmekteyiz. Bu çeşitli uygulamalar listesi, propolisin sadece insanlar için değil, ayrıca hayvanlar için de fonksiyonel bir gıda olarak sınıflandırılmasını desteklemekte ve yüksek ticari değerini haklı

çıkarmaktadır (24). İnsanlara uygulandığında güvenilir olan propolisin, insanlar için önerilen güvenli dozu 1.4 mg/kg ve 70 mg/gün'dür (22).

Propolis aynı zamanda antimikrobiyal aktivite gösterdiği için birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi ve önlenmesi için bir alternatif olarak kabul edilir. Antimikrobiyal ilaçlarla sinerjistik bir etkiye sahiptir ve böyle bir birliktelik, tedavide kullanılacak yeni güçlü ürünlerin keşfi için ilaç endüstrisi tarafından takip edilmesi gereken bir ilgi alanıdır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda propolisin çeşitli ekstraktlarının antibiyotiklerle eşzamanlı uygulanmasının antibakteriyel sinerjizm ürettiği gösterilmiştir (4, 89).

2.1.9. Propolisin Antioksidan Aktivitesi

Bitki kökenli maddeler flavonoidler ve fenolik asitler gibi çeşitli bileşenleri içerir ve bu fitokimyasalların antioksidan özellikleri iyi bilinmektedir. Bu sebeple, polifenolik bileşen içerdiği bilinen propolisin antioksidan aktivitesi üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, propolisin serbest radikallere ve serbest radikallerin sebep olduğu hasara karşı antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir. Propolisin içeriğindeki polifenolik bileşenlerin antioksidan aktivitesini, serbest radikal yakalama, metal iyonlarını şelatlama, enzimlerin aktivitelerini değiştirme ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme etkisi oluşturmaktadır (17, 25). Bileşen polifenollerin kimyasal yapısı, propolisin serbest radikalleri etkili bir şekilde ortadan kaldırmasını sağlar. Propolisin antioksidan özelliğinin mekanizması, hücreyi oksidasyon reaksiyonlarından korumak için hidrojen iyonlarını serbest radikallere bağışlayan fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (19, 25).

Propolisin ve bileşenlerinin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda sonuçların büyük çoğunluğu oksidatif stres belirteçlerinde bir azalma olduğunu göstermiştir. Propolisin, lipid peroksidasyon oluşumunu azaltarak, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak, serbest radikallerden koruyarak ve serbest radikal oluşumunu engelleyerek çeşitli dokularda oksidatif stres önlediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, oksidatif stres üzerinde propolis ve bileşenlerinin bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü olarak önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (90).

2.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu olan ömrü kısa, stabil olmayan (kararsız) ve oldukça reaktif kimyasal ajanlardır (91).

Radikaller kimyasal formüllerde ve kısaltmalarda, genellikle sağ taraftaki üst simge noktayla gösterilirken ($R^\cdot$), pozitif yüklü, negatif yüklü ve elektriksel olarak yüksüz olabilmektedirler (92).

Biyolojik dokularda üretildiklerinde, yakınlarındaki moleküller ile kolayca reaksiyona girerek, çoğu durumda insanlar için zararlı olan radikal veya radikal olmayan türler üretirler ve bu şekilde oluşan zincir reaksiyonu binlerce reaksiyona rol açar (91). Serbest radikal türleri arasında reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS), karbon merkezli radikaller ve sülfür merkezli radikaller bulunur.

Serbest radikaller, herhangi bir biyokimyasal süreç için temeldir ve aerobik yaşamın ve metabolizmanın önemli bir bölümünü temsil ederler. Genellikle normal bir molekülün; kovalent bağının homolitik bölünmesi, tek bir elektron kaybı ve tek bir elektron eklenmesi ile oluşabilmektedirler. Serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklardan üretilebilir. Endojen olarak, hücre içinde üretilirler; hücre içinde hareket ederler ve çevreye salınırlar (92). Endojen kaynaklı serbest radikal kaynakları, genellikle daha karmaşık ve kapsamlı mekanizmaları içerir. Serbest radikallerin en önemli endojen kaynakları, mitokondriyal solunum zinciri enzimleri, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz'a ek olarak, Fe ve Cu gibi metal iyonları ve biyolojik moleküllerin (katekolamin, hemoglobin gibi) otooksidasyon reaksiyonlarını içerir. Eksojen kaynaklar arasında ise ilaçlar (özellikle antikanser ajanlar), ksenebiyotikler, radyasyon, kimyasal kirleticiler (örneğin pestisitler), virüsler, bakteriler, egzoz ve sigara (hem aktif hem de pasif) yer almaktadır. Aşırı alkol ve stres koşulları da serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir (92, 93).

Moleküler oksijen (O_2), yaşam ve hücre işlevi için temel bir bileşiktir. Reaktif oksijen türleri üretiminin en önemli kaynağı mitokondrideki normal aerobik metabolizmadır. Solunum zinciri yoluyla ATP oluşumunun fizyolojik süreci sırasında, moleküler oksijen iki su molekülüne indirgenir (94). Bununla birlikte, enerji dönüşümü sırasında bazı elektronlar erken "sızar", bu solunum zincirinden kaçan elektronlar ROS'dan biri olan süperoksit anyonu vermek için moleküler oksijen ile etkileşime girer ve ardışık reaksiyonlarla birlikte çeşitli reaktif oksijen türleri üretilir (91).

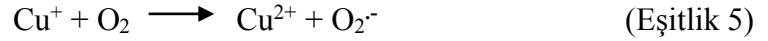
Canlı sistemlerdeki reaktif azot türleri ise esas olarak nitrik oksit ($NO^\cdot$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^\cdot$) radikallerinin yanı sıra nitrik asit (HNO_2) gibi radikal olmayanları içerir. $NO^\cdot$, eşlenmemiş elektronu sayesinde serbest bir radikaldir ve hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) ve $NO_2^\cdot$ üretebilir. O_2 'nin $NO^\cdot$ ile reaksiyonu, güçlü bir biyolojik oksidan olan peroksinitritin

(ONOO⁻) oluşumu nedeniyle ilgi görmektedir (92, 95). En önemli ROS ve RNS üyeleri arasında çok reaktif olan OH[•], süperoksit radikali (O₂^{•-}), NO[•] ve peroksil radikallerinin (RO₂[•]) yanı sıra hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (O[•]), hipokloröz asit (HOCl) ve peroksinitrit (ONOO⁻) gibi radikal olmayan türler bulunmaktadır (93).

2.2.2. Serbest Radikal Türleri

2.2.2.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit spesifik olarak zararlı bir tür değildir, doğası gereği indirgeyicidir ve esas olarak bir hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının bir indirgeyicisi olarak kullanılır. Moleküler oksijen, paralel dönüşlere sahip iki eşleşmemiş elektron nedeniyle nispeten reaktif değildir ve elektron aldığı anda süperoksit anyon radikalini oluşturur. İlk tek değerlikli indirgeme aşaması (yani oksijenin aktivasyonu), bir elektron bağış gerektirir ve “Eşitlik 3” örneğinde olduğu gibi O₂^{•-} üretir. İndirgenmiş geçiş metallerinin oto-oksidasyonu da “Eşitlik 4” ve “Eşitlik 5” de olduğu gibi O₂^{•-} oluşturabilir (92).

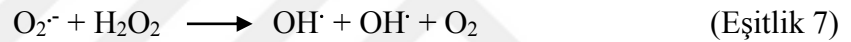


Süperoksit radikalleri, bir süperoksit radikalının başka bir süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek oksijen ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açtığı yerde dismutasyona uğrama kabiliyetine sahiptir (94). Dismutasyon reaksiyonları, çoğu serbest radikal için tipiktir; aynı radikalın iki molekülü bir elektron transfer sürecinde reaksiyona girer (91). Bununla birlikte, üretilen H₂O₂, daha kimyasal reaktif bir molekül olan OH[•] oluşumuna yol açar (94).

2.2.2.2. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, en reaktif serbest radikal türüdür ve çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Dolayısıyla yakın çevredeki çok çeşitli hücrel bileşenlerle yüksek affinite ile reaksiyona girebilir. Örneğin, amino asit kalıntılarını oksitleyebilir, DNA’nın bazlarında kimyasal değişiklikler oluşturabilir ve DNA’nın her iki ipliğinde kırılmaya sebep olabilir. Ayrıca, lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatmak için membran lipidlerine saldırabilir (92, 94).

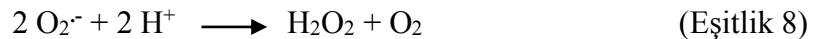
Biyolojik sistemlerdeki bilinen en zararlı oksijen türlerinden biri olan OH[•] Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen iki büyük biyokimyasal reaksiyonla üretilir (94). İlk olarak, “Eşitlik 6” da olduğu gibi metal iyonundan bir elektron çıkararak hidrojen peroksitten (Fenton reaksiyonu) hidroksil radikallerinin üretilmesini içerir. İkinci reaksiyonda ise “Eşitlik 7” deki gibi metal iyonları tarafından yeniden oluşturulan süperoksit radikalleri hidrojen peroksit ile reaksiyona girerler ve hidroksil radikalleri oluştururlar (Haber-Weiss). Geçiş metal iyonları (örneğin Fe²⁺, Cu²⁺, vb.) biyolojik sistemlerde elektron vericisi olarak işlev görürler (92) ve Fenton ve Haber-Weiss tipi reaksiyonlar yoluyla hidroksil radikallerinin oluşumuna katılabilirler. Bu nedenle, hücrelerdeki serbest metal seviyelerini artıran herhangi bir şey veya regüle edilmemiş redoks-aktif metaller, ROS’u aşırı üretmek için uygun olmayan bir şekilde oksijen ile reaksiyona girebilir (91).



2.2.2.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit esas olarak reaktif bir tür değildir; bir oksitleyici ajandır ve özellikle geçiş metal iyonlarının varlığında bir hidroksil radikali kaynağı olarak kullanılır. H₂O₂’nin biyolojik moleküllerin çoğuna karşı reaktivitesi düşüktür. H₂O₂’nin *in vivo* zararlı etkilerinin çoğunun ya geçiş metal iyonları ya da çeşitli enzimler tarafından aracılık edildiği düşünülmektedir. Bu işlemler, daha reaktif olan radikal türleri üretir.

Hidrojen peroksit, “Eşitlik 8” de görüldüğü gibi süperoksit anyonundan dismutasyon (iki süperoksit molekülü birbirleriyle reaksiyona girerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturması) reaksiyonu gibi kimyasal, enzimatik (süperoksit dismutazlar, amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi çeşitli enzimler tarafından katalizlenir) ve fitokimyasal işlemlerle üretilir (91).



2.2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

Aerobik yaşam, normal metabolizmada fizyolojik koşullar altında üretilen reaktif oksijen türleri gibi sürekli bir serbest radikal üretimiyle karakterize edilir. Reaktif oksijen türlerinin canlı sistemlerde zararlı veya yararlı olabilecek türler olarak ikili roller oynadıkları

bilinmektedir. Yararlı etkileri, düşük ila orta konsantrasyonlarda ortaya çıkma eğilimindedir ve çeşitli fizyolojik rollere ve çok sayıda hücrel sinyâl yoluna katılımlarını içerir. Potansiyel biyolojik hasara neden olan zararlı etkileri ise ROS üretimindeki artış, antioksidan savunmasındaki azalma veya fazla prooksidanların (örneğin metal iyonları) bir sonucu olarak aşırı üretimlerinin bir sonucudur (91).

Reaktif oksijen türlerinin yararlı ve zararlı etkileri arasında sürekli ve hassas bir denge, sağlıklı organizmaların önemli bir yönüdür ve bir dizi mekanizma ile sağlanır. Reaktif oksijen türlerinin hücreye verebileceği hasar, sadece hücre içi konsantrasyonlarına bağlı değil aynı zamanda ROS ve antioksidan türler arasındaki dengeye de bağlıdır. Oksidan ve antioksidan denge kaybolduğunda DNA, RNA, lipidler ve proteinlerde dahil olmak üzere birçok hücre içi molekülü değiştiren ve zedeleyen “oksidatif stres” oluşmaktadır. Oksidatif stres, ROS oluşumu ile bir organizmanın bu reaktif ara maddeleri detoksifiye etme veya neden oldukları hasarı onarma kabiliyetinin bozulması arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır (93).

Oksidatif stres biyolojik açıdan önemlidir çünkü kanser, nörodejeneratif, inflamatuvar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi geniş çapta pek çok hastalık ile ilişkilidir. Tüm bu hastalıkların tedavisinde hem doğal hem de sentetik çok çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır.

Antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilen ve hayati moleküller zarar görmeden zincir reaksiyonunu sona erdirebilen, zararlı serbest radikallere karşı savaşçıdır ve hücrel hasarın önlenmesinde rol oynarlar. Antioksidan talebi biyolojik sistemlerle sınırlı değildir çünkü bir antioksidan molekül yalnızca tek bir serbest radikal ile reaksiyona girebilir. Bu nedenle, antioksidan kaynakların endojen olarak veya takviye yoluyla yenilenmesi için sürekli bir ihtiyaç vardır (92).

Biyolojik sistemleri serbest radikal toksisitesinden korumak için, çeşitli hücrel savunma mekanizmaları ile enzimatik ve enzimatik olmayan yollar, ROS üretimini kontrol altında tutar (95). Serbest radikallerin aktif oksijen türevleri olan oksidanlar, canlı organizmalarda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi büyük moleküler ağırlıklı antioksidan enzim sistemleri ile çok sayıda düşük molekül ağırlıklı transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve α -tokoferol (E vitamini) ve karoten gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar. Enzimatik ve enzimatik

olmayan bu bileşenler serbest radikallerin neden olduğu hasarı önlemeye veya onarmaya yarar (92).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların ve sarf malzemelerin listesi üretici firmaları ve üretim yerleri ile birlikte Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma/Üretim yeri
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo, Türkiye
Cam şişe (25 ve 50 mL)	Wheaton, ABD (Amerika Birleşik Devletleri)
Cam vial (2 mL)	Agilent Technologies, Polonya
Çalkalayıcı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14, ABD
Çeşitli cam malzemeler	Isolab, Almanya
Çeşitli hacimlerde (0.1-1000 µL) pipet uçları	Eppendorf, Hindistan
C18 kolon	Thermo Scientific, ODS-2 HYPERSIL, ABD
DAD	Agilent, Almanya
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch, Türkiye
Enjektör (Steril Şırınga)	Ayset, Türkiye
Enjektör filtresi (0.2 µm)	Agilent, Polonya
Filtre (0.45 µm)	Agilent, Almanya
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S, İsviçre
HPLC	Agilent 1100 Series, Almanya
Kapaklı tüp (1.5 mL)	Lp Italiana SPA, İtalya
Manyetik karıştırıcı	Termal, Türkiye
Mavi vidalı kapak	Agilent Technologies, USA
Mikropleyt okuyucu	Versa max, Molecular devices, ABD
Otomatik pipetler	Socorex, İsviçre
pH-metre	Hanna Instruments, HI 2211, Romanya
Pleyt (96 kuyucuklu)	Greiner bio one, Almanya
Saf su arıtma cihazı	Kros, Birleşik Krallık
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter, ABD
Sonikatör	Sonics, ABD
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3, Almanya

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları ile birlikte Tablo 4’te verildi.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve kodları

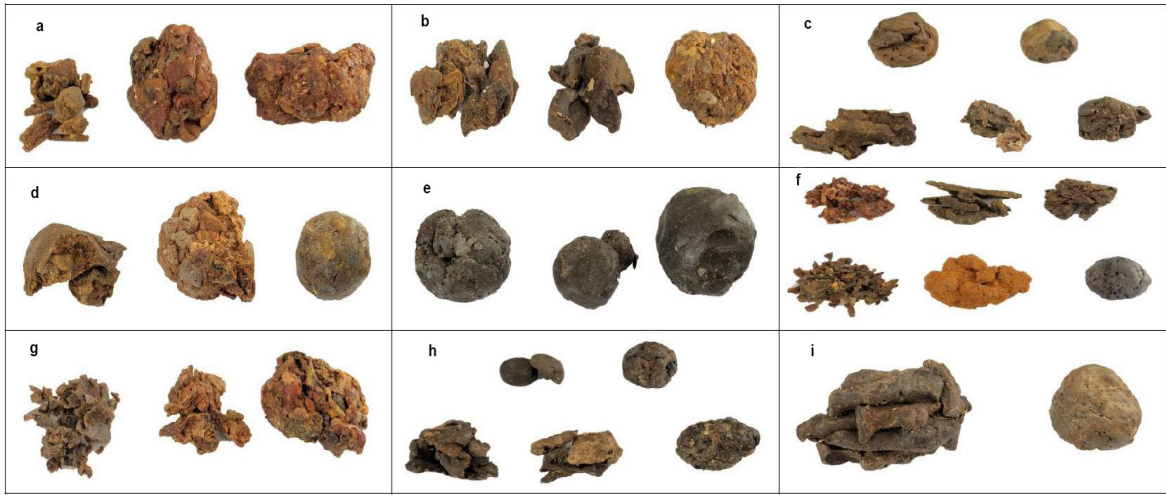
Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma ve Kodu
Alüminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	Fluka, 06274
Asetik asit (CH_3COOH)	Sigma-Aldrich, 27225
Asetonitril (CH_3CN)	Sigma-Aldrich, 34851
Demir (III) klorür (FeCl_3)	Sigma, F7134
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, K16290176
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma, 34870
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck, HC140610
Gallik asit	Sigma, G7384
Kafeik asit	Sigma, C0625
Klorojenik asit	Aldrich, C3878
Kuersetin	Sigma, Q4951
Metanol (CH_3OH)	J.T.Baker, 8415
Potasyum asetat (KCH_3COO)	Merck, K32043020
Potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Lancaster, 13746-66-2
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, K1305445
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Lancaster, 13098
Trans-sinamik asit	Aldrich, C80857
Trikloro asetik asit (TCA)	Merck, K41041807
2-Propanol	Merck, K40861440
(±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit (Troloks)	Aldrich, 238813

3.2. Yöntem

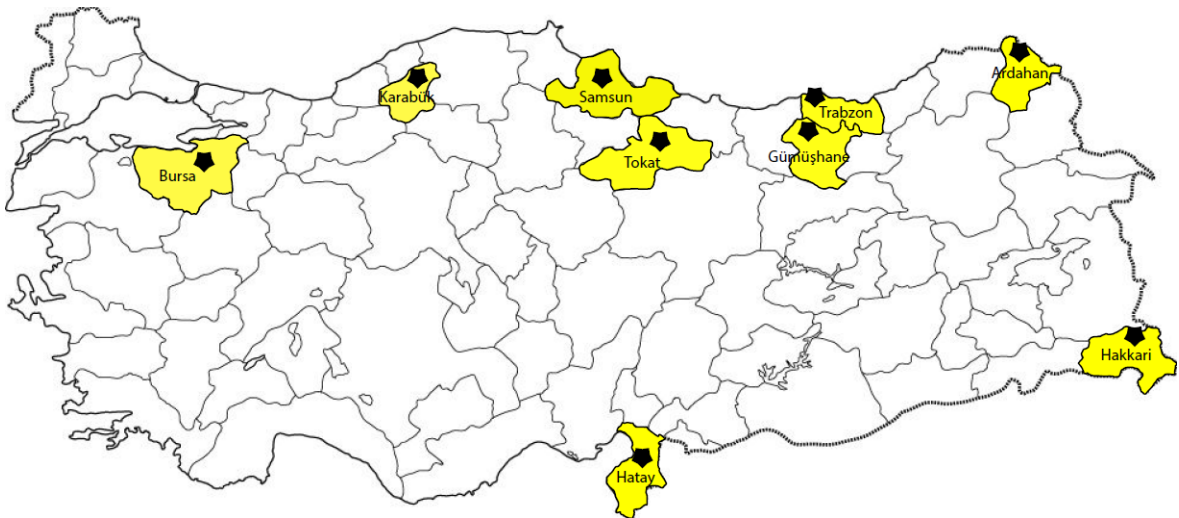
Çalışmamızın ekstrakt ve standart hazırlama kısımları ile antioksidan ve HPLC analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.2.1. Propolis Örneklerinin Kaynakları

Ham propolis örnekleri, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgesindeki arı ürünleri üretiminin yoğun olduğu Samsun (Bafra, Havza, Salıpazarı), Karabük (Eskipazar, Safranbolu, Yenice), Hakkari (Çukurca, Şemdinli, Yüksekova), Gümüşhane (Merkez, Torul), Trabzon (Ortahisar, Sürmene, Şalpazarı, Tonya, Yomra), Hatay (Dört Yol), Ardahan (Çıldır, Göle, Hanak, Merkez, Posof), Tokat (Erbaa, Merkez, Zile), Bursa (Gemlik, Nilüfer, Orhanlı) illerinin belirtilen ilçelerinden Arıcılar Birliği tarafından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan propolis numunelerinden bazıları Resim 2'de gösterildi. Şekil 13'te temin edilen tüm propolis örneklerinin Türkiye'de toplandığı iller gösterildi.



