



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN SULU VE ETANOLLÜ
EKSTRAKTININ HPLC VE GC-MS İLE
KARAKTERİZASYONU**

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON - 2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN SULU VE ETANOLLÜ
EKSTRAKTININ HPLC VE GC-MS İLE
KARAKTERİZASYONU**

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

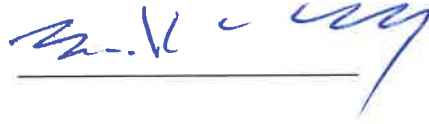
TRABZON - 2017

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

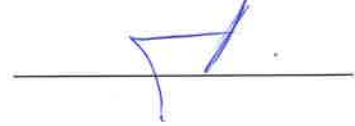
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



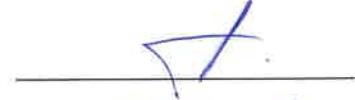
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU'nun hazırladığı "Türk Propolisinin Sulu ve Etanolü Ekstraktının HPLC ve GC-MS ile Karakterizasyonu" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER



Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



Prof. Dr. Engin YENİLMEZ



Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN



Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ



Tarih:/..../....

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak 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 kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24/01/2017

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

İthaf

Bu doktora tezimi, her zaman ve her koşulda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli, canım aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca üzerimde büyük emeği olan, bilimsel, akademik ve insani açıdan her daim örnek aldığım, tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle daima yanımda ve yol gösterici olarak bulunan, danışman hocam sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Tez çalışmam süresince özellikle kromatografik analizlerin gerçekleştirilmesinde çok büyük katkısı olan, bilimsel ve akademik anlamda her türlü imkan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ahmet YAŞAR ve KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca her bakımdan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocalarım; emekli öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve aramızdan ansızın ayrılan, her zaman saygı ve sevgiyle andığım değerli hocam Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e,

Çalışmamda bana yardımcı olan KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri Nevin ÇOLAK ve Sercan YILDIRIM'a,

Gerek iş gerekse eğitim-öğretim hayatım boyunca pek çok anı biriktirdiğim, desteklerini hiç eksik etmeyen, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli çalışma arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın tüm doktora ve yüksek lisans öğrencilerine,

Bu tez çalışmasını gerçekleştirirken maddi ve manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim, daima yanımda olduklarını bildiğim aileme ve tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Arş. Gör. Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

Bu tez çalışması, "Türk Propolisinin Sulu ve Etanollü Ekstraktının HPLC ve GC-MS ile Karakterizasyonu" başlıklı, 113S805 kodlu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Propolis	7
4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	8
4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	8
4.1.3. Polifenoller (Fenolik Bileşikler)	10
4.1.3.1. Flavonoidler	12
4.1.3.2. Fenolik Asitler	21
4.1.4. Kafeoilkuinik Asitler	23
4.1.5. Propolisin Bitkisel Kaynağı	25
4.1.6. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu	28
4.1.7. Propolisin Analizinde HPLC-DAD ve GC-MS Kullanımının Önemi	30
4.1.8. Propolisin Biyolojik Aktivitesi	31
4.1.9. Propolisin Kullanım Şekilleri ve Kullanım Alanları	32
5. GEREÇ ve YÖNTEM	34
5.1. Gereçler	34
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	34
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	34
5.2. Yöntemler	36
5.2.1. Propolisin Kaynağı	36

5.2.2. Türk Propolisinin Sulu ve Etanollü Ekstraktlarının Hazırlanması	36
5.2.3. HPLC-DAD Analizleri	36
5.2.3.1. Standartların Hazırlanması	36
5.2.3.2. HPLC-DAD ile Analiz Koşullarının Belirlenmesi	37
5.2.3.3. Standartların, Sulu ve Etanollü Türk Propolisi Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi	39
5.2.4. GC-MS Analizleri	39
5.2.4.1. Türevlendirme	39
5.2.4.2. Rtx-1 ve Rtx-5ms Kapiller Kolon ile GC-MS Analizi	40
6. BULGULAR	41
6.1. HPLC-DAD Analizleri	41
6.1.1. Standartların HPLC-DAD ile Analizi	41
6.1.2. Sulu Türk Propolisi Ekstraktının HPLC-DAD ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi	44
6.1.3. Etanollü Türk Propolisi Ekstraktının HPLC-DAD ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi	46
6.2. GC-MS Analizleri	48
6.2.1. Sulu Türk Propolisi Ekstraktının GC-MS ile Analizi	48
6.2.2. Etanollü Türk Propolisi Ekstraktının GC-MS ile Analizi	51
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
8. KAYNAKLAR	70
9. EKLER	91
9.1. Polifenol ve Kafeoilkuinik Asit Standartlarının Kalibrasyon Grafikleri	91
10. ÖZGEÇMİŞ	100

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	9
Tablo 2. En yaygın propolis türleri: Bitki kaynağı, coğrafik kökeni ve başlıca bileşenler	27
Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri	34
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler	34
Tablo 5. Çalışma için belirlenen gradient elüsyon programı	38
Tablo 6. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC-DAD ile maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları	41
Tablo 7. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının kalibrasyon grafiklerinden elde edilen alıkonma zamanları, regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları, % BSS, LOD ve LOQ değerleri	43
Tablo 8. Sulu Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol ve kafeoilkuinik asit bileşikleri ve miktarları	46
Tablo 9. Etanollü Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol bileşikleri ve miktarları	48
Tablo 10. Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler	49
Tablo 11. Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler	50
Tablo 12. Etanollü Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler	52
Tablo 13. Etanollü Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Rutin, ferulik asit, apigenin, luteolin, kuersetin ve kafeik asitin moleküler yapıları	11
Şekil 2. Flavonoidlerin temel yapısı	12
Şekil 3. Flavonoidlerin temel moleküler yapıları	14
Şekil 4. Kuersetin, mirisetin, rutin, fisetin ve kaempferolün moleküler yapıları	15
Şekil 5. Apigenin, krisin ve luteolinin moleküler yapıları	16
Şekil 6. Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin moleküler yapıları	17
Şekil 7. Kateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın moleküler yapıları	18
Şekil 8. Genistein ve daidzeinin moleküler yapıları	18
Şekil 9. Siyanidin, malvidin, apigenidin, delfinidin moleküler yapıları	19
Şekil 10. Fenolik asitlerin yapısı ve aradaki çeşitliliği sağlayan üç yapı	22
Şekil 11. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu	23
Şekil 12. Kafeoilkuinik asitlerin moleküler yapısı	24
Şekil 13. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC ile belirlenen pikleri	42
Şekil 14. Sulu Türk propolisi ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	45
Şekil 15. Etanollü Türk propolisi ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	47
Şekil 16. Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı	48
Şekil 17. Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı	50
Şekil 18. Etanollü Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı	52

Şekil 19. Etanollü Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı

53



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

BSS	Bağıl standart sapma
BSTFA	Bis-trimetilsilil Trifloroasetamid
CAT	Katalaz
CE	Kapiller Elektroforez
DAD	Diyod Array Dedektör
DMSO	Dimetil sülfoksit
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HPLC-DAD	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diyod Array Dedektör
LOD	Tayin Sınırı
LOQ	Ölçüm Sınırı
NAC	N-Asetil sistein
NIR	Yakın Kızılötesi Spektroskopi
nm	Nanometre
PDA	Fotodiyod Array Dedektör
RP-HPLC	Ters Faz-Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
SOD	Süperoksit Dismutaz
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TMCS	Trimetilklorosilan
UV	Ultraviyole
UV/Vis	Ultraviyole/Görünür

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
g	Gram
k	Kilo
m	Mili
M	Molar
n	Nano

Formüller

-OH	Hidroksil grubu
$(\text{H}_2\text{O}_2)^{\cdot}$	Hidrojen peroksit radikali
$(\text{O}_2^{\cdot})^-$	Süperoksit anyon radikali
$(\text{HO}^{\cdot})^-$	Hidroksil radikali
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Ca	Kalsiyum
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Fe	Demir
I	İyot
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Na	Sodyum
Zn	Çinko

1. ÖZET

Türk Propolisinin Sulu ve Etanollü Ekstraktının HPLC ve GC-MS ile Karakterizasyonu

Propolis, bal arıları tarafından çeşitli bitki kaynaklarından toplanan yapışkan, reçineli bir maddedir. Propolisin etanollü ekstraktı reçineden arındırılmış polifenolik bileşenlerce zengin propolis ekstraktı elde etmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Propolisin sulu ekstraktı ve kafeoilkuinik asitleri içeren başlıca bileşenleri çok büyük antioksidan aktiviteye ve bazı enzimlere karşı yüksek inhibitör/aktivatör etkiye sahiptir. Propolisin tüm bileşenlerinin karakterizasyonu hem kalitatif hem de kantitatif kimyasal analizini kapsamaktadır. Özellikle HPLC ve GC-MS gibi kromatografik teknikler her bir polifenolik bileşiğin profilini ve tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan ve günümüzde önemi giderek daha fazla anlaşılmaya başlanan Türk propolisinin sulu ekstraktı ve etanollü ekstraktında HPLC-DAD ve GC-MS aracılığıyla içeriğinde bulunan bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. HPLC-DAD ile yapılan analizlerinde Türk propolisinin sulu ekstraktının fazla miktarda kafeik asitin (204.00 µg/mL) yanısıra trans-sinamik, klorojenik ve kafeoilkuinik asitleri içerdiği, etanollü ekstraktın ise çok yüksek miktarda krisin (641.33 µg/mL), kafeik asit fenetil ester (630.67 µg/mL), pinosembrin (572.67 µg/mL), galangin (534.11 µg/mL), naringenin (372.39 µg/mL) ve aynı zamanda kaempferol, trans-sinamik asit, kafeik asit, mirisetin, kuersetin gibi diğer flavonoid ve fenolik asitleri içerdiği belirlenmiştir. Rtx-1 ve Rtx-5ms olmak üzere farklı iki kolon kullanılarak yapılan GC-MS analizlerinde ise Rtx-5ms kolon ile sulu propolis ekstraktında çok daha fazla bileşen tespit edilmiştir. Rtx-5ms kolon ile yapılan analizde sulu propolis ekstraktının kuinik asit ve ferulik asit içerdiği, Rtx-1 kolon kullanılarak yapılan analizde ise etanollü propolis ekstraktının kafeik asit bulundurduğu belirlenmiştir. Bu analizler neticesinde her iki kolon ile belirlenen sulu ve etanollü propolis ekstraktlarının şekerler bakımından çok daha zengin içeriğe sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Flavonoidler, GCMS, HPLC, Kafeoilkuinik asit, Polifenoller, Propolis

2. ABSTRACT

Characterization of Water and Ethanolic Extracts of Turkish Propolis by HPLC and GC-MS

Propolis is an adhesive, resinous substance collected by honey bees from various plant sources. Ethanolic extract of propolis is widely used for obtaining resin-free concentrated propolis extracts. Water extract of propolis and its components containing caffeoylquinic acids have a strong antioxidant activity and inhibitor/activator effects on some enzymes. Characterization of all components of propolis involves qualitative and quantitative chemical analysis. Chromatographic techniques, especially HPLC and GC-MS provide identification and determination of profiling of each polyphenolic compounds. The aim of this study is qualitative and quantitative determination of contents of Turkish propolis, a food supplement used by people, collected from various regions of Turkey using HPLC-DAD and GC-MS in water extract containing caffeoylquinic acids that is responsible of its antioxidant activity, and also ethanolic extract. In HPLC-DAD analyses, it was determined that water extract of Turkish propolis contains phenolic acids such as caffeic acid (204.00 µg/mL), trans-cinnamic, chlorogenic, and caffeoylquinic acids; whereas, the alcoholic extract of Turkish propolis contains chrysin (641.33 µg/mL), caffeic acid phenethyl ester (630.67 µg/mL), pinocembrin (572.67 µg/mL), galangin (534.11 µg/mL), naringenin (372.39 µg/mL), and also kaempferol, trans-cinnamic acid, caffeic acid, myricetin and quercetin. GC-MS analyses done with Rtx-1 and Rtx-5ms columns showed that more compounds have been detected by Rtx-5ms column in water extract of propolis. It was determined that water extract of propolis contains quinic acid and ferrulic acid by Rtx-5ms column, whereas ethanol extract of propolis contains caffeic acid by Rtx-1 column. Various sugar derivatives were detected by both columns in water and alcoholic extracts of Turkish propolis.

Key Words: Caffeoylquinic acid, Flavonoids, GCMS, HPLC, Polyphenols, Propolis

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Doğal ürünler hastalıkların tedavisi amacıyla ilaçların geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (1). Dolayısıyla birçok ilaç binlerce yıldır insanlar tarafından kullanılan mikroorganizmalar, bitkiler veya hayvanlardan doğal olarak elde edilen ara ürünler ve/veya yan ürünlerdir (2).

Doğal gıdalar, insan sağlığını korumaya yardım edebileceği düşünülerek, son yıllarda tüketiciler, gıda endüstrisi ve araştırmacılar tarafından artan bir ilgiyle karşılanmaktadır (1). Bu konuda fonksiyonel gıdalar olarak bilinen nutrasotikler, tasarlanmış gıdalar, tedavi edici gıdalar, süpergıdalar ya da tıbbi gıdalar önemli bir rol oynamaktadır (1, 3). Bu gıdalar arasında bal, propolis ve arı sütü gibi arı kovanlarında meydana getirilen besinleri sayabiliriz. Bunların hepsi sadece besin değeri bakımından değil, aynı zamanda fonksiyonel ve biyolojik özellikleri nedeniyle de önemli tamamlayıcı gıdalardır (4).

Propolis (arı zımkı), çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları tarafından toplanan ve yine arılar tarafından kovanlarındaki delikleri kapatmak, iç duvarları düzgünleştirmek ve girişi davetsiz misafirlere karşı korumak amacıyla kullanılan reçineli maddenin genel adıdır (5). Propolis yapışkan, rengi koyu sarı, yeşil, kırmızı ve kahverengiye kadar değişen, reçineye benzeyen karakteristik kokulu bir maddedir (6, 7). Propolis filiz, yaprak ve çam, meşe, okalıptüs, kavak, kestane gibi ağaç ve bitkilerin benzer kısımlarından arılar tarafından toplanır ve mumla karıştırılır (7).

Genel olarak, propolis % 50 reçine ve bitkisel balsam, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 organik artıkları içeren çeşitli başka maddelerden oluşmuştur (8). Farklı propolis örneklerinde 300'den fazla bileşen tanımlanmıştır (9). Propolis polifenoller (flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve esterleri, fenolik aldehytler, alkoller ve ketonlar), seskuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler gibi çeşitli kimyasal bileşenleri içermektedir (10, 11).

Propolisin kimyasal bileşiminin coğrafik konum, bitkisel kaynak, toplanma zamanı ya da bal arılarının cinsi gibi çeşitli faktörlere göre belirlendiği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (12-14). Bu açıdan propolisin standardizasyonu zordur ve çeşitli çözücüler (etanol, metanol ve su) aktivitesini etkileyen farklı bileşiklerin ekstrakte edilebilmesine neden olur (15, 16).

Coğrafiik farklılıklar sebebiyle Avrupa, Güney Amerika ve Asya'ya ait propolis örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak değişik kimyasal bileşimlere sahiptir (17, 18). Propolisin temel bileşenleri Avrupa, Çin ve Kuzey Amerika'da flavonoidler ve fenolik asit esterleridir. Brezilya propolisinde bulunan ana bileşikler arasında diterpenler, lignanlar, *p*-kumarik asitin prenillenmiş türevleri, seskuiterpenler ve asetofenonlar vardır (19). Bulgaristan, Türkiye, Yunanistan ve Cezayir'e ait propolis örnekleri başlıca flavonoidler ve kafeik ve ferulik asitin esterlerini içerir (20).

Propolis geleneksel tıpta (halk hekimliğinde) sağlığı yardımcı madde olarak eski çağlardan beri birçok ülkede kullanılmakta ve Doğu Avrupa ülkelerinde kapsamlı şekilde çalışılmaktadır (18). Antibakteriyel, antifungal, antiviral, lokal anestezik, antiinflatuar, antioksidan, hepatoprotektif, immunostimulan ve sitostatik aktiviteleri kapsayan birçok biyolojik özellik propolise atfedilmiştir (21).

Yakın geçmişte propolis oldukça popülerlik kazanmış ve Amerika, Avrupa ve Japonya'yı kapsayan dünyanın değişik bölgelerinde tamamlayıcı tıp ya da gıda takviyesi olarak sağlığı iyileştirmek ve yaşlanma, inflamasyon, kalp hastalıkları, diyabet ve kanser gibi hastalıkları önlemek amacıyla içecek ve yiyeceklerde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (22, 23). Tüm bu nedenlerden dolayı ilaç sanayiinde, içecek, yiyecek ve kozmetik gibi insanların tüketimi yönüyle ağırlıklı olarak Asya ülkelerinde bu doğal ürüne ilgi uyanmıştır (24).

Çok sayıda flavonoid, aromatik asit ve fenolik bileşiğinin varlığının propolisin pek çok biyolojik ve farmakolojik aktivitesinden sorumlu olduğu öne sürülmüştür (22). Flavonoidlerin antibakteriyel, antiviral, antiinflatuar, antialerjik ve damar genişletici etkisini kapsayan biyolojik aktivitesini geniş bir aralıkta sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca flavonoidler lipid peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kapiller geçirgenlik ve kırılabilirliği, siklooksijenaz ve lipooksijenazı içeren enzim sistemlerinin aktivitesini engellemektedirler (25).

Propolis ham halde kullanılmadığı için çözücülerle yapılan ekstraksiyon ile saflaştırılması gerekir. Bu süreçte inert maddeler uzaklaştırılmalı, polifenolik kısımlar ise korunmalıdır. Etanol ile ekstraksiyon reçineden arındırılmış polifenolik bileşenlerce zengin propolis ekstraktı elde etmek için özellikle uygundur (26). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin etanollü ekstraktı antibakteriyel,

antifungal, antioksidan ve antikarsinojenik aktiviteler sergilemektedir (27). Saf su, metanol, hekzan, aseton ve kloroform ile ekstraksiyon da aynı zamanda kullanılmaktadır (28).

Propolisin etanollü ekstraktı en yaygın şekilde kullanılmasına rağmen sulu ekstraktı ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Bugüne dek propolisin sulu ekstraktının hem kimyasal hem de immunolojik karaciğer hasarı modellerinde hepatoprotektif aktivite, antiviral aktivite, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği ve polifenolik bileşiklerinin yüksek içeriğiyle birlikte iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (29).

Propolisin içindeki maddelerin çoğu lipofilik bileşiklerdir. Lipofilik bileşikleri etanol kullanarak ekstrakte etmek kolay olduğundan propolisin etanollü ekstraktı iyi bilinmektedir ve oldukça dikkat çekmektedir. Propolisin sulu ekstraktı ve kafeoilkuinik asitleri içeren başlıca bileşenlerinin ise daha yüksek antioksidan aktiviteye ve bazı enzimlere karşı yüksek inhibitör/aktivatör etkisine sahip olduğu bildirilmiştir (30).

Propolisin tüm bileşenlerinin karakterizasyonu hem kalitatif hem de kantitatif kimyasal analizini kapsamaktadır (28). Propolisteki flavonoidler ve fenolik asitlerin analizi için spektrofotometri, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS) ve kapiller elektroforez (CE) gibi birçok farklı metod geliştirilmiştir (31, 32).

Gaz kromatografisi ve özellikle HPLC gibi kromatografik teknikler her bir polifenolik bileşiğin profilini ve tanımlanmasını sağlar. Polifenolik bileşiklerin karakterizasyonundaki önemi nedeniyle dedektör sistemlerine ayrı bir ilgi gösterilmiştir (28). HPLC ultraviyole (UV)-absorblayan bileşiklerin ortaya çıkarılmasında güçlü bir araç iken, GC-MS uçucu maddelerin belirlenmesinde mükemmel bir tekniktir (33). GC kusursuz bir ayırma sağlar, fakat flavonoidleri analiz için uygun hale getirmede genellikle analizden önce ekstra türevlendirme basamağına ihtiyaç vardır. Tüm bu metodlar arasında, polifenolik bileşiklerin karakterizasyonu için HPLC kuşkusuz halen en geçerli ve güvenilir analitik tekniği temsil etmektedir (32). Bununla birlikte daha önceden yapılan çalışmalarda propolisin analizi yönünde bilginin çoğunlukla ham propolisin çok az örneğinde flavonoidlerin içerik ve miktarının belirlenmesi

üzerine odaklanılmıştır. Başka bir deyişle çok az pratik uygulama ticari propolis ürünlerinin analizi amacıyla kabul görmüştür ve HPLC ile yapılan çalışmalar bile çok azdır (26, 32).

Bu çalışmada, propolisi ekstrakte etmek için kullanılan farklı çözücüler, içeriğinde bulunan farklı bileşiklerin çözünmesini sağlayacağından dolayı Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının HPLC-DAD ve GC-MS yöntemleri kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Özellikle insanlarda güçlü antioksidan içeriğinden dolayı bir gıda takviyesi olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmek açısından laboratuvarımızda kendi yöntemlerimizle hazırladığımız sulu propolis ekstraktının analizi ve bunun etanollü ekstrakt ile karşılaştırılması da amaçlanmıştır. Bu çalışma ile Türk propolisinin etanollü ekstraktının daha önceki çalışmalarda sadece GC-MS ile belirlenen içeriğine HPLC ile elde edilecek ve özellikle polifenollerini gösterecek içerik eklenecektir. Türk propolisinin sulu ekstraktının karakterizasyonu ise ilk defa çalışılacaktır.

Bu amaçla hazırlanan çalışmanın belirlenen hedeflere ulaşması durumunda Türk propolisinin dünya pazarındaki değerinin daha fazla artacağı ve ülke ekonomisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Propolis (arı zambkı), çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve yine arılar tarafından kovanlarındaki delikleri kapatmak, iç duvarları düzgünleştirmek ve girişi yılan, kertenkele gibi yabancı istilacılara, rüzgar ve yağmura karşı korumak amacıyla kullanılan reçineli maddenin genel adıdır (5, 34). Bu terim Yunanca'dan türetilen bir ifade olup *pro-* için 'ön, giriş' ve *-polis* için 'şehir, topluluk' kelimeleri bir araya getirilerek bal arılarının kovan savunması ile ilgili olarak 'şehrin ya da kovanın savunulması' anlamında kullanılır (35). Bal arıları ağaçların kabuklarından ve yaprakların tomurcuklarından topladıkları reçineyi çiğneyip, tükürük enzimlerini ilave ederler. Kısmen sindirilen maddeyi bal mumu ile karıştırırlar ve kovanda kullanırlar (8).

Ham propolisin kesin bileşimi kaynağına bağlı olarak çeşitlilik kazanmaktadır (8). Marcucci (12) propolis reçinesindeki (ham, işlenmemiş propolisteki) bileşiklerin üç kaynaktan meydana geldiğini belirtmiştir (8). Bunlar arılar tarafından toplanan bitki salgıları, arı metabolizmasından salgılanan maddeler ve propolisin dikkatle işlenmesi esnasında ortaya çıkarılan maddelerdir (8). Son 30 yıl içinde propolisin farklı türleri sağlığın desteklenmesi ve hastalıkların engellenmesi amacıyla yoğun farmakolojik ve kimyasal çalışmaların bir konusu haline gelmiştir (36).

Propolis arı kovanının yan ürünüdür ve kovan aracı ile kovanın üst yapısını kazıyan arıcılar tarafından toplanır. Bu işlem genellikle her yıl sonbahar mevsiminde balın özü çıkarıldıktan sonra yapılmaktadır. Propolis ve mum karışımı sandıklar, variller veya çuvallar yardımıyla işlenmek üzere nakledilir (8).

Özellikle Avrupa'dan Doğu Asya'ya kadar birçok ülkede geleneksel tıpta yaygın bir şekilde kullanılan, günümüzde giderek artan bir önem kazanan ve doğal bir ürün olan propolis ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde oldukça ilgi görmektedir (14, 22, 37).

Propolisin medikal uygulamaları kaynağının yanısıra, kimyasal bileşimine duyulan önemin de artmasına yol açmaktadır (21). Propolisin önemli biyolojik ve biyomedikal özellikleri sadece akademik çevrelerin değil, aynı zamanda tüketicilerin de ilgisini çekmesi nedeniyle kimyasal içeriğinin aydınlatılması gerekliliğini beraberinde getirmektedir (14, 38).

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis coğrafi kökenine, bitki kaynağına, yaşına bağlı olarak koyu sarı, yeşil, kırmızı ve kahverengiye kadar değişen renklindedir ve içeriğindeki uçucu yağlar sayesinde karakteristik bir kokuya sahiptir (6, 39, 40). Propolisin ciltte yağlar ve proteinlerle oldukça güçlü etkileşimi olduğundan insan cildinden çıkması zordur, dolayısıyla yapışkan özellik gösterir (8, 41).

Propolis genellikle soğukta (10 °C'nin altında) sert ve kırılğan, sıcakta ise yumuşak ve oldukça yapışkan bir şekilde olup, 15-25 °C arasında mum kıvamında elastik bir yapı gösterir, 30-40 °C'de yumuşayıp yapışkan bir hal alır ve 80 °C'de ise kısmen erir (8, 42). Fakat bazı örneklerin erime sıcaklığı 100 °C'lere kadar çıkar (34). Resim 1'de propolis gösterilmiştir.



Resim 1. Propolis (Wikipedia'dan, 43)

4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin kimyasal bileşimi oldukça komplekstir ve yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu bileşim, propolisin coğrafik konumu, bitkisel kaynağı, toplanma zamanı ya da bal arılarının cinsi gibi faktörlere göre çeşitlilik göstermektedir (10, 12, 13, 14). Genel olarak, propolis % 50 reçine ve bitkisel balsam, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 organik artıkları içeren çeşitli başka maddelerden oluşmuştur (8).

Farklı propolis örneklerinde 300'den fazla bileşen tanımlanmıştır (9). Propolis polifenoller (flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve esterleri, fenolik aldehitler, alkoller ve ketonlar), seskuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler gibi çeşitli kimyasal bileşenleri içermektedir (10, 11).

Propolisin yapısında pinosembrin, akasetin, krisin, rutin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, apigenin, mirisetin, kuersetin gibi flavonoidlerin yanısıra kafeik asit ve sinamik asit gibi fenolik asitler de tespit edilmiştir (12, 44). Propolis magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn) ve demir (Fe) gibi bazı mineralleri, B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi içerir. Ayrıca süksinat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimleri ihtiva eder (9).

Polifenoller olarak da adlandırılan fenolik bileşikler (çoğunlukla flavonoidler) propolisin toplam ağırlığının % 50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (45). Tablo 1'de propoliste bulunan başlıca bileşenler verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (Cuesta'dan, 46)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler	45-55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asitler ve esterleri	
Mum ve yağ asitleri	Arılar ve bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25-35
Esansiyel yağlar	Uçucular	10
Polen	Proteinler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	
	Eser elementler (Cu, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs)	
Diğer maddeler	Ketonlar	5
	Laktonlar	
	Kinonlar	
	Steroidler	
	Şekerler	

4.1.3. Polifenoller (Fenolik Bileşikler)

Polifenoller veya fenolik bileşikler bitkilerde meydana gelen en önemli ve en yaygın bulunan bileşiklerdendir. Ayrıca polifenoller bitkilerin ikincil metabolizma ürünleridir (47, 48). Polifenoller sahip olduğu aromatik halkada çeşitli fonksiyonel gruplara (esterler, metil esterler, glikozitler gibi) ilaveten iki veya daha fazla hidroksil (-OH) grubu taşıyan bileşiklerdir (49).

