

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

ORCID : - - -

Trabzon

ÖNSÖZ

Karşılaştığım zorluklar zamanımı alsa da karşılığında bir o kadar değerli tecrübeler kazanmamı sağlamıştır. Bu olumsuzluklar, onları ortadan kaldırmak ve aynı yolu paylaştığım bilim insanlarına aynı zamanda da bilime faydalı olmam konusunda azmimi daha da arttırmıştır. Bizler çıktığımız bu yolda önümüze çıkan engelleri sadece kendimiz için değil aynı zamanda bizden sonraki nesiller içinde ortadan kaldırmayı görev edinmeliyiz. Ancak bu düşünce ile ailemize, toplumumuza ve milletimize faydalı birer birey olabilir, bilime ve eğitime katkı sağlayabiliriz.

Akademik sürecimin başından itibaren nice zorluklarla karşılaştım da önümdeki yolun daha uzun ve çetrefilli olduğu su götürmez bir gerçektir. Bizler bu yolu ailemizin, hocalarımızın ve arkadaşlarımızın desteği ile kat edebiliriz.

Çalışmamın her bir adımında vermiş olduğu maddi ve manevi desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübeleri ışığında bu süreci en sağlıklı şekilde tamamlamamı sağlayan ve bana bu süreçte yol gösteren saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya teşekkürü borç bilirim.

Bu eserin oluşmasında tecrübeleri ve birikimleri ile desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Zehra CAN hocama, deneysel çalışmalarımnda laboratuvarını kullanmama müsaade eden Doç. Dr. Oktay YILDIZ hocama, gerek arkadaşlıkları gerekse çalışmalarımdaki yardımları ile yanımda olan Hilal Ebru Çakır, Ceren Birinci ve Esra Birinci'ye şükranlarımı sunarım. Çalışmam süresince yardımları ile çalışmama değer katan Dr. İkbal Sarıkaya ve Dr. Elif Ayazoğlu Demir hocalarıma ve Melek Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada geliştirilen HPLC-PDA metodunun validasyon işlemlerinde sağladığı yardımlardan dolayı Sayın Emrah Kalyoncu'ya teşekkür ederim.

Bu zamana kadar aldığım eğitimler ve önüme çıkan engelleri aşma konusunda sevgi ve destekleri ile her an yanımda olan başta annem, babam, kardeşlerim ve abilerim olmak üzere tüm aileme ve sevgisi ile desteğini eksik etmeyen eşim Cennet'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yakup KARA
Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Fenolik Bileşiklerin RP-HPLC-PDA İle Analiz Yöntemi Geliştirilmesi, Validasyonu Ve Etanolik Propolis Özütlerine Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 23/06/2020

Yakup KARA

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| ÖNSÖZ..... | III |
| TEZ ETİK BEYANNAMESİ..... | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| ÖZET..... | VIII |
| SUMMARY..... | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | X |
| TABLolar DİZİNİ..... | XI |
| KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ..... | XIII |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. Propolisin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapısı..... | 1 |
| 1.3. Biyolojik Aktivitesi ve Apiterapik Olarak Önemi..... | 4 |
| 1.4. Antioksidanlar..... | 6 |
| 1.5. Antioksidan Savunma Sistemi..... | 7 |
| 1.6. Fenolik Bileşikler..... | 7 |
| 1.6.1. Fenolik Asitler..... | 8 |
| 1.6.2. Flavonoidler..... | 9 |
| 1.6.2.1. Antosiyanidinler..... | 10 |
| 1.6.2.2. Flavonlar ve Flavonollar..... | 10 |
| 1.6.2.3. Flavononlar..... | 11 |
| 1.6.2.4. Kateşinler ve Löykoantosiyanidinler..... | 11 |
| 1.6.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)..... | 12 |
| 1.7. Kromatografi..... | 13 |
| 1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)..... | 15 |
| 1.7.1.1. Ultraviyole (UV) Dedektör..... | 17 |
| 1.7.1.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)..... | 18 |
| 1.8. Kromatografide Temel Parametreler..... | 19 |
| 1.8.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü..... | 19 |
| 1.8.2. Seçicilik Faktörü..... | 20 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.8.3. | Kolon Etkinliği..... | 20 |
| 1.8.4. | Ayırma Gücü..... | 21 |
| 1.9. | Antioksidan Tayin Yöntemleri..... | 21 |
| 1.9.1. | Toplam Fenolik Madde Tayini..... | 22 |
| 1.9.2. | Toplam Flavonoid Madde Tayini..... | 22 |
| 1.9.3. | Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP..... | 22 |
| 1.9.4. | DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi..... | 23 |
| 2. | YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 24 |
| 2.1. | Kullanılan Cihazlar..... | 24 |
| 2.2. | Kimyasal Maddeler..... | 24 |
| 2.3. | Kullanılan Çözeltiler..... | 26 |
| 2.4. | Çalışılan Örneklerin Temini ve Saklama Koşulları..... | 28 |
| 2.5. | Propolis Ekstraktlarının Analizler İçin Hazırlanması..... | 28 |
| 2.6. | Fiziksel Analizler..... | 31 |
| 2.6.1. | Briks Tayini..... | 31 |
| 2.6.2. | pH Tayini..... | 31 |
| 2.7. | Antioksidan Analizler..... | 31 |
| 2.7.1. | Toplam Fenolik Madde Analizi..... | 31 |
| 2.7.2. | Toplam Flavonoid Madde Analizi..... | 32 |
| 2.7.3. | DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analizi..... | 33 |
| 2.7.4. | Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analizi..... | 34 |
| 2.8. | HPLC-PDA ile Fenolik İçeriğın Belirlenmesi..... | 35 |
| 2.8.1. | RP-HPLC-PDA Analiz Koşulları..... | 35 |
| 2.8.2. | Standart Fenolikler..... | 35 |
| 2.8.3. | Kalibrasyon ve Validasyon..... | 36 |
| 2.9. | İstatistiksel Analiz..... | 37 |
| 3. | BULGULAR..... | 39 |
| 3.1. | Fiziksel Analiz Sonuçları..... | 39 |
| 3.1.1. | Briks Analiz Sonucu..... | 39 |
| 3.1.2. | pH Analiz Sonucu..... | 40 |
| 3.2. | Antioksidan Analiz Sonuçları..... | 41 |
| 3.2.1 | Toplam Fenolik Madde Analiz Sonucu..... | 41 |
| 3.2.2. | Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonucu..... | 43 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2.3. | DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analiz Sonucu..... | 45 |
| 3.2.4. | Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analiz Sonucu..... | 47 |
| 3.2.5. | İstatistiksel Analiz Sonucu..... | 48 |
| 3.3. | HPLC-PDA Metod Validasyon ve Fenolik İçerik Analiz Sonuçları..... | 49 |
| 3.3.1. | HPLC-PDA Metod Validasyon Parametreleri..... | 49 |
| 3.3.1.1. | Lineer Ölçüm Aralığı..... | 50 |
| 3.3.1.2. | Keskinlik..... | 51 |
| 3.3.1.3. | Doğruluk..... | 53 |
| 3.3.1.4. | Gözlenebilme Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)..... | 54 |
| 3.3.2. | Standart Fenolik Bileşiklerin Spektrum ve Kromatogramları..... | 55 |
| 3.3.3. | Anadolu Propolisinin Fenolik İçerik Analiz Sonucu..... | 62 |
| 4. | TARTIŞMA..... | 65 |
| 5. | SONUÇLAR..... | 74 |
| 6. | ÖNERİLER..... | 76 |
| 7. | KAYNAKLAR..... | 77 |
| ÖZGEÇMİŞ | | |

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

FENOLİK BİLEŞİKLERİN RP-HPLC-PDA İLE ANALİZ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ, VALİDASYONU VE ETANOLİK PROPOLİS ÖZÜTLERİNE
UYGULANMASI

Yakup KARA

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2020, 101 Sayfa

Bal, polen ve propolis gibi arı ürünlerinin biyolojik aktif değerleri yapılarında bulunan polifenollerden ileri gelmektedir. Arı ürünleri içinde en yüksek polifenol içeren ürün propolisdir. Propolis arılar tarafından çiçek ve tomurcuklardaki reçinelerin toplanması ve bazı enzimlerle işlenmesiyle oluşan doğal bir karışım olup kovanın savunmasında rol oynar. Kovanlardan kazımak suretiyle elde edilen ham propolis direk olarak tüketilemez. Etanolik ekstraktları şeklinde değişik formülasyonlarda işlendikten sonra tüketilmektedir. Yapılan bu çalışma ile etanolik propolis ekstraktlarının hazırlanmasında ve fenolik profilinin tespit edilmesinde optimum şartların belirlenmesi amaçlandı. %0 dan %100'e kadar farklı yüzdelerde etanol/su karışımı kullanılarak en ideal ekstraksiyon çözücüsü arandı. Toplam polifenol (TP), toplam flavonoid (TF), toplam antioksidan (TA) kapasite ve briks düzeylerine göre propolis örneklerinin değerlendirmesi yapıldı. Propolis ekstraktlarının fenolik kompozisyonu kesinlik, doğruluk, LOD, LOQ ve % geri kazanım gibi validasyon parametreleri dikkate alınarak 25 fenolik standart üzerinden HPLC-PDA sisteminde analiz edildi. Sonuç olarak optimum etanolik çözücü yüzdesinin %60 ile %70 arasında değişim gösterdiği, ultrasonik ekstraksiyon işleminin verimi arttırdığı ve en ideal propolis-çözücü oranının (g/v) 1:5 ile 1:10 aralığında değişim gösterdiği tespit edildi. Kullanılan çözücünün polaritesi arttıkça fenolik asit miktarının arttığı, buna karşın polarite azaldıkça flavanoidlerin miktarı arttığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Propolis, Ekstraksiyon, Antioksidan, Fenolik Bileşik, HPLC-PDA, Validasyon

Master Thesis

SUMMARY

DEVELOPING ANALYSIS METHOD OF PHENOLIC COMPOUNDS BY RP-HPLC-PDA, VALIDATION AND APPLICATION TO ETHANOLIC PROPOLIS EXTRACTS

Yakup KARA

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2020, 101 Pages

The biological active values of bee products such as honey, pollen and propolis are due to the polyphenols contained in it. The highest polyphenol-containing product among the bee products is propolis. Propolis is a natural mixture formed by collecting the resins in flowers and buds by bees and processing them with some enzymes and plays a role in the defense of the hive. Raw propolis obtained by scraping from the hives cannot be consumed directly. It is consumed after processing in different formulations as ethanolic extracts. With this study, it was aimed to determine the optimum conditions for the preparation of ethanolic propolis extracts and determination of the phenolic profile. The ideal extraction solvent was searched using ethanol / water mixture in different percentages from 0% to 100%. Propolis samples were evaluated according to total polyphenol (TP), total flavonoid (TF), total antioxidant (TA) capacity and brix values. The phenolic composition of propolis extracts were analyzed with the 25 phenolic standards in the HPLC-PDA system, considering the validation parameters such as precision, accuracy, LOD, LOQ and % recovery. As a result, it was determined that the optimum ethanolic solvent percentage varies between 60% and 70%, the ultrasonic extraction process increases the solubility and the most ideal propolis-solvent ratio (g/v) varies between 1: 5 and 1:10. It was found that the amount of phenolic acid increased as the polarity of the solvent used increased, whereas the amount of flavonoids increased as the polarity decreased.

Key Words: Propolis, Extraction, Antioxidant, Phenolic Compound, HPLC-PDA, Validation

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı..... | 9 |
| Şekil 2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi şematik gösterim..... | 16 |
| Şekil 3. Fotodiyot dizisi dedektörü çalışma prensibi..... | 19 |
| Şekil 4. Kromatogramda alıkonma zamanı ve alıkonma hacimlerinin belirlenmesi..... | 20 |
| Şekil 5. Demir (III)'ün demir (II)'ye indirgenme reaksiyonu..... | 22 |
| Şekil 6. DPPH• radikalinin kimyasal yapısı..... | 23 |
| Şekil 7. Fenolik analiz için ayrılan propolis ekstraktları..... | 29 |
| Şekil 8. Döner buharlaştırıcıda yapılan çözücü uzaklaştırma işlemi sonrası..... | 30 |
| Şekil 9. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi..... | 30 |
| Şekil 10. Anadolu propolisine ait briks değerleri..... | 40 |
| Şekil 11. Propolis ekstraktlarında çözücü oranlarına bağlı pH değişimi..... | 41 |
| Şekil 12. Gallik asit standart kalibrasyon grafiği..... | 42 |
| Şekil 13. Farklı çözücü oranlarında toplam fenolik madde (TP) miktarı..... | 42 |
| Şekil 14. Farklı çözünen-çözücü oranlarında TP madde miktarı değişimi..... | 43 |
| Şekil 15. Kuersetin standart kalibrasyon grafiği..... | 44 |
| Şekil 16. Farklı çözücü oranlarında toplam flavonoid madde (TF) miktarı..... | 45 |
| Şekil 17. Troloks'a ait SC50 hesaplama grafiği..... | 46 |
| Şekil 18. Farklı çözücü oranlarında DPPH aktivite değerleri..... | 46 |
| Şekil 19. FeSO ₄ .7H ₂ O'ın standart kalibrasyon grafiği..... | 47 |
| Şekil 20. Farklı çözücü oranlarında antioksidan güç FRAP değerleri..... | 48 |
| Şekil 21. 250 nm dalga boyundaki standart kromatogram..... | 60 |
| Şekil 22. 280 nm dalga boyundaki standart kromatogram..... | 61 |
| Şekil 23. 320 nm dalga boyundaki standart kromatogram..... | 61 |
| Şekil 24. 360 nm dalga boyundaki standart kromatogram..... | 61 |
| Şekil 25. 25 standardı içeren birleştirilmiş kromatogram..... | 62 |

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Tablo 1. Alkolik propolis ekstraktında tespit edilen bazı kimyasal maddeler..... | 3 |
| Tablo 2. Propoliste tespit edilen bazı bileşik türleri ve adetleri..... | 3 |
| Tablo 3. Fenolik asitlerden bazılarına ait yapısal gösterimler..... | 8 |
| Tablo 4. Antosiyanidinler ve bazı antosiyanidin türevi bileşikler..... | 10 |
| Tablo 5. Flavon ve Flavonolların kimyasal yapıları ve bazı türevleri..... | 11 |
| Tablo 6. Flavanonların genel yapısı ve bazı flavanon türevi bileşikler..... | 11 |
| Tablo 7. Kateşinlerin genel yapısı ve bazı kateşin türevi bileşikler..... | 12 |
| Tablo 8. Proantosiyanidinlere ait kimyasal yapı..... | 12 |
| Tablo 9. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması..... | 13 |
| Tablo 10. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka/model bilgileri..... | 24 |
| Tablo 11. Çalışmada kullanılan kimyasal madde bilgileri..... | 24 |
| Tablo 12. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları..... | 26 |
| Tablo 13. Anadolu propolis örneğinin ekstraksiyon koşulları..... | 28 |
| Tablo 14. İdeal propolis-çözücü oranının belirlenmesi için doygunluk testi..... | 29 |
| Tablo 15. Toplam fenolik madde miktarı deney prosedürü..... | 32 |
| Tablo 16. Toplam flavonoid madde miktarı deney prosedürü..... | 33 |
| Tablo 17. DPPH• radikal temizleme aktivitesi tayini deney prosedürü..... | 33 |
| Tablo 18. Demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP tayini deney prosedürü... | 34 |
| Tablo 19. HPLC-PDA sisteminde uygulanan gradient programı..... | 35 |
| Tablo 20. Anadolu propolisine ait briks değerleri..... | 39 |
| Tablo 21. Propolis ekstraktlarında çözücü oranlarına bağlı pH değişimi..... | 40 |
| Tablo 22. Farklı çözücü oranlarında toplam fenolik madde (TP) miktarı..... | 42 |
| Tablo 23. Farklı çözücü oranlarında toplam flavonoid madde (TF) miktarı..... | 44 |
| Tablo 24. Farklı çözücü oranlarında DPPH aktivite değerleri..... | 46 |
| Tablo 25. Farklı çözücü oranlarında antioksidan güç FRAP değerleri..... | 48 |
| Tablo 26. Fiziksel parametrelerin korelasyon düzeyleri..... | 49 |
| Tablo 27. Antioksidan parametrelerin korelasyon düzeyleri..... | 49 |
| Tablo 28. Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki kalibrasyon bilgileri..... | 50 |
| Tablo 29. Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki kesinlik ölçütleri..... | 52 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tablo 30. | Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki doğruluk ölçütleri..... | 53 |
| Tablo 31. | HPLC-PDA sisteminde standartlara ait gözlenebilme ve tayin limit değerleri..... | 54 |
| Tablo 32. | Metotta kullanılan standartlara ait kimyasal yapılar ve spektrumlar..... | 56 |
| Tablo 33. | Normal ekstraksiyon ile hazırlanan Anadolu propolisi fenolik içerik analiz sonucu..... | 63 |
| Tablo 34. | Ultrasonik ekstraksiyon ile hazırlanan Anadolu propolisi fenolik içerik analiz sonucu..... | 64 |



SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|---------------|---|
| μg | : Mikrogram |
| μl | : Mikrolitre |
| μm | : Mikrometre |
| Ca | : Kalsiyum |
| CAPE | : Kafeik asit fenetil ester |
| Cu | : Bakır |
| DMSO | : Dimetil Sülfoksit |
| DPPH | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| Fe | : Demir |
| FRAP | : Ferrik İndirgeyici Antioksidan Gücü |
| g | : Gram |
| GAE | : Gallik asit eşdeğeri |
| GC | : Gaz kromatografisi |
| H | : Tabaka yüksekliği |
| HPLC | : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| I | : İyot |
| K | : Potasyum |
| LOD | : Gözlenebilme sınır |
| LOQ | : Tayin sınır |
| M | : Molarite |
| m | : Kalibrasyon grafiğinin eğimi |
| <i>m-</i> | : Meta pozisyonu |
| Mg | : Magnezyum |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : MiliMolarite |
| Mn | : Mangan |
| N | : Normalite |
| N | : Tabaka sayısı |

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| Na | : Sodyum |
| nm | : Nanometre |
| °C | : Santigrat derece |
| <i>p</i> - | : Para pozisyonu |
| PDA | : Forodiyot dizisi dedektör |
| ppm | : Milyonda bir birim |
| QE | : Kuersetin eşdeğeri |
| R ² | : Determinasyon katsayısı |
| rpm | : Dakikada devir sayısı |
| R _s | : Ayırma gücü |
| SD | : Standart sapma |
| <i>t</i> - | : trans |
| t ₀ | : Ölü zaman |
| TF | : Toplam Flavonoid |
| TLC | : İnce tabaka kromatografisi |
| TP | : Toplam Polifenol |
| TPTZ | : 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine |
| t _R | : Alıkonma zamanı |
| t _s | : Düzeltilmiş alıkonma zamanı |
| UV | : Ultraviyole |
| V ₀ | : Ölü hacim |
| V _R | : Alıkonma hacmi |
| V _S | : Düzeltilmiş alıkonma hacmi |
| Zn | : Çinko |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Türkiye coğrafi konumu ve iklim çeşitliliği sayesinde geniş bitki örtüsü ile arılar için vazgeçilmez bir yaşam alanı sunmaktadır. Arıcılıkta Çin ve Arjantin'i takip eden Türkiye bu konuda kendini geliştirmektedir (Can, 2014). Hem kendi yaşam döngüleri hem de bize sundukları ürünlerle arılar geçmişten günümüze insanların dikkatini çekmişlerdir. Arıların bu denli önemli olmasında ürettikleri bal, polen, propolis, arı sütü ve bal mumu gibi ürünlerin kimyasal yapısı, biyolojik özellikleri, farklı sahalarda uygulanabilirliği ve alternatif tıpta kullanımının olması sayılabilir (Doğan ve Hayoğlu, 2012; Kumova, 2002).