Resim 2. Çalışmada kullanılan propolis numunelerinden bazıları. (a) Karabük. (b) Tokat. (c) Ardahan. (d) Samsun. (e) Hakkari. (f) Trabzon. (g) Bursa. (h) Hatay. (i) Gümüşhane.



Şekil 13. Propolis örneklerinin toplandığı iller

3.2.2. Sulu Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Arıcılar Birliği tarafından temin edilen ve buzdolabında -20 °C’de dondurulmuş olan çeşitli propolis örnekleri rendelendi ve rendelenen bu propolis örnekleri çalışma sonuna kadar -20 °C’de saklandı. Propolis örneklerinden hassas terazide 0.5’er g tartılarak herbiri ayrı ayrı 50 mL’lik cam şişelere aktarıldı ve son hacimleri saf su ile 20 mL’ye tamamlandı. Karışımlar iyice vorteksledikten sonra 60 °C’de 150 rpm’de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrası karışımların her biri 3000 g’de 10 dakika santrifüjlendi, süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.45 µm’lik membran filtrelerden geçirildi. Bu şekilde hazırlanan 25 mg/mL’lik sulu propolis ekstraktları gerekli denemeler ve analizlerde kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C’de karanlıkta saklandı. Hazırlanan sulu propolisi ekstraktlarından bazılarının görünümü Resim 3’te gösterildi.



Resim 3. Hazırlanan sulu propolis ekstraktlarından bazılarının görünümü

3.2.3. Sulu Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan sulu propolis ekstraktlarının antioksidan özellikleri; toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi.

3.2.3.1. Toplam Polifenol İçeriğinin Belirlenmesi

Sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metod; fosfotungstik asidin ($H_3P[W_3O_{10}]_4$) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ölçülen fosfotungstik mavisinin absorbansının miktarı, fenolik grupların sayısı ile orantılıdır ve toplam polifenol içeriğinin ifade edilebilirliği için standart olarak gallik asit kullanılmaktadır (96, 97).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%20'lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi: 1 mL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 mL saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltilti. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

Standartlar: 10 mg gallik asit 1 mL saf su ile çözülerek 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik gallik asit standardı elde edildi. Bundan 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standart hazırlanarak saf su ile çözülerek 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81, 3.906 ve 1.953 $\mu\text{g/mL}$ 'lik gallik asit standartları seri dilüsyon ile meydana getirildi.

Deneyin Yapılışı

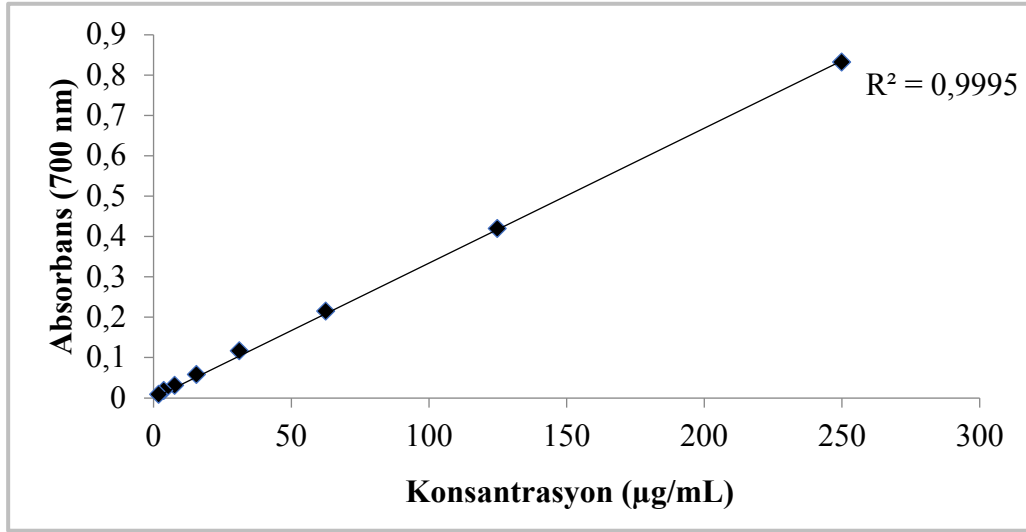
Propolis ekstraktları çeşitli oranlarda saf su ile seyreltilti. Tablo 5'teki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı. Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı ve mg gallik asit/g propolis (mg GA/g propolis) şekline dönüştürüldü (Şekil 14). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).

Tablo 5. Sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su	12.5 μL	-	-
Ekstrakt	-	12.5 μL	-
Standart	-	-	12.5 μL
1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi	62.5 μL	62.5 μL	62.5 μL
%20'lik Na_2CO_3	125 μL	125 μL	125 μL

Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

700 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.



Şekil 14. Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan gallik asit standart grafiği

3.2.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Sulu propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi. Metodun prensibi, $AlCl_3$ 'ün flavon ve flavonollerin C4 keto grubu, C3 veya C5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak $AlCl_3$, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının *orto*-dihidroksil grupları ile de kompleks oluşturabilmektedir. Ölçülen absorbansın miktarı, flavonoid miktarıyla orantılıdır ve toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak kuersetin kullanılmaktadır (98-100).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%80'lik Etanol Çözeltisi: 80 mL'lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%10'luk $Al(NO_3)_3$ Çözeltisi: 2.5 g $Al(NO_3)_3$ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

1 M KCH_3COO Çözeltisi: 2.454 g KCH_3COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

Standartlar: 10 mg kuersetin 800 µL saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 µL'ye tamamlandı. 10 000 µg/mL'lik kuersetin standardı elde edildi. Bu ana stoktan 1:10 dilüsyon ile 1000 µg/mL'lik standart hazırlanarak %80'lik etanol ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 µg/mL'lik kuersetin standartları seri dilüsyon ile oluşturuldu.

Deneyin Yapılışı

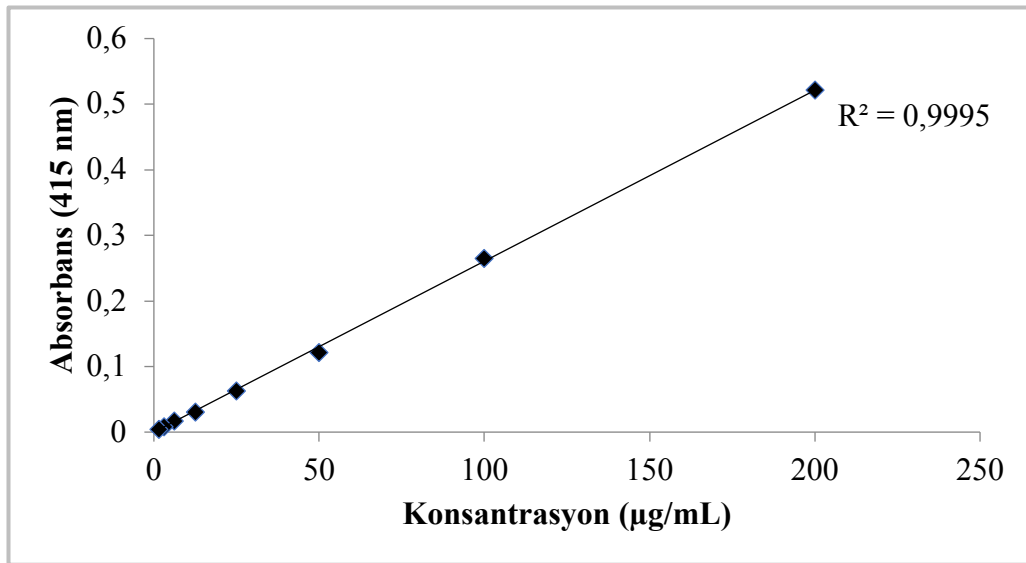
Propolis ekstraktları çeşitli oranlarda saf su ile seyreltildi. Tablo 6'daki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı. Sonuçlar kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı ve mg kuersetin/g propolis (mg K/g propolis) şekline dönüştürüldü (Şekil 15). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı ($n=3$).

Tablo 6. Sulu propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su	20 μL	-	-
Ekstrakt	-	20 μL	-
Standart	-	-	20 μL
%80'lik etanol	172 μL	172 μL	172 μL
%10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	4 μL	4 μL	4 μL
1 M KCH_3COO	4 μL	4 μL	4 μL

Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi.

415 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.



Şekil 15. Toplam flavonoid içerik tayini için kullanılan kuersetin standart grafiği

3.2.3.3. Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi

Antioksidanlar gibi indirgen maddelerin varlığı, Fe^{3+} -ferrisiyanür kompleksinin Fe^{2+} 'ye indirgenmesine neden olmaktadır. Bu metodda, test edilen örneğin indirgenme gücüne bağlı olarak test çözeltisinin rengi sarıdan yeşile dönmektedir. Oluşan yeşil renk 700 nm'de maksimum absorbands vermekte ve artan absorbands artan indirgenme kuvvetini göstermektedir. Demir indirgeyici gücün ifade edilebilirliği için standart olarak troloks kullanılmaktadır (101, 102).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

0.2 M Fosfat Tamponu (pH: 6.6): 2.137 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.121 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak karıştırıldı. Saf su eklenerek 90 mL'ye kadar çözüldü. Daha sonra pH'sı 6.6'ya ayarlanarak hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Çözeltisi: 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

%10'luk TCA Çözeltisi: 5 g TCA tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

%0.1'lik FeCl_3 Çözeltisi: 0.1 g FeCl_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

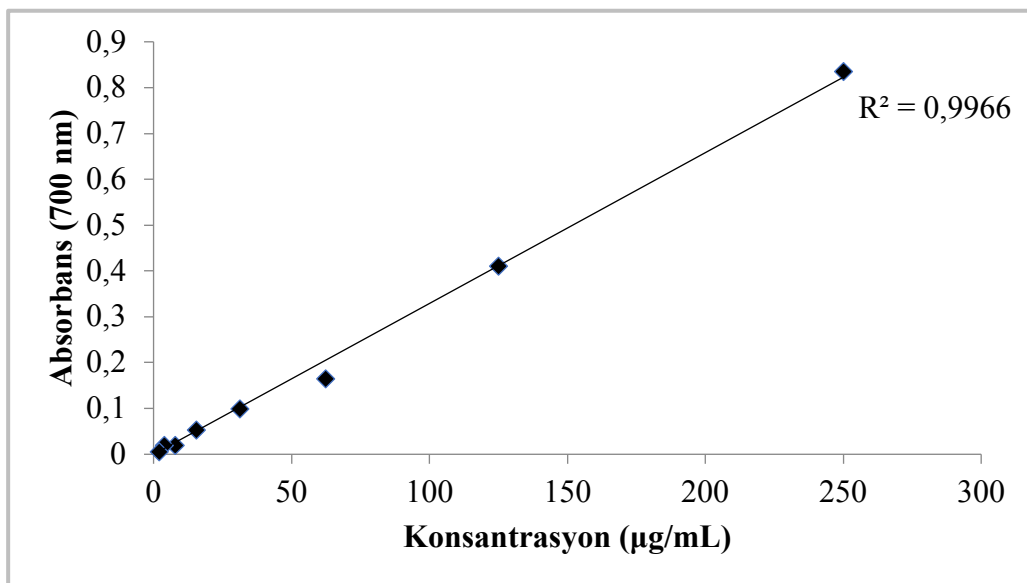
Standartlar: 1 mg troloks 1 mL saf etanol ile çözülerek 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik troloks standardı elde edildi. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standarttan saf etanol ile çözülmüş 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906 ve 1.953 $\mu\text{g/mL}$ 'lik troloks standartları seri dilüsyonla oluşturuldu.

Deneyin Yapılışı

Propolis ekstraktları çeşitli oranlarda saf su ile seyreltilti. Metod modifiye edilerek spektrofotometrik küvetler yerine Tablo 7'deki pipetlemelerin ilk altı aşaması 1.5 mL hacimli kapaklı tüplerde, sonraki aşamalar ise 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı. Sonuçlar troloks standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı ve mg troloks/g propolis (mg T/g propolis) şekline dönüştürüldü (Şekil 16). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).

Tablo 7. Sulu propolis ekstraktlarının demir indirgeyici gücünün belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su	40 µL	-	-
Ekstrakt	-	40 µL	-
Standart	-	-	40 µL
0.2 M Fosfat Tamponu (pH: 6.6)	100 µL	100 µL	100 µL
%1'lik K ₃ Fe(CN) ₆	100 µL	100 µL	100 µL
50 °C'de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
%10'luk TCA	100 µL	100 µL	100 µL
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki fazlardan 100'er µL alınarak 96 kuyucuklu mikropleyde aktarıldı.			
Saf su	100 µL	100 µL	100 µL
%0.1'lik FeCl ₃	20 µL	20 µL	20 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.			
700 nm'de mikropleyde okuyucuda absorbans ölçüldü.			



Şekil 16. Demir indirgeyici güç tayini için kullanılan troloks standart grafiği

3.2.4. HPLC-DAD Analizleri

3.2.4.1. Standartların Hazırlanması

HPLC ile analizde kullanılan standart maddeler literatür ve daha önce bölümümüzde gerçekleştirdiğimiz çalışmalar göz önüne alınarak sulu propolisin içeriğinde en fazla bulunabilecek bileşiklerden seçilerek klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit olarak belirlendi. Çözünme durumlarına göre bu standart maddelerden 5'er mg tartılarak kafeik asit ve trans sinamik asit %100'lük metanolle ve klorojenik asit ise %40'lık metanolle çözülüp ilgili çözücülerıyla 5'er mL'ye tamamlanarak 1000 µg/mL'lik ana stok standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan tüm ana stok standart çözeltileri 0.2 µm'lik membran filtreden geçirildi. Ardından seçilen 3 standartın alıkonma zamanlarının belirlenebilmesi amacıyla 1000 µg/mL'lik ana stok standartların her birinin %40'lık metanolle 10 µg/mL'lik standart çözeltileri hazırlandı. Ayrıca tüm standartların kalibrasyon grafiklerinin çizimi için %40'lık metanol ile seyreltmek koşuluyla bu ana stok standartların tümünü içeren 2.5, 5, 10, 25 ve 50 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda karışımlar hazırlandı.

3.2.4.2. HPLC-DAD Analiz Koşullarının Belirlenmesi

Analiz koşulları Villiers ve ark. uyguladıkları yöntem modifiye edilerek daha önce bölümümüzde gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızda belirlendi (78, 103). Bu metoda göre mobil fazlar hazırlanarak 0.45 µm'lik membran filtreden geçirildi. Daha sonra mobil fazların tam çözünmesini sağlamak ve çözücülerini degaz etmek amacıyla 3 dakika boyunca sonikatör kullanıldı. Kromatografik analiz koşulları ve dalga boyları aşağıdaki şekilde belirlenen koşullara göre HPLC-DAD cihazında analizler yapıldı.

Kolon: Thermo RP18

Mobil fazlar: %2'lik Asetik asit çözeltisi (çözücü A)

1:1 Asetonitril:Su içindeki %0.5 Asetik asit çözeltisi (çözücü B)

Asetonitril (çözücü C)

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Dalga boyu: 280 nm ve 320 nm

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Akış hızı: 1.2 mL/dak (Gradient elüsyon programı)

Çalışma süresi: 55 dakika

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%2'lik Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (Çözücü A): 40 mL asetik asit deiyonize su ile 2 L'ye tamamlandı.

1:1 Asetonitril:Su İçindeki %0.5 Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (Çözücü B): 5 mL asetik asit deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiye 1 L asetonitril ilave edildi.

Çalışma için belirlenen gradient elüsyon programı Tablo 8'de verilen şekilde uygulandı.

Tablo 8. Çalışma için belirlenen gradient elüsyon programı

Zaman (Dakika)	% A	% B	% C
0	95	5	0
5	95	5	0
8	80	20	0
10	78	22	0
17	75	25	0
19	73	27	0
30	60	40	0
35	55	45	0
40	35	65	0
43	29	70	1
45	18	80	2
48	6	90	4
50	0	100	0
52	0	0	100
53	95	5	0
55	95	5	0

Gradient elüsyon programından sonra bir sonraki analiz için kolonu dengeye getirmek amacıyla, kolondan 10 dakika %95 çözücü A, %5 çözücü B içeren sıvı geçirilerek kolonun temizlenmesi ve tekrar analize hazır duruma gelmesi sağlandı. Analiz işlemi her bir örnek için en az üç kere tekrarlandı (n=3).

3.2.4.3. Standartların ve Propolis Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi

Ana stok standartların her birinin %40'lık metanolle hazırlanan 10 µg/mL'lik standart çözeltileri Agilent 1100 Series markalı HPLC cihazında, literatürde yer alan ve bölümümüzde daha önceden belirlediğimiz maksimum absorbans gösterdikleri 280 ve 320 nm dalga boylarında DAD ile çalışılarak her bir standart pikinin alıkonma zamanları belirlendi (78, 104-106). Daha sonra ana stok üç standardın hepsini içerecek şekilde 2.5, 5, 10, 25 ve 50 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda hazırlanan karışımlar HPLC cihazında analiz edildi ve iki dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. Alıkonma zamanları belirlenen standart piklerine göre farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tüm standartların karışımı vasıtasıyla her bir standart için kalibrasyon grafiği çizildi.

Analize uygun haldeki sulu propolis ekstraktları ise HPLC cihazında çalışılarak hem standart piklerinin alıkonma zamanlarına göre kalitatif olarak hem de kalibrasyon grafiğinden hesaplanan miktarsal sonuçlar ile kantitatif olarak analiz edildi.

Yapılan tüm analizler ile birlikte sulu propolis ekstraktlarının verimi (Çözücüde çözülen propolis miktarı x 100 / Tartılan toplam propolis miktarı) de çalışılarak hesaplandı. Sulu propolis ekstraktlarının verimi %20 olarak bulundu. Dolayısıyla % verim dikkate alındığında sulu propolis ekstraktındaki tüm değerler ve sonuçlar Tablo 9 ve Tablo 14'e en son şekliyle yansıtıldı.

3.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) (IBM SPSS 23, ABD) programında gerçekleştirildi. Sürekli verilerin normal dağılıma uygunlukları "Kolmogorov Smirnov" testi ile analiz edildi. Bağımsız ikiden fazla değişkenin karşılaştırılmasında normal dağılıma uyan parametreler için "One Way Anova" (ANOVA) ve ikili değişken (post-hoc) için "Tukey" testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan bağımsız ikiden fazla değişkenin değerlendirilmesinde "Kruskall-Wallis" testi ve ikili değişken (post-hoc) için "Mann-Whitney U" testi uygulandı. Herbir gruba ait değerler, aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sulu Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Özellikleri

Sulu propolis ekstraktlarının antioksidan gücü; toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi. Tayin sonuçları ekstraktların % verim hesabı göz önüne alınarak hesaplandı ve Tablo 9’da verildi.