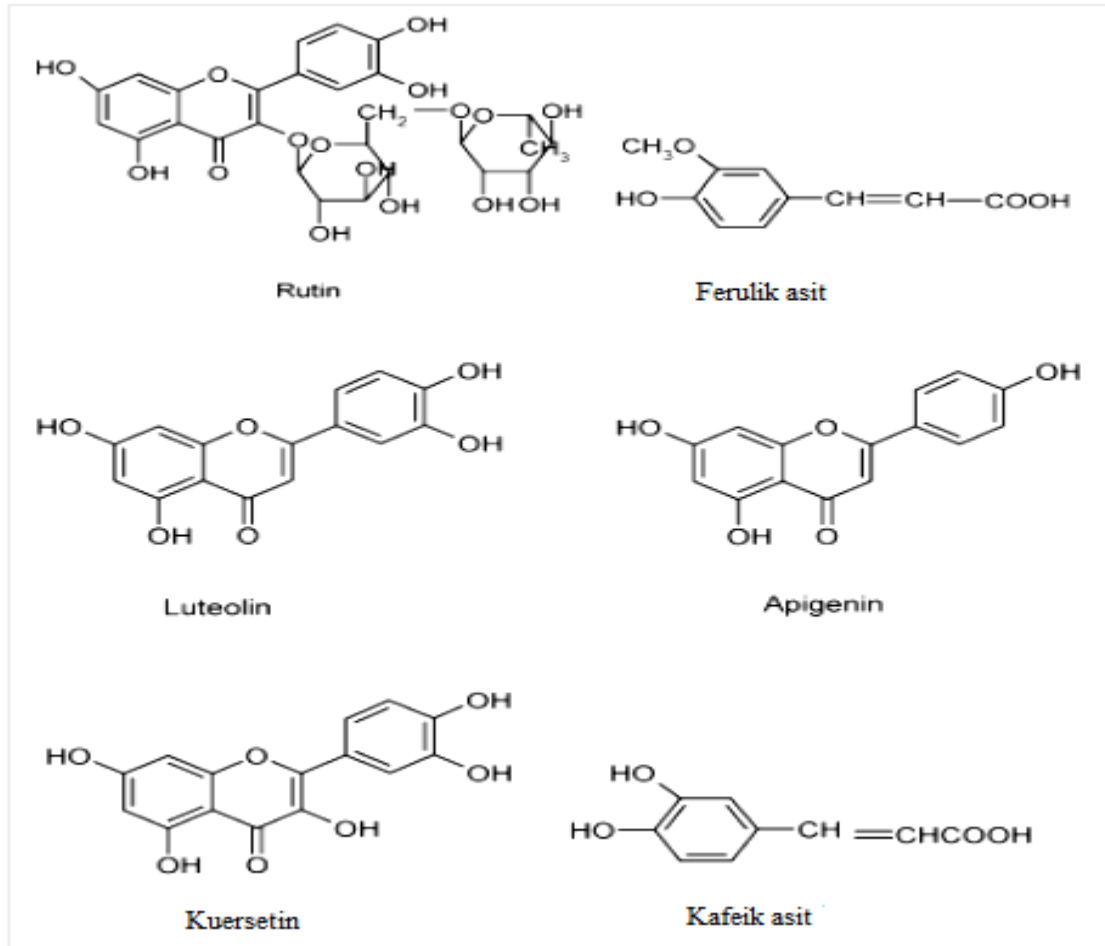
Polifenoller içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve fonksiyonuna göre farklı gruplara ayrılırlar. Bu gruplar fenolik asitler, stilbenler, lignanlar (non-flavonoidler) ve flavonoidlerdir (50). Flavonoidler ve fenolik asitler halihazırda tanımlanmış 5000'den fazla bileşik ile polifenollerin en önemli sınıfını oluştururlar (48). Fenolik asitler hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri olarak iki alt gruba ayrılırlar ve içerdikleri hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler (51, 52). Flavonoidler flavan (2-fenol-benzo-dihidropiran) halkasından türeyerek flavanoller, antosiyaninler, flavonoller, flavonlar ve flavanonlar olmak üzere beş gruba ayrılırlar (50, 51). Her bir flavonoid ailesindeki yapısal farklılık halkanın değişimi ile ilgili çeşitli hidroksilasyon, metoksilasyon ve glikozilasyondan ortaya çıkmaktadır. Bitkilerdeki polifenoller glikozidik bağ ile serbest bileşikler ya da bazı durumlarda asetillenmiş türevler olarak meydana gelirler (51).

Polifenoller pek çok bitkide renk, koku ve tattan sorumlu olan sadece önemli duyuşsal özellikleri nedeniyle değil, aynı zamanda oksidatif stres ile ilişkili çeşitli hastalıkların engellenmesinde anahtar rol oynayabildikleri gerekçesiyle ilgi çekmektedirler (50). Epidemiyolojik çalışmalar; günlük diyetle ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı şarap, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (53).

Propolis ağırlıklı olarak flavonoidler ve çok çeşitli polifenoller içerir (54). En önemli polifenoller sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve ferulik asitlerdir (55).

Polifenoller gıda maddelerinin görünüş, tat ve lezzet gibi tüketim açısından önemli olan kalite özellikleri üzerine etkileri ve doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle önemli bileşenlerdir (54).

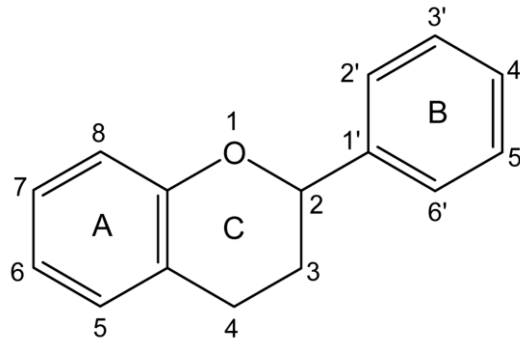
Polifenoller indirgeyici ajan, hidrojen verici, metal şelatlayıcı ve ayrıca singlet oksijen süpürücü olarak rol oynayan redoks özellikleri sayesinde oksidasyon reaksiyonlarına karşı dikkate değer ölçüde koruyucu etki gösterirler (56). Polifenoller *in vitro* olarak reaktif oksijen ve azot türlerini süpürme ve redoks-aktif geçiş metal iyonlarını şelatlama özellikleri ile antioksidan olarak rol oynarlar (57). Bu bileşiklerin antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiaterojenik, antitrombotik, bağışıklığı düzenleyici ve analjezik aktivite gibi insan sağlığına yararlı etkileri olduğu gösterilmekle birlikte, bu gibi biyolojik fonksiyonları serbest radikalleri süpürme ve antioksidan aktivitelerine atfedilmiştir (28, 51, 58). Şekil 1’de bazı önemli polifenollerin moleküler yapıları gösterilmiştir.



Şekil 1. Rutin, ferulik asit, apigenin, luteolin, kuersetin and kafeik asitin moleküler yapıları (Cao’dan, 31)

4.1.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler yapı ve özellikleri bakımından geniş bir şekilde çeşitlilik gösteren polifenollerin bir grubudur (59). Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B ve C halkasından meydana gelen difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısı oluşturur (59-61). A ve B aromatik halkalar, C ise hetero halka olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (62). Şekil 2’de flavonoidlerin temel yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. Flavonoidlerin temel yapısı (60)

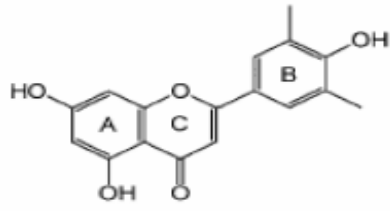
Bu bileşikler halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (62, 63).

Flavonoidler A ve B halkalarının substitüsyon yapısındaki tekli bileşikler dahilinde bir sınıfa ayrılırken, C halkasının doymuşluğu ve oksidasyon derecesi bakımından farklı sınıflara ayrılırlar. Yapıdaki ve substitüsyondaki farklılık fenoksil radikallerinin kararlılığını ve böylece flavonoidlerin antioksidan özelliklerini etkilemektedir (64). A halkası 5 ve 7 pozisyonunda karakteristik bir hidroksilasyon gösterirken, B halkası genellikle 4'-, 3',4'- veya 3',4',5'- pozisyonlarında hidroksillenir (65).

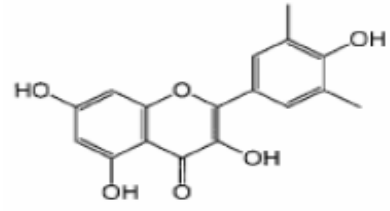
Flavonoidler düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bugüne kadar 4000’den fazla bitkide tanımlanan flavonoidler büyük ölçüde bitkinin yaprak, tohum, kabuk ve çiçek kısımlarına dağılmışlardır (66, 67).

Flavonoidler bitkilerde, şekerli formu ‘aglikon’ ve şeker eklenmiş formu ‘glikozit’ olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Flavonoidlerin adlandırılmasında; glikozit türevleri halinde bulunan flavonoidlere -in ya da -idin eklenirken, aglikon halinde bulunanlara da -etin eklenmektedir. Bağırsaklardan flavonoid glikozitlerinin absorpsiyonlarını belirleyen en önemli faktör şeker kısmıdır (68).

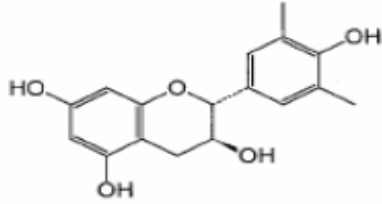
Besinsel flavonoidler genellikle glikozillenmiştir ve meyve ve bitkilerde turuncu, kırmızı, mavi renklere sorumlu olan antosiyaninler, flavanoller (kateşinler), flavonlar, flavanonlar ve flavonoller olarak sınıflandırılabilirler (69, 70). Bunlardan son üç tanesi antosiyaninler olarak adlandırılırlar. Flavonoidler neredeyse bütün bitkilerde bulunmaktadır. Flavanonlar ve flavonlar çoğunlukla aynı bitkide (sıklıkla turuncgillerde) bulunmasına rağmen ne flavonlar ve flavonoller ne de flavanonlar ve antosiyaninler genel olarak birlikte bulunmamaktadırlar. Baklagillerde (en çok soya fasülyesinde) kayda değer yoğunlukta bulunmaları nedeniyle izoflavonlar genellikle bu beş alt gruptan ayrı olarak ele alınırlar (69). Flavonoidlerin temel moleküler yapıları Şekil 3’te verilmiştir.



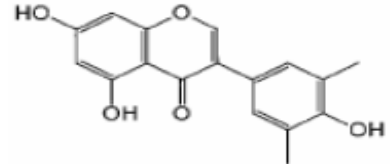
flavon



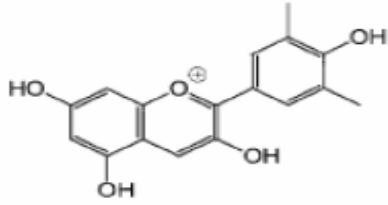
flavonol



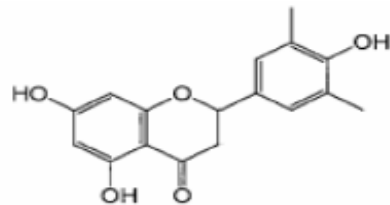
flavanol



izoflavon



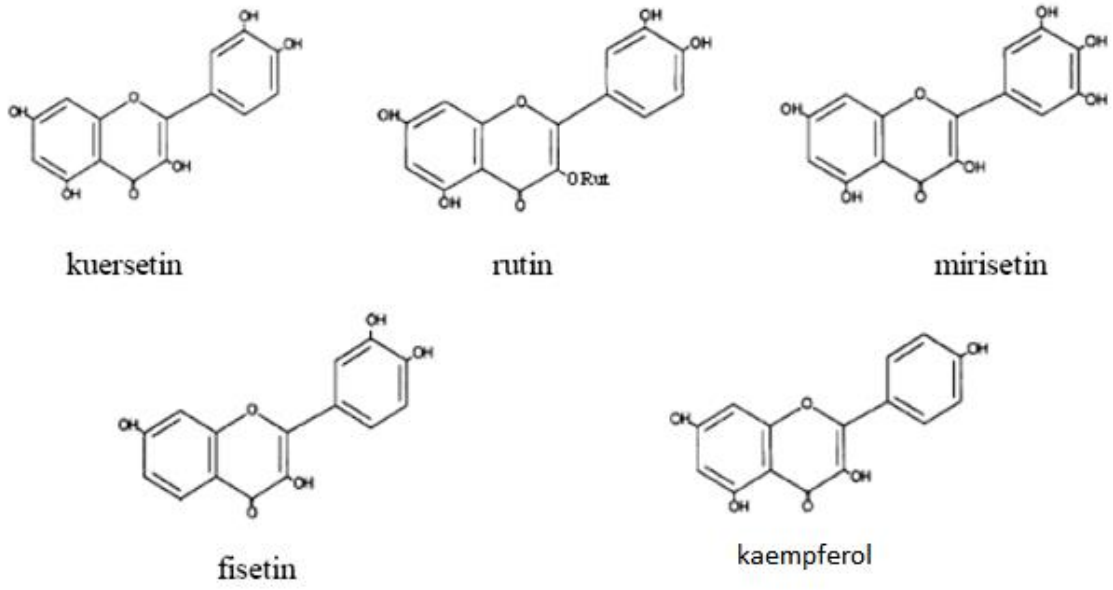
antosiyanidin



flavanon

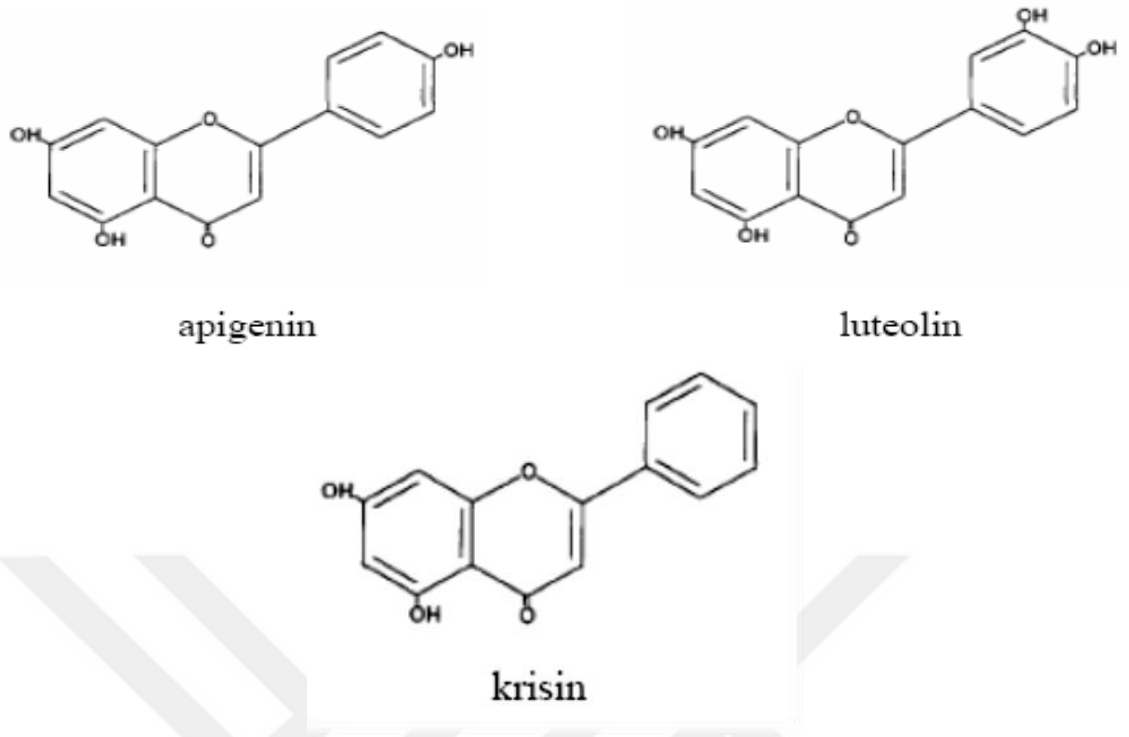
Şekil 3. Flavonoidlerin temel moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Flavonoller, C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfıdır. Bunlar 3. karbonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzo- γ -piran çekirdeğine sahiptirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır (71). En önemli flavonoller kuersetin, mirisetin, rutin, fisetin ve kaempferoldür. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğan, elma ve lahanada bol miktarda bulunur. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur (62, 72). Şekil 4'te önemli flavonollerden bazıları gösterilmiştir.



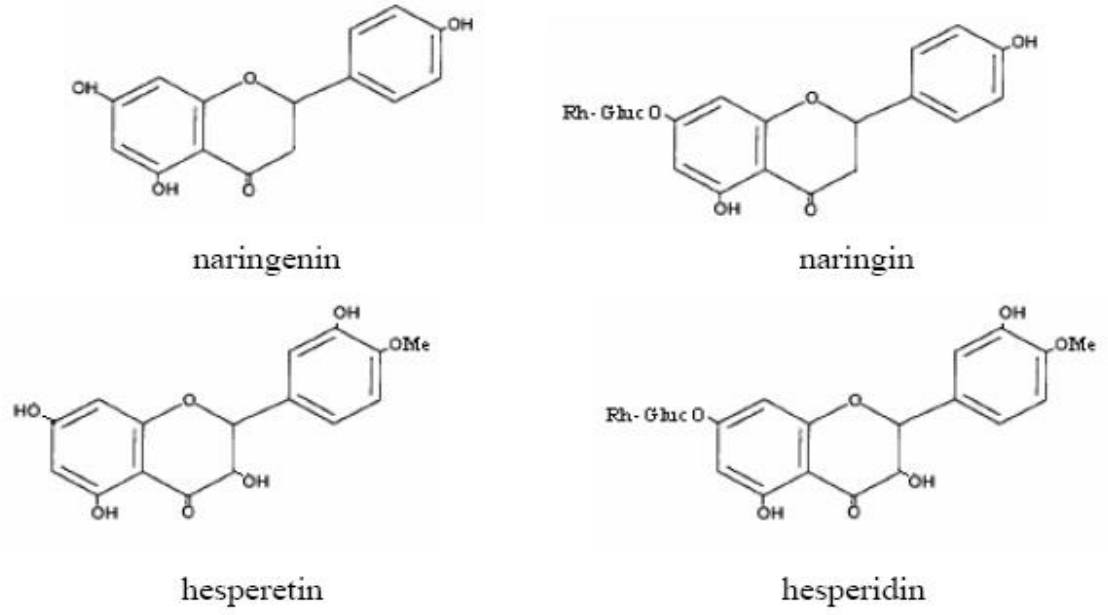
Şekil 4. Kuersetin, mirisetin, rutin, fisetin ve kaempferolün moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Flavonlar, flavonoidlerin bitki aleminde yaygın olarak rastlanan sınıfıdır. Bu bileşiklerin hetero halkasında 2. ve 3. karbon atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dihidro türevleridir. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar (71). En önemli flavonlar apigenin, krisin ve luteolindir. Apigenin; maydanoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise acı biberde bulunmaktadır (62, 72). Önemli flavonlardan apigenin, luteolin ve krisinin moleküler yapıları Şekil 5'te gösterilmiştir.



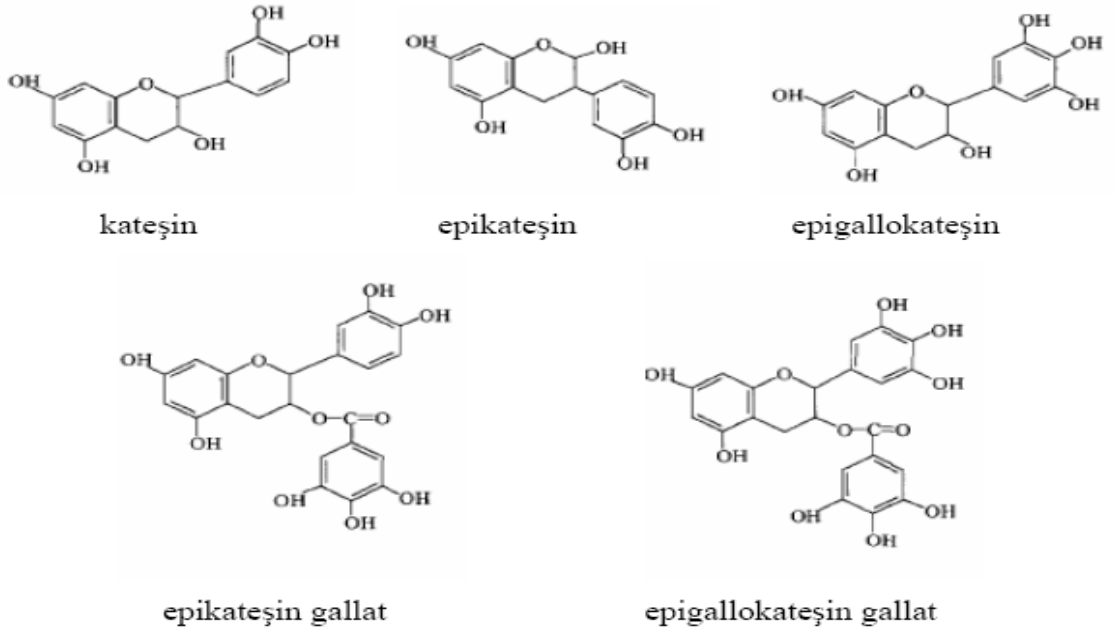
Şekil 5. Apigenin, luteolin ve krisinin moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Flavonun dihidroksi türevi flavanondur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetindir. Naringenin 3-hidroksi flavanondur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikozidi olan naringindir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bol miktarda bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozididir (62, 72). Şekil 6'da naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin moleküler yapıları verilmiştir.



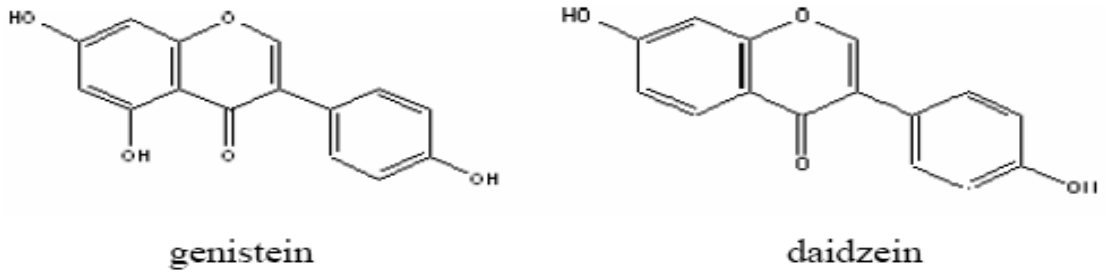
Şekil 6. Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Flavonollerin C halkasında bulunan çift bağlı oksijen atomunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde flavanoller (kateşinler) oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridirler. En önemlileri kateşin ve epikateşindir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çay, kırmızı ve beyaz şarap, şeftali ve elmada bol miktarda bulunurlar (62, 72). En önemli flavanoller Şekil 7'de gösterilmiştir.



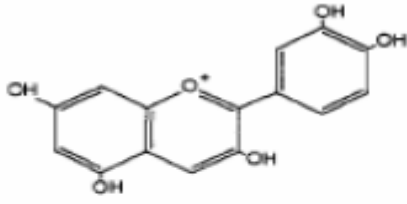
Şekil 7. Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Flavonların izomeri olan izoflavonlar ise aromatik B halkasının, C halkasındaki 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ve soya fıstığında mevcuttur (62). Şekil 8'de genistein ve daidzeinin moleküler yapıları verilmiştir.

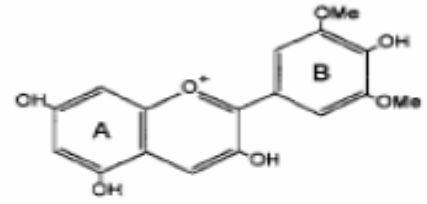


Şekil 8. Genistein ve daidzeinin moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

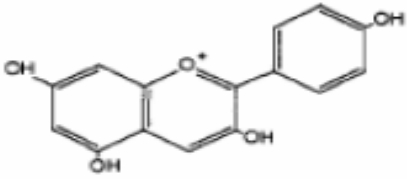
Antosiyaninler, flavanollerin aromatik B halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları antosiyanidinlerdir. En önemlileri apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidindir. Renkli meyvelerde, özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunurlar (62, 72). Başlıca antosiyaninler Şekil 9'da gösterilmiştir.



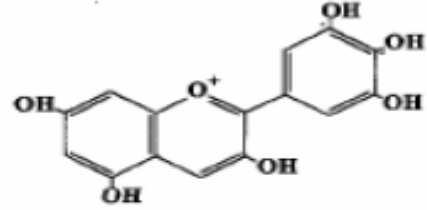
siyanidin



malvidin



apigenidin



delfinidin

Şekil 9. Siyanidin, malvidin, apigenidin, delfinidin moleküler yapıları (Karademir'den, 62)

Hayvanlar ve insanlar flavanoidleri sentezleme yeteneğine sahip değildirler. Bu nedenle flavanoidler genellikle yumurta, et, tavuk, süt ve deniz ürünlerinde bulunmazlar (73, 74).

Flavanoidler ikincil bitki metabolitleri olarak bulundukları ve insanlar tarafından sentezlenemedikleri için beslenmenin (insan diyetinin) önemli kısmını oluştururlar (75). Flavonoller biyolojik yönden flavon ve flavononlardan çok daha aktiftirler. Bu bileşiklerin ayrı ayrı kullanımlarına göre flavonol ve flavonların birlikte kullanılması sinerjik ve daha baskın etki elde edilmesini sağlar (76, 77).

Besinsel flavanoidler hidroksil, metoksi ve glikozidik yan grupların yerleşimi ve A ve B halkaları arasındaki konjugasyon (birleşme) bakımından değişiklik gösterirler. Metabolizma süresince hidroksil grupları eklenir, metillenir, sülfatlanır ya da glukuronidasyona uğrar. Besinlerdeki flavanoidler esas olarak 3-O-glikozitler ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Bununla beraber yeni oluşan bileşiklerin yapısal ve fizikokimyasal nitelikleri emilimi, farmakokinetiği, biyotransformasyonu ve metabolitlerin rölatif aktiviteleri organizmadaki biyolojik etkilerinin ciddi belirleyici faktörleridir (67).

Flavonoidlerin biyolojik etkileri biyolojik polimerlere bağlanma afiniteleri, ağır metal iyonlarına bağlanmaları, elektron transportunu katalizlemeleri ve serbest radikalleri süpürme yetenekleri olmak üzere dört farklı şekildedir (8).

Genel olarak flavonoidler 70 yıldan fazladır *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde çalışılmaktadır (78). Flavonoidlerin antibakteriyel, antiviral, antiinflammatuar, antiallerjik ve vazodilatör etkiler gibi çok sayıda biyolojik aktivite sergilediği belirtilmiştir. Ayrıca flavonoidler lipid peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kapiller geçirgenliği ve kırılganlığı, siklooksijenaz ve lipooksijenazı içeren enzim sistemlerinin aktivitesini engellerler (25, 79).

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi süperoksit, hidroksil radikali, peroksil radikali, hipokloröz asit ve peroksinitröz asit gibi reaktif oksijen, azot ve klor türlerini doğrudan süpürme yeteneklerine dayanır (80). Flavonoidlerin hidroksil substitüentlerinin yüksek reaktivliğinden dolayı radikaller etkisiz hale gelirler (81). Flavonoidler aynı zamanda endojen antioksidan enzim sistemlerinin [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon] fonksiyonunu arttırmırlar (80, 81). Buna ek olarak, antioksidan etkiler, radikal temizleme ve enzim işlevleri ile etkileşimin, her ikisinin birleşiminin bir sonucu olabilir (81).

Flavonoidlerin güçlü antioksidan aktiviteleri yapısındaki üç unsurdan kaynaklanmaktadır (59, 67, 72, 82, 83). Bunlar:

- B halkasındaki *orto*-dihidroksi (katekol) grubu oksijen ve azot radikallerini kayda değer şekilde süpürme yeteneği sergiler ve fenoksil radikallerini oluşturan yüksek kararlılığı sağlar. B halkasındaki hidroksil grupları radikaller için elektron ve azot vericidirler.

- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çift bağ (doymamış bağ) ve B halkasındaki elektronun ayrılması (dislokasyonu) nedeniyle C halkasındaki 4-okso (4-keto, karbonil) grubunun varlığı. Antioksidan özellikler aromatik halkanın elektronunun ayrılmasından kaynaklanır. Serbest radikaller ile bileşiklerin reaksiyonu sırasında fenoksil radikalleri oluşur ve aromatik halka rezonansının etkisi ile kararlı hale gelir.

- A ve C halkalarındaki 4-okso (4-keto, karbonil) grubunun yapısında 3. ve 5. karbonlardaki hidroksil grupları maksimum serbest radikal süpürme etkisi meydana getirir (59).

Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır (84).

Giderek artan kanıtlar, flavonoidlerin DNA (tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları, şeker ve baz kalıntılarındaki oksidatif hasar, kromozom anomalisi ve mutasyon) ve diğer hücresel bileşenlerin oksidatif hasarını engellediğini göstermektedir (80).

Flavonoidlerin tespitine (tanımlanmasına) yönelik metodlar farklı doğal ürünlerdeki bu bileşiklerin geniş çapta bulunması nedeniyle ilgi uyandırmaktadır (85).

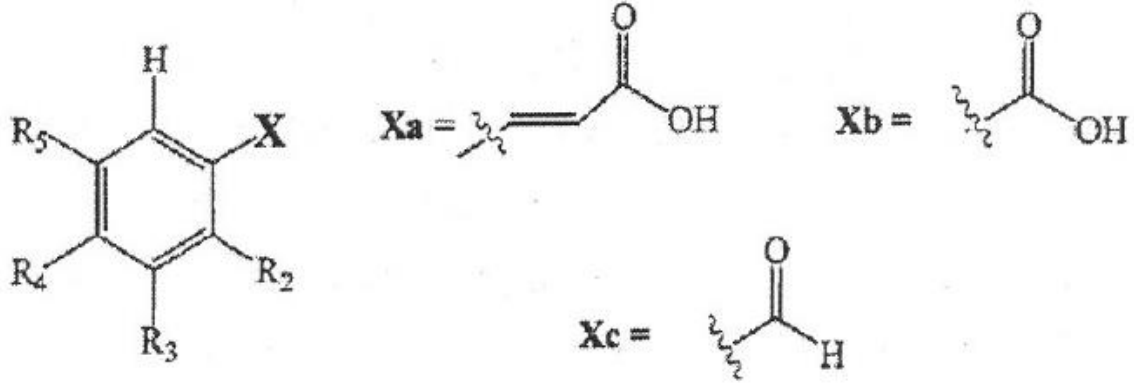
Flavonoidler gibi polifenoller propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan maddelerdir (86). Flavonoidlerin sentezinde rol oynayan ve doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerden biri olan sinamik asit, propolisin aktif bir bileşenidir (87). Bugüne kadar propoliste galangin, kaempferol, kuersetin, pinosebrin, pinostrobin, pinobanksin gibi bileşikler içeren en az 38 flavonoid tespit edilmiştir (55).