1.2. Propolisin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapısı

Propolis kelimesi, arıların kovanlarının savunmasında kullandıklarının görülmesi ve eski Yunan dilinde pro (ön, giriş) ve polis (şehir) anlamlarındaki kelimelerin birleşmesi neticesinde ortaya çıkmıştır. Propolis ilk kez Yunanlılar tarafından antibiyotik olarak kullanılmıştır (Kutluca vd., 2006). Günümüzde propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-inflamatör, anti-ülser ve antitümör, gibi yararlı biyolojik aktivite göstermesi tıp ve kozmetik alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır. Bu ürünün üretimine baktığımızda, çiçeklerin ve tomurcukların koruyucu reçinelerinin arıların alt çeneleriyle kazınarak toplanması, ağızda nemlendirip yumuşatılması, bazı enzimlerle etkileştirerek pelet haline getirilmesi ve arka bacaklarında bulunan polen sepetine aktarılması ile propolis üretilmiş olur (Ghisalberti, 1979). Arılar propolisi kovanda bulunan delik ve çatlakları kapatmada, petekleri tamir etmede, birbirlerine yapıştırmada ve parlatmada, kovan girişini daraltmada, çeşitli arı hastalıklarından koloniyi korumada kullanır. Arılar propolisin mikroorganizmalara etkisi sayesinde kovanda mantar ve bakteri canlılığını en düşük seviyede tutar.

1960 yılında propolis araştırmacıların dikkatini çekmiş ve kimyasal yapısının aydınlatılması, biyolojik aktivitesinin belirlenmesi, farmakolojik ve tedavi edici etkilerinin araştırılması üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu konuda ilk yayın 1978 yılında

Ghisalberti tarafından yapılmıştır. Takip eden çalışmalar propolisin kimyasal yapısı ve biyolojik aktivitesi hakkında bilgiler ortaya koymuştur. Propolisin etkin özelliklerinin yanı sıra toplanmasında, bal hasadını ve petekli balın pazar değerini düşürmesi gibi dezavantajlardan dolayı sıkıntılar yaşanmaktadır. Son zamanlarda propolisin tıp, kozmetik, dişçilik ve bitkisel üretim alanlarındaki kullanımının sağladığı yararların ön plana çıkması ile propolis üretimine önem veren ülkelerde bulunmaktadır (Kumova, 2002).

İyi kalitede bir propolis elde etmek için propolisin nektar akımından sonra veya yağışlı mevsimin başlamasıyla toplanması gerektiğini belirten araştırmacılar vardır. Propolis üretimi arının cinsine, iklime, bitki örtüsüne ve tuzaklama mekanizmalarına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Propolisin yapısında elde edildiği bitki örtüsüne bağlı olarak koku ve renk başta olmak üzere farklılıklar gözlenebilir (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Propolisin yapısında 180 farklı bileşik bulunmuştur ve bu kimyasal çeşitlilik bal arısının yaşam çevresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Toplandığı bitki örtüsünün bilinmesi propolis hakkında bir standardizasyon oluşturmada önemli yere sahiptir. Bal arıları tarafından toplanan propolisin kavak, dişbudak, söğüt, huş, kestane, çam, kızıl ağaç, köknar, kara ağaç, meşe ve erik gibi en az 67 farklı türden elde edildiğini belirtmiştir (Crane, 1990). Bitki türleri, propolisin yapısında farklılığa sebep olmasından dolayı propolis besin maddeleri yönünden zengin bir içeriğe sahip olmaktadır. Bünyesindeki çeşitli besin maddeleri sayesinde günümüzde doğal bir ilaç olarak önemi daha iyi anlaşılmaktadır (Krell, 1996; Kumazawa vd., 2002; Crane, 1990).

Propolis reçinenin kaynağına göre açık sarıdan koyu kahverengiye kadar değişen renklerde olabilir. Propolis, 25-45 °C sıcaklık aralığında yumuşak, esnek ve çok yapışkan bir halde iken 15 °C'den az sıcaklıklarda kısmen donmuş haldedir. Artan sıcaklıklarda yapışkanlığı artarak 60-70°C'de sıvı hale geçer. Ancak elde edildiği bölgelerin farklı olmasından kaynaklı olarak örneklerde erime noktası 100 °C'yi bulabilmektedir (Krell, 1996; Doğan ve Hayoğlu, 2012).

Propolisin kovandan elde edildiği gibi direkt kullanımı veya bilimsel olmayan yöntemlerle hazırlanıp pazarlanması kullanıcılar için faydadan ziyade zarar oluşturabilmektedir (Banskota vd., 2001). Ham propolisin en önemli çözücüsü tıbbi amaçlı kullanımlarda %70'lik etanol, kimyasal analiz amaçlı kullanımlarda ise %99'luk etanoldür (Pietta vd., 2002). Propolisin yapısında bulunan önemli biyolojik aktiviteye sahip bileşikler, alkol gibi çözücülerde hazırlanan ekstraktlardır. Günümüzde alkolün yanı sıra zengin bir bileşime sahip ve çözücü olarak suyun kullanıldığı ekstraktlar hazırlanmaya

çalışılmaktadır. Alkolik ekstraktlarda tespit edilen bazı kimyasal maddeler Tablo 1’de özetlenmiştir (Kutluca vd., 2006).

Tablo 1. Alkolik propolis ekstraktında tespit edilen bazı kimyasal maddeler

| | Kimyasal Bileşenler |
|----------------------------|---|
| Alkolik propolis ekstraktı | Flavonoidler, Krisin, Apigenin, Acacetin, Quercetin, Kaempferide, Kaemperol-7,4'-dimethyl ether, Ermanin, Galangin, Pinochembrin, Pinobanksin, Pinobanksin-3 acetate, Pinostrobin, 3',4'-dihydroxyflavanoids, Flavan-3-ols, Pectolinaringenin, Luteolin, 3,4-dimethyl ether, luteolin, Artepillin C, Eriodictyol, Pinosylvin (3,5-dihydroxystilbene), Ferulic asit, Isoferulic asit, Benzoik asit, Cinnamic asit, Isopentyl ferulate, p-Coumaric asit benzyl ester, Caffeic asit, Prenyl caffeate, 3-methyl-but-2-enyl caffeate, Caffeic asit phenetyl ester, Methyl caffeate, Diterpenoid clerodan, eterik yağlar. |

Farklı çözücülerde hazırlanan propolis ekstraktlarında tespit edilen bazı bileşik türleri ve adetleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Propoliste tespit edilen bazı bileşik türleri ve adetleri

| Bileşik Türleri | Tespit edilen bileşik adetleri |
|---------------------------|--------------------------------|
| Flavonoidler | 38 |
| Hidroksiflavonlar | 27 |
| Hidroksiflavononlar | 11 |
| Kalkonlar | 2 |
| Benzoik Asit ve Türevleri | 12 |
| Asitler | 8 |
| Esterler | 4 |
| Benzaldehit Türevleri | 2 |

Tablo 2'nin devamı

| | |
|--|----|
| Sinamil ve Sinamik Asit ile türevleri | 14 |
| Alkoller, Ketonlar, Fenoller | 8 |
| Heteroaromatik Bileşikler | 12 |
| Terpen ve Sekuterpen ve Türevler | 7 |
| Alifatik Hidrokarbonlar | 6 |
| Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar | 11 |
| Steroller ve Steroid Hidrokarbonlar | 6 |
| Mineraller | 22 |
| Şeker | 7 |
| Aminoasitler | 24 |

Yapılan çalışmalarda propolisin yapısında Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn ve Fe gibi elementler, B1, B2, B6, C ve E vitaminler ve yağ asidi olduğu ortaya konulmuştur. Aynı zamanda süksinik dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler içerdiği tespit edilmiştir (Doğan ve Hayoğlu, 2012).

1.3. Biyolojik Aktivitesi ve Apiterapik Olarak Önemi

Apiterapi, propolis, bal, polen, arı sütü ve arı zehri gibi arı ürünleri ile yapılan bir tedavi yöntemidir. Antibiyotiğin keşfinden önce arı ürünleri doğal antibiyotik olarak kullanılmaktaydı. Günümüzde hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların oluşturduğu yan etkilerden, alerjik durumlardan ve bazı ilaç etken veya katkı maddelerine olan dirençten dolayı doğal yöntemlere yönelinmektedir. Tedavinin bitkisel yöntemler ile yapılması sonucu fitoterapi, arı ürünleri ile yapılması sonucu apiterapi gibi alternatif tedavi yöntemleri gelişmiştir (Can, 2014).

Dünyada Çin, Mısır ve Romanya gibi ülkeler başta olmak üzere hastalıkların arı ürünleri ile tedavi edildiği klinikler ve apiterapi merkezlerinin yaygınlığı artmaktadır. Propolisin içeriğine bakıldığında %50'sini reçine ve zamksı maddeler, %30'unu bitkisel mumlar, %10'unu esansiyel yağlar, %5'ini polen ve %5'ini de organik bileşikler ve mineral maddeler oluşturmaktadır. Tamamen doğadan gelen propolis, yapısında bulunan çeşitli polifenolik bileşikler, mineraller ve enzimler sayesinde antioksidan, antiviral,

antimikrobiyal ve anti-iflamatuar gibi biyolojik aktiviteler göstermektedir (Russell, 1983; Bogdanov, 1997; Cook ve Saman, 1996; Hepşen vd., 1996).

Propolisin ana bileşenlerinden reçineler; flavonoid, fenolik asit ve esterlerdir. Alkol gibi organik çözücülerde çözünen en önemli grubu flavonoidler oluşturmaktadır. Fazla miktarda pigment içermektedir. Aynı zamanda balda bulunan flavonoidlerden 25 kadarı propoliste de bulunmaktadır. Bu sebeple arı ürünleri içinde balın yeri ve değeri düşünüldüğünde propolisin de azımsanmayacak bir değere sahip olduğu ortaya çıkmaktadır (Maciejewicz, 2001; Maciejewicz vd., 2001). Propoliste bulunan flavonoidlerden bazıları arının tükrük enzimleri ile yapısal değişikliğe uğramaktadır. Ayrıca flavonoidlerin, çeşitli bakterilere karşı etkili olduğu, kan dolaşımında düzenleyici rol üstlendiği, ülserle karşı etki gösterdiği, salgı sistemini düzenlediği ve mide yaralarını azalttığı ortaya konulmuştur (Kutluca vd., 2006). Propolisde farmakolojik aktivite sahip bileşenlerden en önemlileri flavonoidlerden olan flavon, flavanol ve flavanonlar ile çeşitli fenolikler ve aromatiklerdir. Hücre yenileme ve onarma, bakteri ve mantara karşı etkiler düşünüldüğünde propolisin en yaygın kullanım alanını dermatoloji ve kozmetik uygulamaları oluşturmaktadır. Arı sütü ve E vitamini ile kullanımında cildi besleyici ve temizleyici özelliği görülmektedir. Kozmetikte krem, burun spreyi, losyon, şampuan, diş macunu ve sabun gibi geniş bir ürün yelpazesinde kullanılmaktadır (Lejeune vd., 1988; Erdem, 2002). Gıda ürünlerinde propolisin kullanımı ile gıdanın raf ömrüne katkı sağlanabilmekte ve bu da propolisin antimikrobiyal özelliğine bağlanmaktadır. Propolisin virüs, mantar, bakteri ve mikroorganizmalara etkisi incelenmiştir. Genellikle gram pozitif bakterilerin propolise karşı daha hassas olduğu gözlenmiştir (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Fenolik maddeler gıda sanayinde kullanıldığı gibi farmakolojide de geniş kullanım alanına sahiptir. İlaç sanayinde özellikle antimikrobiyal özelliğinden faydalanılmaktadır. Bununla beraber propolis antibakterial, antiviral, antiseptik, antifungal ve antibiyotik özellikleri ile de kullanıldığı bildirilmektedir. Sentetik antibiyotiklerde görülen direnç ile karşılaşılması propoliste görülmemektedir. Bununla birlikte yararlı bakterilere de olumsuz bir etkisinden bahsedilmemektedir. Propolisin geniş spektrumlu bir antibiyotik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz (Bankova vd., 1983; Krell, 1996; Erdem, 2002; Kumova, 2002).

Farklı bölgelerden toplanan propolislerin birbirinden farklı kimyasal yapıya sahip olması benzer etkiye sahip olmamalarını gerektirmez. Aksine propolislerin benzer biyolojik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Çünkü propolisin birincil görevi koloniyi enfeksiyonlardan korumaktır. Bu sebeple hem antibakteriyal hemde antifungal özellik

göstermektedir. Bu da propolisin antimikrobiyal etkisinin neden bu kadar çok çalışıldığının cevabı olabilir.

Propolis kullanımı son zamanlarda tüketicinin bu ürüne marketlerde rahat ulaşımı sayesinde artmıştır. Kapsül, tablet, granül, boğaz pastilleri, çiklet gibi propolis ürünlerini tedarik etmek kolay olsa da propolisin kimyasal bileşimi tam olarak aydınlatılamamış ve standardizasyonu henüz gerçekleştirilememiştir. Propolisin antibakteriyal ve antioksidan etkisinden dolayı apiterapide, ilaçta, kozmetikte ve gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım alanının geniş olduğu görülen propolisin üretim teknikleri ile ilgili verimli ve yeterli çalışmaların olmadığı görülmektedir.

1.4. Antioksidanlar

Canlılığın vazgeçilmezi olan oksijen alınan besin molekülerinin yakılmasında kullanılır. Oksijen metabolizmaya yüksek oranda solunum ile alınır ve oksitleyici özelliği sayesinde yaşam için gerekli olan enerji ve diğer sekonder metabolitlerin oluşumunu sağlar. Oksijenin tam indirgenmesi ile su molekülü oluşurken, indirgenme tam olmazsa süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller yüksek oranda reaktif ve kısa ömürlüdür. Aktif halde olan bu radikaller hücrede protein ve lipid gibi birçok biyomoleküle zarar vererek kanser, damar tıkanıklığı gibi pek çok hastalığın patolojisinde önemli rol oynar (Tsao ve Deng, 2004; Halliwell vd., 1992; Ulusoy, 2010).

Oksitleyici özellik gösteren serbest radikallerle reaksiyona girerek oksidan özelliği durduran veya yavaşlatan maddelere antioksidan madde denilmektedir (Young ve Woodside, 2001). Serbest radikallerin bu zararlı etkilerinden korunmak için endojen ve eksojen antioksidan maddeler bulunmaktadır (Thomas, 1995; Blomhoff, 2005). Endojen antioksidanlar canlı vücudunda var olan moleküllerdir. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır (Eu vd., 2000). Enzimatik olanlara, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz örnek verilebilirken enzimatik olmayan antioksidanlara ise, redükte glutatyon (GSH), bilirubin, ferritin, seruloplazmin, melatonin, sistein, transferrin, haptoglobülin ve ürik asit örnek verilebilir. Eksojen antioksidanlar ise besinler aracılığıyla vücuda alınan α -tokoferol ve askorbik asit gibi vitaminler ile fenolik maddelerdir (Kolaylı ve Keha, 1999; Şahin, 2014)

1.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Mitokondrial oksijen hareketleri metabolizmadaki oksidan-antioksidan dengeyi bozan önemli endojen kaynaklardır. Yüksek düzeyde oksijene maruziyet litik enzimlerin aktivitelerini arttırır. Hava kirliliği, stresli yaşam ve sigara gibi alışkanlıklar antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına sebep olur. Bunun sonucunda hücre hemeostazi oksidanlar lehine kayar (Dündar ve Aslan, 1999). Dengenin oksidanlar lehine kaydığı bir sistemde oksitleyici olan serbest radikaller serbest olmayan radikalleri etkileyerek yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Halliwell vd., 1995).

Serbest radikalleri tutma ve stabil hale getirme özelliği göstererek oksidanların neden olduğu yıkıcı reaksiyonları durduran veya yavaşlatan maddelere antioksidan madde denir. Mekanizmalarına göre antioksidanlar ikiye ayrılır (Koca ve Karadeniz, 2003; Elliott, 1999). Var olan radikallerle reaksiyona girerek zararlı formlar oluşturmasını engelleyen antioksidanlar, birincil antioksidanlardır. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimler serbest radikalleri temizleme etkinliğindedir. Serbest radikallerin bu enzimler sayesinde protein, lipid ve deoksiribo nükleik asit gibi biyomoleküllere zarar vermesi önlenmiş olur (Koca ve Karadeniz, 2003; Diplock, 1998). Serbest radikalleri tutan ve radikal zincir reaksiyonlarını bozan E ve C vitaminleri, ürik asit ve polifenoller gibi bileşikler ise ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırılır (Koca ve Karadeniz, 2003; Ou vd., 2002).

1.6. Fenolik Bileşikler

Bitkiler çeşitli sekonder metabolitler ile kendilerini zararlı canlılara karşı korurlar (Saldamlı, 2007). Bitkilerdeki bu sekonder metabolitlerden en önemlileri besinlere organoleptik özellik sağlayan fenolik bileşikler ve polifenollerdir (Fabre vd., 2001; Borbálan vd., 2003; Fang vd., 2007). Benzen halkasına bir hidroksil grubunun bağlı olması ile fenol, birden fazla hidroksil grubunun bağlı olması ile polifenol olarak adlandırılan bileşiklere fenolik bileşikler denir. Benzen halkasındaki hidroksillerde bulunan hidrojenin kararsız olmasından dolayı fenolik bileşikler hidrojen kaybetme eğiliminde olduklarından zayıf asidiktirler. Fenolik bileşiklerin yapılarındaki hidroksil hidrojeninin birini kaybetmesi ile fenolat anyonu oluşur ve bu anyonun sudaki çözünürlüğü yüksektir (Vermerris ve Nicholson, 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin önemli bir bileşenidir ve 5000'den fazla

fenolik bileşiğin olduğu bilinmektedir (Pyrzynska ve Biesaga, 2009). Fenolik bileşikler bitkilerin çiçek, tohum, meyve, gövde ve kök kısımlarında sentezlenen doğal maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Bitkilerin sentezledikleri fenolik bileşikler, fenolik asit ve flavonoid olmak üzere iki grupta incelenir.