Tablo 9. Sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü (n=3)

Temin Edilen (İl-İlçe)	Toplam Polifenol İçerik (mg GA/g propolis)	Toplam Flavonoid İçerik (mg K/g propolis)	Demir İndirgeyici Gücü (mg T/g propolis)
Karabük-Eskipazar	67.00±1.37	4.84±0.20	135.22±5.27
Karabük-Safranbolu	92.78±1.78	5.79±0.39	145.36±4.28
Karabük-Yenice	46.39±0.34	2.31±0.20	65.14±1.84
Tokat-Erbaa	54.75±1.31	7.69±0.12	98.70±1.81
Tokat-Merkez	77.09±3.33	7.35±0.49	136.43±5.12
Tokat-Zile	69.45±1.22	5.97±0.10	118.61±4.64
Ardahan-Çıldır	115.22±0.43	10.57±0.63	181.90±7.24
Ardahan-Göle	27.27±0.10	2.09±0.30	103.66±2.22
Ardahan-Hanak	68.61±0.92	4.94±0.36	65.14±6.24
Ardahan-Merkez	91.05±2.51	6.06±0.30	91.12±8.61
Ardahan-Posof	87.61±0.79	6.34±0.24	134.88±5.70
Samsun-Bafra	44.77±1.07	2.98±0.35	150.58±4.41
Samsun-Havza	57.48±0.88	4.27±0.27	94.68±4.29
Samsun-Salıpazarı	52.05±1.81	5.68±0.41	174.95±5.54
Hakkari-Çukurca	72.78±2.45	26.86±0.76	154.59±8.87
Hakkari-Şemdinli	85.37±1.73	15.91±1.26	171.77±5.60
Hakkari-Yüksekova	136.29±4.27	13.38±0.39	258.96±6.19
Trabzon-Sürmene- 1	78.22±1.22	7.47±0.70	146.59±6.23
Trabzon-Sürmene- 2	115.58±1.97	4.72±0.22	163.77±4.85
Trabzon-Şalpazarı	58.54±0.36	5.43±0.75	101.19±0.50
Trabzon-Ortahisar	43.55±1.79	3.41±0.13	77.74±2.09
Trabzon-Tonya	34.47±0.14	3.91±0.84	56.02±2.43
Trabzon-Yomra	66.38±0.51	4.66±0.27	105.66±2.70
Bursa-Gemlik	11.66±0.06	0.86±0.06	19.31±1.06
Bursa-Nilüfer	47.04±1.21	3.08±0.32	73.50±5.43
Bursa-Orhaneli	54.18±3.18	5.92±0.41	93.87±3.19
Hatay-Dörtyol	19.57±0.70	1.14±0.07	23.89±0.75
Hatay-1	32.06±0.14	3.99±0.23	46.26±0.55
Hatay-2	27.72±0.14	1.93±0.08	38.05±0.28
Hatay-3	21.95±0.37	1.53±0.40	31.70±0.64
Gümüşhane-Merkez	92.06±2.23	23.60±0.92	120.13±3.84
Gümüşhane-Torul	87.46±1.12	6.70±0.49	136.48±6.45

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

Yapılan analizler sonucunda sulu propolis ekstraktlarının toplam polifenol içeriklerinin 11.66-136.29 mg GA/g propolis, toplam flavonoid içeriklerinin 0.86-26.86 mg K/g propolis ve demir indirgeyici güçlerinin 19.31-258.96 mg T/g propolis arasında değiştiği görüldü. En düşük toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü değerleri Bursa-Gemlik'te bulundu. En yüksek toplam polifenol içerik ve demir indirgeyici gücü değeri Hakkari-Yüksekova'da görülürken en yüksek toplam flavonoid içerik değeri ise Hakkari-Çukurca'da görüldü.

Ekstraktların bölgelere göre toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü değerleri Tablo 10 ve Şekil 17'de verildi.

Tablo 10. Bölgelerdeki ekstraktların toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü

	Karadeniz	Akdeniz	Marmara	Doğu Anadolu	p
Toplam Polifenol İçerik (mg GA/g propolis)	66.94±21.46	25.32±5.65 ^a	37.63±22.77 ^a	85.53±32.37 ^{a,b,c}	0.0001
Toplam Flavonoid İçerik (mg K/g propolis)	6.28±4.73	2.15±1.27 ^a	3.29±2.54 ^a	10.77±7.96 ^{a,b,c}	0.0001*
Demir İndirgeyici Gücü (mg T/g propolis)	119.25±34.03	34.97±9.49 ^a	62.23±38.54 ^a	145.25±61.23 ^{a,b,c}	0.0001

p; "ANOVA" testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler "Tukey" testine göre yapıldı.

*p; 0.0001, "Kruskall-Wallis" testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler "Mann-Whitney U" testine göre yapıldı.

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

^aKaradeniz'e göre anlamlı farklı, ^bAkdeniz'e göre anlamlı farklı, ^cMarmara'ya göre anlamlı farklı değerler verildi. (p<0.05)

Karadeniz Bölgesi (5 il, 17 numune): Karabük (Eskipazar, Safranbolu, Yenice), Tokat (Erbaa, Merkez, Zile), Samsun (Bafra, Havza, Salıpazarı), Trabzon (Sürmene-1, Sürmene-2, Şalpazarı, Ortahisar, Tonya, Yomra), Gümüşhane (Merkez, Torul)

Akdeniz Bölgesi (1 il, 4 numune): Hatay (Dörtyol, Hatay-1, Hatay-2, Hatay-3),

Marmara Bölgesi (1 il, 3 numune): Bursa (Gemlik, Nilüfer, Orhaneli),

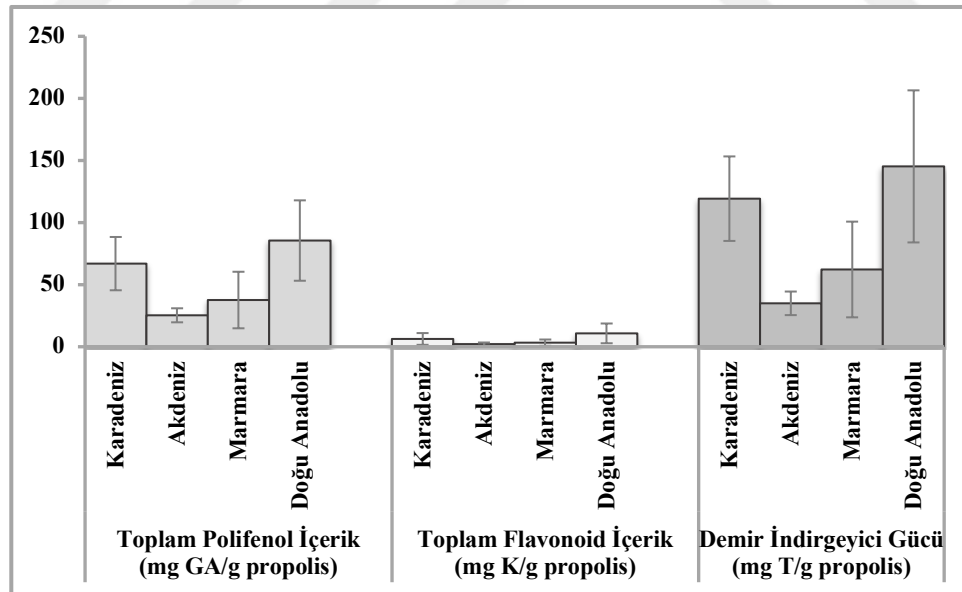
Doğu Anadolu Bölgesi (2 il, 8 numune): Ardahan (Çıldır, Göle, Hanak, Merkez, Posof), Hakkari (Çukurca, Şemdinli, Yüksekova)

Ölçümler sonucunda, toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü değerlerinde bölgelere göre istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (p=0.0001). En yüksek toplam polifenol içerik değeri Doğu Anadolu bölgesinde bulundu (85.53±32.37). Toplam polifenol içerik değerleri karşılaştırıldığında Doğu Anadolu bölgesi

ile Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.007$). Karadeniz bölgesi ile Marmara ve Akdeniz bölgeleri arasında toplam polifenol içerik değerleri olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.0001$).

En yüksek toplam flavonoid içerik değeri Doğu Anadolu bölgesinde bulundu (10.77 ± 7.96). Toplam flavonoid içerik değerleri karşılaştırıldığında Doğu Anadolu bölgesi ile Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.0001$, $p=0.005$). Karadeniz bölgesi ile Marmara ve Akdeniz bölgeleri arasında toplam flavonoid içerik değerleri olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.0001$).

En yüksek demir indirgeyici gücü miktarı Doğu Anadolu bölgesinde bulundu (145.25 ± 61.23). Toplam demir indirgeyici gücü değerleri karşılaştırıldığında Doğu Anadolu bölgesi ile Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.047$). Karadeniz bölgesi ile Marmara ve Akdeniz bölgeleri arasında demir indirgeyici gücü değerleri olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.0001$).



Şekil 17: Bölgelerdeki ekstraktların toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü

Karadeniz bölgesindeki illere göre toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü değerleri Tablo 11 ve Şekil 18’de verildi.

Tablo 11. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü

	Karabük	Tokat	Samsun	Trabzon	Gümüşhane	p
Toplam Polifenol İçerik (mg GA/g propolis)	68.73±23.24	67.10±11.36	51.43±6.38	66.12±28.85	89.76±3.25 ^c	0.012
Toplam Flavonoid İçerik (mg K/g propolis)	4.32±1.80	7.00±0.91	4.31±1.35	4.93±1.43	15.15±11.95 ^{a,b,c,d}	0.0001
Demir İndirgeyici Gücü (mg T/g propolis)	115.24±43.68	117.92±18.87	140.07±41.15	108.5±40.66	128.31±11.56	0.206

p; “ANOVA” testine göre verildi. Grup içindeki iller arası post-hoc değerlendirmeler “Tukey” testine göre yapıldı.

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

^aKarabük’e göre anlamlı farklı, ^bTokat’a göre anlamlı farklı, ^cSamsun’a göre anlamlı farklı, ^dTrabzon’a göre anlamlı farklı değerler verildi. (p<0.05)

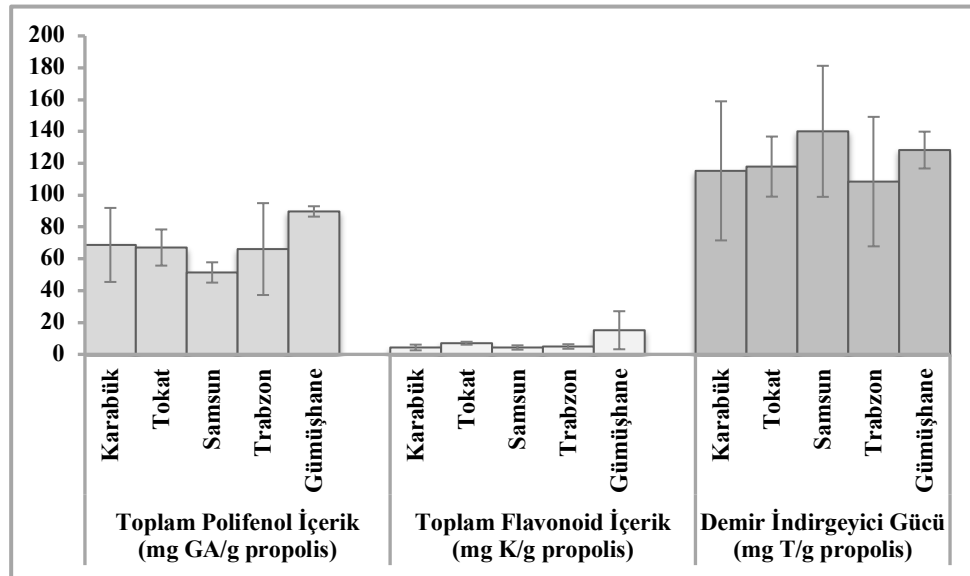
Karabük (3 numune): Eskipazar, Safranbolu, Yenice,

Tokat (3 numune): Erbaa, Merkez, Zile,

Samsun (3 numune): Bafra, Havza, Salıpazarı,

Trabzon (6 numune): Sürmene-1, Sürmene-2, Şalpazarı, Ortahisar, Tonya, Yomra,

Gümüşhane (2 numune): Merkez, Torul



Şekil 18. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarının toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü

Ölçümler sonucunda, toplam polifenol içerik ve toplam flavonoid içerik değerlerinde Karadeniz bölgesindeki illere göre istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0.012$, $p=0.0001$). En yüksek toplam polifenol içerik değeri Gümüşhane’de bulundu (89.76 ± 3.25). Toplam polifenol içerik değerleri karşılaştırıldığında Gümüşhane ile Samsun arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.004$).

En yüksek toplam flavonoid içerik değeri Gümüşhane’de bulundu (15.15 ± 11.95). Toplam flavonoid içerik değerleri karşılaştırıldığında Gümüşhane ile Karabük, Tokat, Samsun ve Trabzon arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$).

En yüksek demir indirgeyici gücü miktarı Samsun’da bulundu (140.07 ± 41.15). Demir indirgeyici gücü değerleri karşılaştırıldığında Karadeniz bölgesindeki iller arasında anlamlı fark bulunmadı.

4.2. HPLC-DAD Analizleri

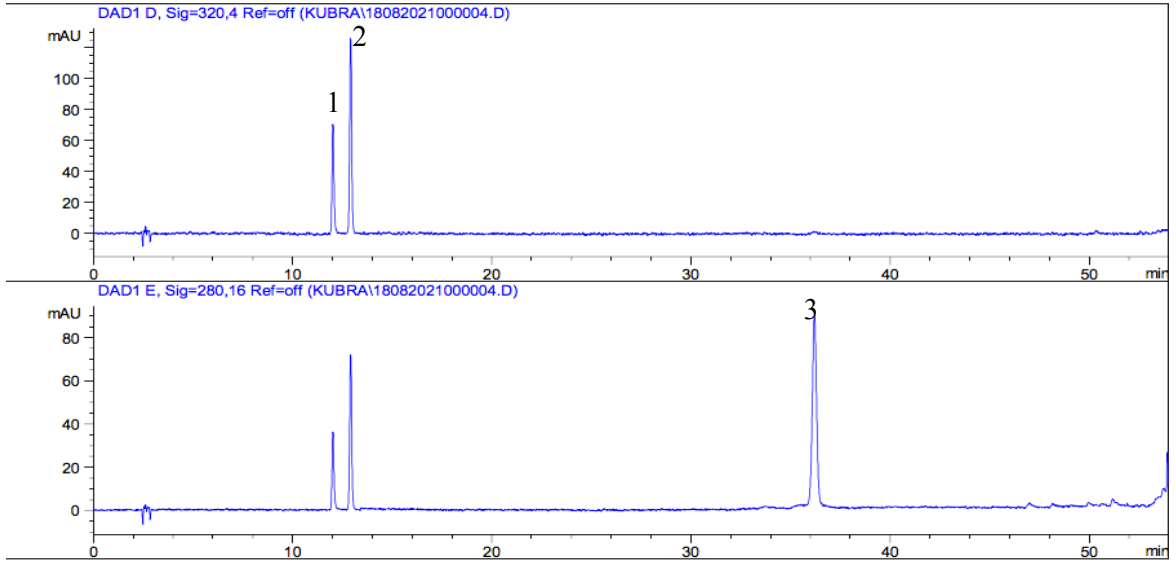
4.2.1. Standartların HPLC-DAD ile Analizi

Çalışmada kullanılan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit standartlarının HPLC-DAD ile maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyları, bölümümüzde daha önce gerçekleştirilen çalışma ışığında, çeşitli denemeler yapılarak belirlendi ve Tablo 12’de verildi.

Tablo 12. Çalışmada kullanılan standartların HPLC-DAD ile maksimum absorbands gösterdiği dalga boyları

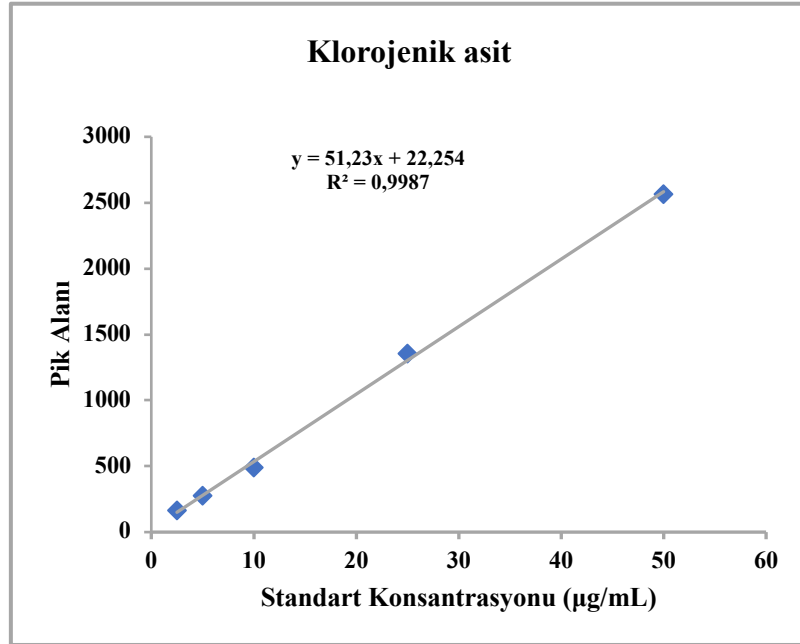
Bileşik No	Bileşik İsmi	Maksimum Dalga Boyu (nm)
1	Klorojenik asit	320
2	Kafeik asit	320
3	Trans-sinamik asit	280

Yapılan analizler sonucunda çalışmada kullanılan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit standartlarının HPLC-DAD ile belirlenen pikleri Resim 4’te gösterildi.



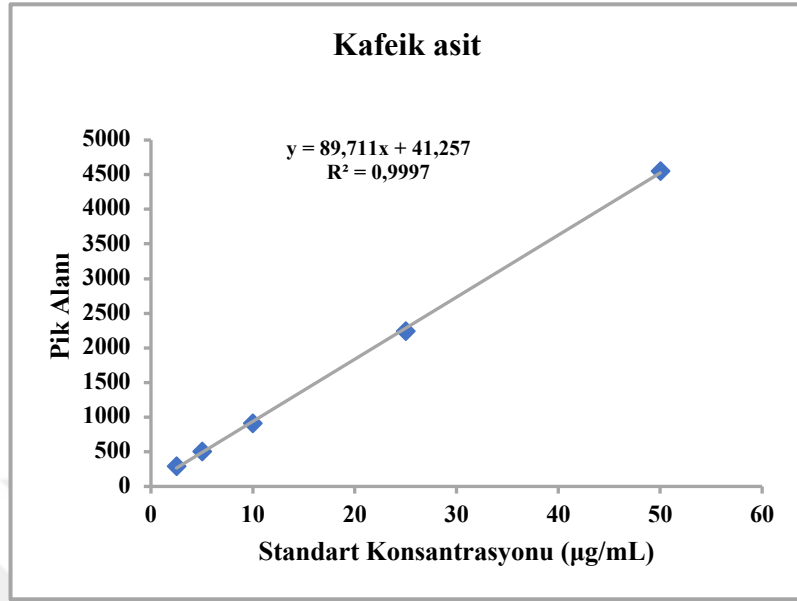
Resim 4. Çalışmada kullanılan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit standartlarının HPLC-DAD ile belirlenen pikleri. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Alıkonma zamanları belirlenen tüm standartların farklı konsantrasyonda hazırlanan karışımları kullanılarak her bir standart için kalibrasyon grafiği çizildi. Çalışmada kullanılan klorojenik asitin kalibrasyon grafiği Şekil 19’da verildi.