Flavonoidler spesifik enzimleri inhibe etme, serbest radikalleri yakalayarak hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı koruma ve bazı hormonları ve nörotransmitterleri stimüle etme gibi kanıtlanmış yetenekleri sayesinde propolisin içinde bulunan önemli farmakolojik açıdan aktif moleküller olarak nitelendirilirler (25, 79).

4.1.3.2. Fenolik Asitler

Bitkilerin ikincil metabolitlerinden olan fenolik asitlerin kimyasal yapıları basittir (C₆-C₁) ve genellikle işlevsel bir karboksilik asit içeren fenoller olarak tanımlanırlar (47, 88). Fenolik asitler benzen halkası, hidroksil ve karboksil gruplarından inşa edilmiş bileşiklerdir (59). Bununla birlikte, fenolik asitler hidroksisinnamik (Xa) ve hidroksibenzoik (Xb) yapısında olan iki ayırt edici temel karbon iskeleti ihtiva ederler. Temel olarak aynı iskelet yapısına sahip olmalarına rağmen yapıları arasındaki çeşitlilik aromatik halkadaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre farklılık gösterir.

Birçok durumda aldehit analogları da 3. bir grubu (Xc) oluşturur (88). Şekil 10'da fenolik asitlerin yapısı ve aralarındaki çeşitliliği sağlayan bu üç yapı gösterilmiştir.

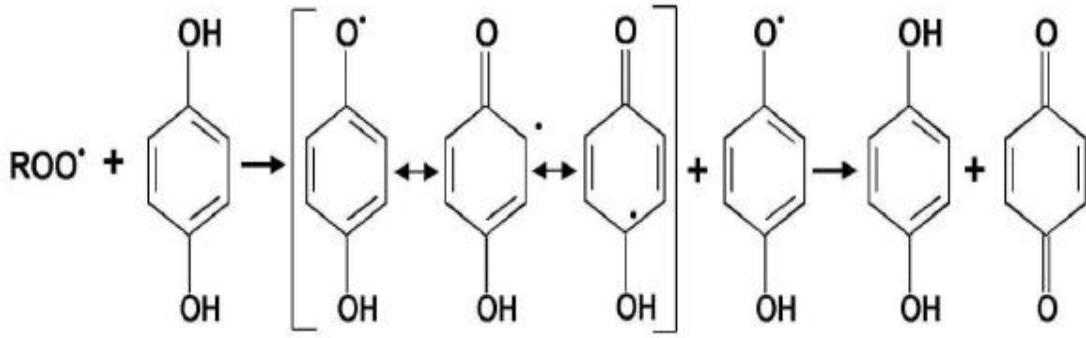


Şekil 10. Fenolik asitlerin yapısı ve aralarındaki çeşitliliği sağlayan üç yapı (Özkök'ten, 74)

Fenolik asitler bitkinin kök, gövde, yaprak ve tohumuna düzenli olarak dağılmışlardır. Özellikle sinamik ve benzoik asitin kafeik, *p*-kumarik, vanilik, ferulik ve protokateşuik asit gibi türevleri meyve, sebze ve tahıllarda bulunurlar (74, 88).

Doğal olarak meydana gelen bu bileşikler kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalığa sebep olan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı güçlü antioksidanlardır (89).

Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi moleküldeki hidroksil gruplarının sayısına ve sterik etkilere bağlıdır. Aromatik halkadaki substitüsyon (yer değiştirme) tipinin yanısıra hidroksil gruplarının pozisyonu da bu bileşiklerin antioksidan aktivitesini etkiler. Bunun sonucu olarak aromatik halka sistemine bağlı hidroksil grubundaki hidrojen ve oksijen atomu arasındaki bağın enerjisi alifatik bileşiklerinkinden daha küçüktür. Oksijen atomundaki azalmış elektron yoğunluğu, hidroksil grubundan ayrılan hidrojen atomundan ötürü aromatik halkanın rezonans etkisinin sonucudur. Fenolik bileşikler aromatik halkadaki yüklerin yerini değiştirmeleri nedeniyle nispeten kararlı fenoksil radikalleri haline gelirler (Şekil 11). Birleşen fenoksil radikalleri kinonları meydana getirirler ya da dimerizasyon veya radikal substitüsyonu gibi diğer reaksiyonlara katılırlar (59).



Şekil 11. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu (Kurek-Gorecka'dan, 59)

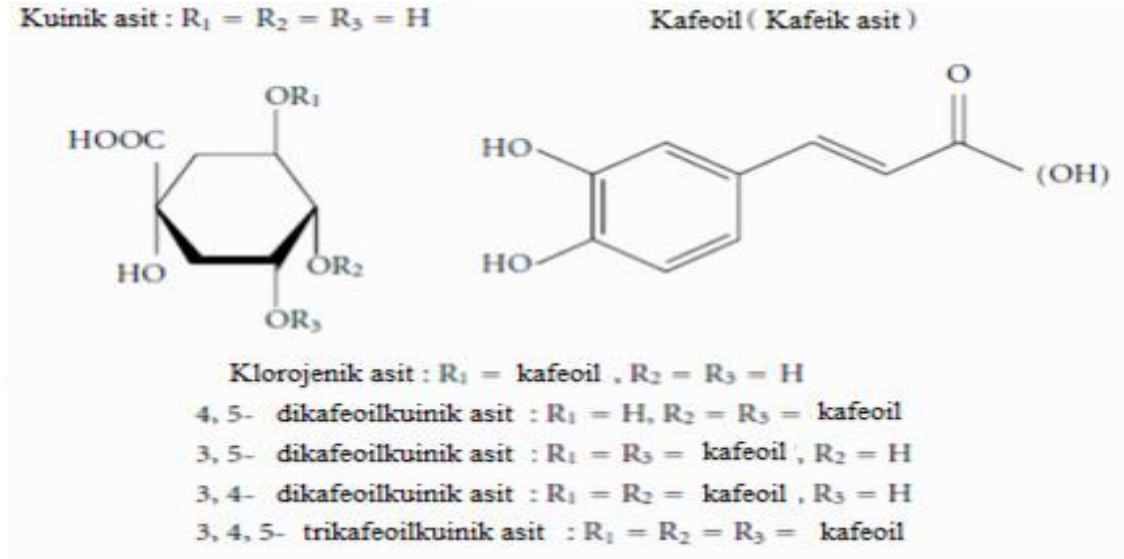
Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi tersine zayıf polar ortamdaki O-H bağının ayrışmasının entalpisinin büyüklüğü ile orantılıdır. Fenolik halkadaki O-H bağının ayrılmasının mekanizması bir süperoksit radikale hidrojen atomunun transferine dayanır. Halkadaki *orto*- ve *para*- pozisyonundaki bir hidroksil grubu ile benzoik asidin monohidroksi türevleri antioksidan aktivite göstermezler. Aksine radikallerin *meta*-monohidroksi türevleri sulu fazda ortaya çıkarlar. Bu da elektronları kendine çeken karboksil gruplarının kabiliyeti ve halkadaki *orto*- ve *para*- pozisyonunun etkisi ile alakalıdır. Monohidroksi asitler etkili hidroksil radikali süpürücüdürler. Buna ek olarak halkadaki fazladan metoksi grubunun varlığı ile birlikte bir hidroksil grubu beraberinde asitli ortamda antioksidan aktivite artar. *Orto*- pozisyonundaki alkil ve metoksi gruplarının substitüsyonu, kararlılığı ve fenolik asitlerin antioksidan özelliğini artırır (59).

4.1.4. Kafeoilkuinik Asitler

Klorojenik asitler, çeşitli izomerik şekillerde bulunan kafeoilkuinik asitler, feruloilkuinik asitler ve *p*-kumaroilkuinik asitler olarak bilinen bir dizi konjuge yapıdan şekillenerek kuinik asit ile kafeik asit, ferulik asit ve *p*-kumarik asitler gibi hidroksisinnamik asitlerin esterifikasyonundan oluşan non-flavonoid fenolik bileşiklerdir (90).

Son birkaç yılda klorojenik asitlerin tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet, Alzheimer gibi hastalıkların rölatif riskini düşürmesi, antibakteriyel ve antiinflamatuvar aktiviteleri gibi sağlığa yararları ilişkilendirilmiştir (91).

Kafeoilkuinik asitler kafeoil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre çeşitli türevleri şeklinde sınıflandırılırlar (92). Şekil 12’de kafeoilkuinik asitlerin moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 12. Kafeoilkuinik asitlerin moleküler yapısı (Urushisaki’den, 93)

Kafeoilkuinik asitler kahve çekirdekleri, tatlı patates, propolis ve diğer bitkiler gibi doğal kaynaklarda bulunan biyoaktif fenilpropanoidlerdir (94).

4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit ve 3,4-di-O-kafeoilkuinik asitin yanısıra propolis monokafeoilkuinik asit (klorojenik asit) ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit gibi kafeoilkuinik asit türevlerini içerir (95, 96). Klorojenik asit, di-kafeoilkuinik asitler ve tri-kafeoilkuinik asit; kuinik asitlerin ve 1, 2 ve 3 kafeik asitlerin esterleridir (96).

Kafeoilkuinik asitler doğal bileşiklerin farmakolojik olarak aktif gruplarından en önemlileri arasındadırlar (97). Kafeoilkuinik asitler antioksidan, antibakteriyel, antikanser, antihistaminik, anti-HIV, nöroprotektif, hepatoprotektif, analjezik, antimutajenik, antitümör, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünmodülatör ve diğer biyolojik etkiler gibi farklı aktivitelere sahiptirler (30, 92, 98-111).

En çok bilinen ve tanınan kafeoilkuinik asit kahve çekirdekleri, elma, domates gibi çoğu bitki, meyve ve sebzede bulunan ve monokafeoil türevi olan klorojenik asittir (112). Klorojenik asit sinamik asitler ve kuinik asitten meydana gelen ester yapıda bir bileşiktir ve 5-O-kafeoilkuinik asit (IUPAC adlandırması) ya da 3-O-kafeoilkuinik asit

(pre-IUPAC adlandırması) olarak bilinir (113, 114). Ancak en yaygın kullanımı 5-O-kafeoilkuinik asittir. Klorojenik asitin hipoglisemik ve hipolipidemik etkiler başta olmak üzere antibakteriyel, antioksidan ve antikarsinojenik aktiviteler gibi birçok biyolojik özellik sergilediği kanıtlanmıştır (98, 114-119). Son zamanlarda klorojenik asitin glukoz ve lipid metabolizmasını *in vivo* olarak metabolik bozukluk durumunda hem sağlık açısından hem de genetik olarak düzenlediği ileri sürülmüştür (114, 116, 120, 121).

4.1.5. Propolisin Bitkisel Kaynağı

Arılar farklı habitatlarda propolisin kaynağı olarak sıklıkla değişik bitki türlerini tercih ederler (122). Propolisin bileşimi arılar tarafından kavak (*Populus* spp.), huş (*Betula alba*), kayın (*Fagus sylvatica*), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), kızılâğaç (*Alnus glutinosa*), çam (*Pinus* spp.), söğüt (*Salix* spp.), karaağaç (*Ulmus* spp.), meşe (*Quercus* spp.), ladin (*Picea* spp.), dişbudak (*Fraxinus* spp.) gibi farklı ağaçlardan toplanan tomurcuk salgıları ile doğrudan ilişkilidir (10, 123-125).

Propolisin kimyasal bileşimi coğrafi kökenine, bölgesel bitki örtüsüne, mevsime, arı türüne göre kalitatif ve kantitatif olarak çeşitlilik göstermektedir (126-129). Dolayısıyla bu doğal ürünün tüm dünyada farklı türleri bulunmaktadır (130).

Poplar cinsi propolis Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın tropik olmayan (ılıman) bölgeleri ve Yeni Zelanda'da bulunur ve çoğunlukla kavak filizlerinden (tomurcuklarından) elde edilir (16, 131, 132). Hem Kuzey hem de Güney yarımküredeki ılıman bölgelerdeki poplar cinsi propoliste yaygın olan başlıca biyoaktif kimyasal bileşenler flavonoid aglikonlar (flavonlar ve flavanonlar), fenolik asitler ve esterlerini içeren polifenollerdir (16, 111, 132). Fenolik bileşenler (flavonlar ve flavonoller) aynı zamanda Rusya kaynaklı huş cinsi propolisin de ayırt edici özelliğidir, ancak poplar cinsi propolisten belirgin biçimde farklıdır (16, 41, 123, 132, 133). Pasifik propolisi karakteristik olarak prenillenmiş flavanonlarca zengindir. Diğer önemli propolis türleri Tayvan, Japonya ve Solomon Adaları'nda bulunur. Tropikal bölgelerden elde edilen propolis daha çok prenillenmiş *p*-kumarik asit türevleri, flavonoidler, benzofenonlar, lignanlar ve terpenleri içerir (134). Propolisin diğer türleri, Küba ve Meksika'da bulunan kırmızı propolisteki izoflavonoidler, Sicilya, Yunanistan, Girit Adası ve Malta'daki Akdeniz cinsi propolisteki diterpenler ve Küba [*Clusia nemorosa*

(Clusiaceae)] ve Venezuela (*Clusia major* ve *Clusia minor*)’da rastlanan *Clusia* cinsi propolisteki poliprenillenmiş benzofenonlar gibi farklı kimyasal bileşenlere sahiptir (16, 132, 135, 136).

Brezilya’da oldukça farklı bitkiler bulunmasından ötürü propolis örnekleri şimdiye kadar renk, yapı, kimyasal içerik bakımından fizikokimyasal özellikler ve coğrafi köken olarak 13 grupta sınıftandırılmıştır ve Kuzeydoğu, Güneydoğu ve Güney olmak üzere ülkenin coğrafi bölgelerinin üçünde dağılmıştır (126, 137-139). Yeşil ve kahverengi propolis Brezilya propolisinin en çok karşılaşılan türleridir (134, 140). Yeşil propolis (Güneydoğu ve Güney Brezilya) *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae, alecrim bitkisi)’dan elde edilmiştir ve prenillenmiş fenilpropanoidler, triterpenoidler, klorojenik ve benzoik asitlerce zengindir (140, 141). *Copaifera* türlerinden elde edilen kahverengi propolis başlıca flavonoidler ve terpenleri içerir (134). Bununla beraber kırmızı Brezilya propolisi (Kuzeydoğu Brezilya) *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae)’dan elde edilmiştir ve izoflavonoidler, prenillenmiş benzofenonlar ve naftakinon epoksit içerir (134, 135, 140, 142, 143).

Bulgaristan, Türkiye, Yunanistan ve Cezayir’deki propolisler genellikle daha çok flavonoidler ve kafeik ve ferulik asitlerin esterlerini içerir (144).

Daha ileri çalışmalar ile birbirinden farklı yeni bitki kaynakları bulunmaya devam edilmektedir (145). Japonya’daki Okinawa ve Okayama propolisi Avrupa ve Brezilya gibi başka bölgelerde görülmeyen bazı fenil flavonoidler içerir. Okinawa propolisinin bitki kaynağı *Macaranga tanarius* iken, Okayama propolisininki *Rhus javanica* var. *chinensis*’tir (145, 146).

Yakın geçmişte ise Akdeniz propolisi olarak adlandırılan ağırlıklı olarak diterpenlerden meydana gelen ve Akdeniz bölgesinde (Yunanistan, Sicilya ve Malta) yaygın olan Cupressaceae ve Pinaceae arasındaki kozalaklı ağaçlardan üretilen propolisin yeni bir türü tespit edilmiştir (147). Son zamanlarda Akdeniz propolisi denilen potansiyel tür gibi Akdeniz Avrupa ülkelerinin yanı sıra Akdeniz Afrika ülkelerinin spesifik diterpenlerce zengin propolis tipinin kimyasal profili açıklanarak, birçok farklı yayında bahsedilmiş ve kullanılmıştır (147-151). Tablo 2’de bitki kaynağı, coğrafi kökeni ve başlıca bileşenlerine göre en yaygın propolis türleri verilmiştir.

Tablo 2. En yaygın propolis türleri: Bitki kaynağı, coğrafik kökeni ve başlıca bileşenler [Sforcin'den (16), Graikou'dan (147), Catchpole'den (152)]

Propolis Tipi	Bitki Kaynağı	Coğrafik Kökeni	Başlıca Bileşenler
Poplar tipi	<i>Populus</i> spp.	Avrupa, Asya'nın tropik olmayan bölgeleri, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika	Flavonoid aglikonlar (flavonlar ve flavanonlar), fenolik asitler ve esterlerini içeren polifenoller
Birch 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, 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, Venezuela	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik tipi	<i>Macaranga tanarius</i>	Pasifik Bölgesi (Endonezya, Tayvan ve Okinawa vilayeti)	Prenillenmiş flavanonlar
Akdeniz tipi	Cupressaceae ailesi	Yunanistan, Sicilya, Girit Adası, Malta	Diterpenler

Propolisin standardizasyonu coğrafik ve bitkisel kökenindeki farklılıktan dolayı kimyasal bileşimindeki ve farmakolojik aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle gerçekten zordur (10, 153). Coğrafik kökeninin kontrolü propolisin bileşiminin tutarlılığını sağlamak açısından oldukça önemlidir (129). Propolis için evrensel bir standardizasyon formüle etmek olanaksızdır, fakat bitki kaynağı ve benzer kimyasal profiline göre farklı propolis türlerine uygun birçok standart belirlemek mümkündür (122). Şimdiye kadar bu durum yalnızca Avrupa, Asya ve Amerika, hatta Yeni Zelanda'daki ılıman bölgelerde kimyasal olarak baskın propolis türü olan poplar cinsi

propolise uygulanmıştır (122, 154-158). Öte yandan tropikal propolis bitki kaynağı ve kimyasal bileşimi ile ilgili olarak çok daha fazla türde bulunmaktadır (10, 122).

4.1.6. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu

Kompleks yapısı dikkate alındığında propolis doğrudan, ham halde kullanılamaz (26, 34). Dolayısıyla çözücülerle yapılan ekstraksiyon ile saflaştırılması gerekir. Bu süreçte inert maddeler uzaklaştırılmalı, polifenolik kısımlar ise korunmalıdır (26).

Propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerini ekstrakte etmek için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır (145). Propolis ticari olarak uygun çözücüler ile ekstrakte edilir (34). Etanol ile ekstraksiyon reçineden arındırılmış polifenolik bileşenlerce zengin propolis ekstraktı elde etmek için özellikle uygundur (26). Bununla birlikte su (bu ekstraktlar büyük ihtimalle suda çok iyi çözünen fenolik asitleri içerir), metanol, hegzan, aseton, kloroform, diklorometan ve eter ile ekstraksiyon da ayrıca kullanılmaktadır (28, 34, 145).

Farklı metodlar ve çözücüler ile yapılan ekstraksiyonlar neticesinde propolisten, ayrı kimyasal bileşimler elde edilebilir (38). Birçok bakteri öldürücü bileşen inert maddeleri uzaklaştıran ve çözünmüş bileşikleri koruyan su veya etanolde çözünür. Propolisin bileşimi coğrafik kaynağının yanı sıra ekstraksiyon metoduna da bağlıdır. Dolayısıyla ekstraksiyon işleminde kullanılacak olan çözücü özenle seçilmelidir (34).

Değişik çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edebileceği için propolis ekstraksiyon metodları, propolisin aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle propolisin standardizasyonu zordur (15, 41). Biyolojik ölçümlerde çok daha yaygın olarak kullanılan ekstraktlar, farklı konsantrasyonlardaki etanol, metanol ve sudur (41).

Çözücünün türü ve konsantrasyonu propolis ekstraktlarının biyolojik aktivitesindeki çeşitliliğin bir diğer kaynağını temsil eder (159). Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin etanollü ekstraktı antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antikarsinogenik aktiviteler sergilemektedir (27).

Propolisin etanollü ekstraktı en yaygın şekilde kullanılmasına rağmen sulu ekstraktı ile ilgili çalışmalar da artmaktadır (29). Bununla birlikte etanol keskin tat, ters reaksiyonlar ve bazı kişilerde alkol intoleransı gibi birtakım dezavantajlara sahiptir (160). Etanollü ekstrakttan daha fazla flavanonlar ve flavonollerin yüksek

konsantrasyonunu içermesi nedeniyle çözücü olarak metanol de kullanılır. Ancak metanol çok zehirlidir ve bu durum kullanımını imkansız hale getirir (160, 161).

Bugüne dek propolisin sulu ekstraktının hem kimyasal hem de immunolojik karaciğer hasarı modellerinde hepatoprotektif aktivite, antiviral aktivite, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği ve polifenolik bileşiklerinin yüksek içeriğiyle birlikte iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (29). Bununla birlikte propolis uygulamasının uzun vadeli etkileri hakkında bilinenler azdır (25).

Propolis suda düşük çözünürlüğe sahiptir ve çalışmalar gerçekten de bu gibi türevlerinde az sayıdadır (162). Su ekstraktları daha basit bir bileşen profili sergiler (33). Propolis örnekleri sinnamik asit ve türevleri (*p*-kumarik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin); kafeoilkuinik asit türevleri [dikafeoilkuinik asit; 3-mono-O-kafeoilkuinik asit (klorojenik asit, ChA); 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit (3,4-diCQA); 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit (3,5-diCQA); 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit (4,5-diCQA) ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit (3,4,5-triCQA)]; kafeik asit (CA) ve diğerleri gibi fenolik asitler ve esterleri olarak yüklü ve nispeten polar bileşenlerini izole etmek için su ile ekstrakte edilmektedir (163).

Propolisin içindeki maddelerin çoğu lipofilik bileşiklerdir (30). Ham propolisin suda çözünen türevlerine nazaran propolisin etanollü ekstraktı flavonlar, flavonoller ve flavanonlar gibi flavonoid aglikon sınıfından lipofilik bileşikler yüksek oranda içerir (164-166). Lipofilik bileşikler etanol kullanarak ekstrakte etmek kolay olduğundan propolisin etanollü ekstraktı iyi bilinmektedir ve oldukça dikkat çekmektedir. Propolisin sulu ekstraktı ve kafeoilkuinik asitleri içeren başlıca bileşenlerinin ise daha yüksek antioksidan aktiviteye ve bazı enzimlere karşı yüksek inhibitör/aktivatör etkisine sahip olduğu bildirilmiştir (30).

Tüm bunların yanı sıra hidroetanolik çözeltiler (% 30-50 ağırlıktaki tincture olarak adlandırılan) propolisin en çok karşılaşılan ticari olarak hazırlanmış şeklidir (167). Ayrıca farmasötik ve kozmetik uygulamalara yönelik olarak propolis ekstraksiyonu için gliserin ve propilenglikol kullanılmaktadır (16, 130).

4.1.7. Propolisin Analizinde HPLC-DAD ve GC-MS Kullanımının Önemi

Kromatografik yöntemler kesin olarak çok daha geniş çapta uygulanan ve mükemmel ayırma yeteneği ve bileşiklerin aynı anda (eşzamanlı) çoklu analizindeki kabiliyetinden dolayı popüler metodlardır (168).

Propolisin tüm bileşenlerinin karakterizasyonu hem kalitatif hem de kantitatif kimyasal analizini kapsamaktadır (28). Propolisteki flavonoidler ve fenolik asitlerin analizi için spektrofotometri, TLC, GC-MS, HPLC, HPLC-MS, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-diyod array dedektör (HPLC-DAD) ve CE gibi birçok farklı metod geliştirilmiştir (31, 32, 168). Bunlar en güçlü analitik ayırma metodlarıdır (169).

Gaz kromatografisi ve özellikle HPLC gibi kromatografik teknikler her bir polifenolik bileşiğin profilini ve tanımlanmasını sağlar. Polifenolik bileşiklerin karakterizasyonundaki önemi nedeniyle dedeksiyon sistemlerine ayrı bir ilgi gösterilmiştir (28).

Dedeksiyon genel olarak, çoğu kez fotodiyod array dedektörü (PDA) kapsayan ultraviyole absorpsiyon ile yapılır (28). HPLC vasıtasıyla genel dedeksiyon (tespit, belirleme) çoğu kez DAD kullanan genellikle UV absorpsiyonun ölçümüne dayalıdır. UV-Görünür bölge spektrumu ve alıkonma zamanının her ikisinin birbirine uygunluğu ayrılmış analitlerin son derece kesin olarak tanımlanmasına yol açabilir. DAD aynı anda (eşzamanlı olarak) farklı dalga boylarındaki kromatogramları saptayabilir. Bu özellik bilhassa bir örnekteki polifenollerin farklı grupları karıştırıldığında ayırma sistemlerinin performansını önemli ölçüde artırır. Uygun dalga boyu seçildiğinde (maksimum absorbansta) tüm gruplar en yüksek hassasiyette belirlenebilir. Dedeksiyon dalga boyunun uygun seçilimi aynı zamanda çözünmemiş ya da zayıf çözünmüş piklerin miktar ölçümünü olanaklı hale getirebilir (48, 170). Bununla birlikte geleneksel yöntemlerin kullanımına bağlı olarak örnekler çok benzer bileşikler içerdiğinde spektrumlar çoğu kez sınırlandırılmıştır (48). Birleştirilmiş teknikler, özellikle kütle spektroskopisi rutin çalışmalarda artan bir şekilde kullanılmaktadır (28).

HPLC UV-absorblayan bileşiklerin ortaya çıkarılmasında güçlü bir araç iken, GC-MS uçucu maddelerin belirlenmesinde mükemmel bir tekniktir (33, 171). GC kusursuz bir ayırma sağlar, fakat flavonoidleri analiz için uygun hale getirmede genellikle analizden önce ekstra türevlendirme basamağına ihtiyaç vardır (32). Tüm bu metodlar

arasında, polifenolik bileşiklerin karakterizasyonu için HPLC ve beraberinde kullanılan MS, UV, DAD ya da PDA sistemleri kuşkusuz halen en geçerli ve güvenilir analitik tekniği temsil etmektedir (31, 32, 168). Bununla birlikte HPLC'nin uzun analiz süreleri, düşük ayırma gücü ve kolayca kirlenme sebebiyle kolon ömrünün kısa olması gibi bazı eksik yönleri vardır (172). Daha önceden rapor edilen çalışmalarda propolisin analizi yönünde çoğunlukla ham propolisin çok az örneğinde flavonoidlerin içerik ve miktarının belirlenmesi üzerine odaklanılmıştır. Başka bir deyişle çok az pratik uygulama ticari propolis ürünlerinin analizi amacıyla kabul görmüştür ve HPLC ile yapılan çalışmalar bile az sayıdadır (26, 32). Ayrıca çoğu analitik metod, karmaşık elüsyon yöntemleri içermektedir ve/veya uzun bir analiz süresi gerektirmektedir (32).

GC-MS ve HPLC analizleri propolisin kimyasal bileşiminin belirlenmesi amacıyla kullanılmasına rağmen, bileşimlerindeki farklılık nedeniyle HPLC ve GC analizi gibi kimyasal yöntemler ile farklı kıtaların propolisinin aktivitesini değerlendirmek zor görünmektedir. Bu suretle uygun biyolojik analizler farklı kaynaklardaki propolislerin en iyi değerlendirme yolu olacaktır (173).

4.1.8. Propolisin Biyolojik Aktivitesi

Propolis geleneksel tıpta (halk hekimliğinde) sağlığa yardımcı madde olarak eski çağlardan beri birçok ülkede kullanılmakta ve Doğu Avrupa ülkelerinde kapsamlı şekilde çalışılmaktadır (18). Propolisin biyolojik aktivitesi çok sayıda bileşeni bünyesinde bulundurmasından dolayı kimyasal kompozisyonu ile birlikte çeşitlilik göstermektedir (137, 159). İlginç şekilde kimyasal bileşimindeki farklılığa karşın tüm bölgelerdeki propolisler ılıman kuşaktan tropikal alana kadar uzanan benzer biyolojik özellikler sergilemektedir (8, 12, 174). Çok sayıda flavonoid, aromatik asit ve fenolik bileşiğin varlığının propolisin pek çok biyolojik ve farmakolojik aktivitesinden sorumlu olduğu öne sürülmüştür (22). Ancak tek bir propolis bileşeni toplam ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip değildir ve bundan dolayı propolisin genel biyolojik özellikleri kendi bileşenlerinin doğal karışımından ileri gelmektedir (41, 175).

Propolis ve içeriğindeki bileşenlerin antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antitümöral, antimikrobiyal, antihiperlipidemik, nöroprotektif, antibakteriyel, antifungal, antiviral, sitotoksik, hepatoprotektif, antimutajenik, antikanser ve immünmodülatör

aktiviteleri içeren çok sayıda biyolojik etki sergilediği yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir (5, 17, 30, 41, 95, 162, 163, 174-187).

4.1.9. Propolisin Kullanım Şekilleri ve Kullanım Alanları

Propolis insanlığın ilk çağlarından beri hem internal hem de eksternal olarak geleneksel tıpta (halk hekimliğinde) kullanılmaktadır ve bu doğal ürüne zamanla Mısırlılar, Araplar, Yunanlılar ve diğer medeniyetler arasında ilgi gösterilmiştir (24, 41, 188). Yakın geçmişte propolis Amerika, Avrupa, Brezilya, Tayvan ve Japonya'yı kapsayan dünyanın değişik bölgelerinde bir gıda takviyesi olarak sağlığı desteklemek ve yaşlanma, inflamasyon, kalp hastalıkları, diyabet ve kanser gibi hastalıkları engellemek amacıyla oldukça popülerlik kazanmıştır (22, 23, 189, 190).