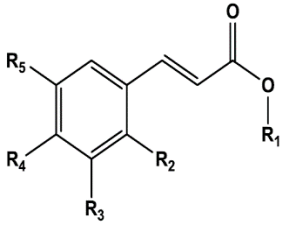
1.6.1. Fenolik Asitler

Sinnamik ve benzoik asitlerin hidroksillenmesi ile oluşan fenolik asitler bitkilerde önemli miktarlarda bulunur. Fenolik bileşiklerin alt grubu olan fenolik asitler antioksidan özelliğe sahip moleküllerdir. Serbest halde bulunmayan fenolik asitler organik asit veya şeker esteri şeklinde formundadır. Fenolik asitlerin karboksil grupları ile karbohidratlar, aminoasitler veya proteinler reaksiyona girebilir ve amino bileşikler ile amidleri, alkol bileşikleri ile fenol esterleri oluştururlar (Akyüz, 2011). Fenolik asitlerden vanilik asit, salisilik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve gallik asit hidroksi benzoik yapısında olan bileşiklerdir. Fenilpropan yapısında olan sinnamik asitlerden çok azı serbest halde bulunur. Çoğunlukla kafeik asit ve onun ester türevi hali olan klorojenik asit ve ferulik asit formunda bulunan sinnamik asit türevleri en yaygınlarıdır (Can, 2014). Fenolik asitlerden bazıları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Fenolik asitlerden bazılarına ait yapısal gösterimler

| Fenolik asit kökü | Ortak kimyasal yapı | Türevlenmiş yapıdaki fenolik asitler | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-----|--------------------|-----|-----|-----|---------------------------|----|-----|----|---------------------------|------------------|-----------------|----|--------------|-------------------|-------------------|-----|------------------------|-------------------|-----|-------------------|-----|----|------------------------|----|-----|----|----|----|--------------|----|----|-------------------|-----|-------------------|
| Hidroksisinnamik Asitler (C6-C3) | | <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>-R₁</th> <th>-R₂</th> <th>-R₃</th> <th>-R₄</th> <th>-R₅</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kafeik Asit</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>Ferulik Asit</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> <td>-CH₃</td> </tr> <tr> <td>İzoferulik Asit</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td><i>p</i>-Kumarik Asit</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td><i>o</i>-Kumarik Asit</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>Sinapik Asit</td> <td>-H</td> <td>-H</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OH</td> <td>-OCH₃</td> </tr> </tbody> </table> | | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | -R ₄ | -R ₅ | Kafeik Asit | -H | -H | -H | -OH | -OH | Ferulik Asit | -H | -H | -H | -OH | -CH ₃ | İzoferulik Asit | -H | -H | -H | -OCH ₃ | -OH | <i>p</i> -Kumarik Asit | -H | -H | -H | -OH | -H | <i>o</i> -Kumarik Asit | -H | -OH | -H | -H | -H | Sinapik Asit | -H | -H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ |
| | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | -R ₄ | -R ₅ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kafeik Asit | -H | -H | -H | -OH | -OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ferulik Asit | -H | -H | -H | -OH | -CH ₃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| İzoferulik Asit | -H | -H | -H | -OCH ₃ | -OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | -H | -H | -H | -OH | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>o</i> -Kumarik Asit | -H | -OH | -H | -H | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sinapik Asit | -H | -H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hidroksibenzoik Asitler (C6-C1) | | <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>-R₁</th> <th>-R₂</th> <th>-R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gallik Asit</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> </tr> <tr> <td>Protokatekuik Asit</td> <td>-OH</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td><i>p</i>-OH Benzoik Asit</td> <td>-H</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td><i>m</i>-OH Benzoik Asit</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>Vanilik Asit</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OH</td> <td>-H</td> </tr> <tr> <td>Şiringik Asit</td> <td>-OCH₃</td> <td>-OH</td> <td>-OCH₃</td> </tr> </tbody> </table> | | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | Gallik Asit | -OH | -OH | -OH | Protokatekuik Asit | -OH | -OH | -H | <i>p</i> -OH Benzoik Asit | -H | -OH | -H | <i>m</i> -OH Benzoik Asit | -OH | -H | -H | Vanilik Asit | -OCH ₃ | -OH | -H | Şiringik Asit | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | | | | | | | | | | | | | | |
| | -R ₁ | -R ₂ | -R ₃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gallik Asit | -OH | -OH | -OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Protokatekuik Asit | -OH | -OH | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | -H | -OH | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | -OH | -H | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vanilik Asit | -OCH ₃ | -OH | -H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Şiringik Asit | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

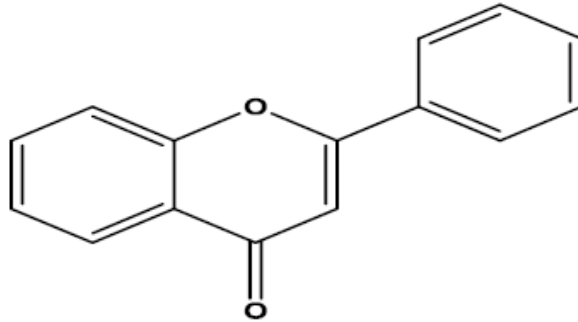
Tablo 3'ün devamı

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|--------------------|----|-----|-------------------|-----|-----|
| Hidroksisinamik Asit Türevleri |  | | | | | | |
| | | Klorojenik Asit | KA | -H | -H | -OH | -OH |
| | | İzoklorojenik Asit | KA | -H | -OH | -OH | -H |
| | | Kaftarik Asit | TA | -H | -H | -OH | -OH |
| | | Kutarik Asit | TA | -H | -H | -OH | -H |
| Fertarik Asit | TA | -H | -H | -OH | -OCH ₃ | | |

*KA: Kuinik Asit, TA: Tartarik Asit

1.6.2. Flavonoidler

Bitkilerde bulunan fenolik bişeliklerden ikincisi olan flavonoidler ikincil metabolitlerdir. Bu tür bileşikler bitkinin organoleptik özelliklerinden sorumludurlar (Fabre vd., 2001; Borbálan vd., 2003; Ulusoy, 2010). Bu bileşikler bitkinin büyüme, gelişme ve zararlı etkilere karşı savunma mekanizmasını oluşturan bitki pigmentleridir. Bu etkilerin yanı sıra farmakolojik, anti-alerjik, anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-fungal, anti-inflamatuar özelliklerinin olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Havsteen, 2002; Hallaç, 2009). Flavonoidler iki aromatik halka arasında bir oksijen içeren heterosiklik bir orta halkanın bulunduğu difenilpropan yapısında bir bileşiktir (Şekil 1).



Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı

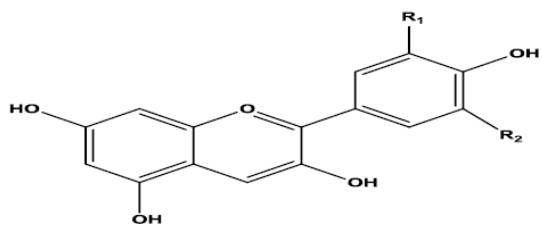
Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil grupları reaktif oldukları için hızlı bir şekilde glikozillenir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Nizamlıoğlu ve Nas, 2010). Bitkilerde glikozit formunda ve hücre öz suyunda çözünmüş olarak bulunurlar. Flavonoid familyası 4000'den fazla bileşiği bünyesinde barındırır (Casagrande ve Darbon, 2001). Flavonoidler

yapısal olarak antosiyanidinler, flavonlar ve flavonollar, flavanonlar, kateşinler / l ykoantosiyanidinler ve proantosiyanidinler (kondense tanenler) olmak üzere 5 gruba ayrılırlar (Saldamlı, 2007).

1.6.2.1. Antosiyanidinler

Doğada serbest halde bulunmayan antosiyanidinler şekerlere glikozidik olarak bağlanmış haldedir ve şekerle olan bağlanmasına göre sınıflandırılırlar (Shahidi ve Nacz, 1995). Antosiyanidinlerdeki şeker grupları genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz şekerleridir. Bununla birlikte ferulik asit, kafeik asit veya *p*-kumarik asit gibi fenolik asitlerler açillenmiş olarakta bulunabilirler (Shahidi ve Nacz, 1995; Francis, 1985; Kurılıch vd., 2005). Antosiyanidinlerin aglikon kısmındaki hidroksil grupları arttıkça renk maviye, metilester grupları arttıkça da renk kırmızıya dönmektedir (Akalin ve Anlı, 2011). Bitkiye kırmızı, mavi, turuncu gibi rengini veren renk pigmentleridir ve suda c z nebilirler (Hulme, 1971). Antosiyanidinlerin genel yapısı ve bazı antosiyanidin türevi bileşikler Tablo 4'te verilmiştir.

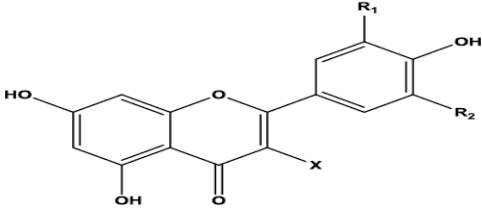
Tablo 4. Antosiyanidinler ve bazı antosiyanidin türevi bileşikler

| Antosiyanidinlerin genel yapısı | Bazı antosiyanidin türevi bileşikler |
|---|--|
|  | <p>Delfinidin Malvinidin Pelargonidin Peonidin Petunidin Siyanidin</p> |

1.6.2.2. Flavonlar ve Flavonollar

Orta halkadaki  c nc  karbondaki bulunan grubun hidrojen veya hidroksil olması bileşimin flavon veya flavonol olduğunu belirler (Cemeroglu vd., 2001). Antosiyanidinlere benzer şekilde yapılarında şeker bulundururlar ve monosakkarit, diksakkarit veya trisakkarit formlarında görülebilirler (Saldamlı, 2007). Flavon ve Flavonolların kimyasal yapıları ve bazı  yeleri Tablo 5'te verilmiştir (Cemeroglu, 2009).

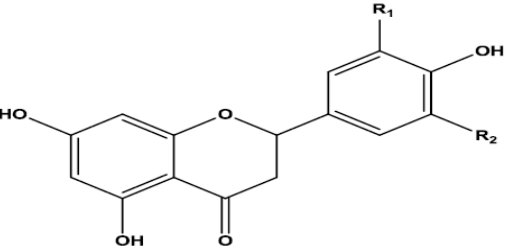
Tablo 5. Flavon ve Flavonolların kimyasal yapıları ve bazı türevleri

| Flavon ve Flavonol genel yapısı | Bazı Flavon ve Flavonol türevi bileşikler |
|---|--|
|  | <p>Flavon: Apigenin, Krisoeriol, Luteolin, Trisin</p> <p>Flavonol: İsoramnetin, Kamferol, Kuersetin, Mirisetin</p> |

1.6.2.3. Flavanonlar

Flavanonları flavonlardan ayıran en önemli özellik ortadaki halkada çift bağın olmamasıdır. Doğada glikozit formunda bulunan flavanonlar turuncgillerde bolca bulunurlar (Cemeroğlu, 2009). Flavanonlara ait genel kimyasal yapı ve bazı flavanon türevi bileşik Tablo 6'da verilmiştir (Nibbs ve Scheidt, 2012).

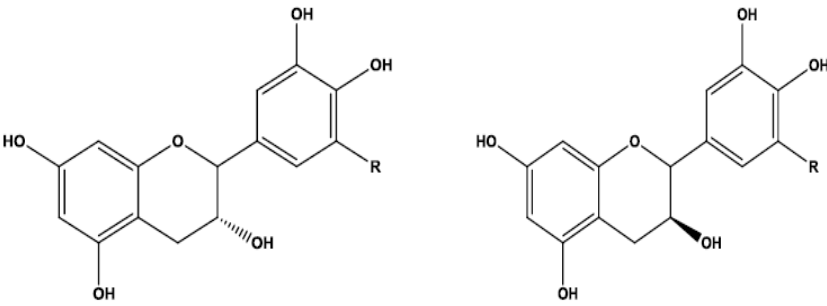
Tablo 6. Flavanonların genel yapısı ve bazı flavanon türevi bileşikler

| Flavanon genel yapısı | Bazı flavanon türevi bileşikler |
|---|--|
|  | <p>Naringenin</p> <p>Eriodictyol</p> <p>Hesperetin</p> |

1.6.2.4. Kateşinler ve Löykoantosiyamidinler

Kimyasal yapısı lavon-3-ol şeklinde olan kateşinler üçüncü karbon atomunda bir hidroksil grubu içerirler. Gıdalarda bolca bulunan kateşinler flavonoid biyosentezinde oluşan renksiz bir ara üründür. Yapısında iki tane kiral karbon atomu olan kateşinlerin dört izomeri vardır. Kateşinlere ait genel kimyasal yapı ve bazı kateşin türevi bileşik Tablo 7'de verilmiştir (Şahin, 2014).

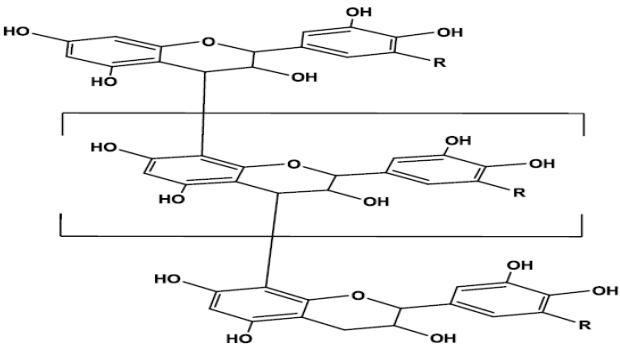
Tablo 7. Kateşinlerin genel yapısı ve bazı kateşin türevi bileşikler

| Kateşinlerin genel yapısı | Bazı kateşin türevi bileşikler |
|--|--|
|  | (-)-Epikateşin (-)-Epigallokateşin (-)-Epigallokateşin (+)-Gallokateşin |

1.6.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

Kateşinler kimyasal veya enzimatik olarak oksijenle reaksiyonu sonucu kondense olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Saldamlı, 2007). Bu reaksiyon ile flavon-3-ol yapısında kimyasal ve enzimatik olarak dimer, oligomer ve polimerlere kondensasyon gerçekleşir. Kondensasyon epikateşin/kateşin ile oluyorsa prosiyanidin, kateşin/gallokateşin ile oluyorsa prodelfinidin denir. Bitkisel ürünlerde proantosiyanidinler (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonları halinde görülmektedir (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010; Can, 2014). Proantosiyanidinlere ait kimyasal yapı Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Proantosiyanidinlere ait kimyasal yapı

| Proantosiyanidinlere ait kimyasal yapı | |
|---|--|
|  | R=H: Prosiyanidin R=OH: Prodelfinidin |

1.7. Kromatografi

İlk olarak Rus botanikçi Mikhail Tswett (1903) tarafından bitkilerdeki renkli pigmentlerin birbirinden ayrılmasında gördüğümüz kromatografi, kimyasal maddelerin ayırım, tanımlama ve tayini için kullanılan analitik bir yöntemdir. Tswett kullanmış olduğu kolonda renkli bandlar görmesinden dolayı bu yönteme renk anlamına gelen “chromatography” adını vermiştir (Skoog vd., 2017; Ettre, 2003; Ulusoy, 2010). Kromatografi yönteminde hareketli ve sabit olmak üzere iki faz vardır. Karışımdaki bileşenler kolondan geçirilir ve bu iki faz ile etkileşime bağlı olarak göç hızlarına göre ayrılırlar. Katı veya katı üzerine emdirilmiş sıvının ya kolon içine doldurulması veya düz zemin üzerine yayılması ile oluşan faza sabit faz denir. Ayrılması istenen bileşen hareketli faz olarak sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan içerisinde sabit faz boyunca taşınır (Ulusoy, 2010). Ayrılacak olan bileşenlerin sabit ve hareketli faz ile olan etkileşimleri birbirinden farklı olacağından göç hızları da farklı olur ve bileşenlerin ayırım, tanımlama ve tayin işlemi yapılmış olur (Skoog vd., 2017; Akyüz, 2011).

Kromatografik yöntemler ayrılma mekanizmasına, uygulama biçimine ve fazın türüne göre üç farklı şekilde sınıflandırılırlar. Tablo 9’da kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmaları verilmiştir. Ayrılma mekanizmasına göre bakıldığında adsorpsiyon kromatografisi, partiyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve afinite kromatografisi sayılabilir.

Tablo 9. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

| Sınıflandırmalar | Örnek kromatografi türleri |
|----------------------------|---|
| Ayrılma mekanizmasına göre | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Adsorpsiyon Kromatografisi ➤ Partiyon (Dağılım) Kromatografisi ➤ İyon Değişim Kromatografisi ➤ Jel Filtrasyon (Boyut Eleme) Kromatografisi ➤ Afinite Kromatografisi |
| Uygulama biçimine göre | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Düzlemsel Kromatografi <ul style="list-style-type: none"> • Kağıt Kromatografisi • İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ➤ Kolon Kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> • Gaz Kromatografisi (GC) |

Tablo 9'un devamı

| | |
|-----------------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) |
| Hareketli fazın türüne göre | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sıvı Kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> • Sıvı-sıvı Kromatografi • Sıvı-Katı Kromatografi ➤ Gaz Kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> • Gaz-Katı Kromatografi • Gaz-Sıvı Kromatografi ➤ Süperkritik Akışkan Kromatografisi |

Adsorpsiyon kromatografisinde ayrılacak bileşenlerin sabit faz üzerine tersinir olarak adsorplanması temel prensiptir. Sıvı olan hareketli faz sabit faz üzerinden geçerken ayrılacak bileşenlerin farklı ilgilerine göre ayırır. Bileşenlerdeki fonksiyonel tür ve sayısı sabit fazla ile olan etkileşimin derecesini belirlemektedir (Trathnigg vd., 2004).

Partisyon kromatografisine baktığımızda sabit faz katı bir yüzey üzerine kaplanan bir sıvıdır. Ayrılacak bileşenler sıvı olan sabit faz ile yine sıvı olan hareketli faz arasındaki etkileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda dağılım gösterirler ve ayrımları yapılır. Sabit fazla etkileşimi fazla olan bileşen sistemde daha fazla zaman geçirirken etkileşimi zayıf olan bileşen daha az zaman geçirir ve sistemi terk etmelerine göre ayrımları yapılmış olur. Partisyon kromatografisinde ayırım gücü sabit faza, hareketli faza ve ayrılacak olan bileşenin polaritesine bağlı olarak değişir (Skoog vd., 2007).

İyon değişim kromatografisine baktığımızda ise sabit fazda yüzeye tutturulmuş iyonlar ile ayrılacak analitteki iyonların iyon yüklerine göre yer değiştirerek ayrılması işlemidir. Analizi yapılacak iyonun anyon veya katyon olmasına göre yüzeye tutturulan iyonların yükleri de değişir. İyonik halde bulunan veya ortamın pH'sına göre iyonlaşabilen maddelerin analizi bu yöntemle yapılabilir. Ayrılacak olan bileşenlerin alıkonma süresi üzerine hareketli fazın pH'sı önemli derecede etkilidir. Ayrılacak bileşen ile sabit faz arasındaki bağlanma ve elektrostatik etkileşim ne kadar güçlü olursa alıkonma süresi de o kadar artar (Meyer, 2013; Snyder vd., 2012).

Jel filtrasyon kromatografisinde ise molekül ağırlığı yüksek olan maddeler için geliştirilmiş bir yöntemdir. Poliakrilamid veya polisakkarit jel boncukları ile doldurulmuş kolondan geçirilen ayrılacak bileşenlerin sabit faz dolgu maddesini oluşturan moleküller arasında geçirdikleri zamanın farklı olmasına göre ayrımı yapılır. Ayrılacak bileşenlerin

kolonda geçirdikleri zaman molekül ağırlıkları ile ters orantılıdır. Çünkü düşük molekül ağırlıklı bileşenler dolgu maddesi arasında daha fazla zaman geçirecek ve kolonu daha geç terk edecektir (Skoog vd., 2017).