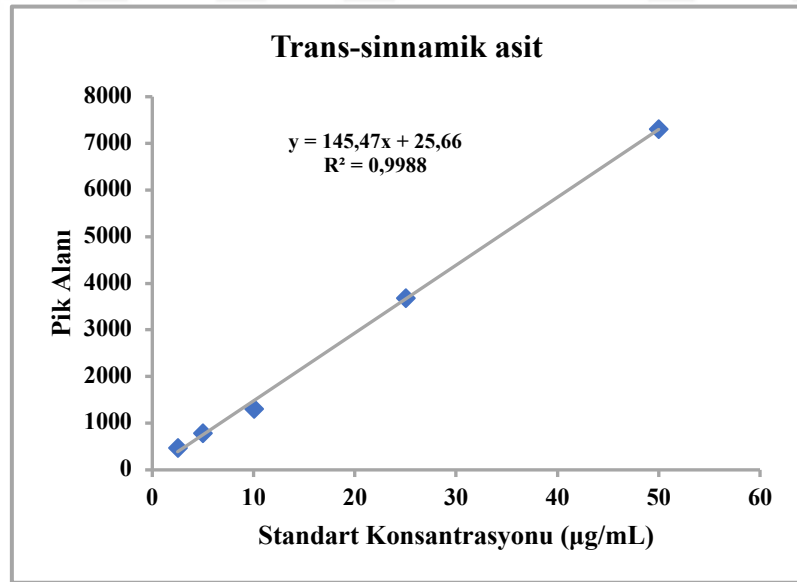
Şekil 19. Klorojenik asidin kalibrasyon grafiği

Çalışmada kullanılan kafeik asitin kalibrasyon grafiği Şekil 20’de verildi.



Şekil 20. Kafeik asidin kalibrasyon grafiği

Çalışmada kullanılan trans-sinamik asitin kalibrasyon grafiği Şekil 21’de verildi.



Şekil 21. Trans-sinamik asidin kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen regresyon denklemleri kullanılarak her bir standardın çeşitli konsantrasyonlardaki miktarlarının ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Her bir standardın 10 µg/mL’lik konsantrasyonundaki ortalama ve standart

sapma değerleri kullanılarak LOD değeri ($\text{LOD} = \text{Standart Sapma} \times 3$), LOQ değeri ($\text{LOQ} = \text{Standart Sapma} \times 10$) ve %BSS ($\text{\%BSS} = \text{Standart Sapma} \times 100 / \text{Aritmetik Ortalama}$) ayrı ayrı hesaplandı. Klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit standartlarının alıkonma zamanları, regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları, yüzde bağıl standart sapma (% BSS), tayin sınırı (limit of detection-LOD) ve ölçüm sınırı (limit of quantification-LOQ) değerleri Tablo 13'te verildi.

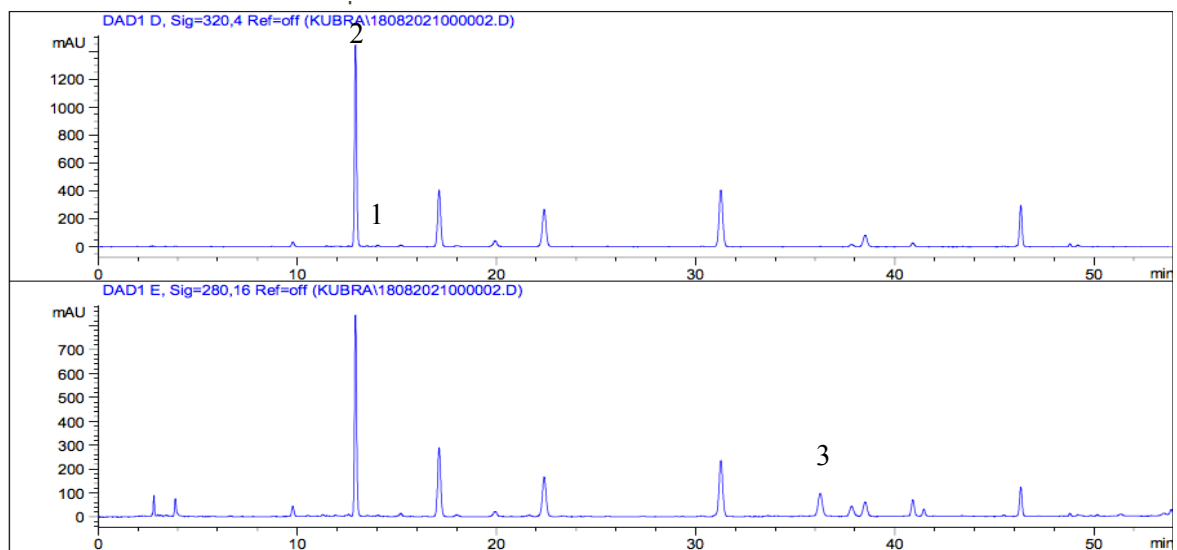
Tablo 13. Standartların alıkonma zamanları, regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları, %BSS, LOD ve LOQ değerleri

Bileşik İsmi	Alıkonma Zamanı (Dakika)	Regresyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı	% BSS (Alan)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Klorojenik asit	12.117	$Y=51.23X+22.254$	0.9987	0.166	0.046	0.154
Kafeik asit	13.043	$Y=89.711X+41.257$	0.9997	0.032	0.009	0.031
Trans-sinamik asit	35.514	$Y=145.47X+25.66$	0.9988	0.131	0.037	0.123

*: Regresyon denkleminde yer alan Y standartın pik alanını, X ise numune miktarını göstermektedir.

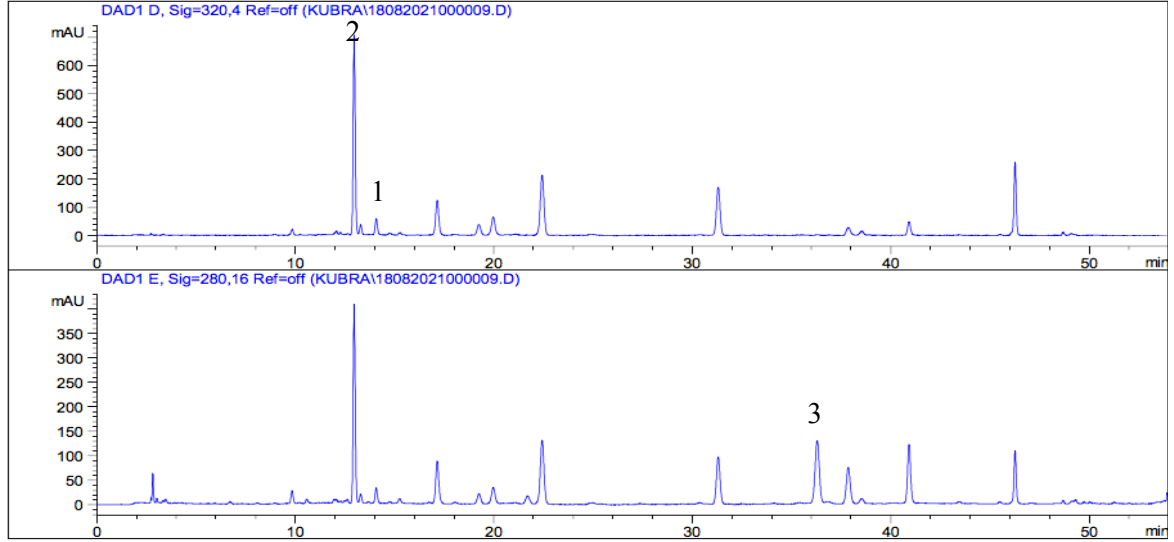
4.2.2. Sulu Propolis Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi

Sulu propolisi ekstraktlarının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramları her bir ilden bir örnek olacak şekilde verildi. Karabük ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 5'te gösterildi.



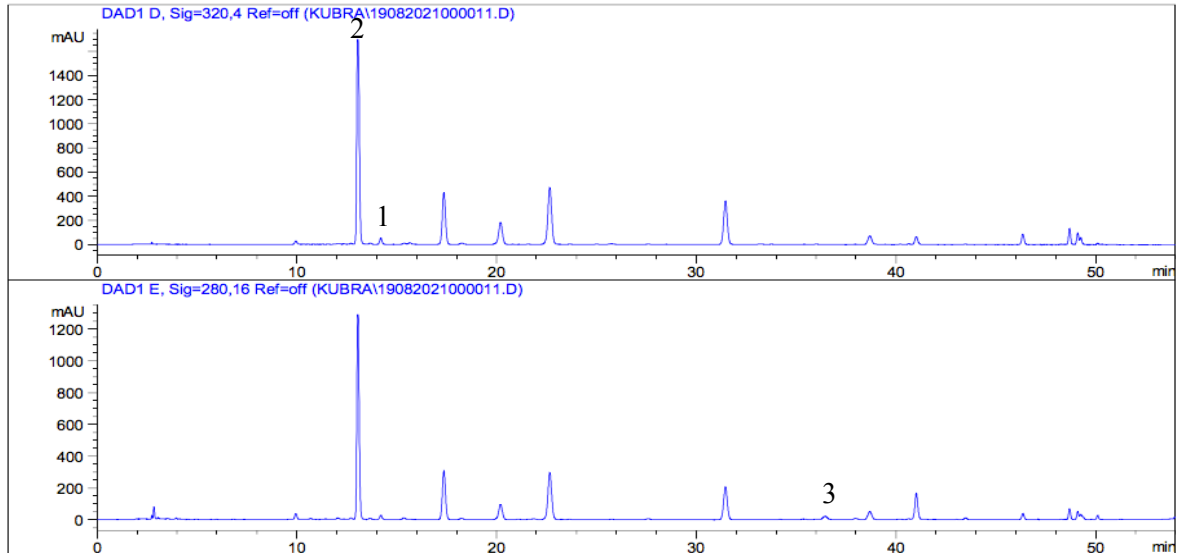
Resim 5. Karabük propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Tokat ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 6’da gösterildi.



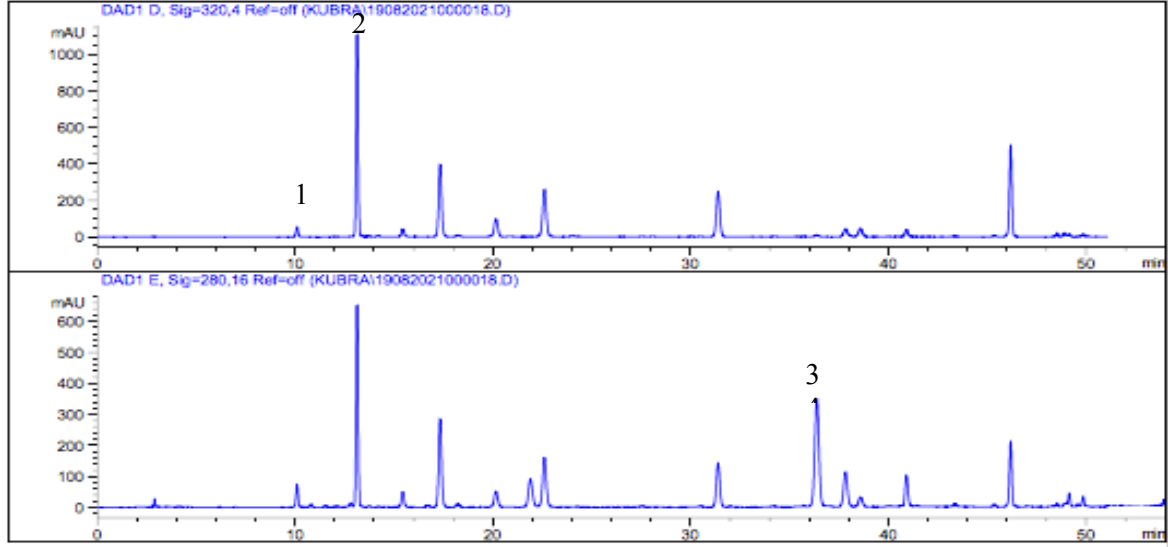
Resim 6. Tokat propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Ardahan ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 7’de gösterildi.



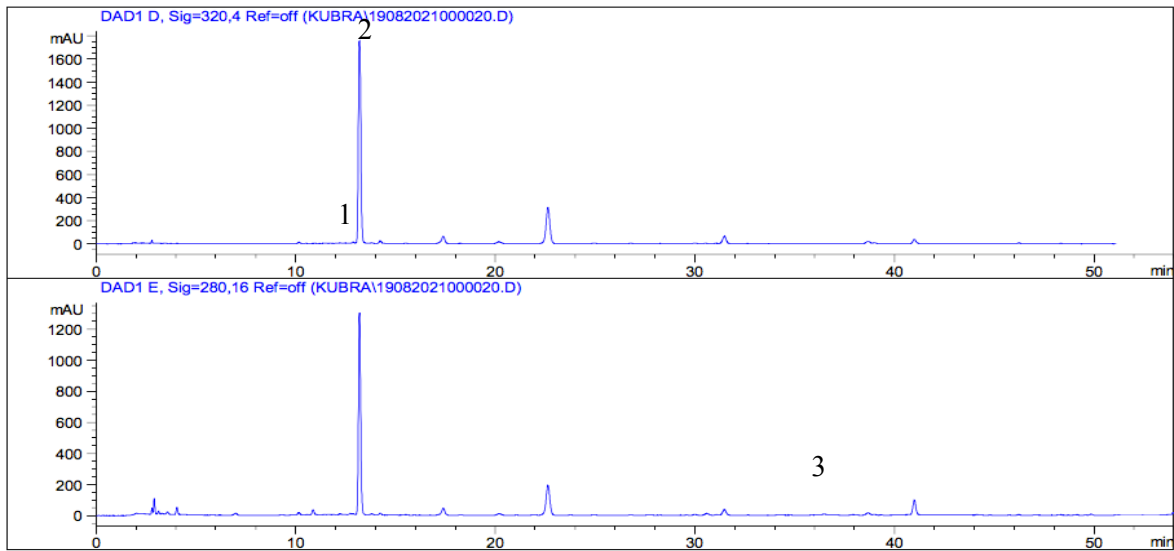
Resim 7. Ardahan propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Samsun ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 8’de gösterildi.



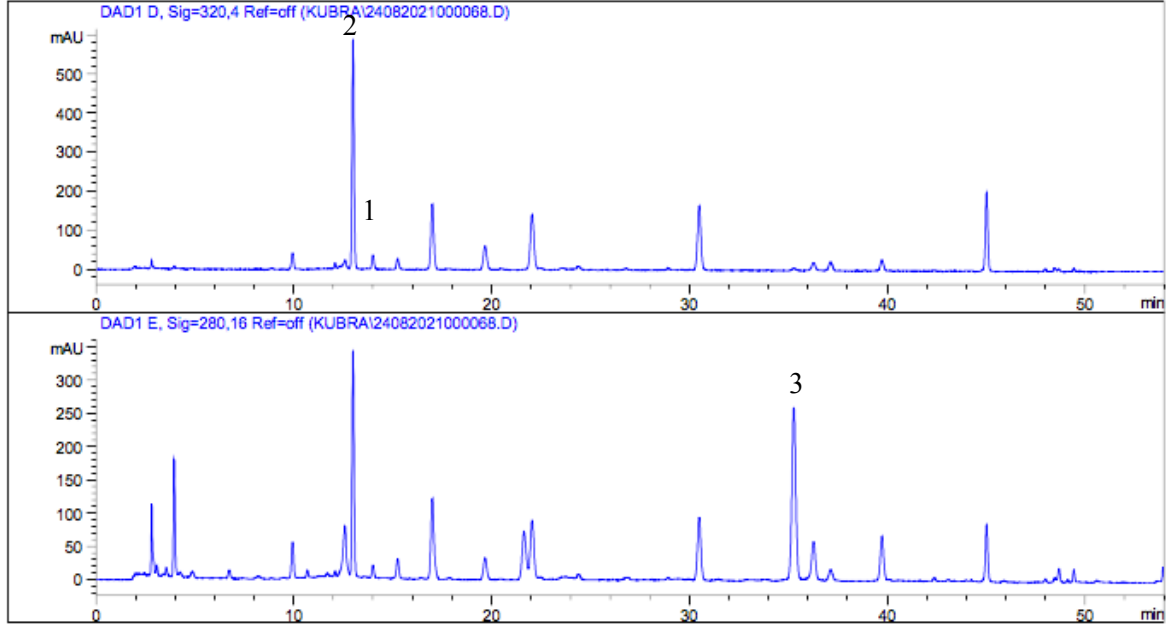
Resim 8. Samsun propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Hakkari ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 9’da gösterildi.



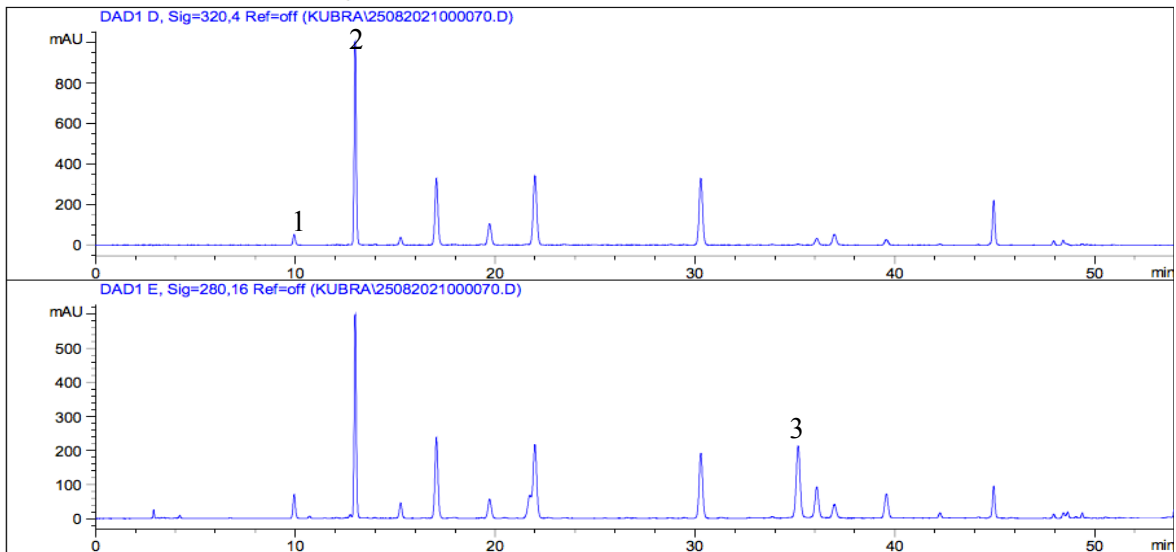
Resim 9. Hakkari propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Trabzon ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 10’da gösterildi.



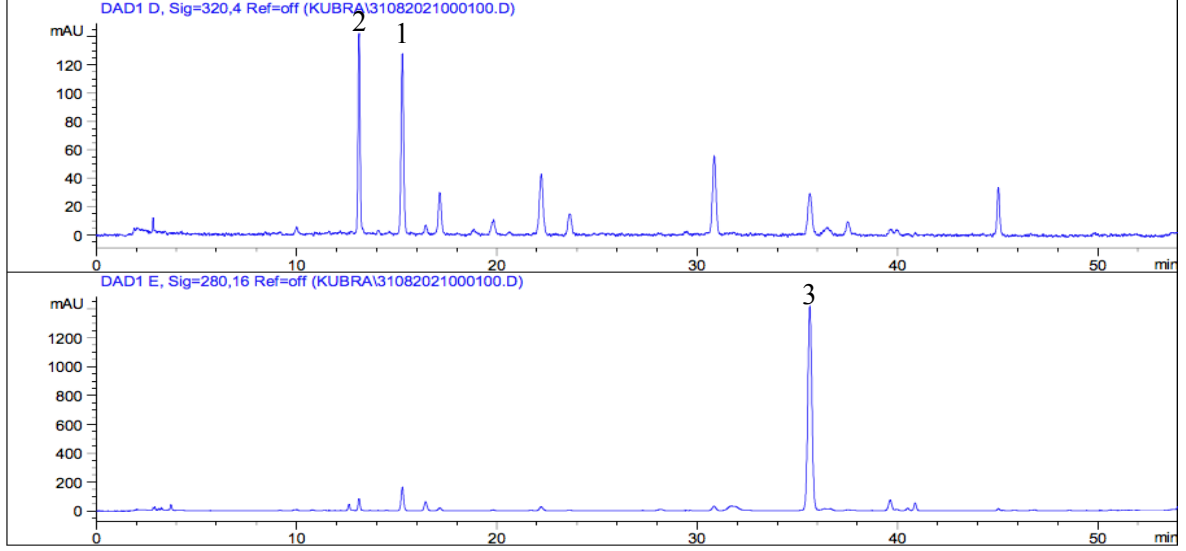
Resim 10. Trabzon propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Bursa ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 11’de gösterildi.