Propolis değerli bir tedavi edici ve sağlığı destekleyici madde olarak nitelendirilir ve çok defa ticari ürün formülasyonlarının içine sağlığa yararlarından dolayı dahil edilmektedir. Kimyasal standardizasyonu kalite ve fayda sağlaması için önkoşuldur. Propolisin standardizasyonu doğal kimyasal karmaşıklığı ve değişkenliği nedeniyle merak uyandırmaktadır (123, 134). Dolayısıyla propolisin içeriğinin belirlenmesi standardize etmek için kıymetli bir araç olmasının yanısıra, olağanüstü sağlığa faydaları olabilecek kemotipine yönelik kimyasal bir işaret sağlamaktadır (134). Propolisin tıbbi uygulamaları kaynağının yanısıra kimyasal bileşimine yönelik önemin artmasına yol açmıştır (191).

Son on yıldır propolis insan sağlığını korumak ve doğal bağışıklığı arttırmak amacıyla çok yönlü biyolojik ve farmakolojik etkilerinin sonucu olarak tıp, kozmetik ve gıda endüstrisinin yanısıra halk arasında da geniş ölçüde kullanılmaktadır (19, 22, 150, 192, 193). Aynı zamanda propolis mumun uzaklaştırılmasıyla saflaştırılmış ürün şeklinde ticari olarak piyasada bulunmaktadır (35). Son dönemlerde propolis çözeltisi (tincture) ve ekstraktları diş hijyeni ürünleri, antibakteriyel sabunlar, immün sistemi destekleyiciler, anti-romatizmal ilaçlar (koruyucular), yüz kremleri, merhemler, losyonlar ve solüsyonlar gibi çok sayıda nutrasötik, farmasötik ve kozmetik uygulamalarda kullanılmıştır (8, 194). Propolis tabletler, kapsüller, diş macunları, ağız gargaraları gibi farklı şekillerde marketlerde de bulunabilmektedir (8).

Propolisin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi biyoaktif gıda paketlemesinin formülasyonunda elverişli bir unsur meydana getirir. Propolis et ürünlerinde kimyasal

koruyucu olarak, gıda ambalajlamada ise mikroorganizma ve böcek öldürücü olarak kullanılmaktadır (195).

Günümüzde propolis bir inovatif (yenilikçi, yaratıcı) koruyucu ve biyoaktif gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (196). Propolisin fenolik bileşiklerinin yüksek konsantrasyonunun öncelikli olarak acılık ve burukluktan sorumlu olduğu bildirilmiştir, ancak keskin ve hoş gitmeyen tadı diğer gıdalar ile birleşince duyuşal özellikleri değiştirir (196, 197). Keskin ve buruk tadı nedeniyle propolis tüketiciler tarafından güçlölkle kabul görmüştür (196).

Propolis düşük dozlarda güvenilir olarak nitelendirilir (35). Burdock'a göre propolis toksik değildir ve insanlar için güvenli konsantrasyonunun 1.4 mg/kg vücut ağırlığı/gün veya yaklaşık olarak 70 mg/gün olabileceğini önermektedir (8). Bununla birlikte yan etkilerine 15 g/gün'ün üzerindeki dozlarda sıkça rastlanmaktadır. En yaygın tecrübe edilmiş yan etkiler deri ya da mukoza membranlarının tahriş gibi allerjik reaksiyonlardır. Egzema ve ürtikerli (kurdeşen) hastalarda ve astımı olan kişilerin tedavisinde kullanımına dikkat edilmelidir (35).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar marka ve modelleri ile birlikte Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Kullanılan Cihazlar	Marka/Model
HPLC	Agilent 1100 Series
DAD	AGILENT MWD TO DAD UPGRADE KIT Cat No: AGT-G1366A
GC-MS	Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Derin dondurucu (-20 °C)	Altus
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo
Hassas terazi	METTLER TOLEDO AB204-S
Vorteks	IKA® VORTEX GENIUS 3
Çalkalayıcı inkübatör	Biolab SHEL Lab Shaking Incubator
Santrifüj	eppendorf Centrifuge 5804 R
Manyetik karıştırıcı	TERMAL (İkamag rh)
pH metre	Hanna Instruments HI 2211
Etüv	Ecocell
Liyofilizatör	Telstar Cryodos
Evaporatör	Heidolph Heizbad Hei-VAP

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler/ Malzemeler	Satın Alınan Firma
Kafeik asit fenetil ester (CAPE), ≥ 97 % (HPLC), toz	Sigma
Kafeik asit, ≥ 98.0 % (HPLC), kristal	Aldrich
<i>p</i> -kumarik asit, ≥ 98.0 % (HPLC)	Sigma
Naringin, ≥ 95 % (HPLC)	Sigma
Apigenin, ≥ 95.0 % (HPLC)	Sigma
Kaempferol, ≥ 97.0 % (HPLC)	Sigma
Pinosembrin, analitik standart, 95% (TLC), katı	Fluka

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler (Devam)

Kullanılan Kimyasal Maddeler/ Malzemeler	Satın Alınan Firma
Mirisetin, ≥ 96.0 % (HPLC)	Sigma
Galangin, flavonoid içeren otofajı	Sigma
Kuersetin, $\geq 95\%$ (HPLC), katı	Sigma
Naringenin, $\geq 95\%$	Aldrich
Klorojenik asit, ≥ 95.0 % (titrasyon)	Aldrich
trans-sinamik asit, ≥ 99.0 %	Aldrich
3,4,5-trikafeoilkuinik asit, > 98 % by HPLC	Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.
3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, ≥ 85 % (LC/MS-ELSD)	Santa Cruz Biotechnology
3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, ≥ 90 % (LC/MS-ELSD)	Sigma
4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, ≥ 85 % (LC/MS-ELSD)	Sigma
Etanol, CHROMASOLV [®] , absolut, HPLC için, $\geq 99.8\%$	Sigma-Aldrich
Asetik asit, (Glasial asetik asit), (ACS reagent, ≥ 99.7 %	Sigma-Aldrich
Asetonitril, CHROMASOLV [®] Plus, ≥ 99.9 % (HPLC)	Sigma
Piridin, CHROMASOLV [®] Plus, HPLC için, ≥ 99.9 %	Sigma-Aldrich
N,O-Bis (trimetilsilil) trimetilklorosilan ile trifloroasetamid (1 mL, 1% TMCS içeren, 99% (TMCS hariç)	Fluka
Enjektör (Steril Şırınga)	Sky Inject
1.5 mL'lik plastik tüp	Eppendorf
Pipet ucu (Hacim: 100-1000 μ l)	HTL
Pipet ucu (Hacim: 1-200 μ l)	HTL
Pipet ucu (Hacim: 0.5-10 μ l)	HTL
C18 kolon, ODS-2 HYPERSIL, Dim. (mm) 250x4.6	Thermo Scientific
Guard kolon tutucu	Macherey-Nagel
Symmetry C18 koruyucu kolon, 100Å, 5 μ m, 3.9 mm X 20 mm	Waters
Kartuş ve koruyucu kolon için tutucu kit	Waters
Rtx-1 kolon (Lenght: 30 m, ID: 0.25 mm)	Restek
Rtx-5ms kolon (Lenght: 30 m, ID: 0.25 mm)	Restek
Vidalı kapak 2 mL'lik cam vial	Agilent Technologies
Mavi vidalı kapak, PTFE/kırmızı silikon septa	Agilent Technologies
Enjektör filtresi, Membran: Naylon, Çap: 13 mm, Gözenek büyüklüğü: 0.2 μ m	Agilent Technologies
Konik cam insert (100 μ L'lik)	Agilent Technologies

5.2. Yöntemler

Çalışmamızın ekstrakt ve standart hazırlama kısımları ile HPLC analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda, türevlendirme ve GC-MS analizleri ise Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu tez çalışması, "Türk Propolisinin Sulu ve Etanollü Ekstraktının HPLC ve GC-MS ile Karakterizasyonu" başlıklı, 113S805 kodlu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklendi.

5.2.1. Propolisin Kaynağı

Propolis örnekleri Trabzon, Erzurum, Zonguldak ve Adıyaman illerindeki üreticiler tarafından toplanarak Fanus Gıda Ticaret A.Ş. (Trabzon) firması vasıtasıyla teslim alındı.

5.2.2. Türk Propolisinin Sulu ve Etanollü Ekstraktlarının Hazırlanması

Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanarak buzdolabında -20 °C'de dondurulan doğal propolis örnekleri rendelendi ve tekrar -20 °C'de donduruldu. Rendelenen propolis örnekleri blendırda toz haline getirilerek, tozlar bir karışım şeklinde birleştirildi. Böylece Türk propolisi adı verilen karma propolis örneği elde edilmiş oldu. Bu örnekten hassas terazide 0.5'er g tartılıp 50 mL'lik iki ayrı cam şişeye aktarıldı. Her bir cam şişeye 20'şer mL deiyonize su ve etanol ilave edilerek iki ayrı çözücü ile muamele edilen propolis örnekleri vortekslendi ve çalkalayıcı inkübatörde 60 °C'de 150 rpm'de 24 saat süreyle çözünmesi için sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası propolis ekstraktları 4 000 rpm (2 057 g)'de 10 dakika santrifüjlendi ve süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Böylece 25 mg/mL'lik sulu ve etanollü stok Türk propolisi ekstraktları hazırlandı ve gerekli denemeler ve analizlerde kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de karanlıkta saklandı.

5.2.3. HPLC-DAD Analizleri

5.2.3.1. Standartların Hazırlanması

HPLC ile analizde kullanılan standart maddeler sulu ve etanollü propolisin içeriğinde en fazla bulunabilecek bileşiklerden seçilerek toplam 17 standart belirlendi. Bu standartlar 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, klorojenik asit, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, apigenin, mirisetin, kaempferol, kuersetin, galangin, krisin, naringin, trans-sinamik asit, pinosembirin ve naringenin olarak kararlaştırıldı. Çözünme durumlarına göre bu standart maddelerden 10'ar mg tartılarak kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, apigenin, mirisetin, kaempferol, kuersetin, galangin, krisin, naringin, trans-sinamik asit, pinosembirin ve naringenin % 100'lük metanolle, 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit % 50'lik metanolle, klorojenik asit % 40'lık metanolle, 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit deiyonize su ile çözölüp ilgili çözücölüleriyle 10'ar mL'ye tamamlanarak 1 000 µg/mL'lik ana stok standart çözeltileri hazırlandı. Tüm ana stok standart çözeltileri 0.2 µm'lik membran filtreden geçirildi. Ardından seçilen 17 standartın alıkönma zamanlarının belirlenebilmesi amacıyla 1 000 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.

5.2.3.2. HPLC-DAD ile Analiz Koşullarının Belirlenmesi

Analiz koşulları Villiers ve ark. (198) uyguladıkları yöntem modifiye edilerek belirlendi (199). Bu metoda göre mobil fazlar hazırlanarak 0.45 µm'lik membran filtreden geçirildi. Daha sonra mobil fazların tam çözünmesini sağlamak ve çözücölüleri degaz etmek amacıyla 30 dakika boyunca ultrasonik banyo kullanılarak aşağıda belirlenen kromatografik koşullara göre HPLC-DAD cihazında analizler yapıldı. Kromatografik analiz koşulları ve dalga boyları nanometre (nm) cinsinden aşağıdaki şekilde belirlendi.

Kolon: Thermo RP18

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

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

Asetonitril (çözücü C)

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Dalga boyu: 265 nm, 280 nm, 290 nm, 320 nm, 360 nm

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

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

Çalışma süresi: 55 dakika

% 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 5'te verilen şekilde uygulandı.

Tablo 5. 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).

5.2.3.3. Standartların, Sulu ve Etanollü Türk Propolisi Ekstraktlarının HPLC-DAD ile Analizi

Ana stok standartların her birinin % 40'lık metanolla hazırlanan 10 µg/mL'lik standart çözeltileri Agilent 1100 Series markalı HPLC cihazında, literatürde yer alan (26, 28, 51), maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyları seçilip, farklı beş dalga boyunda DAD ile çalışılarak her bir standart pikinin alıkonma zamanları belirlendi. Daha sonra ana stok standartların tümünü içerecek şekilde 2.5, 5, 10, 25 ve 50 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda hazırlanan karışımlar HPLC cihazında analiz edildi ve beş farklı dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. Alıkonma zamanları belirlenen standart piklerine göre farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tüm standartların karışımı vasıtasıyla her bir standart için kalibrasyon grafiği çizildi.

HPLC-DAD ile analiz için sulu ve etanollü Türk propolisi ekstraktları analizden önce 0.45 µm'lik membran filtreden geçirildi. Analize uygun hale getirilen sulu ve etanollü Türk propolisi ekstraktları da 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 ve etanollü Türk propolisi ekstraktlarının verimi (Çözücüde çözülen propolis miktarı x 100 / Tartılan toplam propolis miktarı) de çalışılarak hesaplandı. Sulu ve etanollü Türk propolisi ekstraktlarının verimi sırasıyla % 20 ve % 90 olarak bulundu. Dolayısıyla % verim dikkate alındığında sulu ve etanollü Türk propolisi ekstraktındaki tüm değerler ve sonuçlar Tablo 8 ve Tablo 9'a en son şekliyle yansıtıldı.

5.2.4. GC-MS Analizleri

5.2.4.1. Türevlendirme

Bu aşamada Türk propolisinin etanollü ekstraktı 0.45 µm'lik membran filtreden süzöldükten sonra türevlendirme işlemi için evaporatörde vakum altında 50 °C'nin aşağısında kuruluğa kadar uçuruldu. Kuru ekstraktın 7 mg'ı 350 µL piridin + 700 µL bis-trimetilsilil trifloroasetamid (BSTFA) karışımı ve % 1 trimetilklorosilan (TMCS) ile reaksiyona sokulan örnekler, 100 °C'de 30 dakika bekletmeye uygun viallerde gaz kromatografisi için hazırlandı. Türk propolisinin sulu ekstraktı da aynı şekilde 0.45 µm'lik membran filtreden süzöldü ve -80 °C'de dondurulup, daha sonra liyofilizatörde

suyu uzaklaştırılarak kuru halde elde edilip gaz fazına geçebilecek şekilde türevlendirmeye uygun hale getirildi.

5.2.4.2. Rtx-1 ve Rtx-5ms Kapiller Kolon ile GC-MS Analizi

Tüm analizler Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra markalı GC-MS cihazında kütle spektrometresi (MS) alev iyonizasyon dedektörü (FID) (70 eV) ile birlikte kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler için kromatografik kolonlar olan Rtx-1 ve Rtx-5ms kapiller kolonlar (30 m) ve taşıyıcı gaz olarak akış hızı 1 mL/dak olan helyum gazı kullanıldı. Enjeksiyon split modda 250 °C’de uygulandı. Türevlendirilen sulu ve etanollü Türk propolisi örnekleri enjeksiyon hacmi 2 µL olarak belirlenip, cihaza enjekte edildi ve kolon başlangıçta 2 dakika 60 °C’de tutuldu, sonra dakikada 3 °C’lik artışla 240 °C’ye yükseltildi. Toplam analiz süresi 62 dakika olarak belirlendi. Ayrılmış bileşiklerin bağıl yüzde miktarı bilgisayarlı integratör ile toplam iyon kromatogramlarından hesaplandı. Tüm bileşenler Nist ve Wiley kütüphaneleri kullanılarak tanımlandı.

6. BULGULAR

6.1. HPLC-DAD Analizleri

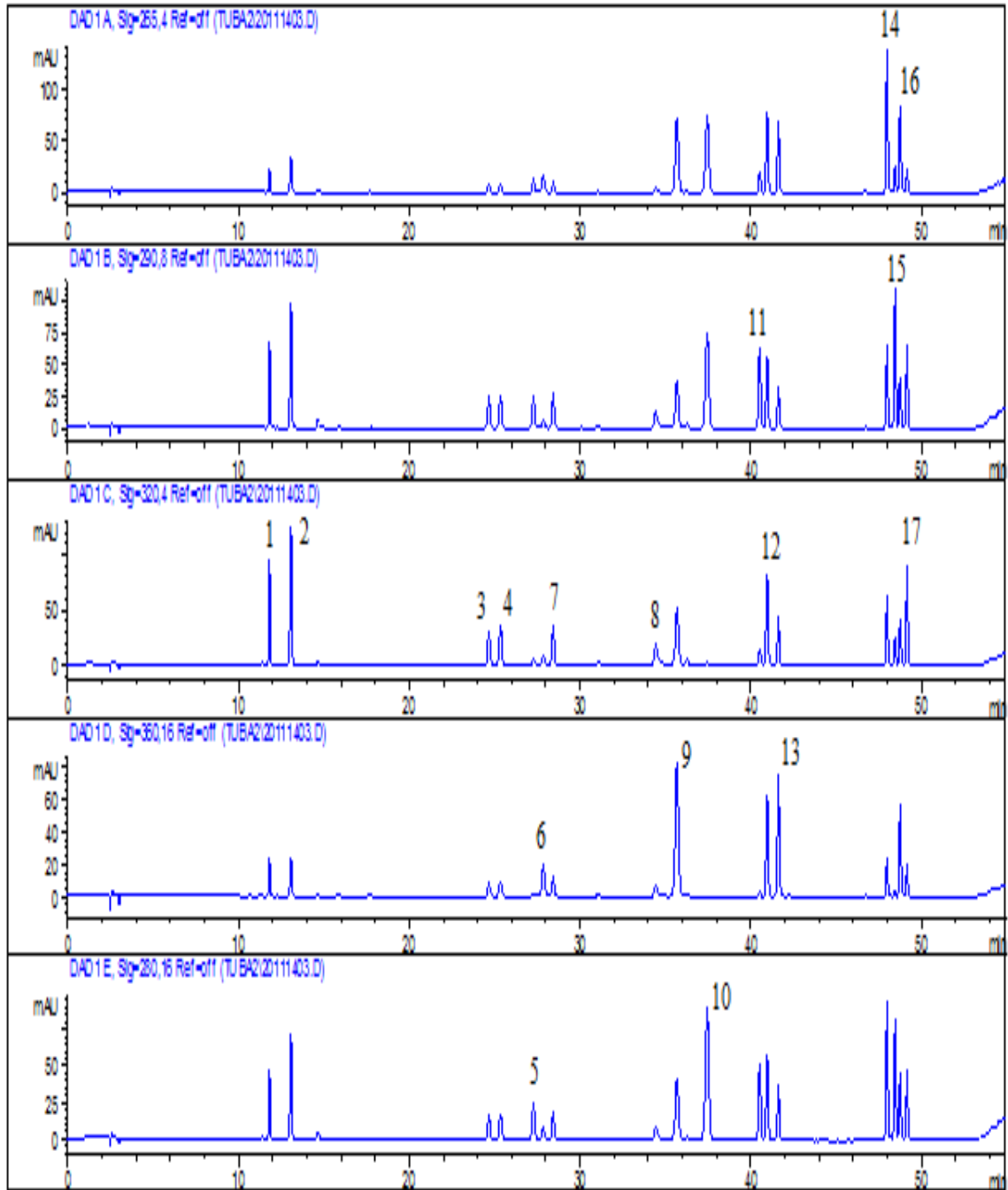
6.1.1. Standartların HPLC-DAD ile Analizi

Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC-DAD ile maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları okunan beş dalga boyu içinden seçilerek Tablo 6’da verildi.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC-DAD ile maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları

Bileşik No	Bileşik İsmi	Maksimum Dalga Boyu (nm)
1	Klorojenik asit	320
2	Kafeik asit	320
3	4,5-di-O-kafeoilkuinik asit	320
4	3,5-di-O-kafeoilkuinik asit	320
5	Naringin	280
6	Mirisetin	360
7	3,4-di-O-kafeoilkuinik asit	320
8	3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit	320
9	Kuersetin	360
10	Trans-sinamik asit	280
11	Naringenin	290
12	Apigenin	320
13	Kaempferol	360
14	Krisin	265
15	Pinosembrin	290
16	Galangin	265
17	Kafeik asit fenetil ester	320

Yapılan tüm analizler neticesinde çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC-DAD ile belirlenen pikleri Şekil 13’te gösterildi.



Şekil 13. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının HPLC-DAD ile belirlenen pikleri (1: klorojenik asit, 2: kafeik asit, 3: 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 4: 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 5: naringin, 6: mirisetin, 7: 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 8: 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit, 9: kuersetin, 10: trans-sinamik asit, 11: naringenin, 12: apigenin, 13: kaempferol, 14: krisin, 15: pinosebrin, 16: galangin, 17: kafeik asit fenetil ester)

Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının kalibrasyon grafiklerinden elde edilen 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 7’de verildi.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının kalibrasyon grafiklerinden elde edilen alıkonma zamanları, regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları, % BSS, LOD ve LOQ değerleri

Bileşik No	Bileşik İsmi	Alıkonma Zamanı (Dakika)	Regresyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı	% BSS (Alan)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	Klorojenik asit	11.813	$Y=45.896X-4.66$	0.9967	1.458	0.373	1.245
2	Kafeik asit	13.067	$Y=87.661X-18.527$	0.9952	1.829	0.497	1.655
3	4,5-di-O- kafeoilkuinik asit	24.662	$Y=25.111X-12.05$	1	2.947	0.884	2.948
4	3,5-di-O- kafeoilkuinik asit	25.340	$Y=49.586X-9.55$	1	1.078	0.324	1.079
5	Naringin	27.272	$Y=24.91X+0.637$	0.9979	1.673	0.448	1.492
6	Mirisetin	27.845	$Y=54.016X-99.099$	0.9996	1.206	0.386	1.286
7	3,4-di-O- kafeoilkuinik asit	28.424	$Y=38.169X-25.85$	0.9929	1.739	0.528	1.760
8	3,4,5-tri-O- kafeoilkuinik asit	34.422	$Y=47.26X-53.614$	0.9996	2.995	0.892	2.973
9	Kuersetin	35.670	$Y=60.978X-185.38$	0.9953	1.093	0.358	1.192
10	Trans-sinamik asit	37.439	$Y=130.25X+26.669$	0.9986	1.264	0.336	1.118
11	Naringenin	40.520	$Y=58.406X-20.871$	0.9997	0.600	0.171	0.570
12	Apigenin	40.953	$Y=66.369X-23.919$	0.9981	0.648	0.191	0.636
13	Kaempferol	41.611	$Y=62.683X-41.648$	0.9994	1.365	0.381	1.269
14	Krisin	47.974	$Y=93.669X-61.048$	0.9965	2.816	0.757	2.524
15	Pinosembrin	48.447	$Y=73.832X-60.166$	0.9991	0.261	0.072	0.239
16	Galangin	48.744	$Y=67.682X-69.854$	0.9984	4.053	1.116	3.721
17	Kafeik asit fenetil ester	49.145	$Y=59.521X-23.245$	0.9994	2.729	0.769	2.563

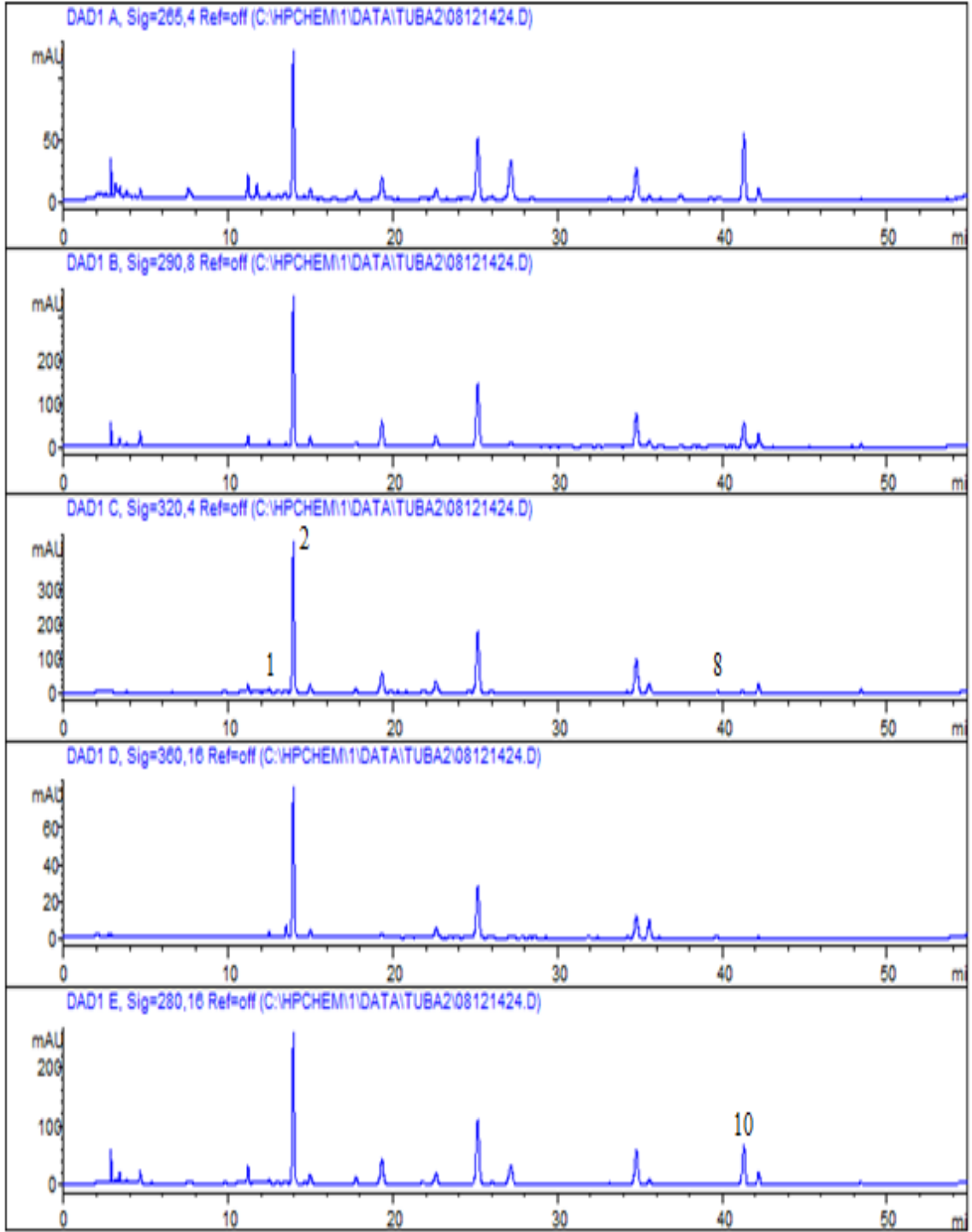
*: Regresyon denkleminde yer alan Y standartın pik alanını, X ise numune miktarını göstermektedir.

Tüm polifenol ve kafeoilkuinik asit standartlarının kalibrasyon grafikleri Ek 9.1’de verildi.

Sulu ve etanollü Türk propolisi ekstraktlarındaki polifenol miktarları, HPLC-DAD ile kromatogramları (Şekil 14 ve Şekil 15) elde edildikten sonra Tablo 7’deki regresyon denklemleri kullanılarak ve ekstraktların % verim hesabı dikkate alınarak hesaplandı (Tablo 8 ve Tablo 9). % BSS ise 10 µg/mL’lik her bir standartın regresyon denkleminde hesaplanan miktarlarının standart sapma değeri ve ortalama değerinin oranı alınarak belirlendi ($\% \text{ BSS} = \frac{\text{Standart Sapma} \times 100}{\text{Aritmetik Ortalama}}$). 10 µg/mL’lik her bir standartın LOD değeri ($\text{LOD} = \text{Standart Sapma} \times 3$) ve LOQ değeri ($\text{LOQ} = \text{Standart Sapma} \times 10$) de standart sapma değeri ile çarpımı sonucunda hesaplandı.

6.1.2. Sulu Türk Propolisi Ekstraktının HPLC-DAD ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Sulu Türk propolisi ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramları Şekil 14’te gösterildi.