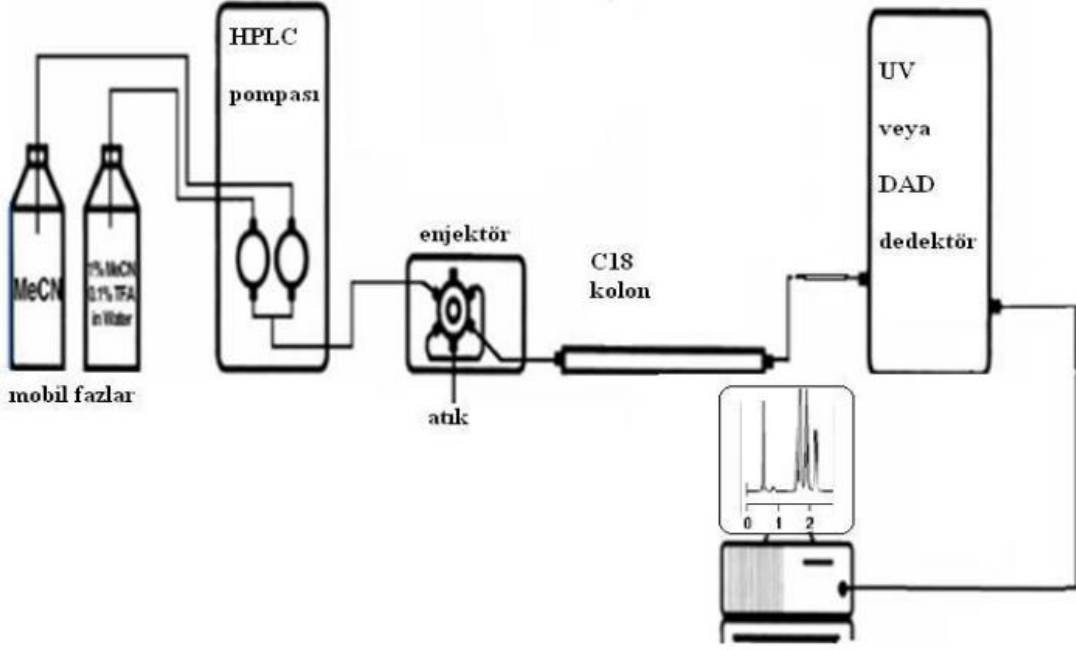
Afinite kromatografisi bir protein ve onun ligandı arasındaki protein-ligand etkileşimini baz alarak geliştirilmiş güncel bir yöntemdir. Proteine özgül bağlanma özelliğindeki ligand bir jel matrikse bağlanarak sabit faz oluşturulur. Bu sayede sabit fazdaki ligandın spesifik etki gösterdiği protein kolondan geçirildiğinde kolonda tutulur ve karışımdan ayrımı yapılmış olur. Hareketli fazın pH'sı ve bileşimi değiştirilerek kolona tutturulmuş olan protein elüe edilir (Sewell vd., 1987).

Uygulama biçimine göre sınıflandırıldığında hareketli ve sabit faz arasındaki temasın türüne göre düzlemsel ve kolon kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Kolon kromatografisi sabit fazın bir kolon içine yerleştirildiği ve hareketli fazın bu kolondan geçirilmesi ile uygulanır. Düzlemsel kromatografide bir plaka veya kağıt üzerine tutturulmuş sabit faz bulunur ve hareketli faz yerçekimi veya kapiler etki ile sabit faz arasından ilerler (Koyunoğlu, 2008). Bu temel prensipler üzerine geliştirilmiş afinite ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi kolon kromatografisi yöntemleri ve ince tabaka kromatografisi gibi düzlemsel kromatografisi yöntemleri vardır.

Hareketli fazın türüne göre kromatografiyi üç sınıfa ayırabiliriz. Bunlar sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisidir (Skoog, 2017). Bu yöntemlerde hareketli fazın türü yapılan kromatografiye adını verir.

1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel örneklerindeki organik ve inorganik bileşiklerin ayırım, tanımlama ve tayininde kullanılan tekniklerden en önemlisi yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (Ulusoy, 2010; Erdik vd., 2013). Bu kromatografi yönteminde sabit faz ince bir kolon içerisine doldurulmuştur ve hareketli faz basınç altında kolondan geçirilir. Ayrılacak olan bileşikler sabit fazla farklı oranlarda etkileşime girerler ve bu sayede kolonda alıkonma zamanları farklı olur. Kolondan farklı zamanda ayrılarak birbirinden ayrılmış ve tayinleri yapılmış olur. Standart bir yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı mobil faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur (Şekil 2) (Yazıcı, 2013).



Şekil 2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi şematik gösterim

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde hareketli faz olarak genellikle iki veya daha fazla çözücü sistem kullanılır. Çözücülerin türü ve yüzde oranları ayırmanın ve analizin verimini arttırmak için uygun şekilde ayarlanır. HPLC’de hareketli fazı oluşturan çözücü sisteminde hava kabarcığı bulunmamalı varsa degazer kullanımı gibi farklı işlemlerle giderilmelidir. Analiz iki veya daha fazla çözücü sistem kullanılıyorsa optimum analiz için gradientli programlar hazırlanır. Analizin başlaması ile programda belirtilen çözücü yüzdelerindeki değişim dışında hareketli fazın akış hızı değiştirilemez. Yüksek performansın elde edilmesinde önemli bir etken hareketli faza kolonda ilerlediği sürece pompa ile basınç uygulanmasıdır. Bu sayede hem akış hızı sabitlenmiş olur hem de ayırım verimi güçlendirilmiş olur. Uygulanacak olan akış hızı kolonun iç çapına göre belirlenir ve kolonun iç çapı düştükçe akış hızının da düşürülmesi gerekir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda 0.5-5 ml/dk akış hızı ve 400 bar basınca kadar çalışabilecek HPLC sistemleri geliştirilmiştir (Skoog, 2017; Akyüz, 2011).

HPLC sisteminde enjeksiyon ünitesi örneğin sisteme verildiği kısımdır. HPLC sistemlerinde manuel enjeksiyon ve oto-enjeksiyon olmak üzere iki çeşit enjeksiyon şekli vardır. Manuel enjeksiyon sistemleri günümüzde kullanımının getirdiği dezavantajlardan dolayı yerini oto-enjeksiyon sistemlerine bırakmıştır. Manuel enjeksiyonda örnek bir

enjektör yardımı ile enjeksiyon sistemindeki valfa aktarılır ve kolona gönderilir. Oto-enjeksiyon sistemlerinde ise cihazda bulunan oto-örnekleyicideki enjektör örneği örnek viallerinden otomatik olarak alır ve kolona gönderir (Dursun, 2011).

Ayrımı yapılacak olan bileşenlerin özelliklerine göre HPLC sisteminde kullanılacak olan tekniklerde farklılık gösterir (Linsay, 1987). HPLC sistemleri genellikle dağılma kromatografisi prensibi üzerine çalışmaktadır. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazın polariteleri analizde temel prensibi oluşturur. Polar özellikteki bileşiklerin analizi yapılacağı zaman sabit faz polar, hareketli faz ise apolar veya az polar olmalıdır. Uygulanan bu yöntem normal faz sıvı kromatografisi denir. Ters faz sıvı kromatografisi yönteminde ise sabit faz apolar, hareketli faz ise polar özellikte çözücüdür. Bu yöntemde analiz edilecek olan bileşikler sabit faza apolar kısımları ile bağlanırken polar karakterdeki bileşenler polaritelerine göre kolonu terk ederler. Kolondan elüe edilme sıralarına göre ayrımları yapılmış olur. Normal faz ve ters faz kromatografilerde temel prensip sabit fazın polaritesine yakın olan maddenin kolonda fazla zaman geçirmesi, hareketli fazın polaritesine yakın olan maddelerin ise kolonu terk etmesi üzerine kuruludur. Ters faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılan yöntemdir. Ters faz kromatografisinde kullanılan kolonlar silika jellerden modifiye edilmiş oktil (C₈) ve oktadesil (C₁₈) kolonlardır (Akyüz, 2011).

Kolonu terk eden elüentler bir diğer HPLC sistem parçası olan dedektöre gider ve dedektör analitin alıkonma zamanı ve miktarına bağlı olarak sinyaller üretir. Üretilen sinyaller zamanın fonksiyonu olarak kromatogram üzerinde pikler halinde kaydedilir. HPLC sistemlerinde kullanılabilen 12 dedektör bulunmasına rağmen en sık olarak UV dedektörü, fotodiyot dizisi (PDA) dedektörü, refraktif indeks dedektörü, floresans dedektörü ve kütle spektrometrik dedektör kullanılır (Can, 2014; Skoog, 2017).

1.7.1.1. Ultraviyole (UV) Dedektör

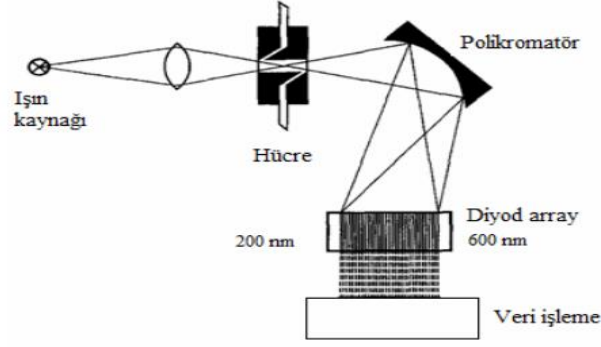
Kromatografide ideal dedektörde yüksek duyarlılık, gürültü seviyesinin düşük olması, seçiciliğin yüksek olması ve geniş numune analiz spektrumuna sahip olması gibi özellikler aranır. Bununla birlikte numunenin cinsine uygun özellikte olmalı, sıcaklık ve basınç gibi değişimlerinden çok fazla etkilenmemesi istenir. Bu özelliklere sahip dedektörlerden biri ultraviyole (UV) dedektörüdür.

Çeşitli fonksiyonel gruplara sahip organik moleküller 190-800 nm dalga boyundaki elektromagnetik enerjiyi absorplar. Numuneye gönderilen ışın demetinin bir kısmı numune tarafından absorplanır ve ışın demetindeki yoğunluk azalması ile madde konsantrasyonu arasındaki ters orantıdan analiz edilen bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizi yapılmış olur (Harvey, 2000).

UV dedektörlerde zamanın fonksiyonu olarak ölçülen absorbands değerinden madde hakkında bilgi sağlanır. UV dedektörlerde tek dalga boyunda veya iki dalga boyunda ölçüm alınabilmektedir. Uygulanabilirliğinin yüksek olması, organik ve inorganik sistemlere cevap verebilmesi, 10^{-4} - 10^{-5} M seviyesinde duyarlılığının olması gibi avantajları sayesinde UV dedektörler diğer detektörlere kıyasla daha yaygın kullanılmaktadır (Can, 2014). UV dedektörlerin zamanla geliştirilmesi sonucu eş zamanlı olarak farklı dalga boylarında tarama yapabilen ve UV dedektörle aynı prensipte çalışan fotodiyot dizisi dedektörleri geliştirilmiştir.

1.7.1.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)

Fotodiyot dizisi dedektörleri, 512 diyottan oluşan bir yüzey ve bu yüzeydeki diyotların her birinin farklı UV-Vis bölgedeki absorbandsları eş zamanlı ve anlık olarak alması özelliğine sahiptir (Şekil 3). Bu sayede elde edilen kromatogramlar üç boyutlu olmakta ve her bir analitin spektrumları anlık olarak taranabilmektedir. Bununla beraber tek bir dalga boyunda değil de dalga boyu aralığında çalışma imkânı vermesi bu dedektörün önemli avantajlarından biridir. Fotodiyot dizisi dedektörlerinde ışık kaynağı olarak döteryum ve tungsten lambalar kullanılır (Yıldız vd., 1993; Can, 2014). HPLC-PDA sistemleri HPLC'nin yüksek performansına ek olarak aynı zamanda spektrumlarının da elde edilmesiyle yüksek doğruluk ve kesinlikte analiz imkânı sunmaktadır. Analiz sonucunda elde edilen üç boyutlu kromatogram sayesinde piklere ait spektrumlar incelenerek karmaşık örneklerdeki bileşenler daha rahat tayin edilebilmektedir.

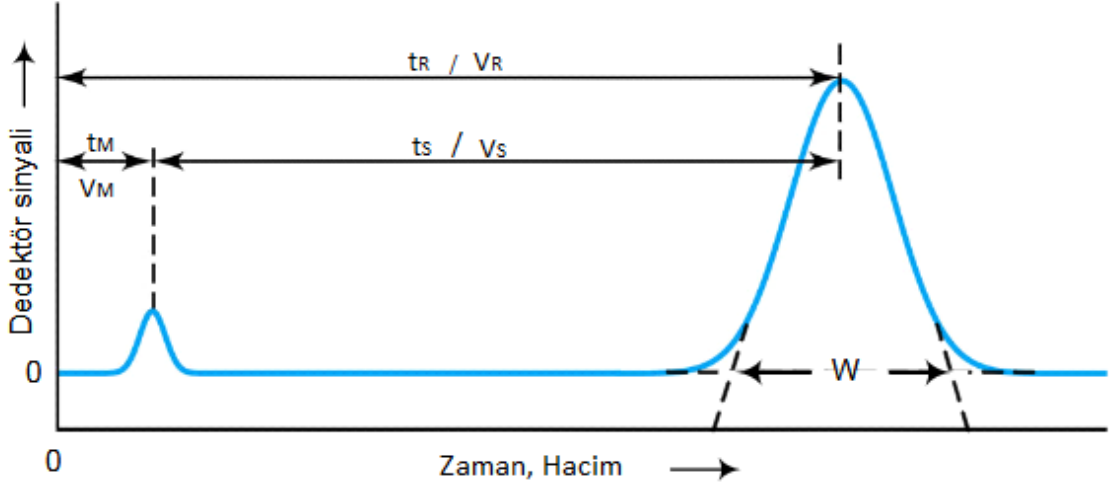


Şekil 3. Fotodiyot dizisi dedektörü çalışma prensibi (Meyer, 2013)

1.8. Kromatografide Temel Parametreler

1.8.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Enjeksiyon işleminden analitin dedektörde pik verdiği zamana kadar geçen süreye alıkonma zamanı denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Numunenin enjeksiyonundan sonra bir bileşenin dedektörde cevap oluşturmasına kadar kullanılan çözücü hacmine ise alıkonma hacmi denir ve V_R ile gösterilir. Hacimsel akış hızı ile alıkonma zamanı kullanılarak alıkonma hacmi hesaplanabilir. Kapasite faktörü ise analitin sabit ve hareketli faz arasındaki dağılım katsayısına göre belirlenir. Her maddeye özgü kapasite faktörü vardır. Kapasite faktöründen yararlanılarak karışımdaki bileşenlerin ayrımı hakkında fikir elde edilebilir. Bu sebeple kapasite faktörü kromatografinin en önemli parametresidir. Kaliteli bir ayırım için kapasite faktörü değeri 1-10 arasında olmalıdır. Sabit fazla etkileşimi olmayan bir türün dedektörde sinyal oluşturduğu ana kadar geçen süreye ölü zaman denir ve t_0 veya t_M ile gösterilir. Bu tür için harcanan çözücü hacmi için de ölü hacim terimi kullanılır ve V_0 veya V_M olarak gösterilir. Analite ait alıkonma zamanından ölü zamanı çıkardığımızda düzeltilmiş alıkonma zamanı, analite ait alıkonma hacminden ölü hacmi çıkardığımızda ise düzeltilmiş alıkonma hacmini buluruz ve sırasıyla t_s ve V_s sembolleri ile gösterilir (Gündüz, 2015; Skoog, 2017) (Şekil 4).



Şekil 4. Kromatogramda alıkonma zamanı ve alıkonma hacimlerinin belirlenmesi

1.8.2. Seçicilik Faktörü

İki veya daha fazla bileşenli sistemlerde bileşenlerin kapasite faktörü birbirinden ayrı olmadıkça ayırım yapılamaz. İki bileşenli bir karışımın ayırımı yapılacaksa bu iki bileşene ait kapasite faktörleri oranlanarak seçicilik faktörü (α) hesaplanır. Seçicilik faktörü sabit fazdan, hareketli fazdan ve sıcaklıktan etkilenir. Seçicilik faktörü değeri daima 1'den büyüktür ($\alpha > 1$) (Koyunoğlu, 2008; Gündüz, 2015).

1.8.3. Kolon Etkinliği

Kolonda ayırma işleminde ilk matematiksel yaklaşımı 1950'lerde teorik tabaka yüksekliğinin hesaplanması ile Hollandalı Kimya mühendisi Van Deemter yapmıştır. Kolon etkinliğinin belirlenmesinde teorik tabaka yüksekliği (H) ve teorik tabaka sayısı (N) kavramları kullanılmaktadır. Tabaka sayısının artması ve tabaka yüksekliğinin azalması kolon verimliliğini artırır. Kolonun uzunluğu, hareketli faz ve akış hızı kolon verimliliğini etkileyen diğer faktörlerdir. Teorik tabaka sayısını ve teorik tabaka yüksekliğini değiştirmek için kolon değişikliğine gidilmesi gerektiğinden ve bu işlemin pahalı olmasından dolayı kolon verimliliğini arttırmak için akış hızı veya hareketli fazın bileşimi düzenlenebilir (Gündüz, 2015; Swell vd., 1987).

1.8.4. Ayırma Gücü

Analizi yapılan iki bileşene ait pikler arasındaki uzaklık farkının piklere ait pik genişliklerinin ortalamasına oranı ayırma gücünü (R_s) verir. Ayırma gücünün 1.5 veya daha büyük olması ayırmanın etkin bir şekilde yapıldığını gösterir. Seçicilik, kapasite faktörü ve tabaka sayısı ayırma gücüne etkileyen etkenlerdir.

$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Eşitlik 1'den görüldüğü üzere seçicilik arttıkça ayırma gücünün artması beklenir. Ancak belirli bir değerden sonra seçiciliğin ayırma gücüne etkisi azalır. Çünkü maddeler arasında termodinamik olarak fark kalmamıştır. Bu sebeple etkin bir ayırma gözlenmez. Etkin bir ayırma gücü için seçiciliğin 1'den büyük olması gerekir.

Kapasite faktörü ve ayırma gücü arasındaki ilişkiye baktığımızda kapasite faktörünün sıfır olduğu durumda ayırma gözlenmez. Bununla beraber kapasite faktörü arttıkça $k'/k'+1$ değeri 1'e yaklaştığı için yine ayırma gücüne bir etkisi gözlenmez. Kapasite faktörü değerindeki fazla artış sadece alıkonma zamanını değiştirir.

Akış hızı, kolonun boyu ve kolon dolgu maddesinin boyutu kolon verimliliğini etkiler. Tabaka sayısının karekökünün bir fonksiyonu olan ayırma gücünde tabaka sayısındaki büyük artışlara küçük değişimler görülür. Kolon verimliliği arttıkça ayırma gücü artar ve daha keskin pikler elde edilir (Gündüz, 2015, Skoog, 2017).