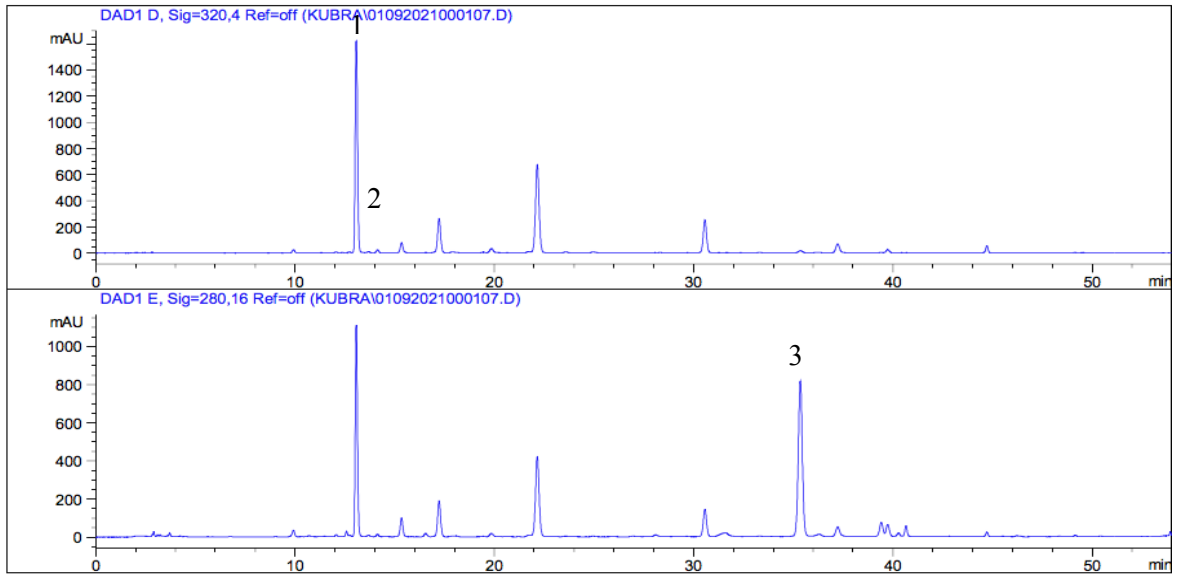
Resim 11. Bursa propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Hatay ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 12’de gösterildi.



Resim 12. Hatay propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

Gümüşhane ilinin sulu propolis ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı Resim 13’te gösterildi.



Resim 13. Gümüşhane propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramı. (1) Klorojenik asit. (2) Kafeik asit. (3) Trans-sinamik asit.

HPLC-DAD kromatogramları elde edilen sulu propolis ekstraktlarındaki polifenol miktarları Tablo 13'teki regresyon denklemleri kullanılarak ve ekstraktların % verim hesabı göz önüne alınarak hesaplandı ve Tablo 14'te verildi.

Tablo 14. Sulu propolis ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları (n=3)

Temin Edilen (İl- İlçe)	Klorojenik asit (µg/mL)	Kafeik asit (µg/mL)	Trans-sinamik asit (µg/mL)
Karabük-Eskipazar	7.16±0.17	569.56±5.87	52.11±0.04
Karabük-Safranbolu	6.45±0.18	728.98±8.36	30.89±0.21
Karabük-Yenice	5.54±0.21	328.31±1.39	171.03±3.70
Tokat-Erbaa	10.02±0.19	272.94±1.27	67.00±0.15
Tokat-Merkez	4.84±0.29	499.27±0.66	36.06±0.19
Tokat-Zile	4.50±0.02	542.64±3.63	133.41±1.51
Ardahan-Çıldır	3.49±0.09	840.26±11.88	7.28±0.01
Ardahan-Göle	7.69±0.16	172.75±0.11	2.82±0.09
Ardahan-Hanak	3.29±0.33	268.51±4.10	11.46±0.25
Ardahan-Merkez	5.17±0.18	561.76±2.32	54.15±0.33
Ardahan-Posof	9.03±0.21	698.84±5.95	43.72±0.11
Samsun-Bafra	4.55±0.24	213.35±5.07	670.57±6.00
Samsun-Havza	39.70±0.38	438.53±4.91	186.29±2.46
Samsun-Salıpazarı	25.35±0.09	284.51±1.33	69.02±0.12
Hakkari-Çukurca	4.05±0.02	477.58±1.42	3.17±0.11
Hakkari-Şemdinli	7.80±0.02	835.42±3.85	2.12±0.05
Hakkari-Yüksekova	5.64±0.10	976.21±6.47	27.62±0.13
Trabzon-Sürmene- 1	7.66±0.31	223.18±0.28	132.05±1.94
Trabzon-Sürmene- 2	7.18±0.07	478.12±0.65	0.55±0.11
Trabzon-Şalıpazarı	5.30±0.10	281.84±1.65	12.66±0.19
Trabzon-Ortahisar	44.28±0.30	354.11±1.71	29.24±0.19
Trabzon-Tonya	10.90±0.12	153.21±0.73	49.68±0.05
Trabzon-Yomra	35.44±0.21	436.04±4.76	96.44±1.54
Bursa-Gemlik	4.17±0.41	96.98±0.43	21.32±0.15
Bursa- Nilüfer	40.50±0.16	380.57±3.88	102.36±2.99
Bursa- Orhaneli	16.24±0.37	296.07±0.49	90.30±0.35
Hatay- Dörtyol	70.10±0.11	27.31±0.05	280.16±0.70
Hatay-1	123.04±6.09	56.96±0.30	746.77±8.72
Hatay-2	67.80±1.96	46.02±0.33	597.04±4.43
Hatay-3	18.73±0.02	34.62±0.05	271.42±1.90
Gümüşhane-Merkez	5.09±0.13	207.18±0.58	21.24±0.10
Gümüşhane-Torul	4.13±0.27	711.38±8.79	410.59±7.00

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

Sulu propolis ekstraktlarının tümünde diğer standartlara oranla yüksek oranda kafeik asit bulundu. Bu analizler sonucunda tüm sulu propolis ekstraktlarında kafeik asit miktarı 27.31-976.21 µg/mL, klorojenik asit miktarı 3.29-123.04 µg/mL ve trans-sinamik asit miktarı 0.55-746.77 µg/mL arasında değiştiği görüldü. En yüksek kafeik asit miktarı Hakkari-Yüksekova’da bulunurken en yüksek klorojenik asit ve trans-sinamik asit miktarı Hatay-1’den elde edilen propolisin sulu ekstraktında bulundu. En düşük kafeik asit, klorojenik asit ve trans-sinamik asit miktarları ise sırasıyla Hatay-Dörtüol, Ardahan-Hanak ve Trabzon-Sürmene-2 şeklinde bulundu.

Ekstraktların bölgelere göre klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları Tablo 15 ve Şekil 22’de verildi.

Tablo 15. Bölgelerdeki ekstraktlarda bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları

	Karadeniz	Akdeniz	Marmara	Doğu Anadolu	p
Klorojenik asit (µg/mL)	13.42±13.61	69.92±42.6 ^a	20.30±18.50 ^b	5.77±2.17 ^{a,b}	0.0001*
Kafeik asit (µg/mL)	395.48±174.6	41.23±13.0 ^a	257.87±145.60	603.91±286.16 ^{a,b,c}	0.0001
Trans-sinamik asit (µg/mL)	127.58±171.06	473.85±236.75 ^a	71.33±43.73 ^b	19.04±20.40 ^{a,b}	0.0001*

p; “ANOVA” testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler “Tukey” testine göre yapıldı.

*p; 0.0001, “Kruskal-Wallis” testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler “Mann-Whitney U” testine göre yapıldı.

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

^aKaradeniz’e göre anlamlı farklı, ^bAkdeniz’e göre anlamlı farklı, ^cMarmara’ya göre anlamlı farklı değerler verildi. (p<0.05)

Karadeniz Bölgesi (5 il, 17 numune): Karabük (Eskipazar, Safranbolu, Yenice), Tokat (Erbaa, Merkez, Zile), Samsun (Bafra, Havza, Salıpazarı), Trabzon (Sürmene-1, Sürmene-2, Şalpazarı, Ortahisar, Tonya, Yomra), Gümüşhane (Merkez, Torul)

Akdeniz Bölgesi (1 il, 4 numune): Hatay (Dörtüol, Hatay-1, Hatay-2, Hatay-3),

Marmara Bölgesi (1 il, 3 numune): Bursa (Gemlik, Nilüfer, Orhaneli),

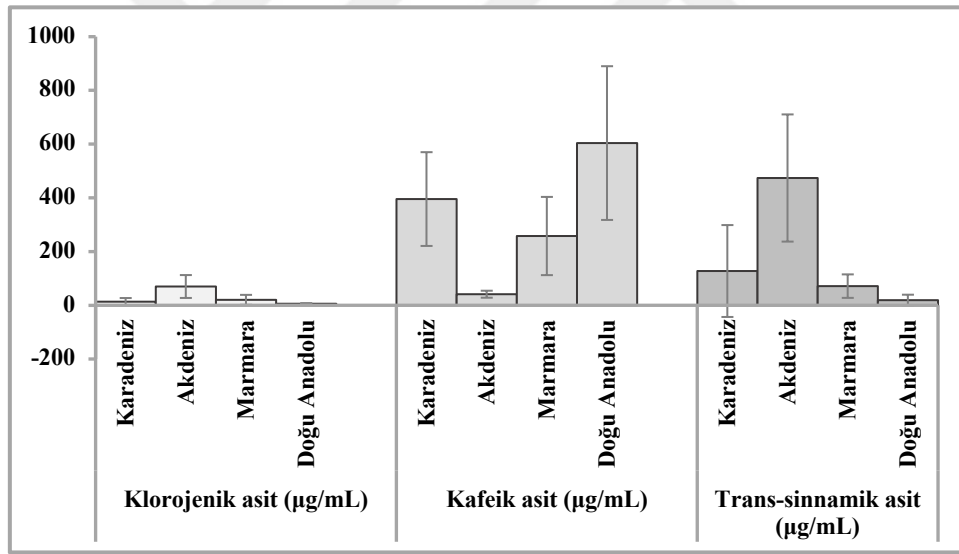
Doğu Anadolu Bölgesi (2 il, 8 numune): Ardahan (Çıldır, Göle, Hanak, Merkez, Posof), Hakkari (Çukurça, Şemdinli, Yüksekova)

HPLC-DAD ile ölçüm sonucunda, klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik miktarlarında bölgelere göre istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (p=0.0001). En yüksek klorojenik asit miktarı Akdeniz bölgesinde bulundu (69.92±42.61). Klorojenik asit miktarları karşılaştırıldığında Akdeniz bölgesi ile Marmara, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.0001, p=0.0001, p=0.0001).

Karadeniz bölgesi ile Doğu Anadolu bölgesi arasında klorojenik asit miktarları olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.014$).

En yüksek kafeik asit miktarı Doğu Anadolu bölgesinde bulundu (603.91 ± 286.16). Kafeik asit miktarları karşılaştırıldığında Doğu Anadolu bölgesi ile Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$). Karadeniz bölgesi ile Akdeniz bölgesi arasında kafeik asit miktarları olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$).

En yüksek trans-sinamik asit miktarı Akdeniz bölgesinde bulundu (473.85 ± 236.75). Trans-sinamik asit miktarları karşılaştırıldığında Akdeniz bölgesi ile Doğu Anadolu, Marmara ve Karadeniz bölgeleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$). Karadeniz Bölgesi ile Doğu Anadolu bölgesi arasında trans-sinamik asit miktarları olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.0001$).



Şekil 22. Bölgelerdeki ekstraktlarda bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları

Karadeniz bölgesindeki illere göre klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları Tablo 16 ve Şekil 23'te verildi.

Tablo 16. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları

	Karabük	Tokat	Samsun	Trabzon	Gümüşhane	p
Klorojenik asit (µg/mL)	6.38±0.81	6.45±3.10	23.20±17.67 ^{a,b}	18.46±16.91 ^{a,b}	4.61±0.68 ^{c,d}	0.002*
Kafeik asit (µg/mL)	542.28±201.72	438.28±144.82	312.13±115.10 ^a	321.08±125.12 ^a	459.28±356.52	0.005
Trans-sinamik asit (µg/mL)	115.24±43.68	78.82±49.74	308.62±318.89 ^{a,b}	53.44±51.16 ^c	215.91±275.31	0.001

p; “ANOVA” testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler “Tukey” testine göre yapıldı.

*p; 0.0001, “Kruskal-Wallis” testine göre verildi. Grup içindeki bölgeler arası post-hoc değerlendirmeler “Mann-Whitney U” testine göre yapıldı.

Sonuçlar, X±SD şeklinde verildi.

^aKarabük’e göre anlamlı farklı, ^bTokat’a göre anlamlı farklı, ^cSamsun’a göre anlamlı farklı, ^dTrabzon’a göre anlamlı farklı değerler verildi. (p<0.05)

Karabük (3 numune): Eskipazar, Safranbolu, Yenice,

Tokat (3 numune): Erbaa, Merkez, Zile,

Samsun (3 numune): Bafra, Havza, Salıpazarı,

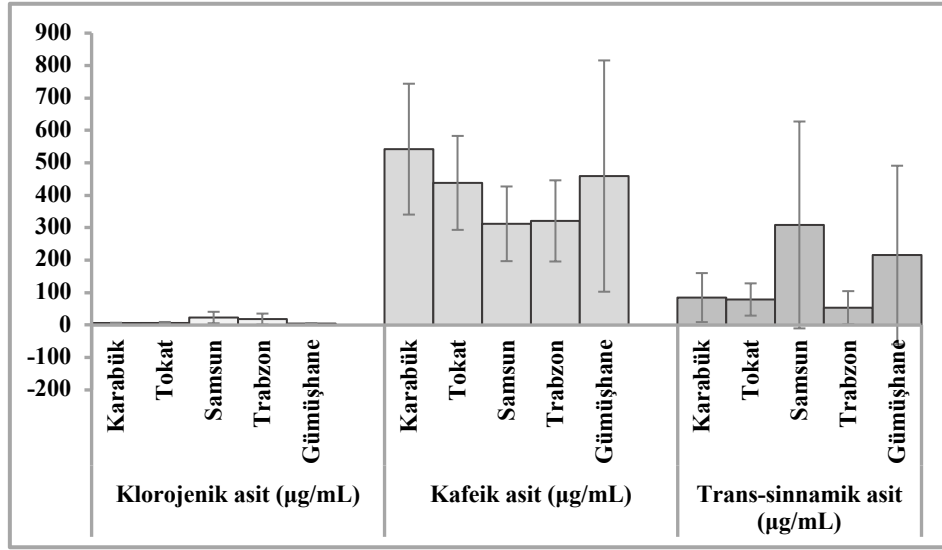
Trabzon (6 numune): Sürmene-1, Sürmene-2, Şalpazarı, Ortahisar, Tonya, Yomra,

Gümüşhane (2 numune): Merkez, Torul

HPLC-DAD ile ölçüm sonucunda, klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik miktarlarında Karadeniz bölgesindeki illere göre istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla p=0.002, p=0.005, p=0.001). En yüksek klorojenik asit miktarı Samsun’da bulundu (23.20±17.67). Klorojenik asit miktarları karşılaştırıldığında Samsun ile Karabük, Tokat ve Gümüşhane arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.028, p=0.029, p=0.031). Trabzon ile Karabük, Tokat ve Gümüşhane arasında klorojenik asit miktarları olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.010, p=0.005, p=0.0001).

En yüksek kafeik asit miktarı Karabük’te bulundu (542.28±201.72). Kafeik asit miktarları karşılaştırıldığında Karabük ile Samsun ve Trabzon arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.02, p=0.007).

En yüksek trans-sinamik asit miktarı Samsun’da bulundu (308.62±318.89). Trans-sinamik asit miktarları karşılaştırıldığında Samsun ile Karabük, Tokat ve Trabzon arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.013, p=0.011, p=0.001).



Şekil 23. Karadeniz bölgesindeki illerin ekstraktlarında bulunan klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit miktarları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan sağlığını korumaya yardımcı olan gıdalara son yıllarda tüketicilerin, gıda sanayinin ve araştırmacıların ilgisinin giderek arttığı görülmektedir. İçerdikleri fizyolojik aktif bileşenler ile insan sağlığını iyileştirmede ve hastalıkların oluşumunu önlemede etkili gıdalar “fonksiyonel gıdalar” olarak adlandırılmaktadır. Bu açıdan fonksiyonel gıdalar olarak isimlendirilen nutrasötikler, tasarlanan gıdalar, terapötik gıdalar, süpergıdalar ya da tıbbi gıdalar önemli bir rol oynamaktadırlar (1, 2). Bu gıdaların, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkları da içeren birçok inflamatuvar ve metabolik hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu pek çok çalışmayla ortaya konulmuştur. Bu koruyucu etkilerini içerisinde ihtiva ettiği polifenoller; özellikle flavonoidler ve fenolik asitlerle gerçekleştirdikleri bilinmektedir (7). Fonksiyonel gıdalarda bulunan bu bileşenler vücudumuzda sentezlenemezler ve bunların eksojen kaynaklı olarak meyve, sebze ve içeceklerden temin edilmesi gerekmektedir (15). Sadece besinsel özelliğinden değil, aynı zamanda belirlenen birçok fonksiyonel ve biyolojik özelliklerden dolayı propolis bu fonksiyonel gıdalardan bir tanesi olarak yer almaktadır ve son yıllarda zengin içeriğinden dolayı bu doğal maddeye karşı ilgi artmaktadır (1, 2).

Propolis, kovanların yakınındaki bitkilerin tomurcuklarından veya eksüdalarından bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve balmumu, polen ve tükürük enzimleriyle hidroliz ederek oluşturulan doğal bir maddedir. Arıların propolisi; petekleri onarmak, peteğin ince sınırlarını güçlendirmek, kovanın su geçirmesini en aza indirmek ve öldürüp dışarıya taşıyamadıkları kovan istilacılarının leşlerini kaplamak için bir mumyalama maddesi olarak kullandıkları bilinmektedir (5). Propolis geleneksel yöntemlerle hastalıkların tedavisinde antik çağlardan beri kullanılmaktadır (107). Günümüzde ise birçok ülkede şekerlemeler, farmasötikler ve kozmetik ürünlerin bir bileşeni olarak kullanılmakla birlikte raf ömrünü uzatmaya ve tüketicilerin sağlığını iyileştirmeye yardımcı olan yiyecek ve içecekler için aktif bileşiklerin bir kaynağı ve doğal koruyucu olarak popülerlik kazanmaktadır (1, 108).

Propolisin kimyasal bileşimi oldukça karmaşık ve çeşitlidir (5). Dünyanın çeşitli coğrafi ve botanik kökeninden elde edilen farklı propolis örneklerinde; esas olarak flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri bulunmakla birlikte 300’den fazla kimyasal bileşik izole edilmiştir (3, 6, 7). Propolisin bu kimyasal bileşimi koleksiyonun toplandığı bölgenin coğrafi ve iklimsel özellikleri, bitki türleri, ortama hakim olan aydınlatma, yıl içerisindeki

toplama zamanı ve toplama yöntemi gibi bir sıra faktörün yanı sıra kraliçe arının genetik değişkenliği ile de ilişkilidir (8, 9).

Literatürdeki çalışmalarda propolis ve bileşenlerinin antioksidan, anti-inflamatuvar, immünomodülatör, antimikrobiyal, hepatoprotektif, nöroprotektif, antikarsinojenik, antifungal ve antiviral olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (5, 11). Propolis bu biyolojik aktiviteleri sebebiyle Avrupa'dan Doğu Asya'ya geleneksel tıp, kozmetik ve gıda sanayinde kullanılmaktadır (12).