Şekil 14. Sulu Türk propolisi ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramları (1:klorojenik asit, 2: kafeik asit, 8: 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit, 10: trans-sinamik asit)

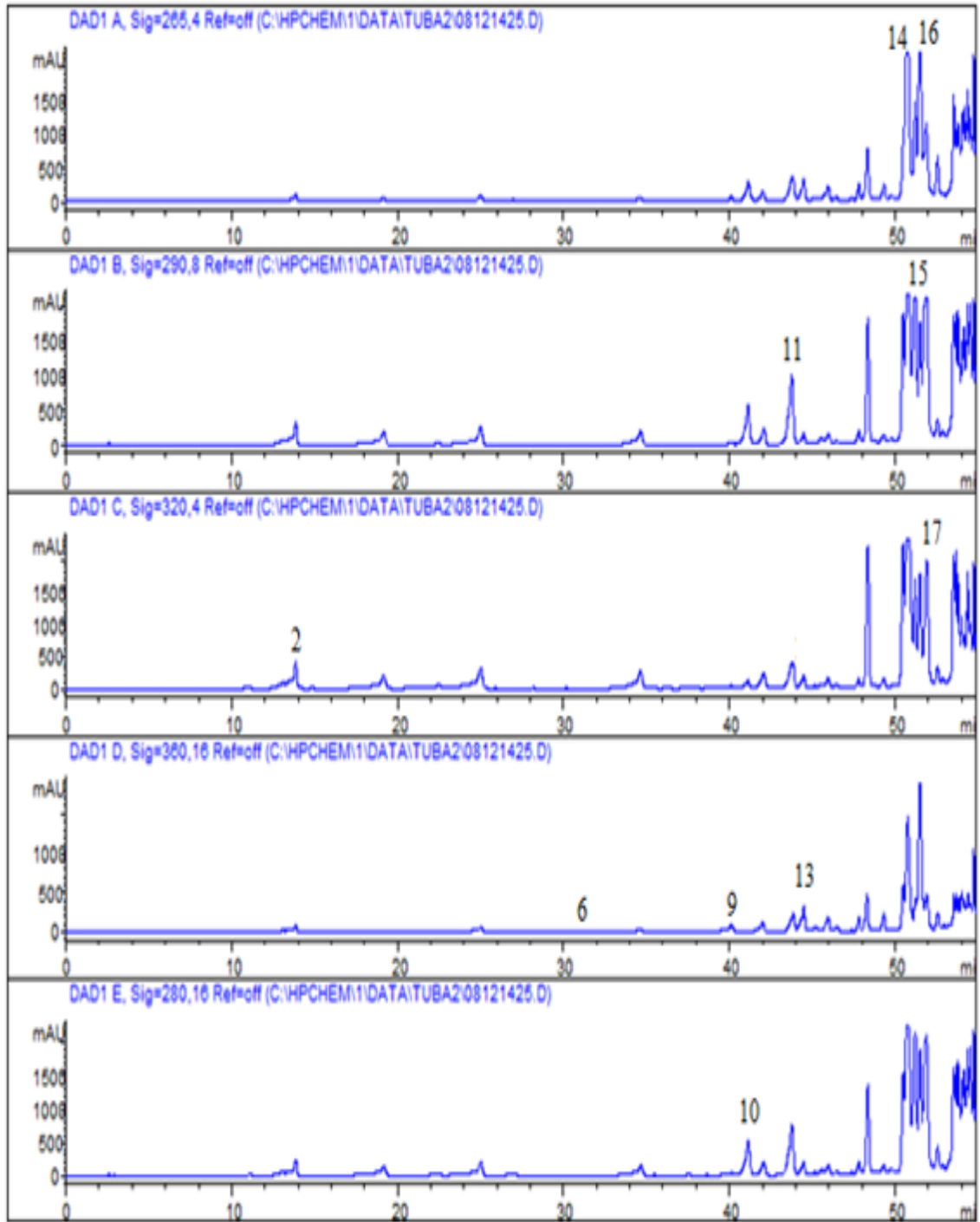
Sulu Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol ve kafeoilkuinik asit bileşikleri ve miktarları Tablo 8’de verildi.

Tablo 8. Sulu Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol ve kafeoilkuinik asit bileşikleri ve miktarları

Bileşik No	Bileşik İsmi	Miktarı (µg / mL)
1	Klorojenik asit	10.20
2	Kafeik asit	204.00
8	3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit	7.75
10	Trans-sinamik asit	28.90

6.1.3. Etanollü Türk Propolisi Ekstraktının HPLC-DAD ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Etanollü Türk propolisi ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramları Şekil 15’te gösterildi.



Şekil 15. Etanollü Türk propolisi ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen kromatogramları (2: kafeik asit, 6: mirisetin, 9: kuersetin, 10: trans-sinamik asit, 11: naringenin, 13: kaempferol, 14: krisin, 15: pinosembrin, 16: galangin, 17: kafeik asit fenetil ester)

Etanollü Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol bileşikleri ve miktarları Tablo 9’da verildi.

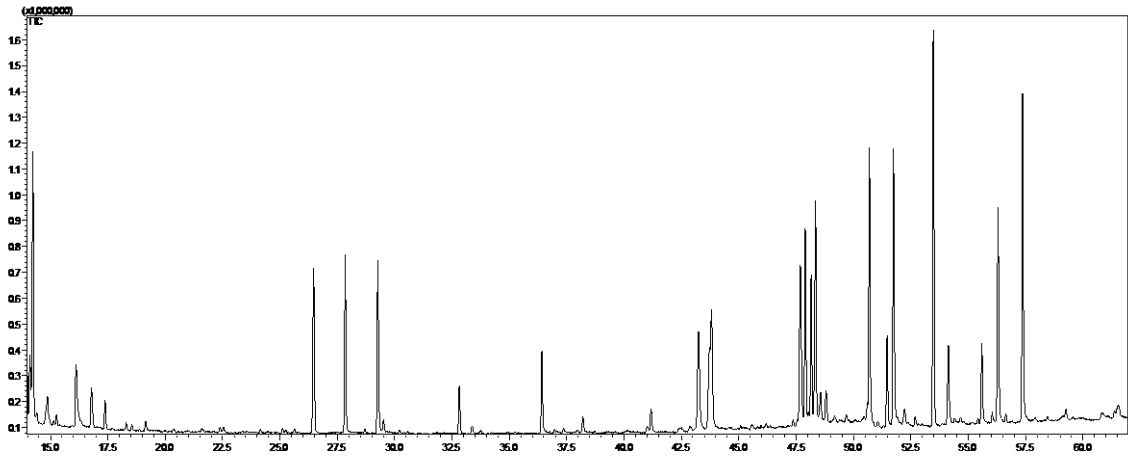
Tablo 9. Etanollü Türk propolisi ekstraktında bulunan polifenol bileşikleri ve miktarları

Bileşik No	Bileşik İsmi	Miktarı (µg / mL)
2	Kafeik asit	66.00
6	Mirisetin	2.32
9	Kuersetin	40.69
10	Trans-cinnamic acid	91.49
11	Naringenin	372.39
13	Kaempferol	98.72
14	Krisin	641.33
15	Pinosembrin	572.67
16	Galangin	534.11
17	Kafeik asit fenetil ester	630.67

6.2. GC-MS Analizleri

6.2.1. Sulu Türk Propolisi Ekstraktının GC-MS ile Analizi

Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı Şekil 16’da gösterildi.



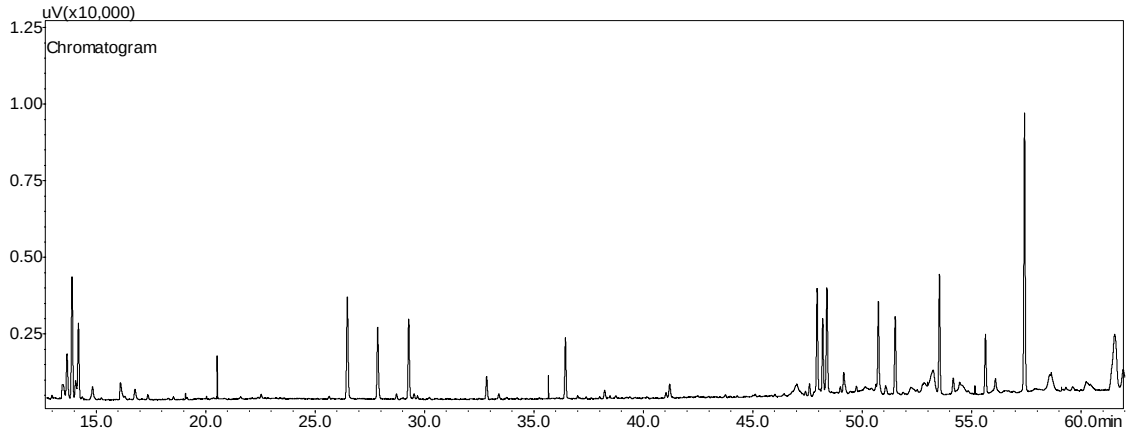
Şekil 16. Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı

Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler Tablo 10’da verildi.

Tablo 10. Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler

Bileşikler	Alıkonma Zamanı	% Alan
N-etil,N-vinilasetamid	14.098	1.57
N-(trimetilsilil)-L-Norvalin	14.228	6.50
N,N-dietil-1,1,1-trimetilsililamin	14.861	0.33
N,N-dietil-Asetamid	16.109	2.00
N-etil-Asetamid	16.782	1.13
Benzoik asit	26.465	4.39
2,2,8,8-tetrametil-5-[(trimetilsilil)oksi]-3,7-Dioksa-2,8-disilanonan	27.845	4.10
Bütandioik asit	29.268	4.06
Hidrokinon	32.818	1.15
[(trimetilsilil)oksi]-Bütandioik asit	36.416	1.78
D-Psikofuranoz (izomer 1)	43.720	2.42
β -D-(-)-Tagatopiranoz	43.808	3.99
α -D-(+)-Talopiranoz	47.686	4.94
D-(-)-Fruktofuranoz (izomer 1)	47.898	4.12
D-(-)-Fruktofuranoz (izomer 2)	48.154	3.14
1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-D-Fruktoz	48.345	5.77
6-metoksi-5-(fenilmetoksi)-1H-Indol	48.562	0.79
1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- β -D-Galaktopiranoz	50.696	6.39
1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- β -D-Glukopiranoz	53.483	8.98
4-metoksi-3-(trimetilsiloksi)-Sinnamik asit	55.592	1.92
Trimetilsilil 3,4-bis(trimetilsiloksi)sinnamat	57.372	7.77

Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı Şekil 17’de gösterildi.



Şekil 17. Sulu Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı

Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler Tablo 11’de verildi.

Tablo 11. Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler

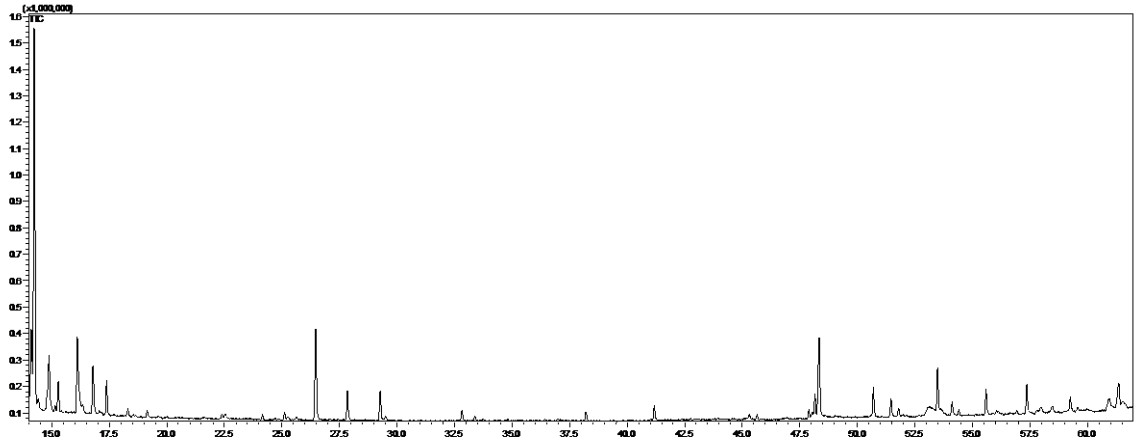
Bileşikler	Alınma Zamanı	% Alan
Hidratlanmış formaldehit	11.619	0.32
N-(trimetilsilil)asetamid	12.441	0.72
Etilbis(trimetilsilil)amin	13.876	8.65
N-etil,N-vinilasetamid	14.041	0.93
N-(trimetilsilil)-L-Norvalin	14.169	4.32
Triizopropilsilan	14.347	0.17
N,N-dietil-1,1,1-trimetilsililamin	14.815	0.76
N,N-dietil-Asetamid	16.078	1.20
2-[(trimetilsilil)oksi]-Propanoik asit	18.509	0.16
[(trimetilsilil)oksi]-Asetik asit	19.137	0.13
trimetil(fenilmetoksi)-Silan	22.522	0.20
trimetil(2-feniletoksi)-Silan	25.625	0.14
Benzoik asit	26.458	5.44
2,2,8,8-tetrametil-5-[(trimetilsilil)oksi]-3,7-Dioksa-2,8-disilanonan	27.840	4.64
Prolin	28.704	0.16
Bütandioik asit	29.262	5.15
Trimetilsilil 2-asetoksiasetat	29.509	0.31
Hidrokinon	32.824	1.25
Benzenpropanoik asit	33.377	0.20

Tablo 11. Sulu Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler (Devam)

Bileşikler	Alıkonma Zamanı	% Alan
O-(trimetilsilil)-Malik asit	36.424	2.64
3-fenil-2-Propenoik asit	38.212	0.25
2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-Guloz	47.392	0.23
metil 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- α -D-Glukofuranozid	47.576	0.50
D-(-)-Fruktofuranoz (izomer 1)	47.924	6.24
D-(-)-Fruktofuranoz (izomer 2)	48.179	4.56
D-(-)-Fruktopiranoz (izomer 1)	48.371	7.48
1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-D-Glukopiranoz	48.984	0.27
metil 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- α -D-Glukofuranozid	49.142	1.52
Kuinik asit	49.714	0.23
D-(+)-Galaktopiranoz (izomer 1)	50.723	6.76
1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-D- Glukopiranoz	51.063	0.36
1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- α -D-Mannopiranoz	53.514	8.57
3,4-dimetoksi-Sinamik asit	54.153	0.47
4-metoksi-3-(trimetilsiloksi)-Sinamik asit	55.621	1.70
Ferulik asit	56.075	0.27
Trimetilsilil 3,4-bis(trimetilsiloksi)sinnamat	57.404	9.54
N-etil-Asetamid	61.553	2.59

6.2.2. Etanollü Türk Propolisi Ekstraktının GC-MS ile Analizi

Etanollü Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı Şekil 18’de gösterildi.



Şekil 18. Etanollic Türk propolisi ekstraktının Rtx-1 kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı

Etanollic Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler Tablo 12’de verildi.

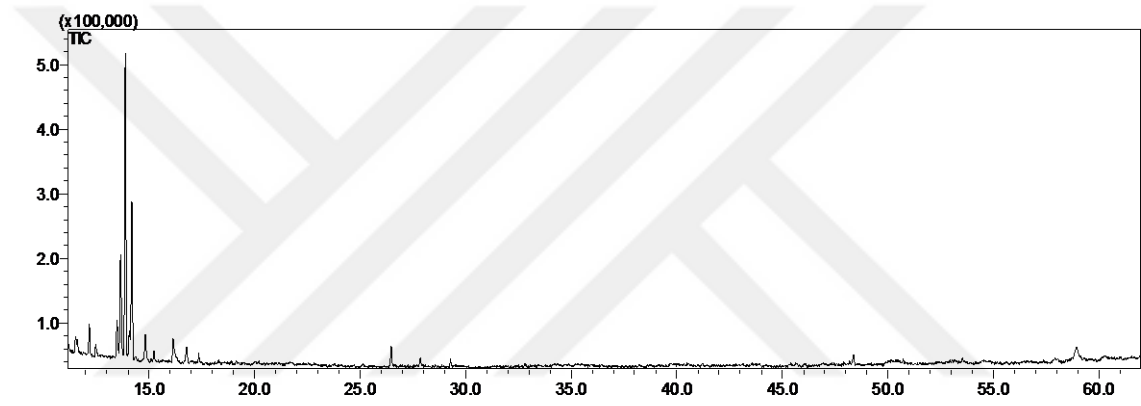
Tablo 12. Etanollic Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler

Bileşikler	Alıkonma Zamanı	% Alan
N-etil,N-vinilasetaid	14.108	5.61
N-(trimetilsilil)-L-Norvalin	14.242	28.94
N,N-dietil-1,1,1-trimetilsililamin	14.880	5.86
1,2-Bis(trimetilsiloksi)etan	15.283	2.23
N,N-dietil-Asetamid	16.105	8.76
2-metil-(E)-2-Bütenoik asit	16.365	0.78
N-etil-Asetamid	16.792	4.50
Benzoik asit	26.470	7.64
2,2,8,8-tetrametil-5-[(trimetilsilil)oksi]-3,7-Dioksa-2,8-disilanonan	27.847	2.24
Bütandioik asit	29.270	2.31
Hidrokinon	32.825	0.61
3-fenil-2-Propenoik asit	38.209	0.66
D-(-)-Tagatofuranoz (izomer 1)	47.901	0.45
p-metoksi-Sinamik asit	48.025	0.41
D-Psikofuranoz (izomer 1)	48.158	1.65
D-Psikopiranoz (izomer 2)	48.342	8.09
D-(+)-Galaktopiranoz (izomer 1)	50.699	2.02
6-metoksi-5-(fenilmetoksi)-1H-İndol	51.463	1.13
β-Eudezmol	51.802	0.56

Tablo 12. Etanollü Türk propolisi ekstraktında Rtx-1 kolon kullanılarak bulunan bileşikler (Devam)

Bileşikler	Alıkonma Zamanı	% Alan
α -D-(+)-Talopiranoz	53.485	3.09
3,4-dimetoksi-Sinamik asit	54.112	1.02
4-metoksi-3-(trimetilsiloksi)-Sinamik asit	55.591	1.74
Kafeik asit	57.366	1.91
trans-9-Oktadekenoik asit	59.262	0.83

Etanollü Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı Şekil 19’da gösterildi.



Şekil 19. Etanollü Türk propolisi ekstraktının Rtx-5ms kolon kullanılarak GC-MS ile belirlenen kromatogramı

Etanollü Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler Tablo 13’te verildi.

Tablo 13. Etanollü Türk propolisi ekstraktında Rtx-5ms kolon kullanılarak bulunan bileşikler

Bileşikler	Alıkonma Zamanı	% Alan
Hidratlanmış formaldehit	11.608	1.56
N-(trimetilsilil)asetamid	12.473	1.31
N-(trimetilsilil)-Etanimidik asit	13.497	5.10
Etilbis(trimetilsilil)amin	13.888	33.54
N-Etil,N-vinilasetamid	14.065	3.68
N-(trimetilsilil)-L-Norvalin	14.181	18.12
N,N-Dietil-1,1,1-trimetilsililamin	14.827	3.46
1,2-Bis(trimetilsiloksi)etan	15.243	0.91
N,N-dietil-Asetamid	16.136	4.05
N-etil-Asetamid	16.777	2.07
Benzoik asit	26.476	2.39
2,2,8,8-tetrametil-5-[(trimetilsilil)oksi]-3,7-Dioksa-2,8-disilanonan	27.850	0.44
Bütandioik asit	29.278	0.77
D-(-)-Fruktopiranoz (izomer 1)	48.369	1.34

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Propolis (arı zımkı) bal arıları tarafından çeşitli bitki kaynaklarından toplanan, değışikliğı uğratılan ve kovandaki delikleri kapatmak, iç duvarları düzgünleştirmek, girişı yabancı istilacılara karşı korumak amacıyla kullanılan yapışkan, reçineli doğal bir arı ürünüdür (8, 180, 200). Propolis ilgi çekici biçimdeki bileşimi nedeniyle ilk çağlardan beri bilinmektedir, ancak bir gıda takviyesi olarak kullanılmasındaki ayrıcalıklı önemi yanında biyolojik, kozmetik ve tıbbi uygulamalara yönelik şekildeki halihazırda kullanımı sayesinde yeniden göz önüne alınmıştır (8, 201).

Propolis sağlığı desteklemek ve inflamasyon, kalp hastalıkları, diyabet, kanser gibi hastalıkları engellemek amacıyla Tayvan, Japonya, Brezilya, Amerika ve Avrupa'yı kapsayan dünyanın farklı ülkelerinde popülerlik kazanmıştır ve sağlıklı yiyecek ve içeceklerde geniş ölçüde kullanılmaktadır (104, 202, 203).

Propolisin bileşimi iklim, mevsim, konum ve yıla göre büyük ölçüde çeşitlilik gösterir ve bu nedenle kimyasal formülü sabit değildir (204). Coğrafi farklılıklar sebebiyle Avrupa, Güney Amerika ve Asya'ya ait propolis örnekleri değişik kimyasal bileşimlere sahiptir (18). Propolis polifenoller (flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri), terpenoidler, steroidler, şekerler ve aminoasitler gibi 300'ün üzerinde bileşen bulundurur (19, 205). Genel olarak flavonoidler ve fenolik bileşikler gibi polifenoller propolisin içeriğindeki en bol bulunan maddelerdir (206). Propolisin bileşenleri aynı zamanda toplandığı bölgenin bitki örtüsüne ve toplanma zamanına göre kalitatif ve kantitatif olarak değişkendir (10, 12, 123, 205).

Propolisin ve bileşenlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, hepatoprotektif, immünmodülatör, antitümör, nöroprotektif ve antimikrobiyal etkileri içeren biyolojik özellikleri ile ilgili çok sayıda bilimsel çalışma yayınlanmıştır (207). Ancak birçok araştırmacı Avrupa'da toplanan propolislerin biyolojik aktivitelerini belirlemiş olmasına rağmen Türk propolisi hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır (208). Propolisin biyolojik aktivitesi ile ilgili çalışmalar, örneğin kimyasal bileşimi ve bitkisel kaynağı ya da en azından coğrafi kökeni hakkındaki bilgiler yanında tamamlayıcı olmalıdır. Böylece bu biyolojik aktiviteler propolisin spesifik türleri ile ilişkilendirilebilirler (209).

Flavonoidler ve fenolik asitler gibi polifenoller propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan bileşiklerdir (25, 199, 210). Flavonoidler antioksidan aktiviteden

sorumludurlar ve bu aktivite temel olarak radikal süpürme etkisine dayalıdır (25, 210). Canlı sisteminde antioksidanların önemli fonksiyonundan biri lipidler, proteinler ve DNA'nın oksidasyonuna neden olan serbest radikalleri süpürmesi vasıtasıyla biyolojik membranlar ve enzimlerin yapısal hasarını ve bozukluğunu engellemesidir (211, 212). Dolayısıyla flavonoidler hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadırlar (25).

Çok yönlü biyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı propolis tıp, kozmetik ve gıda endüstrisinde geniş çaplı kullanıma sahiptir (22, 192). Son on yıldır propolis insan sağlığını korumak ve doğal bağışıklığı arttırmak amacıyla çok çeşitli biyolojik aktivitelerinin sonucu olarak yiyecek endüstrisi [içecekler, sağlıklı (doğal) besinler ve gıda takviyeleri], kozmetik ve alternatif tıp ürünlerinin (diş macunu, sabun, şurup ve şeker) yanısıra halk arasında da geniş ölçüde kullanılmaktadır (19, 150, 193).

Propolis standardizasyonu coğrafik ve bitkisel kökenindeki farklılıktan dolayı kimyasal bileşimindeki ve farmakolojik aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle gerçekten zordur (10, 153). Coğrafik kökeninin kontrolü propolis bileşiminin tutarlılığını sağlamak açısından oldukça önemlidir (129). Propolis için evrensel bir standardizasyon formüle etmek olanaksızdır, fakat bitki kaynağı ve benzer kimyasal profiline göre farklı propolis türlerine uygun birçok standart belirlemek mümkündür (122). Şimdiye kadar bu durum Avrupa, Asya ve Amerika, hatta Yeni Zelanda'daki ılıman bölgelerde kimyasal olarak baskın propolis türü olan poplar cinsi propolise uygulanmıştır (122, 154-158). Öte yandan tropikal propolis bitki kaynağı ve kimyasal bileşimi ile ilgili olarak çok daha fazla türde bulunmaktadır (10, 122).

Çin ve Avrupa propolis örnekleri çoğunlukla flavonoidlerin ve fenolik asit esterlerinin birçok çeşidini içerirken, Brezilya propolis örneklerinde terpenoidler, kafeoilkuinik asitler ve *p*-kumarik asitin prenillenmiş türevleri baskın olmaktadır (10, 28, 178). Bulgaristan, Türkiye, Yunanistan ve Cezayir'e ait propolis örnekleri başlıca flavonoidler, kafeik ve ferulik asitlerin esterlerini içerir (20).

Dünyada en fazla bal üreten ülkeler arasında 4. sırada yer alan Türkiye arıcılık için nadir elverişli koşullara sahip ülkelerden biridir (213). Bununla birlikte Türk propolisinin polifenolik bileşimi ve biyolojik aktivitesi ile ilgili çalışmalar çok az

sayıdadır (61, 182, 203, 213). Türkiye bal, polen ve propolis gibi arı ürünlerinin besin değerini arttıran hem Avrupa hem de Asya bitki örtüsü özelliğine sahiptir (213).

Propolisin önemli biyolojik ve biyomedikal özellikleri sadece akademik çevrelerin değil, aynı zamanda tüketicilerin de ilgisini çekmesi nedeniyle kimyasal içeriğinin aydınlatılması gerekliliğini beraberinde getirmektedir (14, 38). Bütün bu bilgilerden yola çıkarak diğer tüm propolisler gibi Türk propolisinin içeriğinin aydınlatılması, bu konuda yapılacak olan pek çok çalışmaya ışık tutması açısından önemli hale gelmiştir.

Her ne kadar propolisin standardizasyonunun zorluğundan bahsedilse de propolisin bileşiminin arıların bu ürünü topladığı bölgeye, iklime, bitki örtüsüne göre değişiklik göstermesinden dolayı içeriğinde bulunan sadece o yöreye özgü bileşikler sayesinde bile standart bir propolis örneği çıkmasına ve bu sayede bölgesel veya ülkesel adlarla anılıyor olmasına yol açmıştır. Biz de çalışmamızda Türkiye'nin dört farklı bölgesinden topladığımız propolis örneklerini harmanlayarak oluşturduğumuz Türk propolisini kullanmayı tercih ettik.

Propolis sert, reçneli bir madde olduğu için ham (doğal) halde kullanılamaz ve tüketilemez (26, 160). Dolayısıyla inert maddelerin uzaklaştırıldığı ve polifenolik kısımların korunduğu ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılması gerekir (26, 214). Aslında bu kısmın terapötik etkilere propolisin diğer bileşenlerinden daha fazla katkıda bulunduğu düşünülmektedir (214).

Propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerini ekstrakte etmek için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır (145). Etanol ile ekstraksiyon fenolik bileşenlerce zengin reçineden arındırılmış propolis ekstraktı elde etmek amacıyla özellikle uygundur ve en yaygın şekilde kullanılan çözücüdür (26, 145). Bununla beraber su, metanol, hegzan, aseton ve kloroform ile ekstraksiyon da ayrıca kullanılmaktadır (145).

Propolis suda düşük çözünürlüğe sahiptir ve çalışmalar gerçekten de bu gibi türevlerinde az sayıdadır (162). Su ekstraktları daha basit bir bileşen profili sergiler (33). Propolis örnekleri sinnamik asit ve türevleri (*p*-kumarik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin); kafeoilkuinik asit türevleri [dikafeoilkuinik asit, 3-mono-O-kafeoilkuinik asit (klorojenik asit), 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit], kafeik asit ve

diğerleri gibi fenolik asitler ve esterleri olarak yüklü ve nispeten polar bileşenlerini izole etmek için su ile ekstrakte edilmektedir (163).

Değişik çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edebileceği için propolis ekstraksiyon metodları, propolisin aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle propolisin standardizasyonu zordur (15, 41). Biyolojik ölçümlerde çok daha yaygın olarak kullanılan ekstraktlar, farklı konsantrasyonlardaki etanol, metanol ve sudur (41).

Silva ve ark. (215) yaptıkları bir çalışmada propolisin hidroalkolik, metanollü ve sulu ekstraktlarını karşılaştırarak sulu ve etanollü ekstraktın polifenoller için en iyi çözücü olduğu sonucuna varmışlardır. Bu nedenle sulu ekstraktın toksik olmaması ve insanlar açısından kullanımının daha rahat olabileceği, aynı zamanda propolisin etanollü ekstraktta çok daha fazla çözünbileceği ve fazla miktarda bileşen bulunabileceği gerekçesiyle çalışmamızda Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktlarını kullanmayı tercih ettik.

Nakajima ve ark. (30) tarafından Brezilya yeşil propolisinin sulu ekstraktı ve ana bileşenleri olan kafeoilkuinik asit türevleri (3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, klorojenik asit) ve sinnamik asit türevleri (*p*-kumarik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin) kullanılarak oksidatif stres tarafından indüklenen retinal hasara karşı nöroprotektif etkilerinin olup olmadığı incelenmiş ve ayrıca nöroprotektif etkileri antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak propolisin sulu ekstraktının ve kafeoilkuinik asit türevlerinin *in vitro* retinal hasara karşı nöroprotektif etkiler gösterdiği ve bu etkilerin de dolaylı olarak antioksidan özelliği sayesinde olduğu belirlenmiştir.

Nakajima ve ark. (216) Brezilya yeşil propolisinin sulu ve etanollü, arı sütünün sulu, polenin ise etanollü ekstraktını hazırlayarak, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil ($HO\cdot$) radikali temizleme kapasitesini değişik antioksidan kapasite yöntemleriyle ölçerek kıyasladıkları bir başka araştırmada, antioksidan potansiyelinin sırasıyla propolisin sulu ekstraktında, daha sonra propolisin etanollü ekstraktında ve polenin etanollü ekstraktında olduğu, fakat arı sütünde herhangi bir etkinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca propolisin sulu ekstraktındaki temel bileşenler olan kafeik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin ve kumarik asitin antioksidan etkileri, kafeik asit, artepillin C ve drupanin şeklinde belirtilen sırada bulunmuştur.

Bakkarin ve kumarik asitin herhangi bir antioksidan etkisi bulunamamıştır. Kafeik asitin radikal temizleme etkisinin troloks kadar kuvvetli olduğu, bunun yanısıra N-asetil sistein (NAC) ve vitamin C'den daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.