1.9. Antioksidan Tayin Yöntemleri

Bir örneğin antioksidan özelliğinin incelenmesinde çeşitli tayin yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemlere baktığımızda temel prensibin oksidasyonun önlenmesi, oluşmuş olan oksidan ajanların indirgenmesi veya temizlenmesi, radikalik zincir reaksiyonlarının durdurulması veya oksidasyon ürünlerinin etkilerinin ortadan kaldırılması olduğu görülmektedir. Bu prensiplerin iki temel esası vardır. Birincisi, hidrojen atomunun transferi ikincisi ise elektron transferidir. Elektron transferine dayanan yöntemler arasında toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için folin yöntemi, FRAP, TEAC, CUPRAC ve DPPH gibi yöntemleri vardır.

1.9.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

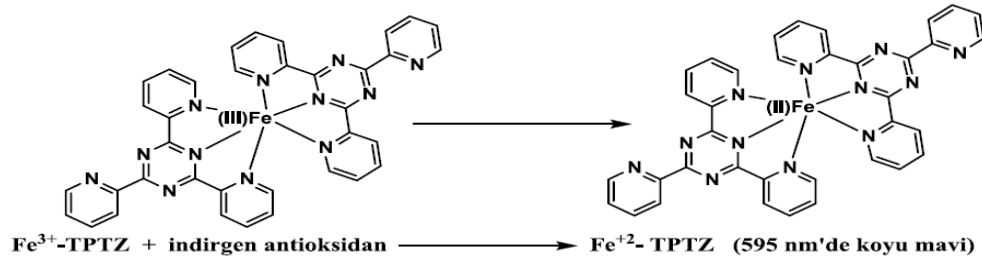
Doğal ürünlerde bulunan toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin Ciocalteu reaktifi ile fenolikler arasındaki reaksiyon sonucu renkli bir kompleks oluşur ve bu mor menekşe rengindeki ürünün spektroskopik olarak 760 nm dalga boyunda absorpsiyonunun ölçülmesi ile toplam fenolik madde miktarı belirlenmiş olur (Singleton vd., 1999).

1.9.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini

Polifenoller molekülde birden fazla fenol grubunun olduğu bileşiklerdir. Bu bileşikler doğal birer antioksidan özelliğe sahiptir. Polifenoller içerisinde en yaygınları flavonoidlerdir. Flavonoidlerin tayininde Fukumoto ve Mazza (2000) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak 415 nm dalga boyundaki absorpsiyonun ölçülmesi ile spektroskopik olarak tayini yapılır (Fukumoto, 2000).

1.9.3. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP

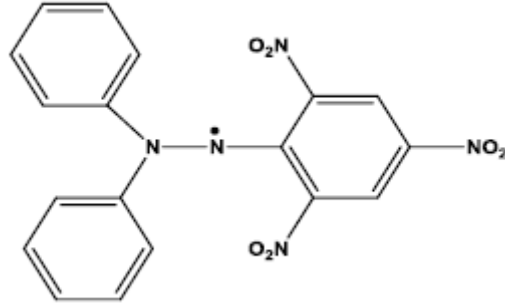
Doğal ürünlerde antioksidan kapasitenin belirlenmesinde sıklıkla Fe(III)- TPTZ kompleksi ile antioksidan maddeler arasında gerçekleşen redoks reaksiyon sonucunda demir (III) iyonunun indirgenmesi esasına dayanan FRAP analizi yapılır (Şekil 5). Oyaizu tarafından 1986 yılında bulunan metod, Benzie ve Strain tarafından 1999 yılında geliştirilmiştir. Örnekteki antioksidanlar tarafından indirgenen demirin 593 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun ölçülmesi ile spektroskopik olarak antioksidan kapasite tayini yapılmış olur (Oyaizu, 1986; Benzie ve Strain, 1999). Sonuçlar doğal bir antioksidan madde referans alınarak hesaplanır.



Şekil 5. Demir (III)'ün demir (II)'ye indirgenme reaksiyonu

1.9.4. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

Sentetik olarak üretilen bir radikal olan DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Şekil 6) (Cuendet vd., 1997). DPPH• radikalının antioksidan maddelerle etkileşimi sonucu 517 nm dalga boyunda alınan absorbans değerinde azalma olur. Değişen konsantrasyonlarda standart bir antioksidan kullanılarak DPPH• radikalini temizleme aktivitesi belirlenir ve bu verilerden yararlanılarak örnekteki antioksidan madde miktarı tayin edilir.



Şekil 6. DPPH• radikalının kimyasal yapısı

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlara ait bilgiler tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka/model bilgileri

| Cihaz | Marka/Model |
|-------------------------|--|
| HPLC-PDA | Shimadzu Corporation LC 20AT- SPD M30A |
| UV-Vis spektrofotometre | Spectro UV-Vis Double Beam PC LaboMed Inc., Los Angeles, CA, USA |
| pH metre | Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre |
| Hassas Terazı | Presica LX 320 A, Dietikon, İsviçre |
| Saf Su Cihazı | Direct-Q 3UV Water Purification System, Merck, USA |
| Vorteks karıştırıcı | Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA |
| Etüv | Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye |
| Magnetik karıştırıcı | Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Almanya |
| Refraktometre | Atago, İstanbul, Türkiye |
| Rotary evaporatör | IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Almanya |
| Vakum Pompası | Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, İsviçre |
| Yarı otomatik pipetler | Eppendorf Research® Plus Hamburg, Almanya |
| Filtre | Whatman Spartan 13/ 0,45 RC Dassel, Almanya |

2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddeler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Çalışmada kullanılan kimyasal madde bilgileri

| Kimyasal Madde | Satın Alındığı Firma |
|--------------------|---------------------------------------|
| Gallik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Protokatekuik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Klorogenik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |

Tablo 11'in devamı

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>p</i> -OH benzoik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Epikateşin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Kafeik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Şiringik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| <i>m</i> -OH benzoik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Rutin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Ellagik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| <i>p</i> -kumarik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Ferulik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Myrisetin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Resveratrol | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Daidzein | Cayman Chemical, Michigan, ABD |
| Luteolin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Kuersetin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| <i>t</i> -Sinnamik asit | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Apigenin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Hesperetin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Ramnetin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Krisin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Pinosembrin | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Kafeik asit feniletil ester | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Kurkumin | Alfa Aesar, Massachusetts, ABD |
| Etanol | Merck, Darmstadt, Almanya |
| Asetonitril-LC Saflıkta | Merck, Darmstadt, Almanya |
| Metanol-LC saflıkta | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Asetik Asit | Merck, Darmstadt, Almanya |
| Etil asetat | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Dietil eter | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Na ₂ CO ₃ | Merck, Darmstadt, Almanya |
| NH ₄ CH ₃ COO | Carlo Erba Reagent, Fransa |
| Al(NO ₃) ₃ | Merck, Darmstadt, Almanya |

Tablo 11'in devamı

| | |
|--|---------------------------------------|
| DPPH | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |
| Troloks | Applichem, Darmstadt, Almanya |
| HCl | Merck, Darmstadt, Almanya |
| TPTZ | Merck, Darmstadt, Almanya |
| FeCl ₃ | Merck, Darmstadt, Almanya |
| CH ₃ CO ₂ Na.3H ₂ O | Merck, Darmstadt, Almanya |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Almanya |

2.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 12'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 12. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

| Çözelti | Hazırlanışı |
|---|--|
| HPLC-PDA Fenolik Bileşen Analizi İçin | |
| Gallik asit Protokatekuik asit <i>p</i> -OH benzoik asit <i>m</i> -OH benzoik asit Klorojenik asit Kaffeik asit Şiringik asit <i>p</i> -Kumarik asit Ferulik asit | %50-50 metanol-saf suda 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlanır, 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak üzere çözücüsüyle (%50-50 metanol-saf su) seyreltilir. |
| Epikateşin Rutin Myrisetin Kuersetin Apigenin Resveratrol Daidzein <i>t</i> -Sinnamik asit Hesperetin Luteolin Ramnetin Krisin | %100 metanolla 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlanır, 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak üzere çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir. |

Tablo 12'nin devamı

| | |
|--|---|
| Pinosebrin CAPE Kurkumin | % 100 metanolle 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlanır, 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak üzere çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir. |
| Ellagik asit | DMSO'da çözüldü, 1000 ppm'lik çözeltisini hazırlamak için % 100 metanol ile hacmi tamamlanır. 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak üzere %100 metanol ile seyreltilir. |
| %2'lik Asetik Asit | 10 ml glasiyel asetik asit balon jodede saf su ile 500 ml'ye tamamlandı. |
| %70-30 Asetonitril-Saf Su | 350 ml asetonitril balon jodede saf su ile 500 ml'ye tamamlandı. |
| Toplam Fenolik Madde Miktarı Analizi İçin | |
| 0,2 N Folin-Ciocalteu | 2 N Folin-Ciocalteu çözeltisinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanıldı. |
| %10'luk Na ₂ CO ₃ | 10 g Na ₂ CO ₃ bir miktar suda çözülür, hacmi 100 ml'ye tamamlandı. |
| Gallik Asit (1 mg/ml) | Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 0,5- 0,25- 0,125- 0,0625- 0,03125 mg/ml olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı. |
| Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi İçin | |
| 1 M NH ₄ CH ₃ COO | 7,7 g NH ₄ CH ₃ COO tartılır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. |
| %10Al(NO ₃) ₃ | 1 g Al(NO ₃) ₃ 10 ml saf suda çözüldü. |
| Kuersetin (1 mg/ml) | Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 0,5- 0,25- 0,125-0,0625- 0,03125 mg/ml olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı. |
| DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Analizi İçin | |
| DPPH Reaktif (0,1 mM) | 100 ml çözelti hazırlamak için; 3,94 mg DPPH tartılır, bir miktar metanolde çözüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. |
| Troloks (0,02 mg/ml) | 10 mg troloks 10 ml metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlandı. 0,02 mg/ml'lik çalışma çözeltisi hazırlamak için metanolle seyreltildi. |
| Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP Analizi İçin | |
| HCl (40 mM) | Bir miktar saf suyun üzerine %37'lik HCl'den 340 µL ilave edildi ve saf suyla son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. |
| TPTZ (10 mM) | 234,249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 ml 40 mM'lık HCl ile çözüldü. |
| FeCl ₃ (20 mM) | 324,4 mg FeCl ₃ destile suyla çözüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. |
| Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6) | 2,325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 ml glasiyel asetik asit ilave edildi.750 ml'ye saf suyla tamamlandı. |
| FRAP Reaktif | 300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlandı. Güneş ışığından muhafaza edilmelidir. |
| FeSO ₄ .7H ₂ O (1000 µM) | 27,8 mg FeSO ₄ .7H ₂ O bir miktar saf suda çözüldü ve saf suyla son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 µM'lık konsantrasyonlara saf su ile seyreltildi. |

2.4. Çalışılan Örneklerin Temini ve Saklama Koşulları

Türkiye Arıcılar Birliğine bağlı birlikler ve arıcılardan temin edilen propolis örnekleri öğütülerek karıştırıldı ve homojen Anadolu propolisi elde edildi. Öğütülmüş Anadolu propolisi analiz edilene kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

2.5. Propolis Ekstraktlarının Analizler İçin Hazırlanması

Anadolu propolisinden 3 gram tartıldıktan sonra 30 ml çözücüsünün olduğu bir falkon tüpe konuldu. Örnekler normal ekstraksiyon ve ultrasonik banyoda bekletilerek yapılan ekstraksiyon olmak üzere iki yöntem uygulandı. Normal ekstraksiyon oda sıcaklığında 24 saat boyunca 200 rpm’lik çalkalama işlemi karıştırıcıda yapıldı. Ultrasonik banyoda bekletilerek yapılan ekstraksiyonda ise örnekler ilk olarak 30 dakika ultrasonik banyoda bekletildi, daha sonra normal ekstraksiyondaki şekilde karıştırma işlemi yapıldı. Örnekler ve çözücüleri ile ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 13’de verilmiştir. Ekstraksiyon sonrası mevcut partiküllerden ve olası safsızlıklardan kurtulmak için önce adi süzgeç kağıdından daha sonra mavi süzgeç kağıdından süzme işlemi yapıldı. Toplanan ekstraktlardan 10 ml’si fenolik içerik analizi yapılmak üzere ayrıldı (Şekil 7). Kalan ekstraktlar, fiziksel ve antioksidan testler yapılmak üzere +4 °C’de saklandı.

Tablo 13. Anadolu propolis örneğinin ekstraksiyon koşulları

| Örnek Kodu | Çözücü | Ekstraksiyon İşlemi |
|------------|-------------------|---|
| 1E-0 | Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-20 | %20 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-40 | %40 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-60 | %60 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-70 | %70 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-80 | %80 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-90 | %90 Etanol-Saf Su | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1E-99,9 | %99,9 Etanol | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-0 | Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-20 | %20 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |

Tablo 13'ün devamı

| | | |
|---------|-------------------|---|
| 2E-40 | %40 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-60 | %60 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-70 | %70 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-80 | %80 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-90 | %90 Etanol-Saf Su | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 2E-99,9 | %99,9 Etanol | 30 dakika ultrasonik banyo, 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |



Şekil 7. Fenolik analiz için ayrılan propolis ekstraktları

Propolis ekstraksiyon işlemi yapılırken maksimum verim ve minimum malzeme kaybının sağlanabilmesi için en ideal çözücü-propolis oranının bilinmesinde fayda vardır. Çalışmamızda farklı çözücü oranlarının (% etanol bileşimi) yanı sıra en ideal çözücü oranındaki doygunluğun bulunması için çalışmalarda yapılmıştır. Bu sebeple sabit çözücü hacmindeki falkonlara artan miktarlarda Anadolu propolisi eklenmiş ve oda sıcaklığında, 200 rpm'lik karıştırıcı ile 24 saat ekstraksiyon işlemi yapılmıştır (Tablo 14). Ekstraktlar önce adi süzgeç kâğıdı ile sonra mavi süzgeç kâğıdı ile süzülerek partiküller ve safsızlıkla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakta toplam fenolik madde miktarı analizi yapılarak ideal çözücü-propolis oranı belirlenmesi amaçlanmıştır.

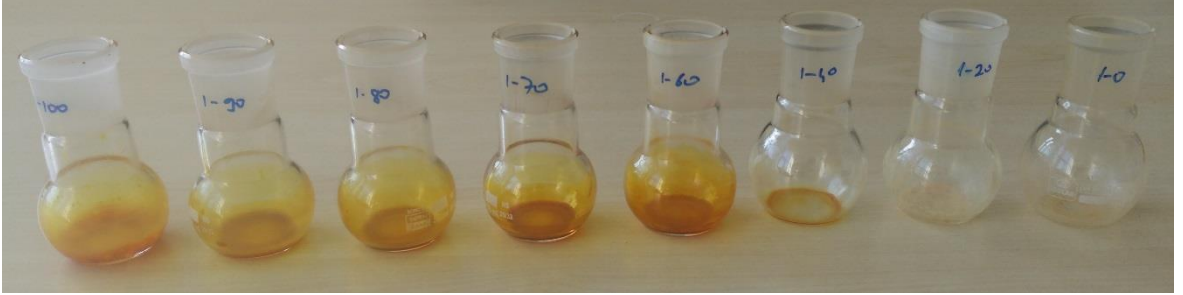
Tablo 14. İdeal propolis-çözücü oranının belirlenmesi için doygunluk testi

| Çözücü-Propolis Oranı | Ekstraksiyon İşlemi |
|-----------------------|---------------------------------|
| 1:1 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:2 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:3 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |

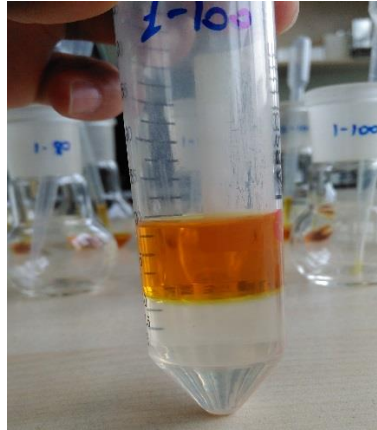
Tablo 14'ün devamı

| | |
|------|---------------------------------|
| 1:4 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:5 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:10 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:20 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |
| 1:40 | 24 saat, 200 rpm, oda sıcaklığı |

HPLC için 10 ml ayrılan alkollü ekstraktların alkolü 40 °C 'deki döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı (Şekil 8) ve kalan kısım 10 ml pH'sı 2'ye HCl ile ayarlanmış olan saf suda çözüldü. Çözücüsü sadece saf su olanın pH'sı 2'ye ayarlandı. Daha sonra sırayla 10 ml ve 5 ml olmak üzere iki defa dietileter ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı (15 dk, 200 rpm, oda sıcaklığı). Aynı işlem etil asetatla tekrarlandı (Şekil 9). Her ekstraksiyon işleminde organik faz darası alınmış balona toplandı. Elde edilen organik kısımdaki çözücü 40 °C'de döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Balonlarda kalan kalıntı 2 ml metanol ile çözülerek 0,45 µm filtreden geçirdi ve fenolik analiz için cihaza verildi.



Şekil 8. Döner buharlaştırıcıda yapılan çözücü uzaklaştırma işlemi sonrası



Şekil 9. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi

2.6. Fiziksel Analizler

2.6.1. Briks Tayini

Gıda maddelerinin briksi kuru madde içeriğini verir. Briks belirlemek için rekraktometrik metodlar kullanılır. Gıda sektörü, eczacılık ve kimya sanayisinde önemli bir yere sahiptir. Örnekteki kuru madde miktarını belirlemek için abbe refraktometresi ile kırılma indisine dayalı olarak % briks değeri belirlendi. Her bir örnek için çözücülerine ait %briks değerleri de ölçüldü.

2.6.2. pH Tayini

Gıdaların asidik değeri tüketimi ve depolanması için önemli bir yere sahiptir. Bunların yanı sıra gıdalardaki asidik değer bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaları etkiler. Asidik değeri ne kadar yüksek ise mikroorganizmaların üremesi ve gıdayı bozma eğilimi o derece düşüktür. Çalışmamızdaki örneklerin pH değeri pH-metre kullanılarak ölçülmüştür.

2.7. Antioksidan Analizler

2.7.1. Toplam Fenolik Madde Analizi

Fenolik bileşikler bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifini indirger ve kendileri yükseltgenir. Oksitleyici ajan görevi gören Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolikler arasındaki redoks reaksiyon Slinkard vd. tarafından belirtilen yöntemin esasını oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977; Singleton ve Rossi, 1965). Bu redoks reaksiyon sonucu oluşan renkli ürünün spektrofotometrik olarak 760 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi ile örnekteki toplam fenolik madde miktarı tayin edilir. Ölçülen absorbans değeri fenolik madde miktarı ile doğru orantılıdır.