Bitki kaynağına, toplandığı bölgenin coğrafi ve iklim koşullarına bağlı olmasından dolayı propolisin kimyasal kompozisyonunun standardizasyonu zordur (10). Bitki kaynağının bileşimi propolisin bileşimini belirlediği için propolis kompozisyonunun ve botanik kökeninin ayrıntılı araştırması zorunludur (4, 67). Bu sebeple dünyanın farklı bölgelerinden propolis örneklerinin karşılaştırıldığı çeşitli türde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kökenlerden gelen propolisin farklı kimyasal bileşime sahip olup farklı biyolojik aktivitelere yol açabildiği, ancak aynı tür biyolojik aktivite de sergileyebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle son yıllarda propolisin biyolojik özelliklerini araştırmak ve karşılaştırmalar yapmak için gerçekleştirilen hemen hemen her çalışma, kullanılan propolis örneklerinin karakterizasyonunu içermektedir.

Serbest radikaller, son yörüngelerinde tek ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir (109). Organizmada serbest radikal kaynağı genellikle ROS'dur. Reaktif oksijen türleri ile antioksidan sistem arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır ve ROS'ların oksidatif stres durumunda hücrelerin lipid, protein ve DNA gibi önemli bileşiklerinin yapılarını bozdukları bilinmektedir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışmada da propolisin bileşiminde bulunduğu bilinen flavonoidlerin ve fenolik asitlerin güçlü antioksidan özellik gösterdikleri doğrulanmıştır (8, 14, 110). Bu özellikleri onların yapısal karakterleriyle yakından ilişkilidir. Propolisin içeriğindeki en önemli bileşenlerden olan fenolik asitlerin antioksidan aktivitesini serbest radikalleri süpürme, metal iyonlarını şelatlama ve oksidazları inhibe ederek enzimlerin aktivitelerini değiştirme etkisi oluşturmaktadır (14).

Ham propolis reçineli bir maddedir. Bu nedenle ham propolis nadiren doğrudan kullanılmakla birlikte etanol, metanol, aseton, kloroform, propilenglikol ve su gibi farklı çözücülerle ekstraksiyonu ile flavonoidler ve fenolik asitlerin elde edildikleri ileri sürülmüştür (77, 111, 112).

Propolisin ekstrakte edilmesinde kullanılan çözücünün ve yöntemin propolisin belirli bileşenlerini çözme etkisinden dolayı, propolisin içeriğinde kimyasal bileşenler yönünden farklılıklar tespit edileceği bilinmektedir (113). Diğer bir deyişle çözücülerin çeşitliliği, farklı biyolojik etkilere sahip olabilen aktif maddelerin farklı bileşimleriyle sonuçlandığını göstermektedir. Su, etanol ve zeytinyağı gibi farklı çözücülerin kullanımı, propolisin toplam fenolik içeriğini böyle bir ölçekte etkileyebilir (13). Propolis ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle etanol çözücü olarak kullanılsa da son dönemdeki çalışmalarda propolisi ekstrakte etmek için çözücü olarak suyun kullanımında artış görülmektedir. Su çözücü olarak biyouyumlu olduğu için su bazlı propolis ekstraktları daha güvenli bir şekilde uygulanabilmektedir. Bununla birlikte, su ekstraktları daha basit aktif bileşik aralığına sahip olduğu da bilinmektedir (114).

İnsanlar tarafından sağlığı korumaya yardımcı olarak tüketimi artan, toksik olmayan ve tüketimi yönünden daha avantajlı olan su ile ekstrakte edilen propolis ile ilgili çalışmalar sınırlı da olsa önemlilik arz etmektedir. Propolisin sulu ekstraktıyla yapılan çalışmalarda antiviral, antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuvar, hepatoprotektif, antioksidan, anti-HIV, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, antitümör ve granülosit farklılaşmasını indükleyen etkinliği gibi pek çok biyolojik özelliği belirlenmiştir (82, 83, 114-116). Propolisin sulu ekstraktındaki başlıca bileşenlerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu da yine bu çalışmalarda belirtilmiştir (81). Mello ve ark. ekstraksiyonda kullanılan çözücü türünün, propolisin antioksidan aktivitesini ve nihai fenolik bileşimini etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir (117).

Tüm bu literatür araştırmaları, son yıllarda propolisin sulu ekstraktının biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu bilinen kimyasal bileşiminin tespiti ve antioksidan aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmaların artmakta olduğunu göstermektedir.

Midorikawa ve ark. çeşitli Brezilya propolis örneklerinin liyofilize su ekstraktlarını analiz etmişlerdir. Farklı yoğunluklarda klorojenik asit, 3,4-di-O- kafeoilkuinik asit ve 3,5-di-O-kafeoilkuinik asite karşılık gelen pikleri gözlemlemişlerdir. Bunun yanında ekstraktlarda *p*-kumarik asit ve kafeik asit de tüm ekstraktlarda tespit edilirken ferulik asit, koniferil aldehid ve vanilin de belirli numunelerde tespit edilmiştir (114).

Nakajima ve ark. daha önceden içeriği belirlenen ve içerisinde kafeoilkuinik ve sinnamik asit türevleri olduğu bilinen Brezilya yeşil propolisinin sulu ekstraktlarının içeriğinde bulunan klorojenik asit, *p*-kumarik asit ve kafeoilkuinik asit türevlerinin oksidatif

stress ile indüklenen hasara karşı nöroprotektif etkilere sahip olduğu ve bunu da kısmen antioksidan etkiler arayıcılığıyla gerçekleştirdiklerini belirtilmiştirler (80).

Nakajima ve ark. hem farklı arı ürünlerinin hem de iki farklı çözücü ile hazırlanmış Brezilya propolisinin antioksidan kapasitesini çeşitli antioksidan yöntemlerle ölçmüşler ve en yüksek antioksidan potansiyelin propolisin sulu ekstraktında olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca propolisin sulu ekstraktının temel bileşenlerinden kafeik asidin, artepillin C ve drupanine göre daha yüksek antioksidan etkisi olduğu bulunmuştur. Kafeik asitin radikal temizleme etkisinin troloks kadar güçlü olduğu, ayrıca N-asetil sistein (NAC) ve vitamin C'den daha kuvvetli olduğu belirlenmiştir (118).

Laskar ve ark. tarafından Hint propolisinin antioksidan aktivitesinin belirlendiği çalışmada, sulu ekstraktın toplam polifenol içeriği 269.10 mg GA/g bulunurken toplam flavonoid içeriği ise 25.50 mg K/g bulunmuştur. Çalışmada sulu ekstraktların önemli ölçüde antioksidan aktivite gösterdiği ve bunun nedenin ise yüksek polifenol içeriği olabileceği belirtilmiştir (119).

Nagai ve ark. Brezilya propolisinin liyofilize su ekstraktının antioksidan aktivitesini ölçmüşlerdir. Aktivite 1 ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda 5mM askorbik aside göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda süperoksit radikale karşı temizleme aktivitesi yüksek olup 50 ve 100 mg/mL'de süperoksit üretimini tamamen engelleyip hidroksil radikalini ise tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu, propolisin su ekstraktının kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıkları olan hastalar için bir farmasötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (83).

Yen ve ark. Brezilya propolis örneklerinin sindirim ürünlerinin faydalı etkinliğini belirlediği çalışmada sulu ekstraktın toplam fenolik içeriğini 8.39 mg GA/g ve toplam flavonoid içeriğini ise 0.6 mg Kateşin/g olarak bulmuşlardır (120).

Brezilya propolisinin antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir başka çalışmada ise sulu ekstraktın toplam polifenol içeriği 36.57 mg GA/g bulunurken toplam flavonoid içeriği 23.67 mg K/g numune olarak bulunmuştur (117).

Coğrafi ve iklimsel orijine ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı coğrafi bölgelerden alınan örneklerden elde edilen propolis bileşimi bilgisi, propolis standardizasyonu sorunu açısından son derece değerlidir. Propolisin kimyasal bileşimine sadece hangi çözücü ile ekstrakte edildiği değil, aynı zamanda toplandığı coğrafik bölgenin

etki ettiği yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Propolisin antioksidan aktivitesi ise fenolik asitler ve flavonoidler gibi polifenollerin zenginleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, toplam antioksidan kapasite, farklı bölgelerden fenolik bileşiklere göre büyük ölçüde değişebilmektedir (13).

Portekizde  bölgeden toplanan propolis örneklerinin antioksidan potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmada toplam fenolik içeriğin 1.75 mg/mL olduğu grlmştir. Antioksidan aktivite ile ölçümlerde her ne kadar hidroalkolik ekstraktlar kullanılmış olsa dahi bölgelerin, analiz yönteminden bağımsız olarak toplam fenolik seviyeleri ile yakından ilişkili olarak çeşitli antioksidan aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir (121).

Cezayir'in Setif bölgesinin dört konumundan toplanan propolis numunelerinin GC-MS kullanılarak kimyasal bileşimi belirlenmiştir. Sulu propolis ekstraktlarında 20'den fazla bileşik tanımlanmıştır. İçerik miktarları bölgeden bölgeye değişmekle birlikte sinnamik asit ve benzoik asit sadece bir örneğin sulu ekstraktlarında bulunduğu grlmştir (122).

Almanya, İrlanda ve ek Cumhuriyeti gibi çeşitli coğrafik orijinlerden toplanan propolis örneklerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. HPLC ile gerçekleştirilen analizde sulu Almanya propolisinin kimyasal bileşiminde sadece sinnamik asit bulunmuştur. Almanya propolisinin sulu ekstraktının toplam flavonoid içeriği 0.11 mg K/g olarak verilirken toplam fenolik içeriği belirtilmemiştir. Sulu Alman propolis özütünün diğer bölge propolislerinin çeşitli ekstraktlarına (sulu olmayan ekstraktlar) göre orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediği belirtilmiştir (123).

Silva ve ark. yaptıkları çalışmada Portekiz'in üç farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerinin sulu ekstraktlarının toplam polifenol içerikleri 18.52-72.15 mg GA/g arasında değişirken toplam flavonoid içeriklerinin 6.34-42.30 mg kateşin/g arasında değiştiği bulunmuştur (124).

Çin'de 26 bölgeden toplanarak gerçekleştirilen bir çalışmada sulu ekstraktların toplam polifenolik içeriklerinin 10.05–377.25 mg GA/g propolis arasında değiştiğini, toplam flavonoid içeriklerinin ise 3.47-15.42 mg K/g arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir (125).

Lagouri ve ark. iki farklı konumdan alınan propolis örneklerinin sulu ekstraktlarıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, Rodosun toplam fenolik içeriği 2.33 mg GA/g iken Batı Makedonyanın 58.53 mg GA/g olduğunu ve Rodosun toplam flavonoid içeriği 0.25 mg K/g

iken Batı Makedonyanın ise 5.05 mg /g olduğunu bulmuşlardır. Toplam fenolik ve flavonoid içerik sonuçlarının benzer olmama nedeninin, coğrafi konumlardaki farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (126).

Propolisin kimyasal bileşimini etkileyen coğrafi konum özelliği dikkate alınarak, bu konu ile ilgili dünyanın farklı ülkelerinde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş olduğunu görmekteyiz. Propolisin karakterizasyon çalışmalarında kimyasal bileşiminin tespiti için kullanılan yöntem de oldukça önemlidir. Yöntemlerin uygulanması, flavonoidler, terpenler, fenoller, esterler, şekerler, hidrokarbonlar ve mineraller dahil olmak üzere daha fazla propolis bileşiğinin tanımlanmasına yol açmaktadır. Güçlü kromatografik araçların kullanımı, propolis gibi karmaşık karışımlardaki biyolojik aktif maddelerin belirlenmesi ve ölçümünü sağlamak için gereklidir (8). Propolisin kimyasal bileşenlerinin ayrılması ve saflaştırılması için HPLC, TLC ve GC gibi tekniklerin yanı sıra MS ve NMR gibi farklı tanımlama teknikler kullanılır (127). Tüm bu metodlar arasında HPLC şüphesiz polifenolik bileşiklerin karakterizasyonu için en yaygın ve güvenilir analitik tekniği temsil etmektedir (15, 128, 129).

Çalışmamızda kullandığımız fotodiyot dizisi ile birleştirilmiş HPLC yöntemi, propolisin karmaşık yapısında bulunan özellikle flavonoidler ve fenolik asit bileşenlerinin tahlili için tercih edilmiştir. Bu yöntemin UV detektöre göre üstün olmasının sebebi ise her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansını eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır (84, 130). HPLC yöntemi ile birleştirilmiş farklı dedektör sistemleri kullanılarak Dünyada sulu propolisi ekstraktlarının kimyasal bileşimlerinin tespitiyle ilgili gerçekleştirilen çalışmaların oldukça az olduğu görülmektedir.

Mishima ve ark. Brezilya propolisinin sulu ekstraktını HPLC ile analiz etmişler ve başlıca klorojenik asit, *p*-kumarik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit bileşikleri bulunurken bunun yanında az miktarda drupanin, artepillin C ve bakkarin tespit etmişlerdir (131). Mishima ve ark. gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise yine Brezilya propolisinin sulu ekstraktı aynı yöntemle analizi gerçekleştirilmiş ve bileşenler arasında 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5- di-O-kafeoilkuinik asit ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit tespit edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda bir önce belirtilen çalışmadan farklı olarak az miktarda kafeik asit ve ferulik asit bulunmuştur (132).

Kubiliene ve ark. Litvanya propolisiyle gerçekleştirdikleri çalışmada propolisin sulu ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini 1.6 mg/mL GA olarak bulmuşlardır. Litvanya propolisiyle yapılan bir başka çalışmada ise toplam fenolik içeriği 1207.9 µg/mL *p*-kumarik asit eşdeğeri olarak bulunurken ekstraktların kimyasal bileşimi HPLC-UV sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktlarda ferulik asit (78.4 µg/mL), kafeik asit (7.5 µg/mL), *p*-kumarik asit (165.2 µg/mL), vanilin (156.6 µg/mL) ve vanilik asit (109.5 µg/mL) bulunmuştur. Yapıda bulunan fenolik asitlerin radikal temizleme aktivitesine katkıda bulunduklarını belirtmişlerdir (133, 134).

Sun ve ark. tarafından yürütülen bir araştırmada, sulu ekstraktın toplam fenolik içeriği 6.68 mg GA/g bulunurken toplam flavonoid içeriği 4.07 mg Rutin/g ve demir indirgeyici gücü 20 µg Troloks/mg bulunmuştur. Sulu ekstraktın HPLC-DAD-MS ile analizi sonucunda bileşenlerinin esas olarak kafeik asit, benzoik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve 3,4-dimetoksisinamik asit olduğu ortaya koyulmuştur. Bunun yanı sıra sulu ekstraktta pinobanksin, pinosembirin ve kaemferol gibi flavonoidler de düşük içerikle tespit edilmiştir (135).

Bütün bu bilgilerden yola çıkılarak diğer tüm propolisler gibi Türk propolisinin içeriğinin aydınlatılmasının önemli hale geldiği görülmüş ve bununla ilgili çeşitli çalışmalar gerek ülkemizde gerekse bölümümüzde gerçekleştirilmiştir. Ancak Türkiye’de propolis ile yapılan çalışmalarda propolisi ekstrakte etmek için etanolün (%70 ya da %90’lık) yaygın olarak kullanıldığı ve bunun yanı sıra sınırlı sayıda çalışmada suyun kullanıldığı göze çarpmaktadır. Yine Türk propolisi ile yapılmış analiz çalışmaları incelendiğinde karakterizasyon için genellikle GC-MS yönteminin kullanıldığı görülmektedir (136-153). Yüksek tekrarlanabilirliği olan bu metodun uçucu bileşenlerin ya da uçucu türevi yapılabilen bileşenlerin analizinde daha etkin olduğu bilinmektedir. Ayrıca bölümümüzde gerçekleştirilen Tuğba ve ark. yaptıkları çalışmada Türk propolisinin sulu ekstraktlarının GC-MS yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiş ve sulu propolisi ekstraktlarında bulunan ve antioksidan özellik gösterdiği bilinen bileşiklerin bu yöntemle tespit edilemediği görülmüştür (78). Bu yüzden bu metodun yerine mükemmel ayırma ve aynı anda birden fazla bileşiği analiz etme kabiliyeti olan HPLC-DAD tekniğini kullanmanın çalışmanın başarısını arttıracakı düşünülmüştür.

Yapılan literatür araştırmalarında Türkiye’nin sulu propolis ekstraktlarının kimyasal bileşimi ve antioksidan özelliği ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğunu görmekteyiz. Gülçin

ve ark. Türkiye'nin Erzurum ilinin liyofilize sulu propolis ekstraktı ile yaptıkları çalışmada ekstraktların toplam fenolik içeriğini 124.3 µg GA/g bulurken toplam flavonoid içeriğini ise 8.15 Kuersetin eşdeğeri olarak bulmuşlardır. Antioksidan aktivitesi için gerçekleştirilen birçok analizde etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi ile yapılan bileşen analizinde ise kafeik asit, ferulik asit, siringik asit, ellagik asit, kuersetin, a-tokoferol, pirogallol, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilin, *p*-kumarik asit, gallik asit ve askorbik asit tespit edilmiştir (12).

Bölümümüzde daha önce gerçekleştirilen karma Türk propolisinin kullanıldığı tezde sulu ekstraktların toplam polifenol içeriği 19.67 mg GA/g, toplam flavonoid içeriği 1.30 mg K/g ve demir indirgeyici gücü ise 26.22 mg T/g bulunmuştur (154).

Çakıroğlu ve ark. yaptıkları çalışmada karma Türk propolisinin sulu ekstraktının HPLC-DAD aracılığı ile gerçekleştirilen analizinde fazla miktarda kafeik asitin (204.00 µg/mL) yanısıra trans-sinamik (28.90 µg/mL), klorojenik (10.20 µg/mL) ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit (7.75 µg/mL) içerdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada HPLC yönteminin standardizasyonu sağlanmış olup çalışmamızda da bu yöntem kullanılmıştır (78).

Gerek Türkiye'de gerçekleştirilen birçok çalışmada gerekse bölümümüzde gerçekleştirdiğimiz daha önceki çalışmalarda "Türk Propolisi" örnekleri kullanılmıştır. Bu propolis örnekleri ya tek bir bölgeden ya da farklı bölgelerden toplanıp harmanlanarak hazırlanmıştır ve toplanma bölgesinin etkisi göz ardı edilmiştir. Hazırlanan bu "Türk propolisi" örneğinin, doğal ve zengin bitki örtüsü sahip olan ülkemizin coğrafik bölgelerindeki çeşitliliği ortaya koyamadığı gözlenmektedir.

Ülkemizin doğal bitki örtüsünün zenginliğinden yola çıkıldığında, bugüne kadar su ile ekstrakte edilmiş Türk propolisiyle ilgili bölgesel değişikliklerin göz önüne alınarak gerçekleştirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Ayrıca farklı bölge etkisi ve antioksidan statüleri parametre olarak incelenmesiyle de ülkemizde hangi bölge ya da yörenin daha kıymetli propolis ürettiği de Türkiye'de ilk kez açığa çıkartılacaktır. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında Türkiye'nin yedi farklı bölgesindeki arı ürünleri üretiminin yoğun olduğu çeşitli illerden (Ordu gibi) propolis örnekleri temin edilecekti. Ancak Koronavirüs hastalığı (Covid-19) veya enfeksiyon etkeninin ülkelerde, kıtalarda, hatta tüm dünya gibi çok geniş bir alanda yayılım göstermesi sebebiyle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi ilan edilmiştir. Bunun sonucunda temin edilmesi beklenen tüm

propolis örneklerinin tarafımıza gönderimi sağlanamamış ve beklenen sayıda numune elde edilemeyip elimizdeki örneklerle çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu durum her ne kadar çalışmamızı sınırlandırmış olsada literatürle uyumlu olarak bölge, çözücü ve aynı zamanda kullanılan yöntemin içerik ve antioksidan potansiyele etkisini gözlememize engel olmamıştır.