Nagai ve ark. (29) yaptığı bir çalışmada propolisin sulu ekstraktı hazırlanıp lipid peroksidasyon model sistemi kullanılarak antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. 1 ve 5 mg/mL'lik ekstraktların antioksidan aktivitesi 5 mM askorbik asitten çok daha yüksek bulunmuştur. Propolisin sulu ekstraktının süperoksit anyon radikaline karşı temizleme aktivitesinin yüksek olduğu, 50 ve 100 mg/mL'lik ekstraktların süperoksitin üretimini ve hidroksil radikalini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile propolisin sulu ekstraktının kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarda hastalar için farmasötik olarak kullanımının mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'mızda son 10 yıldır Trabzon ilinden ve Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi de daha önce yüksek lisans tezi olarak sunduğumuz çalışmadır. Bu çalışmada, değişik çözücüler propolisin içindeki farklı bileşenleri, farklı miktarlarda çözeceği için propolisin çeşitli ekstraktlarının kalitatif ve/veya kantitatif içeriklerinin de farklı olacağı düşünülerek, içeriğinde bulunan, antioksidan aktivitesinden başlıca sorumlu bileşikler olan polifenoller ve flavonoidlerin hangi çözücü ile muamele edildiğinde ekstraktta en fazla bulunduğunu tespit etmek amaçlanmıştır. Dolayısıyla Trabzon ilinden toplanan Türk propolisinin sulu, etanollü, dimetilsülfoksitli (DMSO'lu), gliserollü ve asetonlu ekstraktları hazırlanıp, toplam polifenol ve flavonoid içerik, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü tayinleri yapılarak, hangi çözücü içinde en fazla çözünebileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca propolisin liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü ve DMSO'lu ekstraktları da aynı yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçları desteklemek amacıyla her bir ekstrakt HPLC ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların toplam polifenol ve flavonoid içerikleri, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güçleri ve toplam antioksidan statüleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. HPLC analizlerinde DMSO'lu ve asetonlu ekstraktlar ile etanollü ve gliserollü ekstraktların piklerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sulu ekstraktta ise temel olarak bir pik gözlenmiştir. Literatür araştırmalarımız sonucunda bu pikin sulu ekstraktta bulunan ve antioksidan

aktivite bakımından güçlü etkilere sahip olan kafeoilkuinik asitler ve türevlerinden biri olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışmalar neticesinde propolisin en iyi DMSO içinde, daha sonra sırasıyla etanol, aseton, gliserol ve suda çözündüğü sonucuna varılmıştır (217). Flavonoidler sulu ekstraktta diğerlerine nazaran en düşük bulunmasına rağmen, diğer ekstraktların hazırlandığı çözücüler de saf olarak kullanıldığı için; su ile çözülen propolis örneklerinin canlılar açısından zararlı olmaması, ancak diğer örneklerin saf halde kullanılmasının zararlı oluşu nedeniyle sağlık üzerine yürütülen çalışmaların sulu ekstraktla yapılmasının daha doğru olacağı gerçeğini ortaya koymuştur. Bu sebeple propolisin gliserol, su gibi toksik olmayan çözücülerle elde edilen ekstraktları *in vivo* çalışmalarda kullanılarak, pek çok farklı çalışmanın devamlılığının sağlanabileceği kanısına varılmıştır.

Öncelikle yaptığımız yüksek lisans tezinden, sonrasında ise literatür araştırmalarımızdan yola çıkarak bugüne kadar Türk propolisinin özellikle sulu ekstraktının HPLC ve GC-MS yöntemi kullanılarak yapılan analizi ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca Türk propolisinin etanollü ekstraktının da bu iki yöntem ile karakterizasyonu sayesinde sulu ekstrakt ile karşılaştırması yapılarak hem Türk propolisinin farklı çözücülerdeki etken maddelerinin neler olduğunun açığa çıkarılması açısından hem de ileriye yönelik çalışmalar bakımından yol gösterici olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının HPLC-DAD ve GC-MS ile içeriğinin hem kalitatif hem de kantitatif olarak belirlenmesi bu konudaki ilk çalışma olması nedeniyle hayli özgündür.

Kromatografik yöntemler kesin olarak çok daha geniş çapta uygulanan ve mükemmel ayırma yeteneği ve bileşiklerin eşzamanlı çoklu analizindeki kabiliyetinden dolayı popüler metodlardır (168). Propolisteki flavonoidleri ve fenolik asitleri belirlemek amacıyla floresans spektrometrisi, kapiller elektroforez, misel elektrokinetik kapiller kromatografi, yakın kızılötesi spektroskopisi (NIR), TLC, GC-MS ve HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-DAD gibi HPLC ile birleştirilmiş çeşitli dedektörleri kapsayan ve buna benzer çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (31, 168, 172). Bu yöntemler arasında HPLC ve beraberinde kullanılan MS, UV ya da PDA sistemleri hala en önemli analitik tekniklerdir (31). GC örnek ekstraksiyonu ve analitlerin türevlendirilmesini gerektirmektedir (168).

Geleneksel HPLC sistemleri üzerinde yapılan geliştirme çalışmaları neticesinde döteryum veya tungsten lambalı ışık kaynaklı diyod array dedektörler kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemin UV/Vis (ultraviyole/görünür) dedektörden farkı 512 diyoddan (elementten) oluşan bir yüzeyde her bir diyodun (elementin) ayrı bir dalga boyundaki absorbansının eş zamanlı olarak ölçülebilmesidir. Ölçüm verileri istenilen dalga boyu aralığında alınır ve üç boyutlu kromatogramlarla desteklenebilir. Eş zamanlı alınabilen spektrumlar sayesinde elüe edilen ve sinyal veren bileşenlerin doğru tanınması mümkün hale gelir. Kütle spektrometrik dedektörler ise kalitatif ve kantitatif ayırma sıklıkla kullanılan dedektörlerdir (218).

Farklı araştırmacılar değişik bölgelerden toplanan propolisin polifenolik bileşiklerini değişik ekstraksiyon sistemlerini ve farklı dedektör sistemleri ile bağlantılı olan çeşitli HPLC metodlarını kullanarak analiz etmişlerdir (28).

Mishima ve ark. (104) yaptıkları bir çalışmada Brezilya propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının temel bileşenlerini HPLC ile analiz etmişlerdir. Klorojenik asit, *p*-kumarik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, drupanin, artepillin C ve bakkarin gradient elüsyon kullanılarak birbirinden ayrılmıştır. Ancak yayınladıkları makalede HPLC ile analiz ettikleri bileşiklerin kromatogramlarını yansıtmamışlardır. Sulu ekstraktta etanollü ekstraktta göre klorojenik asit, *p*-kumarik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit ve 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit daha fazla miktarda bulunmuştur.

Mishima ve ark. (219) yaptıkları bir başka çalışmada ise Brezilya propolisinin sulu ve % 10, % 25, % 50, % 70, % 95'lik etanollü ekstraktlarını hazırlayarak bu ekstraktların temel bileşenlerini 325 nm dalga boyunda HPLC ile analiz etmişlerdir. Klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3-4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit ve artepillin C sulu propolis ekstraktında tespit edilmiştir. Ancak analiz sonucunda elde edilen bileşiklerin kromatogramları makaleye yansıtılmamıştır. % 25'lik etanollü ekstraktın 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit (% 5.41), 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit (% 5.69) ve 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit (% 0.86) olmak üzere toplam % 11.96 oranında kafeoilkuinik asit bileşikleri içerdiği belirlenmiştir. % 70'lik etanollü ekstraktta klorojenik, *p*-kumarik,

kafeoilkuinik asitleri içeren sinnamik asit türevlerinin miktarı azalmış, flavonoidler ise artmış olarak bulunmuştur.

Cardoso ve ark. (220) Brezilya yabani yeşil propolisinin etanollü ekstraktını HPLC-DAD ters faz sistem ile inceleyerek, içeriğindeki hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin % 33.33'lük kısmı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bunlar 4-kafeoilkuinik asit (4.84 µg/mL), 5-kafeoilkuinik asit (14.6 µg/mL), kafeik asit (23.5 µg/mL), 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit (27.3 µg/mL), 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit (18.4 µg/mL) olarak saptanmıştır.

Propolisin etanollü ekstraktı hazırlanarak Arjantin, Avustralya, Brezilya, Bulgaristan, Şili, Çin, Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika ve Özbekistan gibi değişik coğrafik bölgelerin propolislerinin antioksidan aktiviteleri Kumazawa ve ark. (178) tarafından karşılaştırılmıştır. Değişik bölgelerden toplanan bu propolis örneklerinin etanollü ekstraktları, PDA ve MS dedektör yardımıyla HPLC ile analiz edilerek ana bileşenleri tanımlanmıştır. Bu bileşikler kafeik asit, *p*-kumarik asit, 3,4-dimetoksi sinnamik asit, kuersetin, pinobanksin 5-metileter, apigenin, kaempferol, pinobanksin, sinnamiliden asetik asit, krisin, pinosembrin, galangin, pinobanksin 3-asetat, fenetil kafeat, sinnamil kafeat, tektokrisin, artepillin C olarak belirlenmiştir. Güney Afrika propolisinin etanollü ekstraktının HPLC kromatogramı diğer ülkelerin propolislerinin HPLC kromatogramlarından çok az farklı olmakla birlikte, Brezilya ve Tayland propolisinin HPLC kromatogramlarının diğerlerinden çok farklı olduğu gözlemlenmiştir. Brezilya propolisinin karakteristik kimyasal bileşiminin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika propolislerinden farklı olduğu rapor edilmiştir.

Bütün bu etanollü propolis örneklerinin kantitatif analizleri yapıldığında kafeik asit ve *p*-kumarik asit Tayland propolisi hariç diğer bütün örneklerde belirlenmiştir. Tayland propolisinde bu 17 bileşikten hiçbirisi bulunmamakla birlikte, artepillin C ise sadece Brezilya propolisinde tespit edilmiştir. Pinosembrin, galangin, pinobanksin 3-asetat ve tektokrisin gibi flavonoidler Brezilya ve Tayland propolisi haricinde diğer bütün etanollü propolis örneklerinde bol miktarda bulunmuştur. Tüm etanollü propolis ekstraktlarında (EPE), özellikle Amerika propolisinde *p*-kumarik asit (19.4 mg/g EPE) çok yüksek miktarda saptanmıştır. 3,4-dimetoksisinnamik asit Brezilya, Güney Afrika,

Tayland dışında diğer tüm etanollü propolis ekstraktlarında belirlenmiştir. Çin'deki üç farklı etanollü propolis ekstraktının da 7 mg/g'ın üzerinde 3,4-dimetoksisinamik asit içerdiği bulunmuştur. Kuersetinin Brezilya, Güney Afrika, Tayland ve Ukrayna haricinde tüm ekstraktlarda var olduğu gözlemlenmiştir. Uruguay propolisinin özellikle fazla miktarda pinobanksin-5-metil eter (51.0 mg/g EPE) içerdiği tespit edilmiştir. Apigenin Yeni Zelanda propolisinin etanollü ekstraktında (78.3 mg/g EPE) çok yüksek miktarda belirlenmiştir, ancak Güney Afrika propolisinde bulunamamıştır. Kaempferol Brezilya ve Tayland propolisinin etanollü ekstraktlarında belirlenememiştir. Ukrayna ve Amerika propolisinin etanollü ekstraktlarının 10 mg/g'ın üzerinde kaempferol içerdiği saptanmıştır. Pinobanksin hemen hemen tüm etanollü propolis ekstraktlarında yüksek miktarda belirlenmiştir. Tüm etanollü propolis ekstraktları içinde Bulgaristan propolisinde pinobanksin (84.8 mg/g EPE) en fazla miktarda bulunmuştur. Her ne kadar Brezilya, Güney Afrika, Taylan ve Ukrayna propolisinin etanollü ekstraktları sinnamiliden asetik asit bulundurmasa da Arjantin ve Şili propolisinin etanollü ekstraktlarının belirli bir miktar (yaklaşık 30 mg/g EPE) içerdiği tespit edilmiştir. Krisin Brezilya ve Tayland propolisinde bulunamamıştır. Çin (Hebei, Hubei, Zhejiang), Okyanusya (Avustralya ve Yeni Zelanda) ve Bulgaristan propolisinin etanollü ekstraktlarının 100 mg/g'ın üzerinde yüksek miktarda krisin içerdiği belirlenmiştir (178).

Szliszka ve ark. (221) Polonya propolisinin etanollü ekstraktındaki fenolik bileşiklerin tanımlamasını ve miktar ölçümünü HPLC-DAD kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Pinobanksin, krisin, metoksiflavanon, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kafeik asit Polonya propolisinin etanollü ekstraktında bulunan başlıca fenolikler olarak belirlenmiştir.

Özellikle diğer analitik ve spektrofotometrik yöntemlere göre HPLC ve GC-MS gibi çok önemli iki analitik yöntemin kullanılması yüksek ayırım gücü, spesifiklik ve hassasiyet bakımından Türk propolisinin içeriğinin tespiti ve bileşimindeki maddelerin miktarının belirlenebilmesi açısından çok büyük avantaj sağlamaktadır. Ancak HPLC ve GC-MS cihazlarının, bu cihazların parçalarının, dedektörlerinin, analiz için kullanılan kolonların, mobil fazların, standartların ve çok çeşitli sarf malzemelerin yüksek maliyetli oluşu da bu yöntemlerin en büyük dezavantajını oluşturmaktadır. Her

ne kadar yaptığımız çalışma Tübitak Projesi ile desteklenmiş olsa da maliyet konusu bizim için de en fazla sıkıntı çektiğimiz alanı oluşturmuştur.

Literatür araştırmalarımız sonucunda HPLC-DAD analizi için standart maddeleri 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, klorojenik asit, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, apigenin, mirisetin, kaempferol, kuersetin, galangin, krisin, naringin, trans-sinamik asit, pinosembrin ve naringenin olarak belirlememizin nedeni, gerek kalitatif gerekse kantitatif bakımdan çeşitli çözücüler kullanılarak ekstraktları hazırlanan farklı propolis türlerinde çok daha yüksek ve etkili oranda bu bileşiklerin bulunmasına dayanmaktadır.

HPLC-DAD aracılığıyla yaptığımız kalitatif ve kantitatif analizlerde Türk propolisinin sulu ekstraktında klorojenik asit (10.20 µg/mL), kafeik asit (204.00 µg/mL), 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit (7.75 µg/mL), trans-sinamik asit (28.90 µg/mL) bulunurken, Türk propolisinin etanollü ekstraktında kafeik asit (66 µg/mL), mirisetin (2.32 µg/mL), kuersetin (41.6 µg/mL), trans-sinamik asit (91.49 µg/mL), naringenin (372.39 µg/mL), kaempferol (98.72 µg/mL), krisin (641.33 µg/mL), pinosembrin (572.67 µg/mL), galangin (534.11 µg/mL), kafeik asit fenetil ester (630.67 µg/mL) bulunmuştur. Her iki ekstraktta da ortak bileşik olarak kafeik asit ve trans-sinamik asit tespit edilmiştir. Türk propolisinin sulu ekstraktında etanollü ekstrakta göre kafeik asit çok daha fazla oranda belirlenmişken, etanollü ekstraktta ise trans-sinamik asit sulu ekstrakta göre fazla miktarda bulunmuştur. HPLC ile birleştirilmiş DAD vasıtasıyla tüm bileşiklerin maksimum absorbands gösterdiği ve 265, 280, 290, 320 ve 360 nm olarak belirlediğimiz farklı dalga boylarında ölçümler alınmıştır. Dalga boylarının bu şekilde belirlenmiş olmasının nedeni literatürdeki çok sayıda makalede genel olarak bu değerlerde çalışılmış olması (26, 28, 51), ayrıca polifenoller ve kafeoilkuinik asitlerin bu dalga boylarında maksimum absorbands göstermesidir.

Seçilen 17 standartın içinde belirlediğimiz metoda göre Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının analizi neticesinde sulu propolis ekstraktının fazla miktarda kafeik asit içerdiği, etanollü ekstraktın ise çok yüksek miktarda krisin, kafeik asit fenetil ester, pinosembrin, galangin ve naringenin içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca sulu propolis ekstraktında yüksek antioksidan aktiviteye sahip kafeoilkuinik asit türevlerinden 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit ve klorojenik asit belirlenirken, önemli fenolik asitlerden biri

olan trans-sinamik asit bulunmuştur. Etanollü propolis ekstraktında ise mirisetin, naringenin, kaempferol, krisin, pinosebrin, galangin ve kuersetin gibi flavonoidler belirlenmiştir.

Tüm bunların yanısıra sulu propolis ekstraktında 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit ve çok çeşitli biyolojik etkileri olan flavonoidlerden kafeik asit fenetil ester, apigenin, mirisetin, kaempferol, kuersetin, galangin, krisin, naringin, pinosebrin ve naringenin saptanmamıştır. Etanollü propolis ekstraktında ise 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, klorojenik asit, apigenin ve naringin belirlenmemiştir.

Yaptığımız HPLC-DAD analizlerinde her bir standartın % BSS değerinin % 2'nin altında olması, bir analizde tamamen aynı yolla elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı olarak adlandırılan kesinlik açısından istenilen bir parametre iken, çalışmamızda kullandığımız 4,5-di-O-kafeoilkuinik asit, 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit, krisin, galangin ve kafeik asit fenetil ester standartları bu değer üstünde sonuç vermiştir. Öte yandan klorojenik asit, kafeik asit, 3,5-di-O-kafeoilkuinik asit, naringin, mirisetin, 3,4-di-O-kafeoilkuinik asit, kuersetin, trans-sinamik asit, naringenin, apigenin, kaempferol ve pinosebrin standartlarının % BSS değeri % 2'nin altında bulunmuştur.

Standartlar için LOD ve LOQ değerleri, 10 µg/mL'lik her bir standartın regresyon denkleminde hesaplanan miktarlarının standart sapma değerlerinden LOD için 3, LOQ için 10 katsayıları ile çarpılarak belirlenmiştir. LOD, analitin istatistiksel olarak tayin edilen en küçük konsantrasyon düzeyi iken LOQ, kesinlik ve doğruluk validasyon parametrelerinin desteklediği ölçülen en düşük analit konsantrasyonudur (218). Bu tanımlamalara göre LOD ve LOQ değerleri genel olarak 2,5-50 µg/mL konsantrasyon sınırları içinde bulunmuştur.

Park ve ark. (126) beşi güney Brezilya, biri Güneydoğu Brezilya ve altısı Kuzeydoğu Brezilya olarak 12 gruba ayırdıkları Brezilya propolisinin etanollü ekstraktını RP-HPLC (ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ve GC-MS ile analiz etmişlerdir. RP-HPLC vasıtasıyla 268 nm dalga boyu seçilerek Brezilya propolisinin ve bitki reçinelerinin etanollü ekstraktında kumarik asit, ferulik asit, pinobanksin,

kaempferol, apigenin, izosakuranetin, pinosembrin, dimetilallil kafeik asit, pinobanksin-3-asetat, krisin, galangin, kaempferid, tektokrisin bileşikleri bulunmuştur. Brezilya propolisinin ve bitki reçinelerinin etanollü ekstraktının GC-MS ile analizinde birçok aromatik bileşik, terpenoid ve yağ asidi esterleri tanımlanmıştır.

Alencar ve ark. (137) kırmızı Brezilya propolisinin etanollü ekstraktını RP-HPLC ve GC-MS aracılığıyla, hegzan ve kloroform fraksiyonunu ise RP-HPLC ile karakterize etmişlerdir. RP-HPLC analizlerinde hegzan fraksiyonunda az sayıda bileşik bulunmuştur ve bu fraksiyonun etanollü ekstrakt ile benzerliğinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Etanollü ekstraktta ve kloroform fraksiyonunda yalnızca bir flavonoid (kuersetin), bir izoflavon (daidzein) ve bir fenolik asit (ferulik asit) belirlenmiştir. GC-MS analizi ile 20 bileşik tanımlanmıştır. Bunlardan dördü izoflavon olmak üzere yedi tane yeni bileşik bulunmuştur.

Kalogeropoulos ve ark. (148) Yunanistan, Yunan Adaları ve Doğu Kıbrıs'tan elde edilen 12 propolis örneğinin etanollü ekstraktlarının kimyasal içeriğini belirlemişlerdir. Etanollü ekstraktların önemli miktarda terpenler ve/veya flavonoidler, antrakinonlar (başlıca emodin ve krizofanol) ve az miktarda fenolik asitler ve esterlerini içerdiği ve karakteristik Avrupa propolisinden farklı, Doğu Akdeniz propolisi ile benzer olduğu bulunmuştur. Basit polifenoller ve terpenik asitler sırasıyla 11.9-373.5 ve 7.23-286.5 mg/g EPE arasında bulunmuşlardır. Ayrıca basit polifenollerden antrakinonlar % 1.3-28.9 arasında gösterilmiştir.

Yıldırım ve ark. (222) Malatya yöresinden elde ettikleri Türk propolisinin sulu ekstraktını hazırlayarak GC-MS ile analiz etmişler ve bu örneğin α -terpinen (% 21.8), β -pinen (% 6.4), pentadekan (% 1.2), benzaldehit (% 1.1), junipen (iongifolen) (% 9.1), hegzadekan (% 2.0), β -kariofillen (% 8.1), trans-pinokarveol (% 4.6), α -terpineol (% 12.3), verbenon (% 1.6), mritenol (% 2.7), *m*-simen-8-ol (% 1.6), *p*-simen-8-ol (% 2.2), benzil alkol (% 3.6), feniletıl alkol (% 3.1), sinnamaldehit (% 6.1), sinnamıl alkol (% 8.7) içerdiğini belirlemişlerdir.

GC-MS aracılığıyla sulu ve etanollü propolis ekstraktlarının analizinin gerçekleştirilmesi için kullanılacak olan ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'mızda bulunan Agilent marka 6890N model GC cihazının 5973 model MS dedektörü çalışmaya başladıktan bir süre

sonra bozulmuş ve bu süre zarfında bakım-onarımı yapılamamıştır. Bu nedenle türevlendirme işlemleri ve tüm GC-MS analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarı'nda mevcut olan Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra markalı GC-MS cihazında MS ve FID (70 eV) ile birlikte kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının içeriğinin belirlenmesi amacıyla Rtx-1 ve Rtx-5ms olmak üzere aynı markalı iki farklı kolon kullanarak ve aynı zamanda kolonlar arasındaki farklılığı da değerlendirmek için yaptığımız GC-MS analizleri sonucunda Rtx-5ms kolon ile sulu propolis ekstraktında çok daha fazla bileşen tespit edilmiştir. Bu analizler neticesinde her iki kolon ile belirlenen sulu ve etanollü propolis ekstraktının polifenollere nazaran çeşitli aldozlar ve karbohidratlar bakımından çok daha zengin içeriğe sahip olduğu saptanmıştır. Rtx-5ms kolon ile yapılan analizde sulu propolis ekstraktının kuinik asit (% 0.23), ferulik asit (% 0.27), sinnamik asit türevleri ve prolin aminoasiti içerdiği belirlenmiştir. Rtx-1 kolon kullanılarak yapılan analizinde ise etanollü propolis ekstraktının kafeik asit (% 1.91) ve sinnamik asit türevleri bulundurduğu belirlenmiştir. Hem sulu hem de etanollü propolis ekstraktının Rtx-1 ve Rtx-5ms kolon ile analizlerinin tümünde aromatik karboksilli bileşiklerin en önemlisi ve diğer birçok bileşiğin çıkış maddesi olan benzoik asit bulunmuştur. Rtx-1 kolon polar olmayan bileşenlerin tespiti için uygunken, Rtx-5ms kolon ise düşük polaritedeki bileşenleri tanımlamak için elverişli olması nedeniyle kullanılmıştır ve bu kolonların dolgu maddeleri birbirinden farklılık göstermektedir.

Agilent marka GC-MS cihazı için flavonoid ölçümünde kullanmak amacıyla özel olarak alınan, fakat cihazın bozulmasıyla kullanılamayan DB-1 kolon ile analiz gerçekleştirilemediği için Türk propolisinin içeriğinde bulunan flavonoidler tam anlamıyla belirlenememiştir. Shimadzu markalı GC-MS cihazı için uygun olan ve o sıradaki imkanlar dahilinde elimizde bulunan Rtx-1 ve Rtx-5ms kolonlar ile gerçekleştirilen ölçümlerde ise kuinik asit, ferulik asit, sinnamik asit türevleri gibi bazı önemli polifenoller belirlenmiştir.

Literatürde yer alan çok sayıdaki GC-MS analizini kapsayan çalışmalara bakıldığında gerek diğer ülke propolisleriyle gerekse Türk propolisinin sulu ekstraktı ile ilgili Yıldırım ve ark. (222) yaptıkları tek bir çalışma dışında kimyasal içerik analizine

yer verilmemiştir. Ayrıca Türk propolisinin içeriğinde bulunan polifenoller gibi önemli bileşiklerin analizine yönelik kapsamlı hiçbir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu araştırmalarda sulu ekstrakt ile analiz gibi Türk propolisinin etanollü ekstraktı ile yapılan analizler de kısıtlı sayıda kalmıştır ve biyolojik açıdan önemli birçok bileşik belirlenememiştir. Bu nedenle Türk propolisinin hem sulu hem de etanollü ekstraktının analizinde farklı kolonlarla çalışılması ve biyolojik açıdan önemi yüksek bileşiklerin bulunması yaptığımız GC-MS analizinin çok daha özgün olmasını sağlamıştır.

Yaptığımız tüm bu kalitatif ve kantitatif HPLC-DAD ve GC-MS analizleri göstermiştir ki Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktları çok yönlü biyolojik aktivitelere sahip olan yüksek miktarda flavonoid, fenolik asit ve kafeoilkuinik asit içermektedir.

Bu çalışma ile ilk kez Türk propolisinin sulu ekstraktında bulunan, özellikle yüksek seviyede antioksidan etki gösteren kafeoilkuinik asitler ve türevlerinin belirlenmiş olması, aynı zamanda etanollü ekstraktın da içeriğinin saptanması neticesinde yapılacak olan çeşitli çalışmalarla bu bileşiklerin antioksidan aktiviteye katkılarının hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleşebileceğinin araştırılması sağlanabilecektir. Aynı zamanda bu çalışmanın neticesi olarak ileride yapılmak istenilen çalışmalar açısından Türk propolisi tanımı daha çok genişletilip, propolisin Türkiye'nin yedi farklı bölgesinden ve bu bölgelerdeki çeşitli illerden toplanarak harmanlanması ile bu harmanlanmış karışımın ve bu illerden toplanan her bir propolis örneğinin ayrı ayrı HPLC ve GC-MS analizleri yapıp, hem propolisin standardizasyonu sağlanacak hem de Türk propolisinin tam anlamıyla hak ettiği yeri almasına yardımcı olacaktır. Ayrıca Türk propolisinin gösterdiği diğer biyolojik aktivitelerin hücrelerde etki mekanizmasının açıklanması daha kolay hale gelebilecektir ve bu konu ile ilgili yapılacak olan çok çeşitli çalışmaların önü açılacaktır. Bunun da ötesinde arıcılık açısından son derece uygun bitkisel ve iklimsel koşullara sahip olan ülkemizde hiçbir katkı maddesi içermeyen ve tamamen doğal şekilde hazırlanan bu ürünün toplumsal bakımdan, insanlar üzerinde ve bir gıda takviyesi olarak kullanımının yolu açılarak büyük bir boşluğun doldurulması sağlanabilecektir. Neticede Türk propolisinin, biyolojik özellikleri ortaya konulmuş Brezilya, Şili, Küba ve Tayvan propolisleri gibi dünya çapında tanınan ve dünya piyasasında propolis konusunda söz sahibi olan

lkelerden biri haline gelebilmesi, dünya pazarındaki değerinin arttırılması ve böylece ülke ekonomisine önemli katkı sağlayabilmesi söz konusu hale gelebilecektir.



8. KAYNAKLAR

1. Agüero MB, Svetaz L, Sanchez M, Luna L, Lima B, Lopez 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.
2. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004). Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod 67: 257-268.
3. Berner LA, O'Donnell JA (1998). Functional foods and health claims legislation: Applications to dairy foods. Int Dairy J 8: 355-362.
4. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez A (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci 73: 117-124.
5. Benkovic V, Horvat Knezevic A, Brozovic G, Knezevic F, Dikic D, Bevanda M, Basic I, Orsolic N (2007). Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. Biomed Pharmacother 61: 292-297.
6. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM (2010). Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. J Ethnopharmacol 129: 314-318.
7. Seven I, Aksu T, Tatlı Seven P (2012). The effects of propolis and vitamin C supplemented feed on performance, nutrient utilization and carcass characteristics in broilers exposed to lead. Livest Sci 148: 10-15.
8. Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). Food Chem Toxicol 36: 347-363.
9. Lotfy M (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer P 7: 22-31.
10. Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31: 3-15.
11. Yonar ME, Mişe Yonar S, Silici S (2011). Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). Fish Shellfish Immun 31: 318-325.

12. Marcucci MC (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99.
13. 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.
14. Gong S, Luo L, Gong W, Gao Y, Xie M (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chem* 134: 583-588.
15. Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Brazil Chem Soc* 15(6): 964-970.
16. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
17. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T (2004). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J Agr Food Chem* 52: 7286-7292.
18. Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Nakayama T (2007). Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett* 252: 235-243.
19. Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jiménez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandez J, Velazquez C (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem* 131: 645-651.
20. Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Mitov I (2006). *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 12: 173-177.
21. Vatansever HS, Sorkun K, Deliloglu Gurhan SI, Ozdal-Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 112: 546-556.
22. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamed M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem* 103: 1097-1103.

23. Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, Andrade SF (2008). Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J Ethnopharmacol* 120: 372-377.
24. 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.
25. Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM (2006). Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 105: 95-98.
26. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73: 7-20.
27. Değer O (2015). Arı Ürünleri ve Tıbbi Özellikleri. *Bal ve Deli Bal* (Ed : Gündüz A). İstanbul, 33-44.
28. Gomez-Caravaca, AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceut Biomed* 41: 1220-1234.
29. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 80: 29-33.
30. 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.
31. Cao YH, Wang Y, Yuan Q (2004). Analysis of Flavonoids and Phenolic Acid in Propolis by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* 59: 135-140.
32. 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.
33. Midorikawa K, Banskota AH, Tezuka Y, Nagaoka T, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S (2001). Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochem Analysis* 12: 366-373.
34. Vijay D (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Phar Sc* 2013: 1-11.

35. Castaldo S, Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73: 1-6.
36. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, de Souza MDO, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JAP, Roesch-Ely M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 52: 137-142.
37. 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.
38. Xu Y, Luo L, Chen B, Fu Y (2009). Recent development of chemical components in propolis. *Front Biol China* 4(4): 385-391.
39. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 80: 67-73.
40. El Ashry SH, Ahmad TA (2012). The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine* 31: 31-39.
41. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14.
42. Kutluca S (2003). Propolis Üretim Yöntemlerinin Koloni Performansı ve Propolisin Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zooteknik Anabilim Dalı, Erzurum.
43. Electronic resources [online]. Available from: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Propolis>. [Accessed 7 December 2014].
44. Eser B (2009). Ratlarda Metotreksatın Yol Açtığı İntestinal Mukoza Hasarı ve Oksidatif Stres Üzerine Propolisin Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.
45. Bankova V, Marcucci MC, Simova S, Nikolova N, Kujumgiev A, Popov S (1996). Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Z Naturforsch* 51c: 277-280.
46. Cuesta A, Rodriguez A, Esteban MA, Meseguer J (2005). *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immun* 18: 71-80.

47. Bravo L (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-333.
48. Pyrzynska K, Biesaga M (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac-Trend Anal Chem* 28(7): 893-902.
49. Demirkıran Ö (2005). *Hypericum Montbretii* Spach. Bitkisindeki Fenolik Bileşiklerin İzolasyonu ve Tanımlanması. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Edirne.
50. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huaman A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem* 113: 1243-1251.
51. Medic-Saric M, Rastija V, Bojic 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.
52. Maden Çalışkol M (2013). Azerbaycan Yöresine Ait Propolis Örneklerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
53. Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 475: 89-111.
54. Karakaş S (2012). Türk Propolisinin Ticari Bitkisel Yağlarda Çözünürlüğünün İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
55. 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.
56. Chaillou LL, Nazareno MA (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Sci Technol* 42: 1422-1427.
57. Rudnicki M, Oliveira MR, Pereira TV, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Moreira JCF (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chem* 100: 719-724.

58. Han X, Shen T, Lou H (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci* 8: 950-988.
59. 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.
60. Stalikas CD (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 30: 3268-3295.
61. Sarıkaya AO (2009). Kestane Bal ve Propolisinin Fenolik Asit Kompozisyonu ve Antioksidan Özelliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
62. Karademir SE (2005). Bazı Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
63. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2(4): 152-159.
64. Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105: 940-949.
65. Simons AL (2005). Structure-degradation relationships of flavonoids and their correlation to human bioavailability. Doctor of Philosophy, Iowa-State University, Ames, Iowa.
66. Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
67. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.
68. Topuz F (2007). Süs Bitkilerinden Flavonoid 3'-Hidroksilaz ve Flvonoid 3',5'-Hidroksilaz Enzimlerinin Klonlanmaları, Karakterizasyonları ve Substrat Spesifitelerinin Çalışılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
69. Merken HM, Beecher GR (2000). Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J Agr Food Chem* 48(3): 577-599.

70. 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.
71. Mülazımoğlu İE (2008). Camsı Karbon Elektrot Yüzeyine Çeşitli Flavonoid Türevlerinin Modifikasyonu, Yüzey Karakterizasyonu, Elektrokimyasal ve Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Konya.
72. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Bio Med* 20(7): 933-956.
73. Peterson J, Dwyer J (1998). Flavonoids: Dietary Occurrence and Biochemical Activity. *Nutr Res* 18(12): 1995-2018.
74. Özkök A (2009). Muğla Bilgesinde Üretilen Çam Balı ve Propolisin Mikroskopik, Organoleptik ve Kimyasal Analizi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
75. Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolicic-Bubalo A, Medic- Saric M, Mayerc L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V (2007). *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 110: 548-554.
76. Amoros M, Simoes CMO, Girre L (1992). Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. *J Nat Prod* 55(12): 1732-1740.
77. Hepşen İF, Tilgen F, Er H (1996). Propolis: Tıbbi Özellikleri ve Oftalmolojik Kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 3(4): 386-391.
78. Yanez JA, Andrews PK, Davies NM (2007). Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *J Chromatogr B* 848: 159-181.
79. Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 96: 67-202.
80. Benkovic V, Kopjar N, Horvat Knezevic A, Dikic D, Basic I, Ramic S, Viculin T, Knezevic F, Orsolic N (2008). Evaluation of Radioprotective Effects of Propolis and Quercetin on Human White Blood Cells *in Vitro*. *Biol Pharm Bull* 31(9): 1778-1785.

81. Benkovic V, Orsolic N, Horvat Knezevic A, Ramic S, Dikic D, Basic I, Kopjar N (2008). Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. *Biol Pharm Bull* 31: 167-172.
82. Pietta P-G (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042.
83. Gülçin İ (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86: 345-391.
84. Bener M (2009). Bitki Özütleri ve Tekstil Boyalarındaki Flavonoidler için Spektrofotometrik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
85. Prytyk E, Dantas AP, Salomao K, Pereira AS, Bankova VS, De Castro SL, Aquino Neto FR (2003). Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J Ethnopharmacol* 88: 189-193.
86. Yousef MI, Salama AF (2009). Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1168-1175.
87. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoğlu N (2006). Propolis ve Etken Maddeleri Olan Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ve Sinamik Asitin, İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Dizisi (CCRF-CEM)'de Sitotoksik ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi* 45(2): 83-92.
88. Robbins RJ (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agr Food Chem* 51(10): 2866-2887.
89. Kim K-H, Tsao R, Yang R, Cui SW (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem* 95: 466-473.
90. Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozier A (2010). Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavan-3-ols. *Nutrients* 2: 820-833.
91. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S (2008). Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J Nutr* 138: 2309-2315.
92. Miyamae Y, Kurisu M, Han J, Isoda H, Shigemori H (2011). Structure-Activity Relationship of Caffeoylquinic Acids on the Accelerating Activity on ATP Production. *Chem Pharm Bull* 59(4): 502-507.

93. Urushisaki T, Takemura T, Tazawa S, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Araki Y, Kuwata K (2011). Caffeoylquinic Acids Are Major Constituents with Potent Anti-Influenza Effects in Brazilian Green Propolis Water Extract. *Evid-Based Compl Alt* 2011: 1-7.
94. Miyamae Y, Kurisu M, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie K, Shigemor H (2012). Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β -protein. *Bioorgan Med Chem* 20: 5844-5849.
95. 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.
96. Mishima S, Inoh Y, Narita Y, Ohta S, Sakamoto T, Araki Y, Suzuki K-M, Akao Y, Nozawa Y (2005a). Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorgan Med Chem* 13: 5814-5818.
97. Hussain S, Schönbichler SA, Güzel Y, Sonderegger H, Abel G, Rainer M, Hucka CW, Bonn GK (2013). Solid-phase extraction of galloyl- and caffeoylquinic acids from natural sources (*Galphimia glauca* and *Arnicae flos*) using pure zirconium silicate and bismuth citrate powders as sorbents inside micro spin columns. *J Pharmaceut Biomed* 84: 148-158.
98. Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, Shibata H (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta* 1335: 335-342.
99. Zhu K, Cordeiro ML, Atienza J, Robinson WE, Chow SA (1999). Irreversible Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by Dicafeoylquinic Acids. *J Virol* 73(4): 3309-3316.
100. Yoshimoto M, Yahara S, Okuno S, Islam S, Ishiguro K, Yamakawa O (2002). Antimutagenicity of Mono-, Di-, and Tricafeoylquinic Acid Derivatives Isolated from Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf. *Biosci Biotech Bioch* 66(11): 2336-2341.

101. Gongora L, Manez S, Giner RM, Recio MC, Schinella G, Rios JL (2003). Inhibition of Xanthine Oxidase by Phenolic Conjugates of Methylated Quinic Acid. *Planta Med* 69: 396-401.
102. Zang L-Y, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V (2003). Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol Cell Biochem* 247: 205-210.
103. Zhu X, Zhang H, Lo R (2004). Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities. *J Agr Food Chem* 52: 7272-7278.
104. Mishima S, Narita Y, Chikamatsu S, Inoh Y, Ohta S, Yoshida C, Araki Y, Akao Y, Suzuki K-M, Nozawa Y (2005b). Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *J Ethnopharmacol* 99: 5-11.
105. Santos MD, Gobbo-Neto L, Albarella L, Souza GEP, Lopes NP (2005). Analgesic activity of di caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *J Ethnopharmacol* 96: 545-549.
106. Yang B, Meng Z, Dong J, Yan L, Zou L, Tang Z, Dou G (2005). Metabolic Profile of 1,5-Dicaffeoylquinic Acid in Rats, an *in vivo* and *in vitro* Study. *Drug Metab Dispos* 33(7): 930-936.
107. Hung TM, Na MK, Thuong PT, Su ND, Sok DE, Song KS, Seong YH, Bae KH (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *J Ethnopharmacol* 108: 188-192.
108. Santos MD, Lopes NP, Iamamoto Y (2008). HPLC-ESI-MS/MS Analysis of Oxidized Di-Caffeoylquinic Acids Generated by Metalloporphyrine-Catalyzed Reactions. *Quim Nova* 31(4): 767-770.
109. Cao X, Xiao H, Zhanga Y, Zou L, Chu Y, Chu X (2010). 1,5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. *Brain Res* 1347: 142-148.
110. Han J, Miyamae Y, Shigemori H, Isoda H (2010). Neuroprotective Effect of 3,5-Di-O-Caffeoylquinic Acid on SH-SY5Y Cells and Senescence-Accelerated-Prone Mice 8 through the Up-Regulation of Phosphoglycerate Kinase-1. *Neuroscience* 169: 1039-1045.
111. Han J, LV Q-Y, Jin S-Y, Zhang T-T, Jin S-X, Li X-Y, Yuan H-L (2014). Comparison of anti-bacterial activity of three types of di-O-caffeoylquinic acids in

- Lonicera japonica* flowers based on microcalorimetry. Chinese Journal of Natural Medicines 12(2): 108-113.
112. Jurgonski A, Juskiewicz J, Zdunczyk Z, Krol B (2012). Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. Nutrition 28: 300-306.
 113. Clifford MN (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. J Sci Food Agr 80: 1033-1043.
 114. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. Evid-Based Compl Alt 2013: 1-11.
 115. Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H (2000). Action of Chlorogenic Acid in Vegetables and Fruits as an Inhibitor of 8-Hydroxydeoxyguanosine Formation In Vitro and in a Rat Carcinogenesis Model. Food Chem Toxicol 38: 467-471.
 116. Sotillo DVR, Hadley M (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. J Nutr Biochem 13: 717-726.
 117. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M (2005). Inhibition of Activator Protein-1, NFκB, and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid. J Biol Chem 280(30): 27888-27895.
 118. Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, Souza GEP (2006). Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. Biol Pharm Bull 29(11): 2236-2240.
 119. Bassoli BK, Cassolla P, Borba-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bazotte RB, Silva RSSF, Souza HM (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. Cell Biochem Funct 26: 320-328.
 120. Nicasio P, Aguilar-Santamaria L, Aranda E, Ortiz S, Gonzalez M (2005). Hypoglycemic Effect and Chlorogenic Acid Content in Two *Cecropia* species. Phytother Res 19: 661-664.

121. Sotillo DVR, Hadleya MT, Sotillo JE (2006). Insulin receptor exon 11+/- is expressed in Zucker (fa/fa) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. *J Nutr Biochem* 17: 63-71.
122. Popova M, Chen C-N, Chen P-Y, Huang C-Y, Bankova V (2010). A Validated Spectrophotometric Method for Quantification of Prenylated Flavanones in Pacific Propolis from Taiwan. *Phytochem Analysis* 21: 186-191.
123. Bankova V (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100: 114-117.
124. 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.
125. Zhang C-P, Zheng H-Q, Liu G, Hu F-L (2011). Development and validation of HPLC method for determination of salicin in poplar buds: Application for screening of counterfeit propolis. *Food Chem* 127: 345-350.
126. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agr Food Chem* 50: 2502-2506.
127. Piccinelli AL, Fernandez MC, Cuesta-Rubio O, Hernandez IM, Simone F, Rastelli L (2005). Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *J Agr Food Chem* 53: 9010-9016.
128. Lotti C, Fernandez MC, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Hernandez IM, Rastrell L (2010). Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *J Agr Food Chem* 58: 2209-2213.
129. Bankova V, Galabov AS, Antonova D, Vilhelmova N, Di Perri B (2014). Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* 21: 1432-1438.
130. Zordi N, Cortesi A, Kikic I, Moneghini M, Solinas D, Innocenti G, Portolan A, Baratto G, Dall'Acqua S (2014). The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. *J Supercrit Fluid* 95: 491-498.
131. Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, Sabatini AG, Marcazzan GL, Bogdanov S (2004). Validated Methods for the

- Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochem Analysis* 15: 235-240.
132. 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.
 133. Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res* 20(6): 531-536.
 134. Kasote D, Suleman T, Chen W, Sandasi M, Viljoen A, Vuuren S (2014). Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. *Biochem Syst Ecol* 55: 156-163.
 135. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I (2006). Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evid-Based Compl Alt* 3(2): 249-254.
 136. Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernandez IM, Rosado A, Rastelli L (2007). Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *J Agr Food Chem* 55: 7502-7509.
 137. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol* 113: 278-283.
 138. Fernandes FH, Guterres ZR, Garcez WS, Lopes SM, Corsino J, Garcez FR (2014). Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Res Int* 62: 20-26.
 139. Freires IA, Alencar SM, Rosalen PL (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem* 110: 267-279.
 140. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agr* 91: 2363-2370.

141. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid-Based Compl Alt* 2(1): 33-38.
142. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK (2008). Brazilian Red Propolis- Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid-Based Compl Alt* 5(4): 435-441.
143. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC, Rastrelli L (2011). Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem* 59: 6484-6491.
144. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I, Kujumgiev A (2000). Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Z Naturforsch* 55c: 790-793.
145. Guo S, Fu S, Shen Z, Zhang Z, Xu Q (2011). Chemical composition, biological activity and application in animal science of propolis- A review. *Advances in Biomedical Engineering* 1: 98-101.
146. Kumazawa S, Nakamura J, Murase M, Miyagawa M, Ahn M-R, Fukumoto S (2008). Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften* 95: 781-786.
147. 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.
148. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos VT (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 116: 452-461.
149. Popova MP, Graikou K, Chinou I, Bankova VS (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J Agr Food Chem* 58: 3167-3176.
150. Popova M, Trusheva B, Antonova D, Cutajar S, Mifsud D, Farrugia C, Tsvetkova I, Najdenski H, Bankova V (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem* 126: 1431-1435.

151. Zhang T, Omar R, Siheri W, Mutairi S, Clements C, Fearnley J, Edrada-Ebel RA, Watson D (2014). Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta* 120: 181-190.
152. Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A (2015). Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia* 106: 167-174.
153. Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L (2002). The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine* 9: 530-535.
154. Garcia-Viguera C, Ferreres F, Tomas-Barberan FA (1993). Study of Canadian Propolis by GC-MS and HPLC. *Z Naturforsch* 48c: 731-735.
155. Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y (1996). HPLC and GC-MS Identification of the Major Organic Constituents in New Zealand Propolis. *Phytochemistry* 42(1): 205-211.
156. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG (2002). Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z Naturforsch* 57c: 530-533.
157. Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S (2002). Constituents of Chinese Propolis and Their Antiproliferative Activities. *J Nat Prod* 65: 673-676.
158. Popova MP, Bankova VS, Bogdanov S, Tsvetkova I, Naydenski C, Marcuzzan GL, Sabatini AG (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* 38: 306-311.
159. Morsy AS, Soltan YA, Sallam SMA, Kreuzer M, Alencar SM, Abdalla AL (2015). Comparison of the in vitro efficiency of supplementary beepropolis extracts of different origin in enhancing the ruminaldegradability of organic matter and mitigating the formation of methane. *Anim Feed Sci Tech* 199: 51-60.
160. 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 Tech* 47: 2510-2518.

161. 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: 3418-3423.
162. 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: 276-283.
163. Valadares BLB, Graf U, Spano MA (2008). Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46: 1103-1110.
164. Kosalec V, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knezevic S (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* 54: 65-72.
165. Sobocanec S, Sverko V, Balog T, Saric A, Rusak G, Likic S, Kusic B, Katalinic V, Radic S, Marotti T (2006). Oxidant/Antioxidant Properties of Croatian Native Propolis. *J Agr Food Chem* 54: 8018-8026.
166. Benkovic V, Knezevic AH, Dikic D, Lisicic D, Orsolic N, Basic I, Kosalec I, Kopjar N (2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in c-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* 15: 851-858.
167. Aliboni A, D'Andrea A, Massanisso P (2011). Treatment of propolis specimens from Central Italy to yield a product with a lower charge of allergenic species. *Sep Purif Technol* 82: 71-75.
168. 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.
169. Volpi N, Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 42: 354-361.
170. Tsao R, Deng Z (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B* 812: 85-99.
171. 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.

172. Jiang L, Fang G, Zhang Y, Cao G, Wang S (2008). Analysis of Flavonoids in Propolis and *Ginkgo biloba* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. J Agr Food Chem 56: 11571-11577.
173. Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT-Food Sci Technol 39: 756-761.
174. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana K, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol 72: 239-246.
175. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacol 64: 235-240.
176. Varanda EA, Monti R, Tavares DC (1999). Inhibitory Effect of Propolis and Bee Venom on the Mutagenicity of Some Direct- and Indirect-Acting Mutagens. Teratogen Carcin Mut 19: 403-413.
177. Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol 73: 243-249.
178. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem 84: 329-339.
179. Orsolic N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. J Ethnopharmacol 94: 307-315.
180. Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life Sci 76: 545-558.
181. Moreno MIN, Zampini IC, Ordonez RM, Jaime GS, Vattuone MA, Isla MI (2005). Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina. J Agr Food Chem 53: 8957-8962.

182. 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.
183. Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 161: 327-333.
184. Chen C-N, Wu C-L, Lin J-K (2007). Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Cancer Lett* 245: 218-231.
185. Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castaneda M, Dominguez Z, Robles R, Vazquez-Moreno L, Velazquez EF, Astiazaran H, Lugo E, Velazquez C (2007). Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Med* 73: 1469-1474.
186. Bufalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM (2009). *In vitro* Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. *Evid-Based Compl Alt* 6(4): 483-487.
187. Li F, Awale S, Zhang H, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S (2009). Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J Nat Prod* 72: 1283-1287.
188. Hady FKA, Hegazi AG (2002). Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z Naturforsch* 57c: 386-394.
189. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L, Lin J-K (2004). Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *Evid-Based Compl Alt* 1(2): 175-185.
190. Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A (2005). Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evid-Based Compl Alt* 2(1): 85-92.
191. Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol* 86: 69-73.

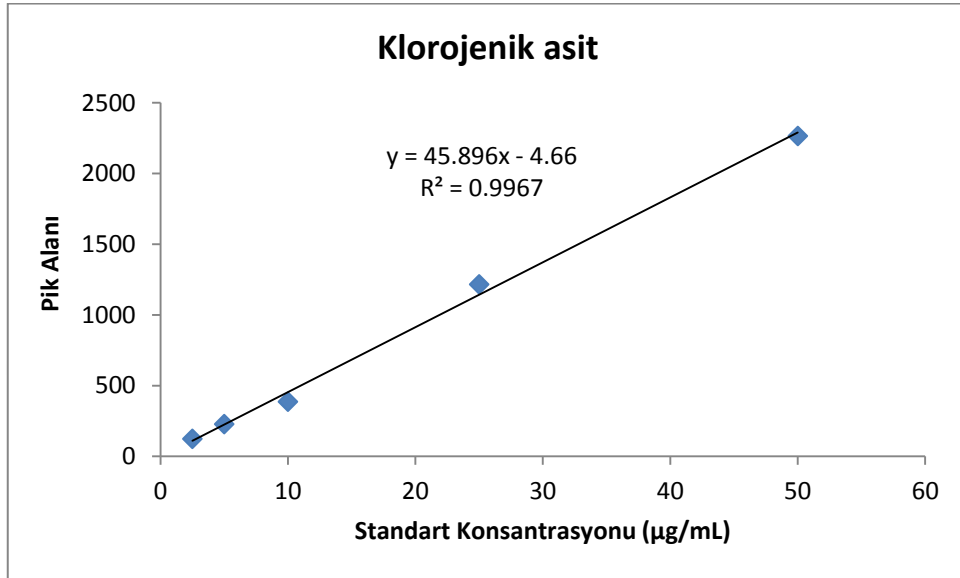
192. Bankova VS, Christov RS, Tejera AD (1998). Lignans and Other Constituents of Propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* 49(5): 1411-1415.
193. Münstedt K, Kalder M (2009). Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergol Immunopath* 37(6): 298-301.
194. Wu J-J, Shen C-T, Jong T-T, Young C-C, Yang H-L, Hsu S-L, Chang C-MJ, Shieh C-J (2009). Supercritical carbon dioxide anti-solvent process for purification of micronized propolis particulates and associated anti-cancer activity. *Sep Purif Technol* 70: 190-198.
195. Rizzolo A, Bianchi G, Povo M, Migliori CA, Contarini G, Pelizzola V, Cattaneo TMP (2016). Volatile compound composition and antioxidant activity of cooked ham slices packed in propolis-based active packaging. *Food Packaging and Shelf Life* 8: 41-49.
196. Osés SM, Pascual-Mate A, Fernandez-Muino MA, Lopez-Diaz TM, Sancho MT (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem* 196: 1215-1223.
197. Naczka M, Shahidi F (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054: 95-111.
198. 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.
199. Ulusoy E (2010). Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
200. Lagouri V, Prasianaki D, Krysta F (2014). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *Int J Food Prop* 17: 511-522.
201. Pastor C, Sanchez-Gonzalez L, Marcilla A, Chiralt A, Chafer M, Gonzalez-Martinez C (2011). Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biol Tec* 60: 64-70.
202. Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima S (1994). Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Biosci Biotech Bioch* 58(5): 945-946.

203. Pereira AD, Andrade SF, Swerts MSO, Maistro EL (2008). First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 46: 2580-2584.
204. 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.
205. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA (2013). Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Braz J Microbiol* 44(2): 577-585.
206. Kai H, Obuchi M, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi S, Park YK, Matsuno K, Yasukawa K, Kurokawa M (2014). *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). *Journal of Functional Foods* 8: 214-223.
207. 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.
208. Katircioğlu H, Mercan N (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions African. *J Biotechnol* 5(11): 1151-1153.
209. Funari CS, Ferro VO, Mathor MB (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 111: 206-212.
210. El-Sharkawy EE, Kames AOG, Sayed SM, Nisr NAEL, 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: 415-421.
211. Niki E (2011). Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? *Journal of Berry Research* 1: 169-176.
212. Mouhoubi-Tafnine Z, Ouchemoukh S, Tamendjari A (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind Crop Prod* 88: 85-90.

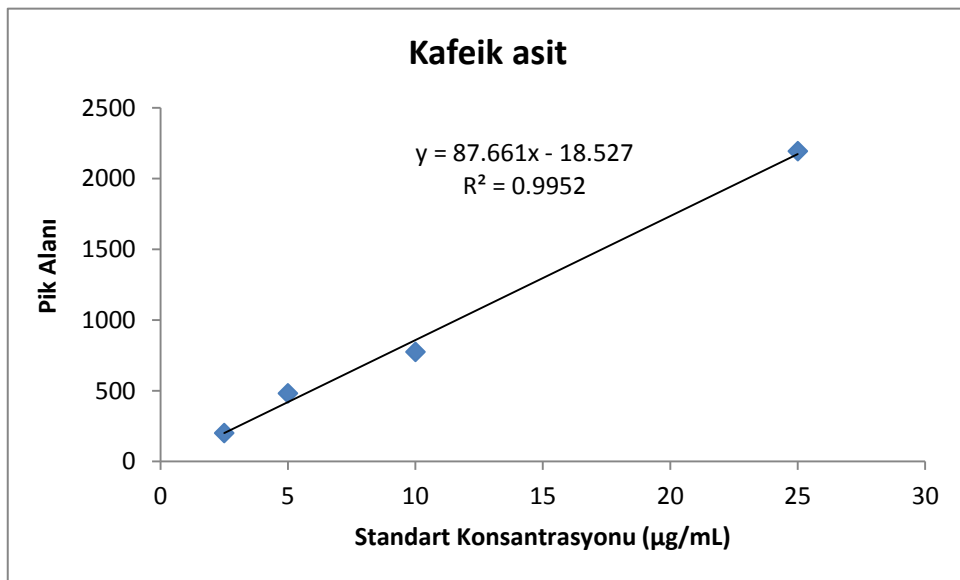
213. Aliyazıcıoğlu R, Sahin H, Ertürk O, Ulusoy E, Kolaylı S (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *Int J Food Prop* 16: 277-287.
214. Erdogan S, Ates B, Durmaz G, Yılmaz I, Seckin T (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem Toxicol* 49: 1592-1597.
215. Silva JC, Rodrigues S, Feas X, Estevinho LM (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* 50: 1790-1795.
216. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern M* 9(4): 1-9.
217. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli Çözücülerde Türk Propolisinin Çözünürlüğünün İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
218. Şahin H (2010). Ormangülü Balı ve Bitkisindeki GTX-III İzoformunun LC-MS/MS ile Aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
219. 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.
220. Cardoso JG, Iorio NLP, Rodrigues LF, Couri MLB, Farah A, Maia LC, Antonio AG (2016). Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol* 65: 77-81.
221. Szliszka E, Sokol-Letowska A, Kucharska AZ, Jaworska D, Czuba ZP, Krol W (2013). Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid-Based Compl Alt* 2013: 1-12.
222. Yildirim Z, Hacıevliyagil S, Kutlu NO, Aydın NE, Kurkcuoğlu M, Iraz M, Durmaz R (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacol Res* 49: 287-292.