Spektrofotometrik ölçümlerde standart kalibrasyon grafiği kullanılarak miktar hesabı yapılır. Fenolik madde tayininde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit standardınının 1 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisinden başlanılarak 0,500, 0,250, 0,125,

0,062, 0,031 ve 0,015 mg/ml'lik çalışma çözeltileri hazırlandı. Çözeltilerin konsantrasyon değerlerine karşılık absorbons grafiği çizildi. Standart kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak örnek içerisindeki fenolik madde miktarı hesaplandı ve sonuç gram örnek başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak verildi. Analiz süresince yapılan pipetlemeler Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Toplam fenolik madde miktarı deney prosedürü

| | Reaktif Körü | Standart | Örnek |
|--|---------------------|-----------------|--------------|
| Distile Su | 700 µl | 680 µl | 680 µl |
| Standart (Gallik Asit) | - | 20 µl | - |
| Örnek | - | - | 20 µl |
| 0,2 N Folin Reaktifi | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| Tüpler vortekslenir ve 3 dk beklenir. | | | |
| %10 Na ₂ CO ₃ | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| Tüpler vortekslenir ve 120 dk sonra 760 nm'de absorbons değeri okunur. | | | |

2.7.2. Toplam Flavonoid Madde Analizi

Fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturan flavonoidler bitkilerde bulunan doğal antioksidanlardandır. Toplam flavonoid madde miktarının tayini için Fukumoto ve Mazza tarafından belirtilen metod kullanıldı (Fukumoto ve Mazza, 2000). Flavonoidler ile alüminyum (III) arasındaki redoks tepkime sonucu oluşan renkli ürünün absorbonsunun 415 nm dalga boyunda ölçülmesi ile toplam flavonoid madde miktarı bulundu. Sonuçların hesaplanabilmesi için kuersetine ait standart kalibrasyon grafiği elde etmek amacıyla 1 mg/ml kuersetin stok çözeltisi hazırlandı. Bu stoktan seri seyreltme ile 0,500, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031 ve 0,015 mg/ml'lik çalışma çözeltileri hazırlanıp metoda göre absorbons değerleri okundu. Kuersetin konsantrasyonuna karşılık absorbons grafiği çizilerek standart kalibrasyon grafiği elde edildi. Standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak örnek içinde bulunan toplam flavonoid miktarı hesaplandı ve sonuçlar gram örnek başına mg Kuersetin eşdeğeri (mg QE/g) olarak verildi. Analizde kullanılan deney prosedürü Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Toplam flavonoid madde miktarı deney prosedürü

| | Reaktif Körü | Renk Körü | Standart | Örnek |
|--|--|------------------|-----------------|--------------|
| Örnek | | 250 µl | | 250 µl |
| Standart (Kuersetin) | | | 250 µl | |
| Metanol | 2400 µl | 2250 µl | 2150 µl | 2150 µl |
| %10 Al(NO ₃) ₃ | 50 µl | | 50 µl | 50 µl |
| 1M NH ₄ CH ₃ COO | 50 µl | | 50 µl | 50 µl |
| | Tüpler vortekslenir ve 40 dk sonra 415 nm'de absorbands değeri okunur. | | | |

2.7.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analizi

DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik olarak üretilen bir radikal olup 517 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermesi ile karakteristiktir. Örneklerde bulunan bileşenlerin radikal temizleme aktivitesini belirlemek için DPPH•'ın 100 µM'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. DPPH• radikal temizleme aktivitesinin belirlenmesinde ortamda sabit tutulan DPPH• radikal konsantrasyonuna seri seyreltme ile elde edilmiş örnek çözeltileri eklendi. Reaktif körü olarak örneklerin çözücüleri kullanıldı. Örnek ile radikal 1:1 oranında karıştırılarak spektrofotometrik olarak 517 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçüldü. Elde edilen değerlerden üstel bir grafik çizilerek örnekteki antioksidan maddenin radikal temizleme gücü hesaplandı. Sonuçlar SC₅₀ değeri olarak verildi (Cuendet, 1997). Analizde yapılan işlemler Tablo 17'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların karşılaştırılması için standart olarak Troloks'un DPPH• radikalini temizleme gücü kullanıldı.

Tablo 17. DPPH• radikal temizleme aktivitesi tayini deney prosedürü

| | Reaktif Körü | Renk Körü | Örnek |
|------------------------------------|---|------------------|--------------|
| Örnek (Değişen Konsantrasyonlarda) | - | 750 µl | 750 µl |
| Metanol | 750 µl | 750 µl | |
| DPPH• (100 µM) | 750 µl | - | 750 µl |
| | Tüpler vortekslenir ve 40 dk sonra 517 nm'de absorbands değerleri okunur. | | |

SC₅₀ değeri, ortamda bulunan radikal konsantrasyonunu yarıya indirmek için gerekli olan antioksidan madde miktarıdır. Örneklerin SC₅₀ değerini bulmak için seri

dilüsyonla farklı konsantrasyondaki çalışma çözeltileri elde edildi. Her birinin radikalle etkileşimi sonucunda absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda ölçüldü ve örnek konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi. Grafikten elde edilen üstel denklem yardımıyla örneğin SC_{50} değeri mg/ml olarak hesaplandı.

2.7.4. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analizi

Fe(III)-TPTZ- 2,4,6-tris (2-pyridily)-S-triazin kompleksi antioksidanlar varlığında indirgenir. Oluşan Fe(II)-TPTZ kompleksi 593 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Benzie and Strain, 1999). Kullanılan bu FRAP yönteminin standardizasyonu ve uygulaması kolaydır. Deneysel işlemlerde kullanılmak üzere FRAP reaktifi 10:1:1 oranında 300 mM pH:3,6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM $FeCl_3$ çözeltilerinin karıştırılması ile taze olarak elde edildi. Standart kalibrasyon grafiği elde etmek için $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ kullanıldı. 1000 μ M hazırlanan stok çözeltilerinden seri seyreltme işlemi yapılarak çalışma çözeltileri elde edildi. Deneysel işlemlerden sonra çözelti konsantrasyonuna karşılık absorbans grafiği çizilerek örnekteki antioksidan güç $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'ın eşdeğeri olarak hesaplandı. Analizde yapılan pipetlemeler Tablo 18'de özetlenmiştir.

Tablo 18. Demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP tayini deney prosedürü

| | Reaktif Körü | Renk Körü | Standart | Örnek |
|-----------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|
| FRAP reaktifi | 1500 μ l | - | 1500 μ l | 1500 μ l |
| Örnek | - | 50 μ l | - | 50 μ l |
| Standart ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) | | - | 50 μ l | - |
| Metanol | 50 μ l | 1500 μ l | - | - |
| | Tüpler vortekslenir ve 4 dk sonra 593 nm'de absorbans değerleri okunur. | | | |

2.8. HPLC-PDA ile Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

2.8.1 RP-HPLC-PDA Analiz Koşulları

Sıvı kromatografi sistemlerinde dedektör seçimi analizin verimliliğine ve kesinliğine etki etmektedir. Bununla beraber bu sistemlerin kurulumunun maliyeti de göz ardı edilemez. Bir veya iki dalga boyunda analiz imkânı sunan UV dedektörlerin aksine fotodiyot dizisi (PDA) dedektörleri 200-800 nm dalga boyu aralığında anlık analiz yapma imkânı sunmaktadır. Çalışmamızda 200-800 nm dalga boyu aralığında eş zamanlı analiz imkânı sunan PDA donanımına sahip Shimadzu Corporation LC 20AT HPLC sistemi kullanıldı. Analiz için hareketli fazda asetonitril, su ve asetik asitle gradientli program uygulandı. Sabit faz olarak ise ters faz C₁₈ (250 mm x4.6 mm, 5µm; GL Sciences) kolonu kullanıldı.

%70-30 asetonitril-ultra saf su bulunan A rezervuarı ve %2 asetik asitli ultra saf su bulunan B rezervuarı ile oluşturulan gradient programı Tablo 19’da verilmiştir. Bununla beraber enjeksiyon hacmi 20 µl, mobil akış hızı 1,0 ml/dk ve kolon fırını 30 °C olacak şekilde çalışmanın optimizasyonu sağlandı.

Tablo 19. HPLC-PDA sisteminde uygulanan gradient programı

| Zaman (dk) | A (%70-30 asetonitril-ultra saf su) | B (%2 asetik asitli ultra saf su) |
|------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 3 | 5 | 95 |
| 8 | 15 | 85 |
| 10 | 21 | 79 |
| 20 | 52 | 48 |
| 35 | 67 | 33 |
| 50 | 90 | 10 |
| 50.01 | 5 | 95 |
| 60 | 5 | 95 |

2.8.2. Standart Fenolikler

Çalışmamız kapsamında gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit,

epikateşin, rutin, myrisetin, kuersetin, apigenin, resveratrol, daidzein, *t*-sinnamik asit, hesperetin, luteolin, ramnetin, krisin, pinosembrin, CAPE, kurkumin ve ellagik asit olmak üzere 25 fenolik standardın analizi tek seferde yapılabilmektedir. Bu standartlardan protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik, rutin, ellagik asit ve daidzein için 250 nm dalga boyunda, gallik asit, epikateşin, şiringik asit, *t*-sinnamik asit, hesperetin krisin ve pinosembrin için 280 nm dalga boyunda, klorojenik asit, kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, apigenin, resveratrol ve CAPE için 320 nm dalga boyunda ve myrisetin, luteolin, kuersetin, ramnetin ve kurkumin için 360 nm dalga boyunda elde edilen absorbanlar kullanılarak standart kalibrasyon grafiği elde edildi.

2.8.3. Kalibrasyon ve Validasyon

Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit standartları %50-50 metanol-saf suda çözülerek stok çözeltisi hazırlandı. Epikateşin, rutin, myrisetin, kuersetin, apigenin, resveratrol, daidzein, *t*-sinnamik asit, hesperetin, luteolin, ramnetin, krisin, pinosembrin, CAPE ve kurkumin standartlarının stok çözeltisinin hazırlanmasında %100'lük metanol kullanıldı. Ellagik asit önce az miktarda DMSO da çözüldü daha sonra hesaplanan son hacme %100'lük metanol ile tamamlanarak stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm'lik çalışma çözeltileri kendi çözücülerini kullanılarak hazırlandı. Standart çalışma çözeltileri ile standartlara ait kalibrasyon eğrileri elde edildi.

Hazırlanan metodun validasyonu için metodun lineer ölçüm aralığı, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme ve tayin limit değerleri hesaplandı. Aynı zamanda kalibrasyon eğrisinin doğrusallığının bir göstergesi olan R^2 değerleri hesaplandı. Geliştirilen yöntemin doğruluğunun ve kesinliğinin belirlenebilmesi için tekrarlanabilirlik ve geri kazanım testleri yapıldı. Bu bağlamda standartların kalibrasyon denklemi, pik alanlarına ait standart sapma, bağıl standart sapma, mutlak hata ve bağıl hata, kalitatif tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonu (gözlenebilme limiti) ve kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonu (tayin limiti) hesaplandı.

Gözlenebilme ve tayin limitlerinin hesaplanmasında üç farklı yol izlenebilir.

- ✓ Analit sonuçlarının standart sapma değerleri üzerinden

- ✓ Oluşturulan yöntemin standart sapma değeri üzerinden (kalibrasyon eğrisi üzerinden)
- ✓ Ölçüm alınan en düşük derişimdeki örneğin sinyal gürültü oranının kullanılması

ile gözlenebilme ve tayin limitleri belirlenir. İlk yöntemde analite ait derişim verilerinin standart sapma değeri kullanılır. $LOD = SD \times 3$ eşitliği ile gözlenebilme limiti, $LOQ = SD \times 10$ eşitliği ile tayin limiti belirlenir. İkinci yöntemde kalibrasyon grafiği oluşturabilmek için kullanılan en düşük konsantrasyondaki örnek 6 tekrarlı olarak çalışılır ve elde edilen verilerin standart sapma değerleri hesaplanarak kalibrasyon grafiğinin eğimine oranlanır. Bulunan sonuç, 3 ile çarpıldığında gözlenebilme limiti, 10 ile çarpıldığında tayin limiti belirlenir (Eşitlik 2, Eşitlik 3). Eşitlikte kullanılan SD değeri, kalibrasyon eğrisinde kullanılan en düşük konsantrasyondaki standart çalışma çözeltisine ait standart sapmayı, m değeri ise kalibrasyon eğrisine ait eğimi ifade etmektedir.

$$\text{Gözlenebilme Limiti (LOD)} = 3,3 \times \left(\frac{SD}{m}\right) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

$$\text{Tayin Limiti (LOQ)} = 10 \times \left(\frac{SD}{m}\right) \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Üçüncü yöntemde ise ölçüm alınabilen en düşük örnek konsantrasyonuna ait sinyalin gürültüye oranlanması ile bulunur. Sinyal gürültü oranının 3'e eşit olduğu değer gözlenebilme limitini, 10'a eşit olduğu değer ise tayin limitini verir. Bu yöntemde ölçüm limiti doğrulanmalıdır. Bu amaçla kör örnek kirletilerek hesaplanan gözlenebilme ve tayin limitinde yeniden analizi yapılmalıdır.

Bahsi geçen gözlenebilme ve tayin limitlerinin belirlenmesine yönelik farklı yöntemlerde mevcuttur. Yapılan çalışma için en uygun yöntem seçilerek onun üzerinden LOD ve LOQ değerleri hesaplanmalı ve yöntemin validasyonu sağlanmalıdır (Semiz, 2018; Yıldız, 2019).

2.9. İstatistiksel Analiz

Farklı çözücü oranları ve koşullarında hazırlanan ekstraktların fiziksel ve antioksidan test sonuçlarının korelasyon analizi SPSS (Statistical Package for Social

Sciences) 21.0 paket programı ile yapıldı. Pearson korelasyon değeri değerlendirildi. Sonuç bağımsız gruplar arasındaki ilişki $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde incelendi.



3. BULGULAR

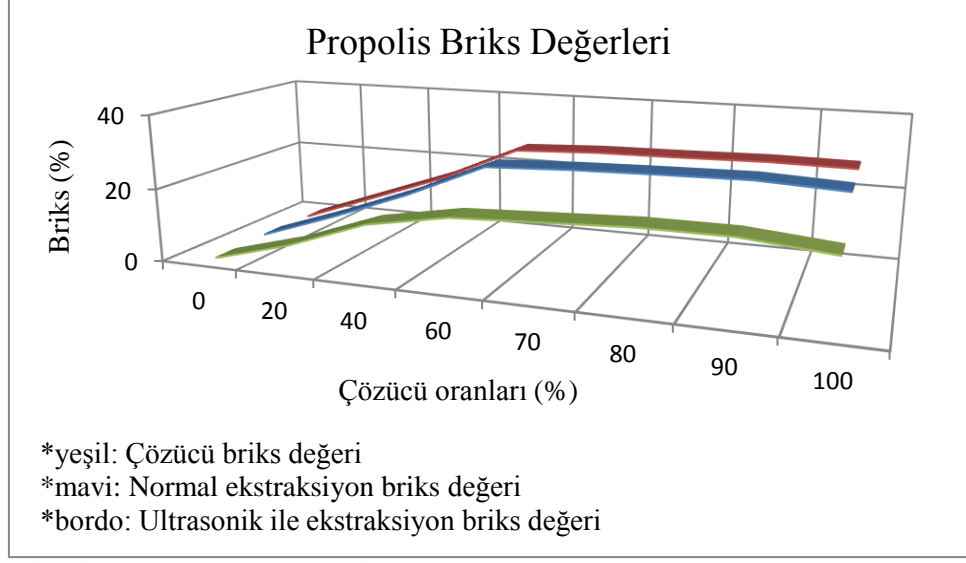
3.1. Fiziksel Analiz Sonuçları

3.1.1. Briks Analiz Sonucu

Örneklere ve çözücülerine ait briks değerleri abbe refraktometresi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 20’de, grafiksel görünüm Şekil 10’da verildi. Normal ekstraksiyonda %60 etanol ile hazırlanan ekstrakta doğrusal artışın kırıldığı ve briks değerindeki artışın plato oluşturduğu görülmektedir. Ultrasonik ile ekstraksiyonda da normal ekstraksiyondakine benzer bir tablo görülmektedir. Çözücülere ait briks değerlerine bakıldığında alkol yüzdesi arttıkça briks değerinin arttığı ancak %40’tan sonra ki artışta bir azalma olduğu %60’da ise plato gözlenmeye başlandığı görülmektedir.

Tablo 20. Anadolu propolisine ait briks değerleri

| Çözücü Oranları (% Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon | Ultrasonik Ekstarksiyon | Çözücü |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|
| 0-100 | 0,4±0,1 | 0,0±0,0 | 0±0,0 |
| 20-80 | 8,0±0,2 | 8,0±0,1 | 6,0±0,0 |
| 40-60 | 16,3±0,2 | 16,0±0,1 | 14,0±0,0 |
| 60-40 | 26,0±0,1 | 26,0±0,1 | 18,0±0,0 |
| 70-30 | 27,0±0,1 | 27,0±0,1 | 19,0±0,0 |
| 80-20 | 27,6±0,2 | 27,3±0,2 | 20,0±0,0 |
| 90-10 | 28,0±0,1 | 27,8±0,2 | 20,0±0,0 |
| 99,9-0 | 27,0±0,2 | 27,7±0,3 | 18,0±0,0 |



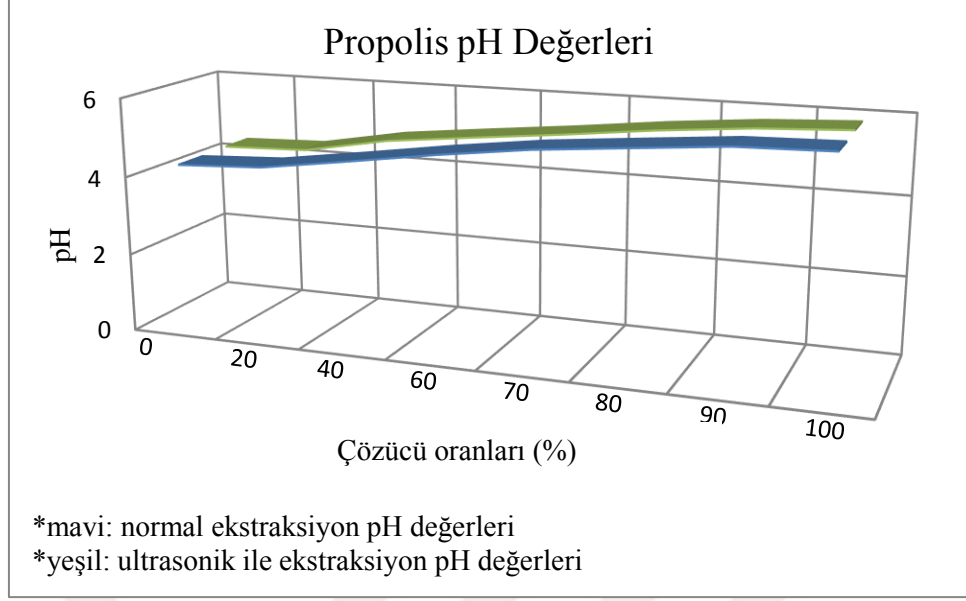
Şekil 10. Anadolu propolisine ait briks değerleri

3.1.2. pH Analiz Sonucu

Propolis örneklerinin farklı çözücüde hazırlanan ekstraktlarına ait pH değerleri Tablo 21’de verilmiştir. Çözücü oranlarına göre pH değişim grafiği Şekil 11’de sunulmuştur. Normal ve ultrasonik ile ekstraksiyon değerlerine bakıldığında çözücü oranındaki etanol yüzdesine bağlı olarak bir artış gözlenmiştir.