Literatürde propolisin sulu ekstraktının antioksidan aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Propolisin sulu ekstraktlarının antioksidan potansiyeli ile ilgili çalışmalar

Coğrafik Bölge	Toplam Polifenol İçerik (mg GA/g propolis)	Toplam Flavonoid İçerik (mg K/g propolis)	Demir İndirgeyici Gücü (mg T/g propolis)	Kaynak
Hindistan	269.10	25.50		119
Brezilya	8.39			120
Brezilya	36.57	23.67		117
Almanya		0.11		123
Portekiz (3 Bölge)	18.52-35.15-72.15			124
Çin (26 Bölge)	10.05–377.25	3.47-15.42		125
Rodos-Batı Makedonya	2.33-58.53	0.25-5.05		126
Çin	6.68		20	135
Türkiye (Erzurum)	0.1243			12
Türkiye	19.67	1.30	26.22	154

Tezimizin antioksidan potansiyelin belirlenmesi kısmında, Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden toplanan propolis örneğinden elde edilen veriler, toplam polifenol ve flavonoid içerikleri ile demir indirgeyici güç analitik yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucunda propolisin sulu ekstraktlarının toplam polifenol içerikleri 11.66-136.29 mg GA/g propolis arasında bulunurken; literatürde Dünya’nın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin sulu ekstraktlarının toplam polifenol içerikleri 2.33-269.10 mg GA/g propolis arasında değiştiği, Erzurum propolisi için 124.3 µg GA/g

propolis ve karma Türk propolisi içinse 19.67 mg GA/g propolis (154) verildiği görülmüştür. Çalışmamızda propolisin sulu ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri 0.86-26.86 mg K/g propolis arasında bulunurken; literatürde Dünyanın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin sulu ekstraktlarının flavonoid içeriği 0.25-25.50 mg K/g propolis arasında değiştiği ve karma Türk propolisi için 1.30 mg kuersetin/g propolis değerleri bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda propolisin sulu ekstraktlarının demir indirgeyici gücü 19.31-258.96 mg T/g propolisi arasında değiştiği bulunurken; Çin propolisi için 20 µg T/mg propolis ve karma Türk propolisi için 26.22 mg T/g olarak bildirildiği görülmüştür. Çalışmamızda ekstraktlarımızın polifenol ve flavonoid miktarlarının literatür ile uyumlu olduğu görüldü. Demir indirgeyici gücü sonuçlarının büyük bir kısmı ise literatüre göre çok daha yüksek bulundu (12, 117, 119, 120, 123-126, 135, 154).

Elde edilen sonuçlara göre, farklı yörelerden toplanan propolis örneklerinin polifenol ve flavonoid madde içerikleri ile demir indirgeyici gücü birbiriyle uyumlu bulunmuştur. En yüksek polifenol içeriği sırasıyla Hakkari-Yüksekova, Trabzon Sürmene-2 ve Ardahan-Çıldır'da bulundu. En yüksek flavonoid içeriği sırasıyla Hakkari-Çukurca'da, Gümüşhane-Merkez ve Hakkari-Şemdinli'de bulundu. En yüksek demir indirgeyici gücü ise sırasıyla Hakkari-Yüksekova, Ardahan-Çıldır ve Samsun-Salıpazarı'nda bulundu.

Bölgeden bölgeye toplam polifenol ve flavonoid içerik sonuçları ile demir indirgeyici gücü testinden elde edilen sonuçlar birbiri ile tutarlılık göstermektedir. En yüksek toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü Doğu Anadolu bölgesinde görülürken bu değerlerde azalış bölgelere göre sırasıyla Karadeniz, Marmara ve Akdeniz bölgesi şeklindedir. Aynı bölgeden bazı illerin birbirinden oldukça farklı polifenolik bileşime, flavonoid bileşime ve demir indirgeyici gücüne sahip olduğu görülmüştür. Hatta aynı ilde farklı yörelerden alınan örnekler arasında bile oldukça büyük farklılıklar olduğu görülmüştür. Görülen bu çeşitliliğinin arkasında yatan sebebin ise aynı solvent ile ekstrakte edilen numunelerdeki bölgesel farklılıkların olduğu kanaatine varıldı.

Çalışmamızın kimyasal karakterizasyon kısmında ise propolisin sulu ekstraktlarının fenolik profilleri HPLC-DAD yöntemi kullanılarak belirlenip gösterilmiştir. HPLC-DAD analizi için kullandığımız standartları klorojenik asit, kafeik asit ve trans-sinamik asit olarak belirlememizin sebebi hem literatürde hem de bölümümüzde daha önceden gerçekleştirilen analizlerde sulu karma Türk propolisinin bileşiminde bu bileşenlerin bulunmuş olmasıdır. Bölümümüzde daha önce gerçekleştirilen karma Türk propolisinin sulu

ekstraktının analiz edildiği çalışmada çok az miktarda da olsa 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit de tespit edilmiştir (78). Bu standardın çalışmamızda kullanılmama sebebi ise birçok firma ile irtibata geçilmesine rağmen yurt dışından temin edilememiş olmasıdır.

HPLC ile birleştirilmiş DAD vasıtasıyla standartlarımızın maksimum absorbans gösterdiği ve 280 ve 320 nm olarak belirlediğimiz iki farklı dalga boylarında ölçümler alınmıştır. Kafeik asit, klorojenik asit ve trans-sinamik asit için kalibrasyon eğrileri, karşılık gelen standartların bilinen miktarlarının tekrarlı çalışmalarından elde edildi. Her bir standardın 10 µg/mL'lik konsantrasyonundaki ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak LOD, LOQ ve %BSS değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Tüm standartlarımızın %BSS değerlerinin %0.2'den düşük olması yöntemimizin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Analitin saptanabilir minimum konsantrasyonu olan LOD değerleri 0.009-0.046 µg/mL arasında bulunurken, miktar tayininin yapılabildiği en düşük analit konsantrasyonu olan LOQ değerleri 0.031-0.154 µg/mL arasında bulunmuştur. Bu değerler, analitik yöntemin propolis numunelerindeki biyoaktif bileşiklerin saptanmasına ve ölçülmesine izin verdiğini göstermektedir.

HPLC-DAD ile yaptığımız kalitatif ve kantitatif analizler sonucunda propolisin sulu ekstraktlarında klorojenik asit miktarı 3.29-123.04 µg/mL arasında bulunurken literatürde karma Türk propolisinde 10.20 µg/mL bulunduğu görülmüştür. Çalışmamızda kafeik asit miktarları 27.31-976.21 µg/mL arasında bulunurken; literatürde Litvanya propolisinin sulu ekstraktlarının kafeik asit miktarı 7.5 µg/mL ve karma Türk propolisinde 204.00 µg/mL değeri bildirilmiştir. Propolis örneklerindeki trans-sinamik asit miktarları ise 0.55-746.77 µg/mL arasında bulunurken karma Türk propolisinde 28.90 µg/mL bulunmuştur (78, 133, 134). Çalışmamızda propolis ekstraktlarımızın çoğunluğunun karma Türk propolisinde bulunan miktarlardan daha yüksek miktarlarda klorojenik, kafeik ve trans-sinamik asit içerdiği tespit edilmiştir.

Sulu propolis ekstraktlarının tümünde diğer bileşenlere oranla yüksek oranda kafeik asit bulundu. En yüksek kafeik asit miktarı sırasıyla Hakkari-Yüksekova, Ardahan-Çıldır ve Hakkari-Şemdinli de bulundu. En yüksek klorojenik asit miktarı sırasıyla Hatay-1, Hatay-Dört Yol ve Hatay-2'de bulundu. En yüksek trans-sinamik asit miktarı sırasıyla Hatay-1, Samsun-Bafra ve Hatay-2'de bulundu.

Elde edilen sonuçlara göre toplanılan bölgenin, propolisin nihai kimyasal bileşimi üzerinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Kimyasal bileşenler yönünden

incelendiğinde bölgeler arasında herhangi bir uyum görülmemiştir. Kafeik asit miktarı bakımından bölgeler karşılaştırıldığında en fazla kafeik asit bulunduran bölge Doğu Anadolu Bölgesi olduğu görülürken en fazla trans-sinamik ve klorojenik asit bulunduran bölgenin ise Akdeniz bölgesi olduğu görülmüştür. Analiz sonuçlarında bileşenlerin farklı konumlarda bu kadar çeşitlilik gösterme sebebinin arıların topladığı bu muhteşem arı ürününün farklı bitki kaynaklarından toplamaları olduğu düşünülmektedir.

Literatürde antioksidan aktivitenin fenolik bileşenlerden doğrudan etkilenebildiği belirtilmektedir (155). Trans-sinamik ve klorojenik asit miktarları ile toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeyici gücü değerleri arasında herhangi bir uyum görülmemiştir. Kafeik asit miktarı yüksek olan ekstraktlarda ise genellikle toplam polifenol içerik ile birlikte demir indirgeyici gücün de yüksek olduğu görülmüştür. Burdan yola çıkarak antioksidan potansiyeli ile kafeik asit miktarının orantılı olduğu söylenebilir. Literatürde propolisin içerisinde bulunan kafeik asidin yüksek radikal süpürücü etkisinin olduğu ve ayrıca iyi bilinen güçlü indirgeme maddesi olan askorbik asitten eşit veya daha iyi indirgeme maddesi olduğu belirtilmektedir (126). Sonuçlarımız da bunu destekler niteliktedir.

Literatürde çeşitli konumlardan alınan propolis örneklerinin hem kimyasal bileşenlerinde hem de antioksidan özelliklerinde farklılıklar olduğu ve bizim sonuçlarımızın da bunu desteklediği görülmektedir. Bu çalışma ile elde edilen en önemli sonuç farklı coğrafik bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin hem kimyasal bileşen yönünden hem de antioksidan özellik yönünden farklı olmasıdır.

Çalışmamız sayesinde sulu Türk propolisi içeriğinin literatüre kazandırılması ve dünyada çapında bilinen birçok önemli propolis arasında önemli bir yere gelmesi sağlanacaktır. Türkiye'nin çeşitli yörelerindeki propolislerin kimyasal içeriklerinin belirlenmesi sayesinde içerdiği bileşikler ile ilişkili olan biyolojik aktiviteler tespit edilip etki mekanizmalarının açıklanması daha kolay hale gelmesi sağlanabilecektir. Özellikle Doğu Anadolu ve bunun yanı sıra Karadeniz bölgesindeki propolis örneklerinin daha zengin içeriğe ve antioksidan potansiyele sahip olduğu belirlendiğinden çalışmalarda o yörelerdeki propolislerin kullanımına ağırlık verilmesi sağlanabilecek olup o yöredeki propolislerin üretimlerine ağırlık verilmesi yönünde ilgili kamu kurumları ve sivil toplum kuruluşlarına tavsiyelerde bulunulacaktır. Özellikle Türk propolisinin sulu ekstraktının insanların kullanımına uygun bir gıda takviyesi olarak daha fazla gündeme gelmesi sağlanabilecek ve

bu ekstraktla ilgili yapılacak olan çalışmalara dikkat çekilebilecektir. Son yıllarda propolisin çeşitli ürünlerinin dünya çapında kullanımı arttığından ülkemize de ithalat yoluyla hem ham propolis hem de ürünleri girebilmektedir. Bu alışma ile gerek iç piyasada rağbetinin artması gerekse dış piyasada birçok ülke propolisi arasında önemli bir yere gelmesi sağlanacaktır. Dolayısıyla bu çalışma ile Türk propolisinin Dünya pazarındaki değeri artacak ve bu da ülkemiz ekonomisi yönünde pozitif katkı sağlayabilecektir.



6. KAYNAKLAR

1. Osés SM, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño MA, López-Díaz TM, Sancho MT (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem* 196: 1215-1223.
2. Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Luna L, Lima B, López ML, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol* 49: 1970-1978.
3. Graikou K, Popova M, Gortzi O, Bankova V, Chinou I (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT-Food Sci Technol* 65: 261-267.
4. de la Cruz-Cervantes JA, Benavides-González F, Sánchez-Martínez JG, Vázquez-Sauceda MDLL, Ruiz-Urbe AJ (2018). Propolis in aquaculture: A review of its potential. *Rev Fish Sci Aquac* 26(3): 337-349.
5. Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, Barriga A, Silva X, de Las Heras B, Hortelano S, Delporte C (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *J Ethnopharmacol* 168: 37-44.
6. Alday E, Valencia D, Carreño AL, Picerno P, Piccinelli AL, Rastrelli L, Robles-Zepeda R, Hernandez J, Velazquez C (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact* 242: 35-44.
7. Wang K, Hu L, Jin X, Ma Q, Marcucci MC, Netto AA, Sawaya AC, Huang S, Ren W, Conlon MA, Topping DL, Hu F (2015). Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B". *J Funct Foods* 19: 464-478.
8. Bittencourt MLF, Ribeiro PR, Franco RLP, Hilhorst HWM, de Castro RD, Fernandez LG (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Res Int* 76: 449-457.
9. Kasote D, Ahmad A, Chen W, Combrinck S, Viljoen A (2015). HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. *Phytochem Lett* 11: 326-331.

10. Silva-Carvalho R, Miranda-Gonçalves V, Ferreira AM, Cardoso SM, Sobral A, Almeida-Aguiar C, Baltazar F (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in *in vitro* and *in vivo* models. *J Funct Foods* 11: 160-171.
11. Kardar MN, Zhang T, Coxon GD, Watson DG, Fearnley J, Seidel V (2014). Characterisation of triterpenes and new phenolic lipids in Cameroonian propolis. *Phytochemistry* 106: 156-163.
12. Gülçin İ, Bursal E, Şehitoğlu MH, Bilsel M, Gören AC (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 48: 2227-2238.
13. Zabaoui N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, Lobaccaro JA (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids* 207: 214-222.
14. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19: 78-101.
15. Luo C, Zou X, Li Y, Sun C, Jiang Y, Wu Z (2011). Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chem* 127: 314-320.
16. El-Guendouz S, Lyoussi B, Miguel MG. Insight on propolis from Mediterranean countries: Chemical composition, biological activities and application fields (2019). *Chem Biodivers* 16(7): e1900094.
17. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother* 98: 469-483.
18. Bankova V, Popova M, Trusheva B (2016). New emerging fields of application of propolis. *Maced J Chem Eng* 35(1): 1-11.
19. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. 2019: 1695-1703.
20. Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, da Cunha MG, Colón DF, de Alencar SM, Rosalen PL (2018). The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* 153: 49-55.
21. Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Bobiş O (2013). Important developments in romanian propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 159392.

22. El Ashry SH, Ahmad TA (2012). The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine* 31: 31-39.
23. Cuesta A, Rodríguez A, Esteban MA, Meseguer J (2005). In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 18(1): 71-80.
24. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araújo RP, Umsza-Guez MA, Barbosa JD, Portela RD, Machado BA (2020). Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric* 100(4): 1369-1382.
25. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19: 78-101.
26. Cao H, Ou J, Chen L, Zhang Y, Szkudelski T, Delmas D, Daglia M, Xiao J (2019). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human study and clinical trial. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59(20): 3371-3379.
27. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* 8(9): 552.
28. Tressera-Rimbau A, Arranz S, Eder M, Vallverdú-Queralt A (2017). Dietary polyphenols in the prevention of stroke. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 7467962.
29. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients* 8(8): 515.
30. Cheng YC, Sheen JM, Hu WL, Hung YC (2017). Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 8526438.
31. Hernandez Zarate MS, Abraham Juarez MDR, Ceron Garcia A, Ozuna Lopez C, Gutierrez Chavez AJ, Segoviano Garfias JDJN, Avila Ramos F (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci Technol* 38: 210-215.
32. Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, Zandi K (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch Virol* 162(9): 2539-2551.
33. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids (2019). *Food Chem* 299: 125124.

34. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5: (1-15).
35. Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparri M, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP, Zhang J, Bravo Lamas L, Martínez Flórez S, Agudo Toyos P, Quiles JL, Giampieri F, Battino M (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* 23(9): 2322.
36. Çakıroğlu TN (2017). Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının HPLC ve GC-MS ile karakterizasyonu. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
37. Stalikas CD (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 30: 3268-95.
38. Bojić M, Maleš Ž, Antolić A, Babić I, Tomićić M (2019). Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta Pharm* 69(4): 483-495.
39. Brouillard R, Cheminat A (1988). Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res* 280: 93-106.
40. Öztürk F (2012). Fındıktaki fenolik bileşiklerin spektrofotometrik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak tayini. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
41. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients* 12(2): 457.
42. Teng H, Chen L (2019). Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59(13): 2040-2051.
43. Özcan FÖ, Aldemir O, Karabulut B (2020). Flavones (Apigenin, Luteolin, Chrysin) and their importance for health. *Mellifera* 20(1): 16-27.
44. Khan MK, Zill-E-Huma, Dangles O (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal* 33: 85-104.
45. Verp D (2016). Bazı tıbbi bitkilerin antioksidan aktivitelerinin tayini ve bazı flavonoid türlerinin HPLC ile belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, Kastamonu.
46. Çetinkaya S (2020). Kamferol, kersetin ve mirisetinin akut lenfoblastik lösemi (CRL2264) hücrelerinde toksikolojik değerlendirilmesi. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri

Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.

47. Cushnie TP, Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 26(5): 343-56.
48. Karakaya S, El SN (1997). Flavonoidler ve sağlık. *J Nutr and Diet* 26(2): 54-60.
49. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82(4): 513-23.
50. Tekin Yalçın G (2013). Flavonoidlerin kanser hücrelerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
51. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 7074209.
52. Kahraman 2002: Kahraman A, Serteser M, Koken T (2002). Flavonoids. *The Medical Journal of Kocatepe* 3: 01-08.
53. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep* 10(1): 2611.
54. Călinoiu LF, Vodnar DC (2018). Whole Grains and Phenolic Acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients* 10(11): 1615.
55. Kumar N, Goel N (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep* 24: e00370.
56. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM (2016). Polyphenols and glycemic control. *Nutrients* 8(1): 17.
57. Rashmi HB, Negi PS (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Res Int* 136: 109298.
58. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. Phenol-based antioxidants an the in vitro methods used for their assesment. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 11(2): 148-173.
59. Indy Tamayose C, Dos Santos EA, Roque N, Costa-Lotufo LV, Pena Ferreira MJ (2019). Caffeoylquinic acids: Separation method, antiradical properties and cytotoxicity. *Chem Biodivers* 16(7): e1900093.
60. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z (2018).

Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* 97: 67-74.

61. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA (2017). Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules* 22(3): 358.
62. Liu D, Liu X, Zhang X (2019). Preparative isolation of caffeoylquinic acid isomers from Kuding tea by salt-containing aqueous two-phase extraction and purification by high-speed countercurrent chromatography. *Sep Sci plus* 2: 170:177.
63. Liang N, Kitts DD (2015). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients* 8(1): 16.
64. Bankova V (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100(1-2): 114-7.
65. Ramos AFN, Miranda JL (2007). Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. *J venom anim toxins incl trop dis* 13(4): 697-710.
66. Serra Bonvehí J, Ventura Coll F (2000). Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z Naturforsch C J Biosci* 55: 778-784.
67. Sforcin JM (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother Res* 30: 894-905.
68. Pellati F, Orlandini G, Pinetti D, Benvenuti S (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *J Pharm Biomed Anal* 55(5): 934-48.
69. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 15: 561-71.
70. Kasote D, Suleman T, Chen W, Sandasi M, Viljoen A, van Vuuren S (2014). Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. *Biochem Syst Ecol* 55: 156-163.
71. Umsza-Guez MA, Silva-Beltrán NP, Machado BAS, Balderrama-Carmona AP (2021). Herbicide determination in Brazilian propolis using high pressure liquid chromatography. *Int J Environ Health Re* 31(5): 507-517.
72. Kumazawa S, Murase M, Momose N, Fukumoto S (2014). Analysis of antioxidant prenylflavonoids in different parts of *Macaranga tanarius*, the plant origin of Okinawan propolis. *Asian Pac J Trop Med* 7(1): 16-20.

73. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133(2): 253-60.
74. Volpi N, Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42(3): 354-61.
75. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*. 2011 Nov;63(11): 1378-86.
76. Jug M, Koncic MZ, Kosalec I (2014). Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT-Food Science and Technology* 57: 530-537.
77. Vargas-Sánchez RD, Mendoza-Wilson AM, Torrescano-Urrutia GR, Sánchez-Escalante A (2015). Antiradical potential of phenolic compounds fingerprints of propolis extracts: DFT approach. *Comput Theor Chem* 1066: 7-13.
78. Bozkuş TN, Değer O, Yaşar A (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 44(1-2): 77-86.
79. Değer O (2019). Do propolis extracts make changes on cell cycle for normal human cells? 5th International Eurasian Congress on 'Natural Nutrition, Healthy Life & Sport', Ankara, 2-6 Ekim 2019.
80. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci* 80: 370–377.
81. Matsui T, Ebuchi S, Fujise T, Abesundara KJM, Doi S, Yamada H, Matsumoto K (2004). Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-Tri-*O*-caffeoylquinic acid. *Biol Pharm Bull* 27(11): 1797-1803.
82. Mishima S, Inoh Y, Narita Y, Ohta S, Sakamoto T, Araki Y, Suzuki K, Akao Y, Nozawa Y (2005). Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorg Med Chem* 13: 5814–5818.
83. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 80: 29–33.

84. Liu Q, Wu H, Liu Z, Xiao R, Wang T, Hu Y, Ding Y, Yu R (2018). Chemometrics-assisted HPLC-DAD as a rapid and interference-free strategy for simultaneous determination of 17 polyphenols in raw propolis. *Anal Methods* 10: 5577-5588.
85. Chew YL, Khor MA, Lim YY (2021). Choices of chromatographic methods as stability indicating assays for pharmaceutical products: A review. *Heliyon* 7(3): e06553.
86. Pyrzynska K, Biesaga B (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends Analyt Chem* 28: 7.
87. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1259510.
88. Asgharpour F, Moghadamnia AA, Zabihi E, Kazemi S, Ebrahimzadeh Namvar A, Gholinia H, Motalebnejad M, Nouri HR (2019). Iranian propolis efficiently inhibits growth of oral streptococci and cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med* 19(1): 266.
89. Almuhayawi MS (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci* 27(11): 3079-3086.
90. Braakhuis A (2019). Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*. 11(11): 2705.
91. Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem* 133: 379-402.
92. Sharma GN, Gupta G, Sharma P (2018). A Comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 28(2): 139-154.
93. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38(7): 592-607.
94. Ifeanyi OE (2018). A review on free radicals and antioxidants. *Int J CurrRes Med Sci* 4(2): 123-133.
95. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 200-6.
96. Lotito SB, Frei B (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic Biol Med* 36(2): 201-11.

97. Horzic D, Komes D, Belscak A, Ganic KK, Ivekovic D, Karlovic D (2009): The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem* 115: 441-448.
98. Lin J-Y, Tang C-Y (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem* 101: 140-147.
99. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
100. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3): 178-182.
101. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol* 46: 3482-3485.
102. Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chem* 103: 505-511.
103. Villiers A, Lynen F, Crouch A, Sandra P (2004). Development of a solid-phase extraction procedure for simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia* 59: 403-409.
104. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73: 7-20.
105. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41(4): 1220-34.
106. Medić-Sarić M, Rastija V, Bojić M (2011). Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *J AOAC Int* 94(1): 32-42.
107. El-Aidy WK, Ebeid AA, Sallam Ael-R, Muhammad IE, Abbas AT, Kamal MA, Sohrab SS (2015). Evaluation of propolis, honey, and royal jelly in amelioration of peripheral blood leukocytes and lung inflammation in mouse conalbumin-induced asthma model. *Saudi J Biol Sci* 22(6): 780-788.

108. Luis-Villaroya A, Espina L, García-Gonzalo D, Bayarri S, Pérez C, Pagán R (2015). Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *Int J Food Microbiol* 205: 90-97.
109. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
110. El-Sharkawy EE, Kames AO, Sayed SM, Nisr NA, Wahba NM, Elsherif WM, Nafady AM, Abdel-Hafeez MM, Aamer AA (2014). The ameliorative effect of propolis against methoxychlor induced ovarian toxicity in rat. *Exp Toxicol Pathol* 66(9-10): 415-21.
111. Jug M, Koncic MZ, Kosalec I (2014). Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT-Food Sci Technol* 57: 530-537.
112. Xie XL, Gi M, Fujioka M, Doi K, Yamano S, Tachibana H, Fang H, Kakehashi A, Wanibuchi H (2015). Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. *Food Chem Toxicol* 83: 193-200.
113. Xu Y, Luo L, Chen B, Fu Y (2009). Recent development of chemical components in propolis. *Front Biol China* 4: 385-391.
114. Midorikawa K, Banskota AH, Tezuka Y, Nagaoka T, Matsushige K, Message D, Huertas AA, Kadota S (2001). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochem Anal* 12(6): 366-73.
115. Chen J, Long Y, Han M, Wang T, Chen Q, Wang R (2008). Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 90(3): 441-446.
116. Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 100(3): 276-283.
117. Mello BCBS, Hubinger MD (2012). Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *Int J Food Sci Technol* 47(12): 2510-1518.

118. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med* 9: 4.
119. Laskar RA, Sk İ, Roy N, Begüm NA (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem* 122: 233-237.
120. Yen CH, Chiu HF, Wu CH, Lu YY, Han YC, Shen YC, Venkatakrisnan K, Wang CK (2017). Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by in vitro simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Sci Technol* 84: 281-289.
121. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol* 48(12): 3418-3423.
122. Soltani EK, Cerezuela R, Charef N, Mezaache-Aichour S, Esteban MA, Zerroug MM (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 62: 57-67.
123. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines (Basel)* 5(1): 2.
124. Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* 50(5): 1790-1795.
125. Guo X, Chen B, Luo L, Zhang X, Dai X, Gong S (2011). Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* 59(23): 12610-12616.
126. Lagouri V, Prasianaki D, Krysta F (2014). Antioxidant properties and phenolic composition of Greek propolis extracts. *Int J Food Prop* 17: 511-522.
127. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F (2018). Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. *Iran Endod J* 13(3): 285-292.
128. Yang H, Huang Z, Yilei Huang, Dong W, Pan Z, Wang L (2015). Characterization of Chinese crude propolis by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrol* 113: 158-164.
129. Sun Y-M, Wu H-L, Wang J-Y, Liu Z, Zhai M, Yu R-Q (2014). Simultaneous determination of eight flavonoids in propolis using chemometrics-assisted high

performance liquid chromatography-diode array detection. *J Chromatogr B* 962: 59-67.

130. Eyüpoğlu OE (2017). HPLC ile proteinlerin ayrılmasında dedeksiyon amaçlı yeni on-line yöntemin geliştirilmesi ve gıda ve ilaç analizinde uygulanması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
131. Mishima S, Narita Y, Chikamatsu S, Inoh Y, Ohta S, Yoshida C, Araki Y, Akao Y, Suzuki K-M, Nozawa Y (2005). Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *J Ethnopharmacol* 99: 5-11.
132. Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T (2005). Antihypertensive effects of Brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 28(10): 1909-1914.
133. Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barauskaite K, Kubilius R, Kasparaviciene G, Savickas A (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern Med* 15: 156.
134. Kubiliene L, Jekabsone A, Zilius M, Trumbeckaite S, Simanaviciute D, Gerbutaviciene R, Majiene D (2018). Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. *BMC Complement Altern Med* 18(1): 165.
135. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 595393.
136. Keskin N, Hazır S, Baser HC, Kürkcüoğlu M (2001). Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch C* 56: 1112-1115.
137. Tartik M, Darendelioglu E, Aykutoglu G, Baydas G (2016). Turkish propolis suppresses MCF-7 cell death induced by homocysteine. *Biomed Pharmacother* 82: 704-712.
138. Yildirim Z, Hacıevliyagil S, Kutlu NO, Aydın NE, Kurkuoglu M, Iraz M, Durmaz R (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacol Res* 49: 287-292.

139. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 12: 221-228.
140. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Salih B (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem* 78: 213-217.
141. Silici S, Kutluca S (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 99: 69-73.
142. Silici S, Ünlü M, Vardar-Ünlü G (2007). Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1797-1803.
143. Duran N, Muz M, Culha G, Duran G, Ozer B (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res* 108: 95-105.
144. Katircioğlu H, Mercan N (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *Afr J of Biotechnol* 5: 1151-1153.
145. Eroğlu HE, Özkul Y, Tatlısen A, Silici S (2008). Anticarcinogenic and antimetabolic effects of Turkish propolis and mitomycin-C on tissue cultures of bladder cancer. *Nat Prod Res* 22: 1070- 1066.
146. Aliyazıcıoğlu R, Sahin H, Ertürk Ö, Ulusoy E, Kolaylı S (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *Int Journal of Food Prop* 16: 277-278.
147. Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalımsı S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomed Pharmacother* 79: 44- 51.
148. Çelemlı ÖG, Hatjina F, Charistos L, Schiesse A, Özkırım A (2013). More Insight into the Chemical Composition of Greek Propolis; Differences and Similarities with Turkish Propolis. *Z Naturforsch C J Biosci* 68: 429-438.
149. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195.

150. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Popova S, Kujumgiev A (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. *Mellifera* 1: 57-59.
151. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I, Kujumgiev A (2001). Propolis from the Mediterranean region: Chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C J Biosci* 55: 790-793.
152. Sorkun K, Süer B, Salih B (2001). Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch C J Biosci* 56: 666-668.
153. Gençay Ö, Salih B (2009). GC-MS analysis of propolis samples from 17 different regions of Turkey, four different regions of Brazil and one from Japan. *Mellifera* 9(17): 19-28.
154. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
155. Mercan N, Kıvrak İ, Duru ME, Katırcıoğlu H, Gülcan S, Malcı S, Acar G, Salih B (2006). Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. *Ann Microbiol* 56(4): 373-378.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : AKBULUT ÇAKIROĞLU, Kübra
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	KTÜ Tıbbi Biyokimya ABD	-
Yüksek Lisans	KTÜ Tıbbi Biyokimya ABD	2014
Lisans	KTÜ Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyokimya AbD	2012-2020

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Ozer Yaman S, **Akbulut K**, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. Nutr Cancer 68(1): 165-172.
2. Turan I, Demir S, Kilinc K, Aliyazicioglu Y, Alver A, Misir S, Ozer Yaman S, **Akbulut K**, Mentese A, Deger O (2017). *Morus rubra* extract induces G₁ cell cycle arrest and apoptosis in human lung and prostate cancer cells. Indian J Pharm Educ Res 51(1): 51-58.

3. Turan I, Demir S, Kilinc K, Arslan Burnaz N, Ozer Yaman S, **Akbulut K**, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2017). Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. Saudi Pharma 25(2): 241-248.
4. Turan I, Demir S, Aliyazicioglu R, Kilinc K, Ozer Yaman S, **Akbulut Cakiroglu K**, Kanbolat Ş, Ayazoğlu Demir E, Menteşe A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2019). Dimethyl Sulfoxide Extract of *Dianthus carmelitarum* Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. Nutr Cancer 71(7): 1181-1188.
5. Kulaksız D, Kart C, Güven S, **Akbulut K**, Çobanoğlu Ü, Değer O (2019). Comparison of the effect of isotretinoin and alitretinoin on endometriotic implants and serum vascular endothelial growth factor level: an experimental study. Gynecol endocrinol 35(4): 301-304.
6. Kerimoğlu G, Bakim ME, **Akbulut Cakiroglu K** (2017). İntraartiküler propolis ekstraktının erişkin sıçanlarda deneysel osteoartrit tedavisinde etkinliği. Dicle Med J 44: 325-332.

BİLDİRİLER

1. Çiftçibaş ı AG, Camlar S, **Akbulut Cakiroglu K**, Bahat Özdoğan E (2019). Hypermanganesemia ay contribute neurologic involvement in Hemolytic Uremic Syndrome. 18th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Venice, Italy, 17-21 Ekim 2019, 121.
2. Korkmaz K, Değer O, Yiğit E, **Akbulut Cakiroglu K**, Demir S (2019). Investigation of protective effect of water extract of Turkish pollen against oxidative damage induced by t-BHP. 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition Healthy Life & Sport, Ankara Türkiye, 2-6 Ekim 2019, 1767-1774.
3. Kartal B, Değer O, **Akbulut Cakiroglu K**, Yiğit E, Korkmaz K (2019). Investigation of the solubility of Turkish propolis in various types of vinegar. 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition Healthy Life & Sport, Ankara Türkiye, 2-6 Ekim 2019, 1841-1774.
4. Aygün P, Değer O, **Akbulut Cakiroglu K**, Yiğit E, Korkmaz K (2019). Investigation of protective effects of ethanolic extract of Turkish propolis against oxidative damage induced by t-BHP. 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition Healthy Life & Sport, Ankara Türkiye, 2-6 Ekim 2019, 1854.

5. Değer O, Yiğit E, Aygün P, Ashgari A, **Akbulut Çakıroğlu K**, Demir S (2018). Protective effects of bee products on oxidative damage for human red blood cells. International Eurasian Congress on 'Natural Nutrition and Healthy Life' 2018, Ankara, Türkiye, 12-15 Temmuz 2018, 1020-1025.
6. Değer Kulaksız B, Değer O, İmamoğlu M, **Akbulut K**, Demir S, Sönmez M, Bedir A (2016). *In vitro* cytotoxic effect of water extracts of Turkish propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cell line. 41st FEBS Congress, Aydın, Türkiye, 3-8 Eylül 2016, 88.
7. Çakıroğlu TN, Değer O, Yaşar A, **Akbulut K** (2016). Identification of water extract of propolis components by using different columns in Gas Chromatography-Mass Spectrometry. 41st FEBS Congress, Aydın, Türkiye, 3-8 Eylül 2016, 390.
8. Çerçiler S, Değer O, **Akbulut K**, Demir S, Değer Kulaksız B, Çakıroğlu TN (2016). Effect of water extract of Turkish propolis on mitochondrial membrane potential in human laryngeal epidermoid carcinoma cell lines. 41st FEBS Congress, Aydın, Türkiye, 3-8 Eylül 2016, 252.
9. Turan I, Demir S, Kilinc K, Aliyazicioglu Y, Alver A, Misir S, Ozer Yaman S, **Akbulut K**, Deger O (2016). Selective cytotoxic effect of *Morus rubra* extract in human lung cancer cells through enhancing apoptosis and cell cycle arrest. 41st FEBS Congress, Aydın, Türkiye, 3-8 Eylül 2016, 330.
10. Turan I, Demir S, Kilinc K, Aliyazicioglu Y, Alver A, Misir S, Ozer Yaman S, **Akbulut K**, Deger O (2016). *Morus rubra* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in human prostate cancer cells. 1st International Cell Death Research Congress, İzmir, Türkiye, 4-07 Mayıs 2016, 125.
11. Değer O, Değer Kulaksız B, Demir S, **Akbulut Çakıroğlu K** (2017). Water extract of Turkish propolis induces human laryngeal epidermoid carcinoma cell arrest in S phase. 45th Apimondia Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Eylül-04 Ekim 2017, 534.
12. Çakıroğlu TN, Değer O, Yaşar A, **Akbulut Cakiroglu K** (2017). Characterization of water extract of Turkish propolis by HPLC and GC-MS methods. 45th Apimondia Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Eylül-04 Ekim 2017, 166.
13. Yiğit E, Değer O, Demir S, **Akbulut Cakiroglu K**, Korkmaz K (2017). Investigation of protective effect of water extract of Turkish propolis against oxidative damage induced by Tert-butyl Hydroperoxide on the Erythrocyte Cells. 45th Apimondia Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Eylül-04 Ekim 2017, 527.

14. Demir S, Aliyazicioglu Y, **Akbulut Cakiroglu K**, Ozer Yaman S, Turan İ, Mentese A, Kulaksiz D, Deger O (2017). Ethanolic extract of Turkish propolis induces apoptotic cell death in human cervix cancer (HeLa) cells. 45th Apimondia Congress, İstanbul, Türkiye, 29 Eylül-04 Ekim 2017, 538.
15. Turan İ, Demir S, Ozer Yaman S, **Akbulut Cakiroglu K**, Aliyazicioglu R, Arslan A, Aliyazicioglu Y (2017). Dianthus carmelitarum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, Konya, Türkiye, 10-12 Mayıs 2017, 880.
16. **Akbulut K**, Değer O, Demir S, Kulaksız B, Çakıroğlu TN (2016). Effect of water extract of Turkish propolis on mitochondrial membrane potential in human laryngeal epidermoid carcinoma cell lines. 41st FEBS Congress, Aydın, Türkiye, 3-8 Eylül 2016, 252.
17. Baki ME, Özcan M, Kerimoğlu G, Önder M, **Akbulut Cakiroglu K** (2016). Eklem içi uygulanan propolisin deneysel osteoartrit modeli üzerindeki etkisi. TOTDER 6. Ortopedi ve Travmatoloji İstanbul Buluşması, İstanbul, Türkiye, 12-15 Mayıs 2016, 72-74.
18. Demir S, Turan İ, Kılınç K, Aliyazicioglu Y, Alver A, Mısır S, Özer Yaman S, **Akbulut K**, Değer O (2016). Morus rubra extract induces apoptosis and inhibits proliferation in human prostate cancer cells. 1st International Cell Death Research Congress, İzmir, Türkiye, 4-07 Mayıs 2016, 125.
19. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan İ, Mısır S, Mentese A, Özer Yaman S, **Akbulut K**, Kılınç K, Değer O (2015). Türk propolisinin akciğer kanseri (A549) hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 2015, 159.
20. Çakıroğlu TN, Değer O, Yaşar A, **Akbulut K** (2015). Identification of components of Erzurum propolis ethanol extract by using different columns in GCMS. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 2015, 135.
21. **Akbulut K**, Taghiabad JG, Değer O, Demir S, Şentürk A, Çakıroğlu TN (2015). Effect of water extract of Turkish propolis on Intracellular SOD and CAT levels in Hep-2 Cell lines. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 2015, 331.
22. Malkoç M, Altay DU, Şen T, Özer Yaman S, Şahin E, Doğramacı Ş, **Akbulut K**, Erdem M, Alver A (2015). Paklitaksel ile tedavi edilmiş meme kanserli sıçanlarda arı

- sütünün CA15-3 seviyesine etkisi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 2015, 280.
23. Değer O, **Akbulut K**, Demir S (2014). Effect of ethanolic and water extracts of propolis on fibroblast cells. 5th Apimedita & 4th Apiquality Forum of Apimondia, Erzurum, Türkiye, 1-05 Eylül 2014, 31.
 24. **Akbulut K**, Değer Kulaksız B, Değer O, İmamoğlu M, Demir S, Çakıroğlu TN, Ayar A (2014). Effect of water extract of Turkish propolis intracellular calcium and hydrogen peroxide levels in human laryngeal epidemroid carcinoma cell lines (Hep-1). IFCC WorldLab, İstanbul, Türkiye, 22-26 Haziran 2014, 1395.
 25. Çakıroğlu TN, Değer O, **Akbulut K**, Demir S (2014). Effect of propolis extracts on cathepsin secretion from KML-62 cell lines. IFCC WorldLab, İstanbul, Türkiye, 22-26 Haziran 2014, 1413.
 26. Çakıroğlu TN, Değer O, **Akbulut K** (2013). Polen ve Propolisin Polimorfonükleer lökositlerde hidroksil radikali temizleme aktivitesi üzerine etkileri. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, Türkiye, 3-06 Eylül 2013, 165.
 27. Çakıroğlu TN, Değer O, Karakaş S, **Akbulut K** (2013). Türk propolisinin metanollü ekstraktının antioksidan aktivitesi. Sağlıkta İnovasyon-Üniversiteden Sanayiye, İzmir, Türkiye, 16-17 Mayıs 2013, 90.