9. EKLER

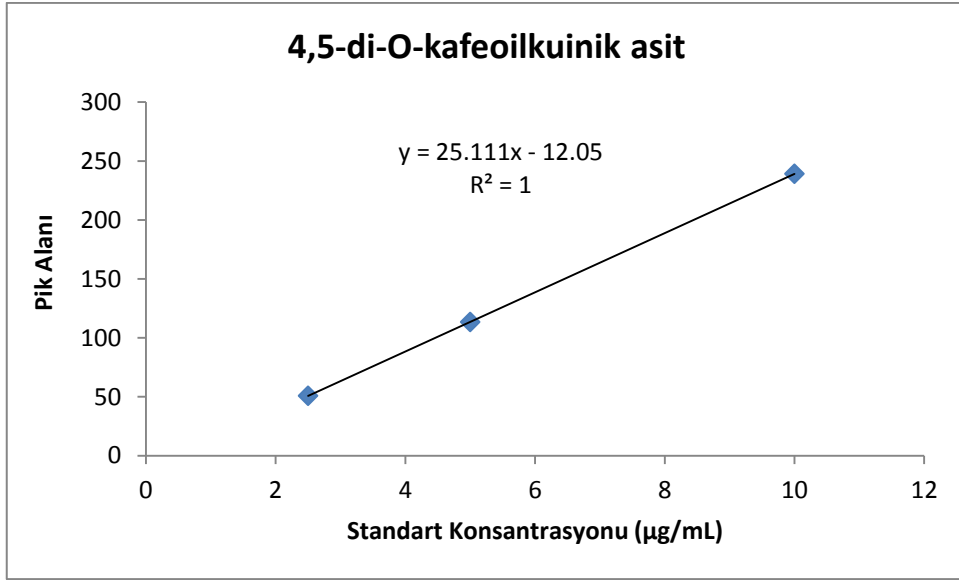
9.1. Polifenol ve Kafeoilkuinik Asit Standartlarının Kalibrasyon Grafikleri



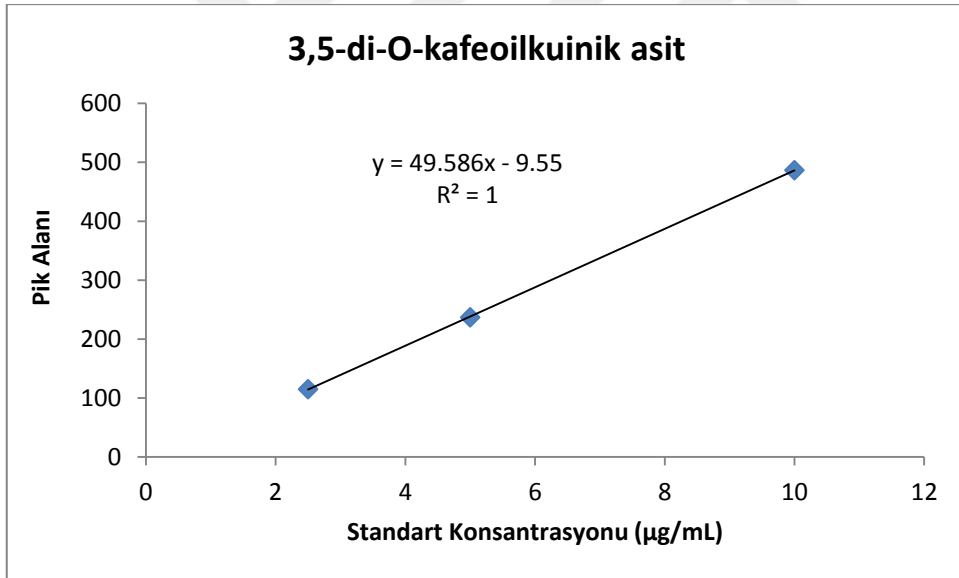
Grafik 1. Klorojenik asitin kalibrasyon grafiği



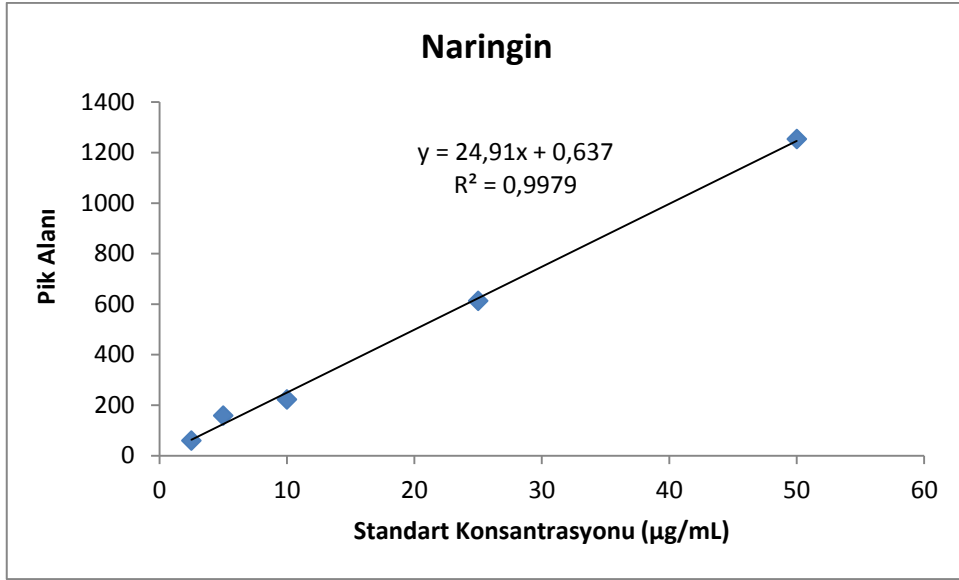
Grafik 2. Kafeik asitin kalibrasyon grafiği



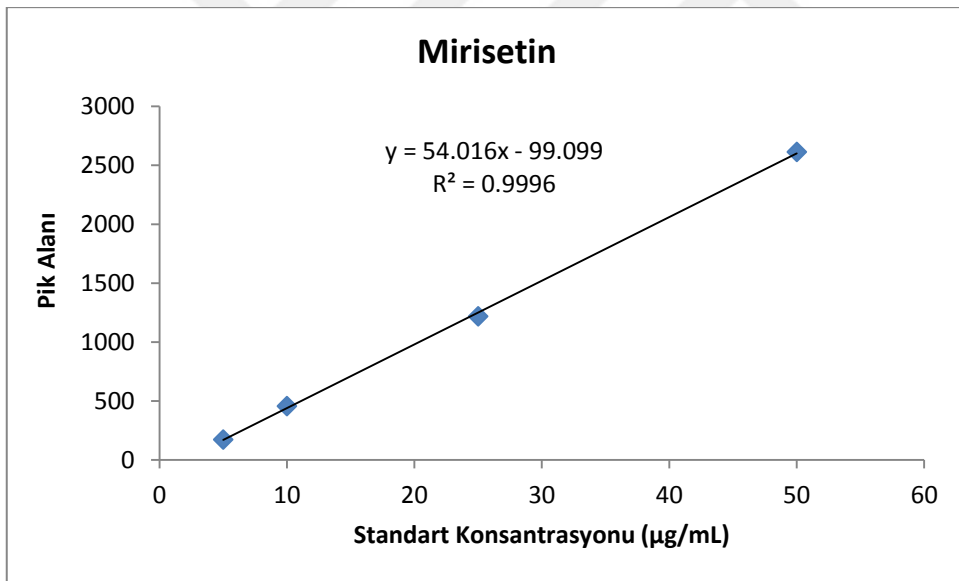
Grafik 3. 4,5-di-O-kafeoilkuinik asitin kalibrasyon grafiği



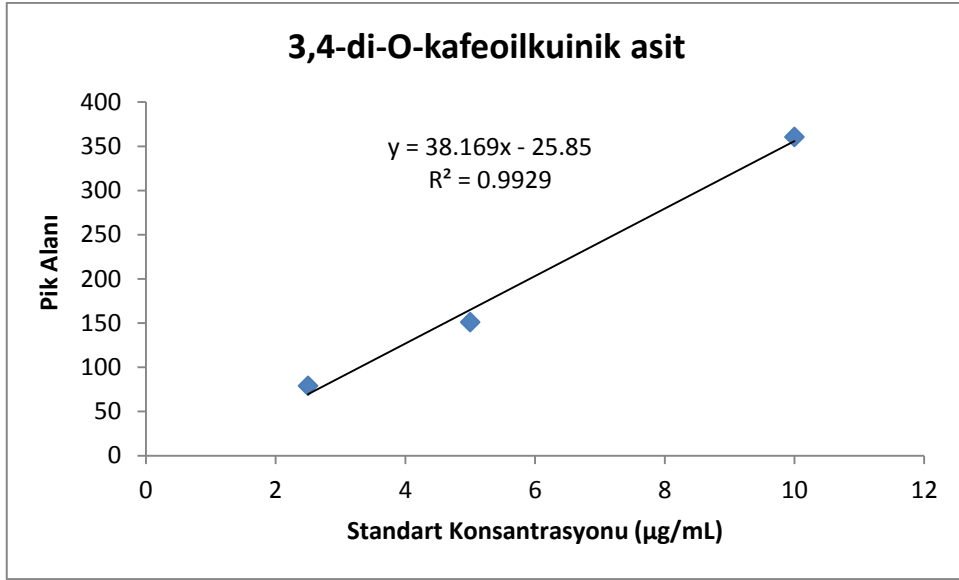
Grafik 4. 3,5-di-O-kafeoilkuinik asitin kalibrasyon grafiği



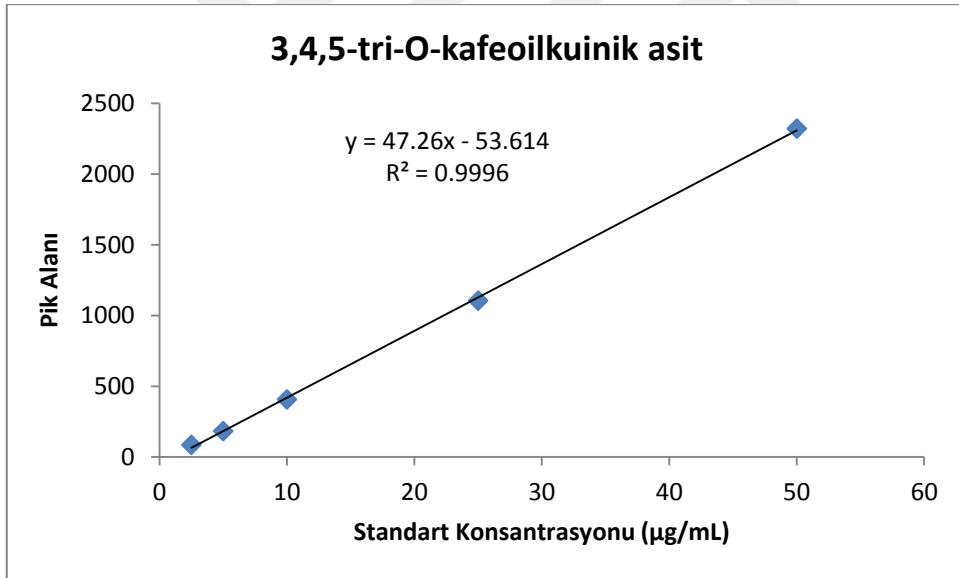
Grafik 5. Naringinin kalibrasyon grafiği



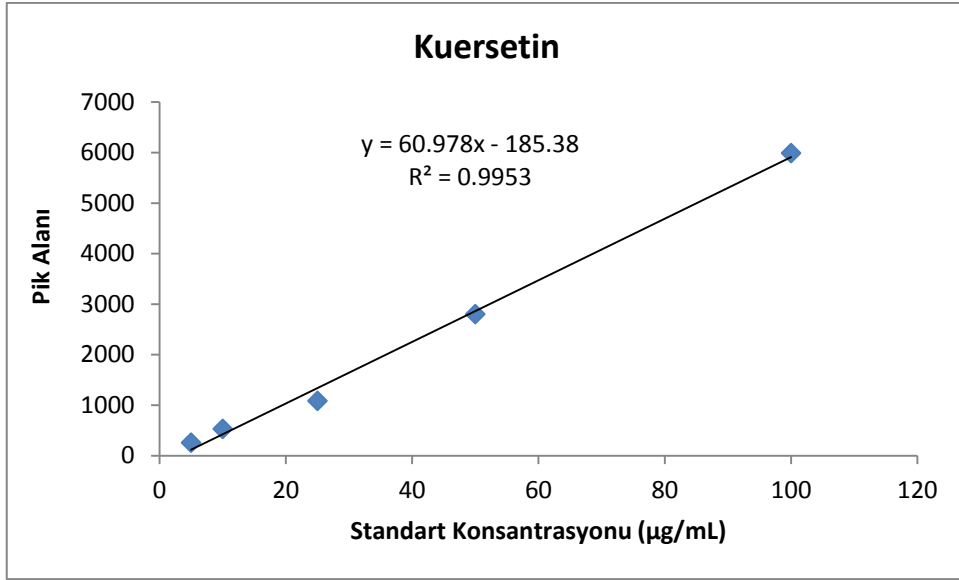
Grafik 6. Mirisetinin kalibrasyon grafiği



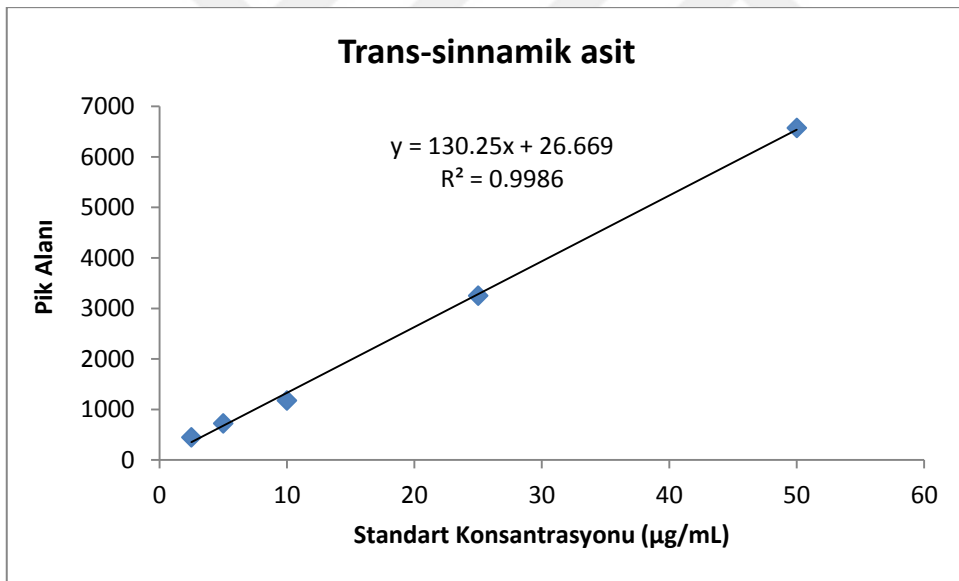
Grafik 7. 3,4-di-O-kafeoilkuinik asitin kalibrasyon grafiği



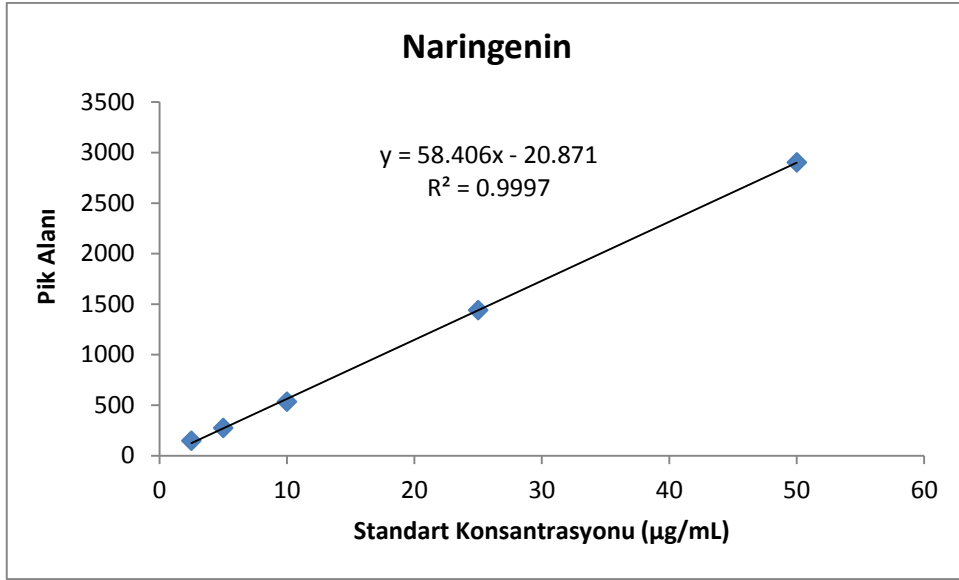
Grafik 8. 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asitin kalibrasyon grafiği



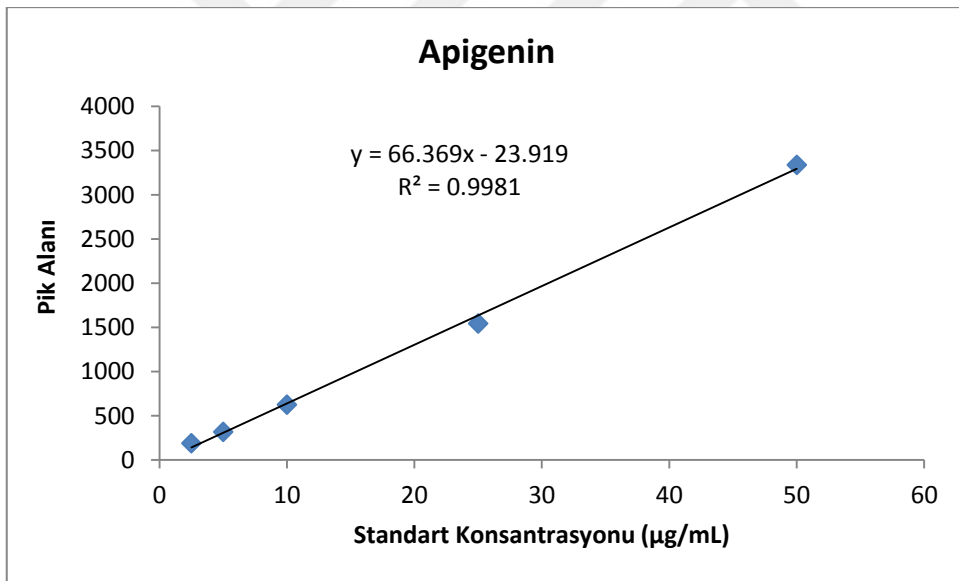
Grafik 9. Kuersetinin kalibrasyon grafiği



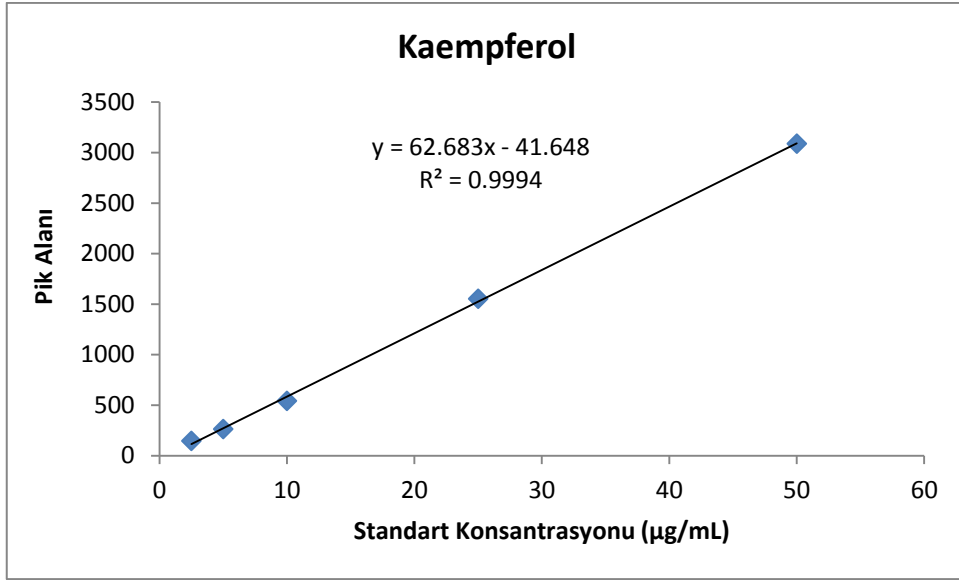
Grafik 10. Trans-sinamik asitin kalibrasyon grafiği



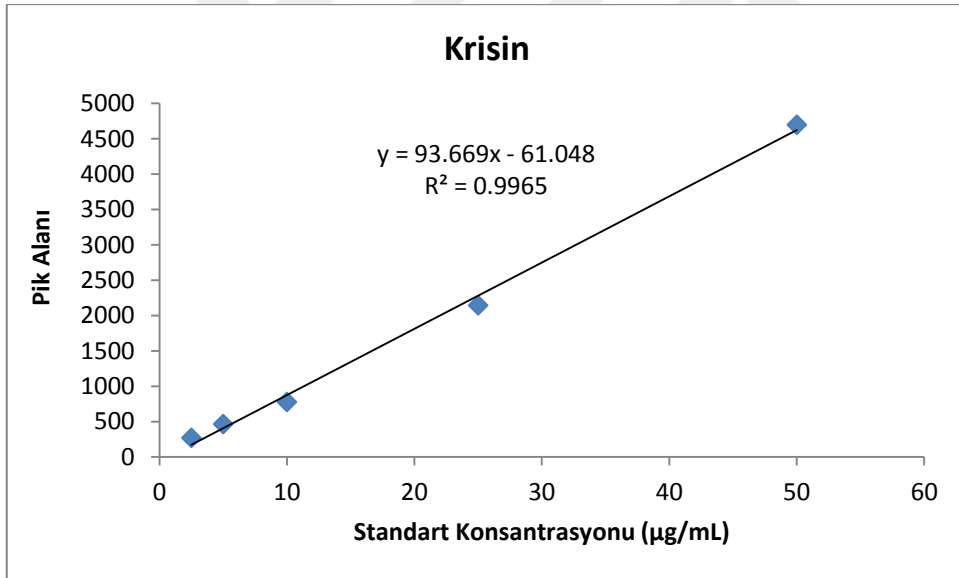
Grafik 11. Naringenin kalibrasyon grafiği



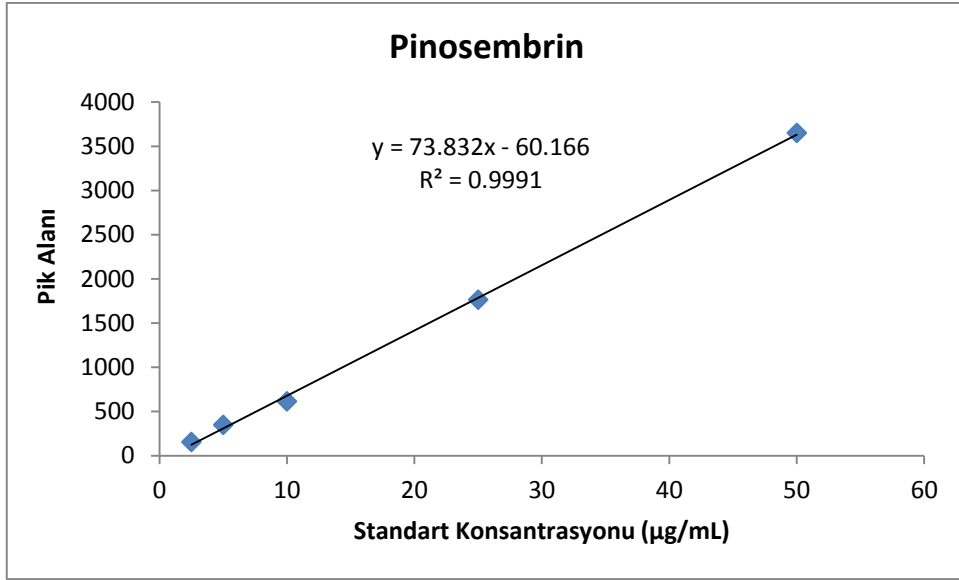
Grafik 12. Apigenin kalibrasyon grafiği



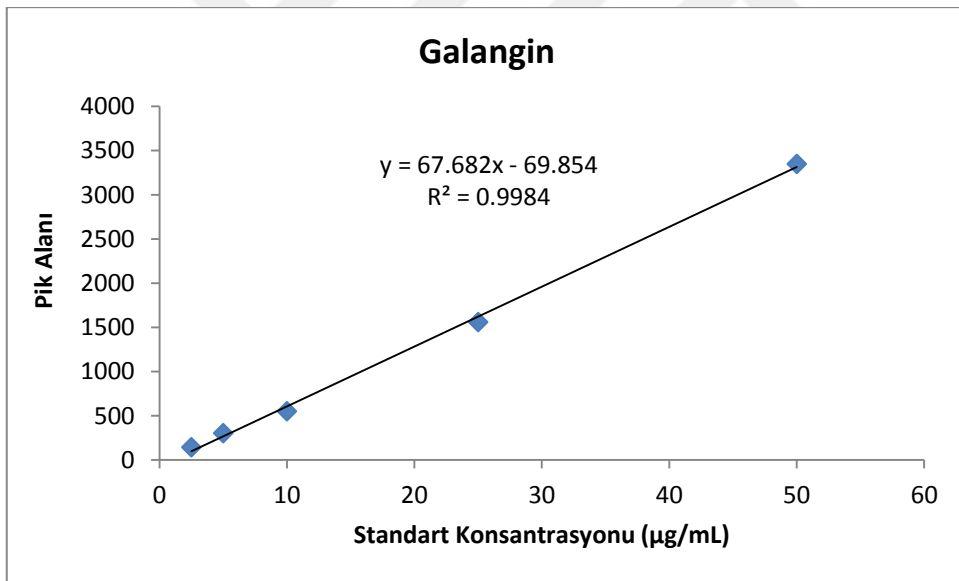
Grafik 13. Kaempferolün kalibrasyon grafiği



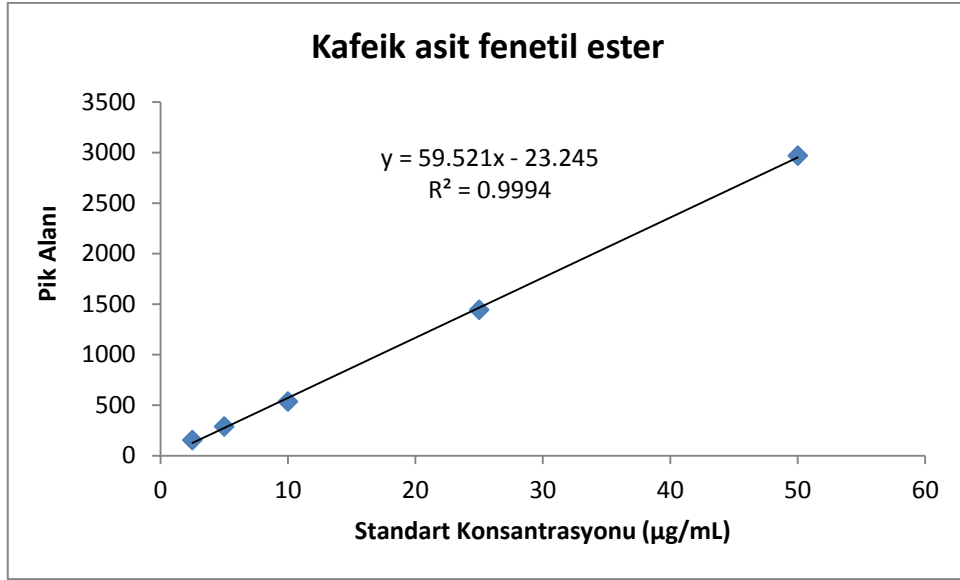
Grafik 14. Krisinin kalibrasyon grafiği



Grafik 15. Pinosembrinin kalibrasyon grafiği



Grafik 16. Galanginin kalibrasyon grafiği



Grafik 17. Kafeik asit fenetil esterinin kalibrasyon grafiği

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU
Doğum Tarihi	08.05.1983
Telefon	0462 377 78 82-89
Medeni Hali	Bekar
E-posta	tubisco@hotmail.com
Adres	K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya (1. Öğretim)	K.T.Ü.	2002-2007
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	K.T.Ü.	2007-2010
Doktora	Tıbbi Biyokimya	K.T.Ü.	2010-2017

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görev, Unvan	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	K.T.Ü. S.A.B.E. Tıbbi Biyokimya Abd	2009-2016

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Propolis, Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri, Oksidan-Antioksidan Sistemler, HPLC, GC-MS

YAYINLAR

1. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, **Cakiroglu TN**, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and Protective Effects of Turkish Propolis on H₂O₂-induced DNA Damage in Foreskin Fibroblast Cell Lines. *Acta Biol Hung* 62(4): 388-396.
2. Barlak Y, Değer O, Uçar M, **Çakıroğlu TN** (2015). Effects of Turkish propolis extract on secretion of polymorphonuclear elastase following respiratory burst. *Türk J Biol* 39: 194-201.

BİLDİRİLER

1. Demir S, Aliyazıcıoğlu Y, Turan İ, Değer O, **Çakıroğlu TN**, Akalın İ, Bedir A (2010). Propolis Ekstraktlarının Fibroblast Hücre Serilerinde H₂O₂ ile Uyarılmış DNA Hasarı (Genotoksisite) Üzerine Etkisinin Comet Assay Yöntemi ile Araştırılması. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, Eskişehir, 27-30 Ekim 2010, 147.
2. **Çakıroğlu TN**, Değer O, Aliyazıcıoğlu Y, Alver A, Barlak Y, Turan İ, Demir S (2010). Çeşitli Çözücülerde Türk Propolisinin Çözünürlüğünün İncelenmesi. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, Eskişehir, 27-30 Ekim 2010, 150.
3. Turan İ, Demir S, **Cakiroglu TN**, Misir S, Aliyazicioglu Y, Deger O (2011). Türk Propolisinin Farklı Konsantrasyonlardaki Etanolik Ekstraktlarının DNA Hasarı İyileşme Zamanı Üzerine Etkisinin İncelenmesi. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 29 Kasım-2 Aralık 2011, 115.
4. **Çakıroğlu TN**, Değer O, Karakaş S, Akbulut K (2013). Türk Propolisinin Metanollü Ekstraktının Antioksidan Aktivitesi. Sağlıkta İnovasyon Çalıştayı “Üniversiteden Sanayiye”, İzmir, 16-17 Mayıs 2013, 90.
5. **Çakıroğlu TN**, Değer O, Akbulut K (2013). Polen ve Propolisin Polimorfo Nükleer Lökositlerde Hidroksil Radikali Temizleme Aktivitesi Üzerine Etkileri. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, 3-6 Eylül, 2013, 165.
6. Akbulut K, Kulaksiz Deger B, Deger O, Imamoglu M, Demir S, **Cakiroglu TN**, Ayar A (2014). Effect of Water Extract of Turkish Propolis on Intracellular Calcium and Hydrogen Peroxide Levels in Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma Cell Lines (HEP-2). IFCC WorldLab, Istanbul, Turkey, 22-26 June 2014, 1395.

7. **Çakiroğlu TN**, Deger O, Akbulut K, Demir S (2014). Effect of Propolis Extracts on Cathepsin Secretion from KML-62 Cell Lines. IFCC WorldLab, Istanbul, Turkey, 22-26 June 2014, 1413.
8. **Çakiroğlu TN**, Değer O, Yaşar A, Akbulut K (2015). Erzurum Propolisi Etanollü Ekstraktının Bileşenlerinin Farklı Kolonlarda GC-MS ile Belirlenmesi. 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 135.
9. Akbulut K, Ghanbari Taghiabad J, Değer O, Demir S, Şentürk A, **Çakiroğlu TN** (2015). Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının HEp-2 Hücre Serilerinde Hücre içi SOD ve CAT Düzeylerine Etkisi. 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 331.
10. Çerçiler S, Deger O, Akbulut K, Demir S, Deger Kulaksiz B, **Çakiroğlu TN** (2016). Effect of Water Extract of Turkish Propolis on Mitochondrial Membrane Potential in Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma Cell Lines. The FEBS Journal Volume 283 Supplement 1 September 2016, 252.
11. **Çakiroğlu TN**, Deger O, Yasar A, Akbulut K (2016). Identification of Water Extract of Propolis Components by Using Different Columns in Gas Chromatography-Mass Spectrometry. The FEBS Journal Volume 283 Supplement 1 September 2016, 390.

BURSLAR

1. TÜBİTAK 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı (Doktora Öğrencisi-Ücretli Çalışan)