Tablo 21. Propolis ekstraktlarında çözücü oranlarına bağlı pH değişimi

| Çözücü Oranları (Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon | Ultrasonik Ekstraksiyon |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| 0-100 | 4,29±0,04 | 4,32±0,01 |
| 20-80 | 4,40±0,01 | 4,39±0,01 |
| 40-60 | 4,71±0,02 | 4,79±0,02 |
| 60-40 | 5,04±0,04 | 5,03±0,01 |
| 70-30 | 5,33±0,01 | 5,26±0,01 |
| 80-20 | 5,53±0,01 | 5,51±0,01 |
| 90-10 | 5,72±0,01 | 5,71±0,02 |
| 99,9-0 | 5,78±0,01 | 5,82±0,04 |

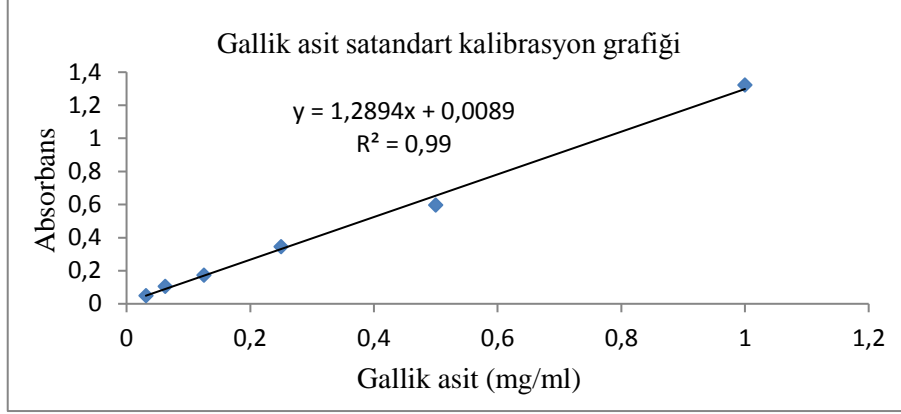


Şekil 11. Propolis ekstraktlarında çözücü oranlarına bağlı pH değişimi

3.2. Antioksidan Analiz Sonuçları

3.2.1. Toplam Fenolik Madde Analiz Sonucu

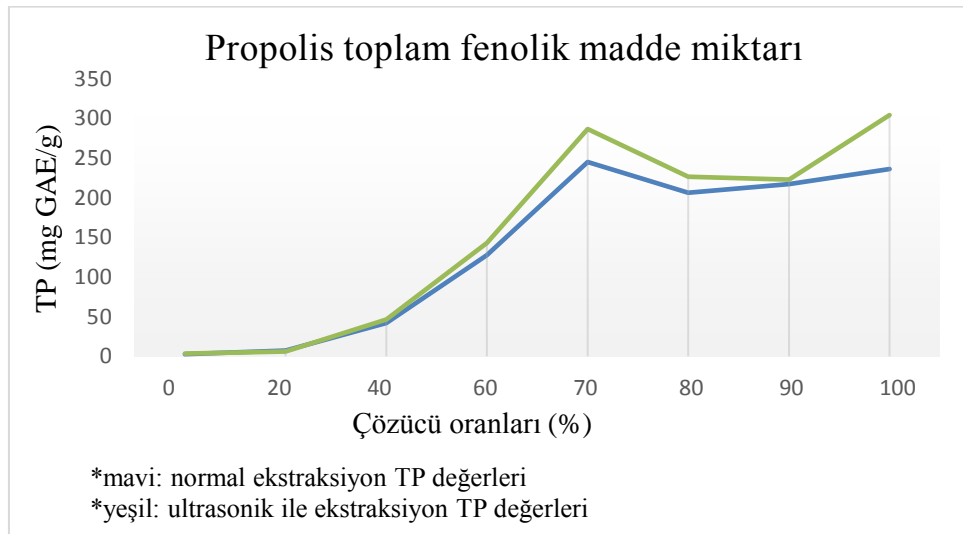
Hazırlanan Anadolu propolis ekstraktlarına ait toplam fenolik madde tayini için örneklerde gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra bölüm 2.7.1'deki yöntem ile analiz gerçekleştirildi. Standart olarak gallik asitin farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanıldı. Gallik asit çözeltilerinin konsantrasyonuna karşılık absorbans grafiği çizilerek örneklerde bulunan toplam fenolik madde içeriği hesaplandı (Şekil 12). Sonuçlar gram propolis başına mg GAE olarak verildi. Farklı çözücü oranlarındaki toplam fenolik madde miktarına ait sonuçlar Tablo 22 ve Şekil 13'te verildi. Normal ekstraksiyonda %60 etanol ile hazırlanan ekstraktta TP değeri $127,468 \pm 0,72$ olarak bulunurken %70 etanol ile hazırlanan ekstraktta TP değeri $244,903 \pm 1,57$ olarak bulunmuştur. Ultrasonik ile yapılan ekstraksiyonda ise bu değerler sırasıyla $142,145 \pm 1,24$ ve $286,266 \pm 1,64$ olarak bulunmuştur. %70 etanol ile hazırlanan ekstraktlarda TP değeri en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Ekstraksiyonunun ultrasonik banyoda yapılmasının TP değerinde artış sağladığı bulunmuştur. %70'ten sonra artan alkol yüzdelerinde %70'te olduğu kadar yüksek seviyede TP değeri gözlenmemiştir.



Şekil 12. Gallik asit standart kalibrasyon grafiği

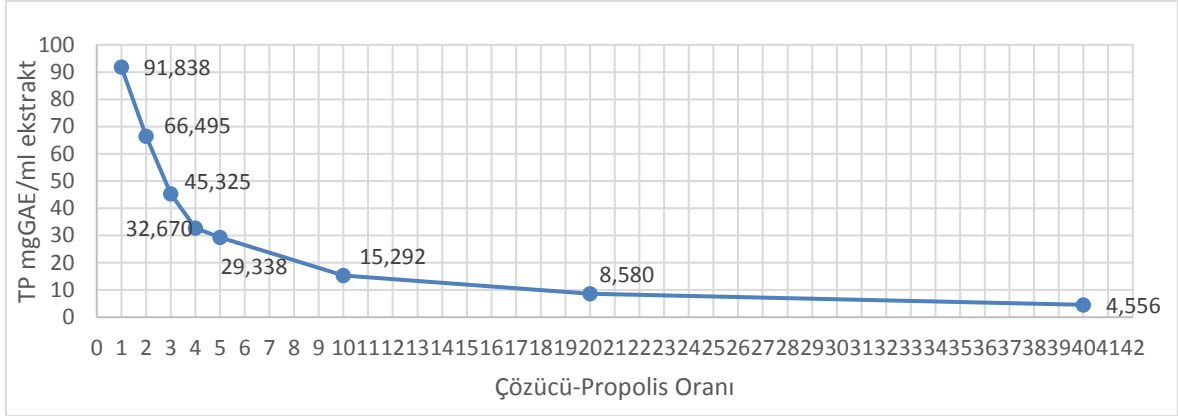
Tablo 22. Farklı çözücü oranlarında toplam fenolik madde (TP) miktarı

| Çözücü Oranları (Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon (mg GAE/g propolis) | Ultrasonik Ekstarksiyon (mg GAE/g propolis) |
|------------------------------------|--|--|
| 0-100 | 2,701±0,04 | 3,449±0,01 |
| 20-80 | 7,049±0,12 | 5,853±0,19 |
| 40-60 | 41,947±0,31 | 46,397±0,55 |
| 60-40 | 127,468±0,72 | 142,145±1,24 |
| 70-30 | 244,903±1,57 | 286,266±1,64 |
| 80-20 | 206,276±1,31 | 226,149±1,57 |
| 90-10 | 217,042±1,25 | 222,583±2,80 |
| 99,9-0 | 235,821±2,55 | 304,050±2,75 |



Şekil 13. Farklı çözücü oranlarında toplam fenolik madde (TP) miktarı

Propolis-çözücü oranının belirlenmesi için yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası ekstraktların TP analizleri yapıldı. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20 ve 1:40 oranlarında hazırlanan ekstraktların TP madde miktarları sırasıyla 91,838±0,41, 66,495±0,57, 45,325±0,21, 32,670±0,90, 29,338±0,65, 15,292±0,31, 8,580±0,21 ve 4,556±0,04 mgGAE / ml ekstrakt olarak bulundu. Ekstraksiyon işlemi için kullanılan propolis miktarındaki azalmaya bağlı olarak elde edilen TP değerlerinde iki farklı veri grubundan bahsedilebilir. 1:5 çözücü oranının alt ve üst oranlarındaki verilerdeki eğimler hesaplandığında 1:1'den 1:5'e kadar olan değerlerde eğimin daha yüksek olduğu, 1:5'den 1:40'a kadar olan değerlerde ise eğimin daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 14). TP değerlerini ml ekstrakt başına değerlendirdiğimizde ise çözültideki propolis miktarı azaldıkça TP madde miktarlarında azalma olduğu görülmektedir.

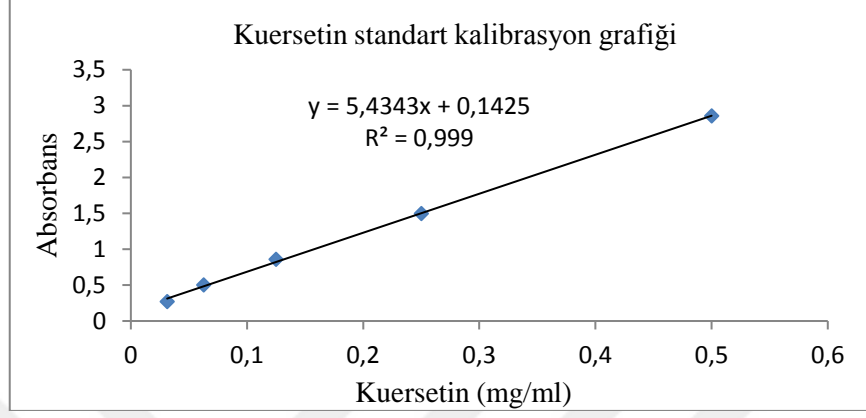


Şekil 14. Farklı propolis-çözücü oranlarında TP madde miktarı değişimi

3.2.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonucu

Anadolu propolis ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktar analizleri bölüm 2.7.2'de belirtilen yöntemle gerekli seyreltmeler yapılarak gerçekleştirildi. Standart olarak kuersetin flavonoidinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak standart kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 15). Sonuçlar g propolis başına mg QE olarak verildi. Elde edilen toplam flavonoid miktarları Tablo 23'te ve grafiksel gösterimi Şekil 16'da verilmiştir. Normal ekstarksiyonda %60 ile hazırlanan ekstraktın TF değeri 10,717±0,04 bulunurken %70 ile hazırlanan ekstraktın TF değeri 12,863±0,06 olarak bulunmuştur. Ultrasonik ile yapılan ekstraksiyonda %60 ile hazırlanan ekstraktın TF değeri 9,479±0,13 bulunurken %70 ile hazırlanan ekstraktın TF değeri 16,118±0,15 olarak bulunmuştur.

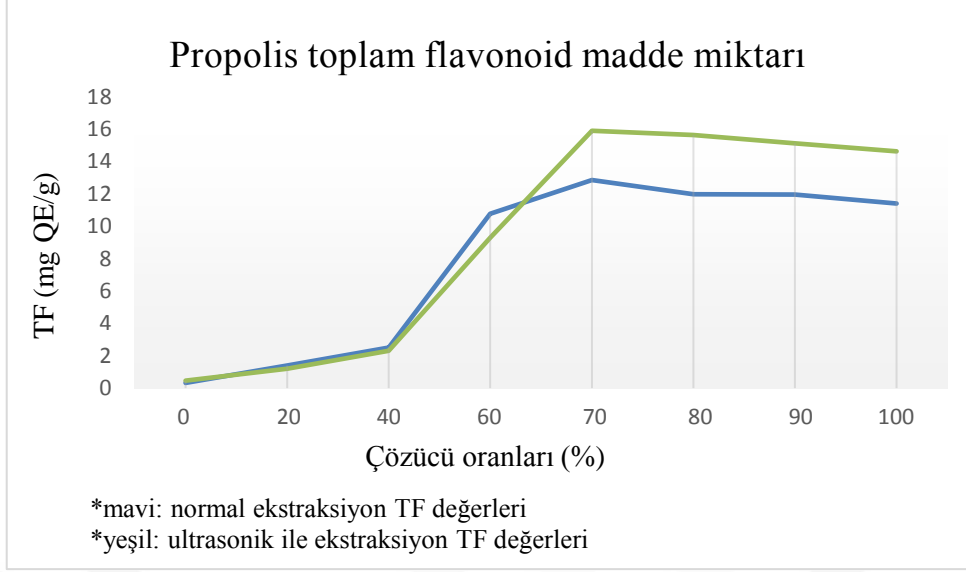
Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyonda TF değerinin normale kıyasla yükseldiği görölmektedir. Çözücü yüzdesi olarak %70'e kadar TF değerlerinde artış gözlenirken %70'ten sonra anlamlı bir artış olmadığı elde edilmiştir.



Şekil 15. Kuersetin standart kalibrasyon grafiği

Tablo 23. Farklı çözücü oranlarında toplam flavonoid madde (TF) miktarı

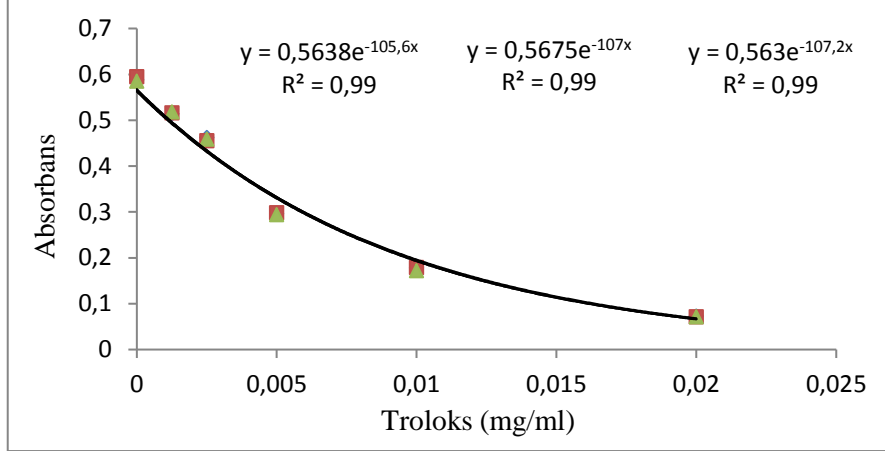
| Çözücü Oranları (Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon (mg QE/g propolis) | Ultrasonik Ekstraksiyon (mg QE/g propolis) |
|------------------------------------|---|---|
| 0-100 | 0,336±0,01 | 0,456±0,01 |
| 20-80 | 1,417±0,01 | 1,208±0,01 |
| 40-60 | 2,535±0,02 | 2,596±0,19 |
| 60-40 | 10,717±0,04 | 9,479±0,13 |
| 70-30 | 12,863±0,06 | 16,118±0,15 |
| 80-20 | 11,986±0,03 | 15,626±0,02 |
| 90-10 | 11,954±0,09 | 15,137±0,02 |
| 99,9-0 | 11,398±0,03 | 14,624±0,18 |



Şekil 16. Farklı çözücü oranlarında toplam flavonoid madde (TF) miktarı

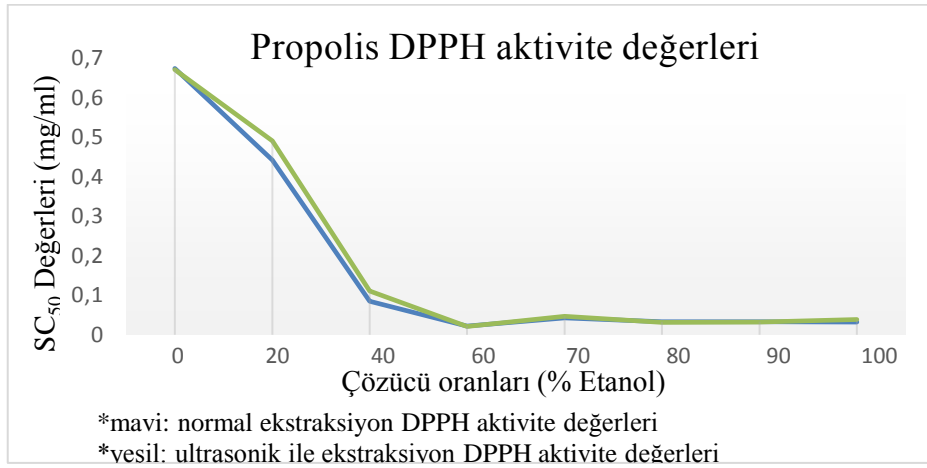
3.2.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analiz Sonucu

Antioksidan bileşenlerin ortamdaki oksidan bileşiklerle tepkimeye girmesi ve oksidan maddeyi yok etmesi esasına dayanan DPPH radikal temizleme aktivitesi testi ile propolis ekstraktlarındaki antioksidan aktivite belirlendi. Her bir ekstrakt için elde edilen konstrasyon-absorbans grafiğinden üstel denklem çıkartılarak radikalın yarısı temizlemek için gerekli olan numune konsantrasyonu (SC_{50}) hesaplandı. Troloksun SC_{50} değeri hesaplanarak standart antioksidan olarak kullanıldı (Şekil 17). Sonuçlar mg/ml olarak verildi. Örnekler antioksidan içeriklerinin karşılaştırılmasında her bir örneğe ait SC_{50} değeri ve troloks'un SC_{50} değeri kullanıldı. Ortamdaki oksidanları temizlemek için gerekli olan antioksidan miktarı ne kadar az ise SC_{50} değeri de o denli düşük olmaktadır. Bu sonuç az miktarda dahi oksidanları temizleyebildiğini yani antioksidan özelliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Hazırlanan ekstraktlara ait SC_{50} değerleri Tablo 24'te ve Şekil 18'de verilmiştir. Normal ekstraksiyon ile hazırlanan ekstraktlarda çözücü olarak sadece su kullanıldığında $0,674 \pm 0,033$ mg/ml'lik SC_{50} değeri elde edilirken, %60 etanol içeren çözücü kullanıldığında $0,022 \pm 0,001$ mg/ml'lik SC_{50} değeri bulunmuştur. %60 ve üzeri etanol kullanılan çözücülerde hazırlanan ekstraktların SC_{50} değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyon işleminde ise normal ekstraksiyonlardan anlamlı olarak farklı sonuçlar elde edilmemiştir. Ultrasonik banyo ile ekstraksiyonun DPPH radikalini temizleme üzerinde bir etkisi olmadığı düşünüldü.

Şekil 17. Troloks'a ait SC₅₀ hesaplama grafiği

Tablo 24. Farklı çözücü oranlarında DPPH aktivite değerleri

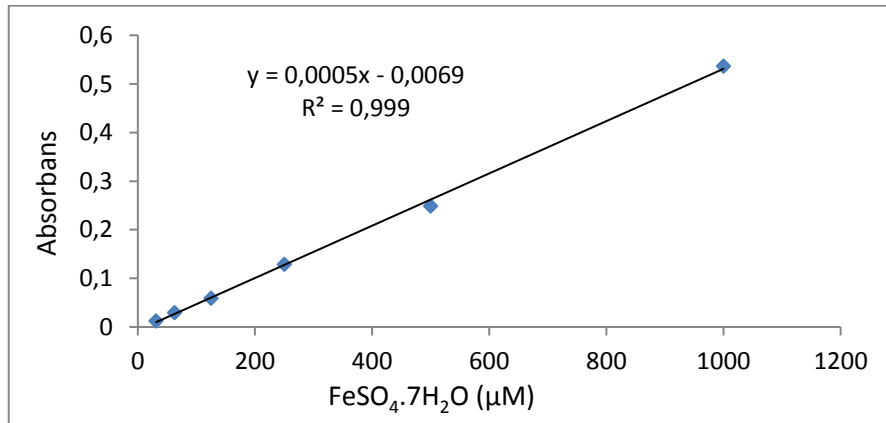
| Çözücü Oranları (Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon (SC ₅₀ , mg/ml propolis) | Ultrasonik Ekstraksiyon (SC ₅₀ , mg/ml propolis) |
|---|--|--|
| 0-100 | 0,674±0,033 | 0,671±0,033 |
| 20-80 | 0,442±0,010 | 0,491±0,005 |
| 40-60 | 0,085±0,002 | 0,111±0,008 |
| 60-40 | 0,022±0,001 | 0,021±0,001 |
| 70-30 | 0,043±0,008 | 0,047±0,007 |
| 80-20 | 0,033±0,001 | 0,031±0,001 |
| 90-10 | 0,033±0,001 | 0,032±0,001 |
| 99,9-0 | 0,032±0,001 | 0,039±0,004 |
| *Troloks SC ₅₀ : 0,006±0,000 mg/ml | | |



Şekil 18. Farklı çözücü oranlarında DPPH aktivite değerleri

3.2.4. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analiz Sonucu

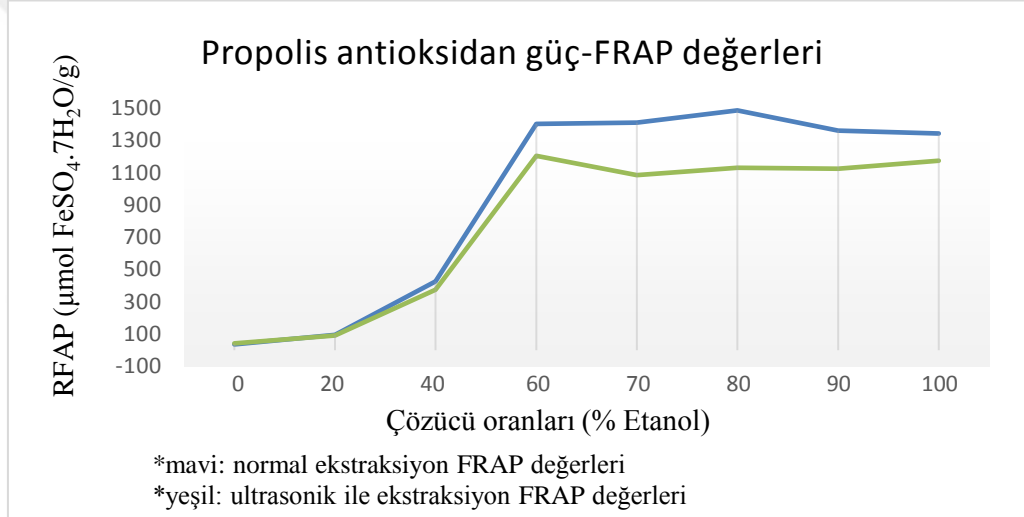
Antioksidan varlığında ferrik-tripiridiltiazin kompleksindeki Fe^{+3} (ferri)'ün Fe^{+2} (ferro)'ye indirgenmesi esasına dayanan bu yöntemle propolis ekstraktlarındaki antioksidan güç analizi yapıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ standart olarak kullanıldı ve $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'ın farklı konsantrasyonundaki absorbans değerinin kullanılması ile standart kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 19). Sonuçlar g propolis başına μmol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ eşdeğeri olarak verildi. Farklı çözücü oranlarında hazırlanan propolis ekstraktlarına ait FRAP analiz sonucu Tablo 25'te ve Şekil 20'de verilmiştir. Normal ekstraksiyon ile elde edilen propolis ekstraktlarından %60 etanol içeren örnekte FRAP değeri $1403,037 \pm 13,39 \mu mol FeSO_4 \cdot 7H_2O/g$ bulunurken, etanol oranının arttığı örneklerde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Ultrasonik banyo kullanılarak hazırlanan %60'luk ekstraktta ise FRAP değeri $1204,604 \pm 10,46 \mu mol FeSO_4 \cdot 7H_2O/g$ olarak en yüksek değerde gözlenirken, etanol yüzdesinin artması ile anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Normal ekstraksiyonla elde edilen antioksidan gücün ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyondan daha yüksek olduğu görülmektedir. Her iki ekstraksiyon yönteminde de sulu ekstraktlarda düşük seviyede antioksidan güç gözlenmiş buna ek olarak %60 etanol oranının üstünde etanol içeren çözücülerde %60'da elde edilen değerden çok fazla farklı olmayan değerler elde edilmiştir. Antioksidan güç (FRAP) için ideal çözücü oranının %60 olduğu daha yüksek oranlarda etanol kullanmanın getirisi olmadığı görülmektedir.



Şekil 19. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'ın standart kalibrasyon grafiği

Tablo 25. Farklı çözücü oranlarında antioksidan güç FRAP değerleri

| Çözücü Oranları (Etanol-Saf su) | Normal Ekstarksiyon ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis) | Ultrasonik Ekstarksiyon ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis) |
|------------------------------------|---|---|
| 0-100 | 36,120 \pm 0,43 | 42,508 \pm 0,56 |
| 20-80 | 95,242 \pm 1,01 | 90,601 \pm 1,67 |
| 40-60 | 427,022 \pm 4,86 | 375,266 \pm 4,47 |
| 60-40 | 1403,037 \pm 13,39 | 1204,604 \pm 10,46 |
| 70-30 | 1410,876 \pm 7,77 | 1084,173 \pm 6,05 |
| 80-20 | 1486,124 \pm 8,58 | 1131,519 \pm 5,03 |
| 90-10 | 1359,925 \pm 11,18 | 1125,086 \pm 9,99 |
| 99,9-0 | 1343,326 \pm 9,60 | 1173,531 \pm 9,25 |



Şekil 20. Farklı çözücü oranlarında antioksidan güç FRAP değerleri

3.2.5. İstatistiksel Analiz Sonucu

Farklı etanol yüzdesi ve ortam şartlarında yapılan ekstarksiyon işlemleri neticesinde elde edilen örneklerin fiziksel ve antioksidan test sonuçları arasındaki ilişkinin belirlenmesi için korelasyon analizi yapıldı. Elde edilen pH ve briks değerleri arasında yüksek düzeyde pozitif bir korelasyon gözlemlendi (Tablo 26).

Tablo 26. Fiziksel parametrelerin korelasyon düzeyleri

| | pH1 | Briks1 | pH2 | Briks2 |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| pH1 | 1 | ,916** | ,996** | ,920** |
| Briks1 | ,916** | 1 | ,903** | ,999** |
| pH2 | ,996** | ,903** | 1 | ,907** |
| Briks2 | ,920** | ,999** | ,907** | 1 |

** : Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-uçlu).

Örneklerin TP ve TF değerleri arasında yüksek düzeyde ilişki olduğu görüldü. DPPH ile diğer antioksidan parametreler arasında negatif bir korelasyon gözlemlendi. Bu ilişki sadece sayısal veriler arasında görülmekte ve antioksidan değerlerinin en yüksek olduğu örneklerin DPPH radikalini de en yüksek düzeyde temizlediği görülmektedir. Antioksidan parametreler arasındaki korelasyon değerleri Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27. Antioksidan parametrelerin korelasyon düzeyleri

| | TP ¹ | TF ¹ | DPPH ¹ | FRAP ¹ | TP ² | TF ² | DPPH ² | FRAP ² |
|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| TP ¹ | 1 | ,964** | -,779** | ,933** | ,990** | ,991** | -,798** | ,921** |
| TF ¹ | ,964** | 1 | -,826** | ,990** | ,940** | ,978** | -,847** | ,981** |
| DPPH ¹ | -,779** | -,826** | 1 | -,863** | -,759** | -,779** | ,994** | -,859** |
| FRAP ¹ | ,933** | ,990** | -,863** | 1 | ,909** | ,952** | -,886** | ,994** |
| TP ² | ,990** | ,940** | -,759** | ,909** | 1 | ,969** | -,776** | ,902** |
| TF ² | ,991** | ,978** | -,779** | ,952** | ,969** | 1 | -,801** | ,933** |
| DPPH ² | -,798** | -,847** | ,994** | -,886** | -,776** | -,801** | 1 | -,882** |
| FRAP ² | ,921** | ,981** | -,859** | ,994** | ,902** | ,933** | -,882** | 1 |

** : Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-uçlu), ¹: Normal ekstraksiyon, ²:Ultrasonik banyoda ekstraksiyon

3.3. HPLC-PDA Metod Validasyon ve Fenolik İçerik Analiz Sonuçları

3.3.1. HPLC-PDA Metod Validasyon Parametreleri

Geliştirilen metodun istenilen amaç için uygunluğunun belirlenmesinde validasyon işlemleri yapılmalıdır. Bu sayede rutin analizlerde metodun kullanılabilirliği sağlanmış olur. Çalışmamızda geliştirilen metodun validasyonu için lineer ölçüm aralığı, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme ve tayin limitleri incelendi. Validasyon parametrelerinin

değerlendirilmesinde her bir standart için kalibrasyon eğrileri çizilerek standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Bölüm 2.8.3'te verilen eşitlik 2 ve eşitlik 3'te belirtilen formüller ile her bir standart için kalitatif olarak belirlenebilecek en düşük numune konsantrasyonu ve kantitatif olarak tayin edilebilecek en düşük numune konsantrasyonu belirlendi.

3.3.1.1. Lineer Ölçüm Aralığı

Geliştirilen metodun doğrusallığının tespiti için her bir standardın 6 farklı konsantrasyondaki çözeltilerinden 3'er defa yürütme işlemi yapıldı. Standartlar 40, 20, 10, 5, 2,5 ve 1,25 ppm'lik çözeltiler halinde uygulandı. Standartların ölçüm aralıklarının bulunması için elde edilen verilere dayanarak bulunan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve R^2 değerleri Tablo 28'de verilmiştir. Standart kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığının yüksek olduğunu R^2 değerleri göstermektedir.

Tablo 28. Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki kalibrasyon bilgileri

| Standart Madde | Kalibrasyon Denklemi | R^2 |
|---------------------------|----------------------------|--------|
| Gallik Asit | $y = 48545,25x - 30268,89$ | 0,9984 |
| Protokatekuik Asit | $y = 62679,43x - 2926,13$ | 0,9986 |
| Klorojenik Asit | $y = 55967,28x - 50901,66$ | 0,9975 |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | $y = 141594,2x - 19873,52$ | 0,9988 |
| Epikateşin | $y = 15590,31x - 13487,66$ | 0,9991 |
| Kafeik Asit | $y = 99045,49x - 53102,93$ | 0,9991 |
| Şiringik Asit | $y = 58487,69x - 24401,14$ | 0,9986 |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | $y = 22225,01x - 9531,442$ | 0,9997 |
| Rutin | $y = 41861,18x - 8889,043$ | 0,9991 |
| Ellagik Asit | $y = 9710,836x - 4409,203$ | 0,9998 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | $y = 110376,6x - 65406,77$ | 0,9981 |
| Ferulik Asit | $y = 79771,24x - 33059,28$ | 0,9982 |
| Mirisetin | $y = 22262,48x - 33711,82$ | 0,9980 |
| Resveratrol | $y = 123052,3x - 26312,94$ | 0,9999 |
| Daidzein | $y = 156142,1x - 10628,39$ | 0,9995 |

Tablo 28'in devamı

| | | |
|-------------------------|----------------------------|--------|
| Luteolin | $y = 150282,3x - 14381,0$ | 0,9999 |
| Kuersetin | $y = 65822,91x + 10579,91$ | 0,9999 |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | $y = 179085,3x - 51249,54$ | 0,9982 |
| Apigenin | $y = 95263,32x + 3686,305$ | 0,9997 |
| Hesperetin | $y = 78668,08x - 3799,182$ | 0,9997 |
| Ramnetin | $y = 51868,93x + 37471,07$ | 0,9978 |
| Krisin | $y = 84787,67x + 12353,53$ | 0,9997 |
| Pinosembrin | $y = 95424,56x + 6673,27$ | 0,9999 |
| CAPE | $y = 61728,7x + 11015,47$ | 0,9998 |
| Kurkumin | $y = 23516,7x + 23959,48$ | 0,9952 |

3.3.1.2. Kesinlik

Kesinlik, bir analizde aynı şartlarda elde edilen verilerin birbirine yakınlığıdır. Bir yöntemin kesinliği onun tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri ile desteklenmelidir. Tekrarlanabilirlik standart sapma ve bağıl standart sapma ile ifade edilir. Bağıl standart sapma örneklem standart sapmasının ortalamaya oranlanması ile elde edilir. Standartların geri kazanım değerlerinin belirlenmesi için iki farklı konsantrasyonda üç tekrarlı analiz gerçekleştirildi ve geri kazanım değerleri yüzde olarak hesaplandı. Geliştirdiğimiz metodun kesinlik ölçütleri Tablo 29'da verilmiştir. Elde edilen veriler ışığında epikateşin, mirisetin ve ellagik asit'e ait bağıl standart sapmalar sırasıyla 0,28855, 0,2712 ve 0,26261 olarak bulunmuştur. Diğer standart bileşiklerin bağıl standart sapma değerleri daha düşük olarak gözlenmiştir. Standartlarımızın bağıl standart sapma değerleri tekrarlanabilirliklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Protokatekuik asit, epikateşin, *m*-OH benzoik asit, rutin, ellagik asit ve mirisetin standartlarının bağıl standart sapma değerleri 0,1'den büyük, bunlar haricindeki standartların bağıl standart sapmalarının 0,1'den küçük olduğu görülmektedir. Kullanılan metodun geri kazanım yüzdesinin hesaplanması için 40 ve 10 ppm'lik çözeltilerdeki değerler incelendiğinde %100 geri kazanımdan çok az sapmalar olduğu, çoğunluğunun geri kazanım yüzdesinin kabul edilebilir düzeyde olduğu bulunmuştur. Konsantrasyon düştükçe geri kazanım

yüzdesindeki sapmaların arttığı ancak yine de kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir.

Tablo 29. Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki kesinlik ölçütleri

| Standart Madde | Standart Sapma (pik alanı) | Bağıl Standart Sapma | Geri kazanım | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------|--------|
| | | | 40 ppm | 10 ppm |
| Gallik Asit | 2402,240 | 0,05429 | 101,22 | 91,43 |
| Protokatekuik Asit | 10693,82 | 0,16203 | 101,17 | 97,13 |
| Klorojenik Asit | 4258,514 | 0,08881 | 101,68 | 93,13 |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | 8449,922 | 0,05913 | 101,17 | 99,47 |
| Epikateşin | 3729,323 | 0,28855 | 100,93 | 94,80 |
| Kafeik Asit | 4829,501 | 0,05327 | 101,04 | 97,68 |
| Şiringik Asit | 2886,402 | 0,05351 | 101,26 | 96,033 |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | 4612,176 | 0,18167 | 100,37 | 102,83 |
| Rutin | 5345,815 | 0,12367 | 99,25 | 106,00 |
| Ellagik Asit | 2299,031 | 0,26261 | 100,17 | 98,033 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | 4387,275 | 0,04304 | 101,53 | 97,13 |
| Ferulik Asit | 6692,479 | 0,08876 | 101,40 | 95,43 |
| Mirisetin | 4366,155 | 0,2712 | 101,37 | 95,90 |
| Resveratrol | 3333,882 | 0,02816 | 100,29 | 100,13 |
| Daidzein | 3872,142 | 0,02484 | 100,68 | 101,53 |
| Luteolin | 4470,869 | 0,02898 | 100,19 | 101,00 |
| Kuersetin | 1358,870 | 0,02003 | 99,88 | 102,50 |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | 7084,483 | 0,04027 | 101,47 | 99,00 |
| Apigenin | 2800,038 | 0,02880 | 100,49 | 101,20 |
| Hesperetin | 1503,143 | 0,01902 | 100,60 | 100,50 |
| Ramnetin | 3065,129 | 0,05390 | 98,73 | 111,37 |
| Krisin | 4433,844 | 0,04999 | 100,49 | 101,80 |
| Pinosembrin | 3940,919 | 0,04018 | 100,33 | 100,70 |
| CAPE | 1385,744 | 0,02199 | 99,66 | 103,53 |
| Kurkumin | 1732,539 | 0,06444 | 98,44 | 107,90 |

3.3.1.3. Doğruluk

Yapılan analizde elde edilen sonucun gerçek değere olan yakınlığı doğruluk ile ifade edilir. Bir yöntemin doğruluğu mutlak hata ve bağıl hata değerleri ile gösterilir. Ölçülen değerlerin gerçek değerden sapması mutlak hata, mutlak hatanın gerçek değere oranlanması ile de bağıl hata hesaplanır. Çalışmamızda oluşturduğumuz metodun doğruluk ölçütleri Tablo 30’da verilmiştir. Çalışmamızda geliştirilen metoddaki standartlara ait bağıl hata düzeyleri resveratrol haricinde 0,02’nin altında gözlenmiştir. Bağıl hata düzeyinin düşük olması kalibrasyon grafiğinin ve örnek analiz sonuçlarının doğruluğunun bir göstergesidir.

Tablo 30. Standartlar için HPLC-PDA sistemindeki doğruluk ölçütleri

| Standart Madde | Mutlak Hata | Bağıl hata |
|---------------------------|-------------|------------|
| Gallik Asit | 0,4867 | 0,0122 |
| Protokatekuik Asit | 0,4667 | 0,0117 |
| Klorojenik Asit | 0,6733 | 0,0168 |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | 0,4667 | 0,0117 |
| Epikateşin | 0,3700 | 0,0092 |
| Kafeik Asit | 0,4167 | 0,0104 |
| Şiringik Asit | 0,5033 | 0,0126 |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | 0,1467 | 0,0037 |
| Rutin | 0,3000 | 0,0075 |
| Ellagik Asit | 0,0667 | 0,0017 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | 0,6100 | 0,0153 |
| Ferulik Asit | 0,5600 | 0,0140 |
| Mirisetin | 0,5467 | 0,0137 |
| Resveratrol | 0,1167 | 0,0290 |
| Daidzein | 0,2700 | 0,0068 |
| Luteolin | 0,0767 | 0,0019 |
| Kuersetin | 0,0500 | 0,0012 |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | 0,5867 | 0,0147 |
| Apigenin | 0,1967 | 0,0049 |
| Hesperetin | 0,2400 | 0,0060 |

Tablo 30'un devamı

| | | |
|-------------|--------|--------|
| Ramnetin | 0,5100 | 0,0128 |
| Krisin | 0,1967 | 0,0049 |
| Pinosembrin | 0,1300 | 0,0033 |
| CAPE | 0,1367 | 0,0034 |
| Kurkumin | 0,6233 | 0,0156 |

3.3.1.4. Gözlenebilme Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Lineer ölçüm aralığında elde edilen standart kalibrasyon denklemi verileri ve bölüm 2.8.3'te verilen eşitlik 2 ve eşitlik 3 kullanılarak standartlar için kalitatif olarak belirlenebilen en düşük konsantrasyon (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük konsantrasyon (LOQ) değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 31'de verilmiştir. Epikateşin, Kafeik Asit, rutin, ellagik asit, mirisetin, pinosembrin ve kurkumin standartlarının LOD değerleri 0,05'in üzerinde, diğer standartların LOD değerleri ise 0,05'in altında bulunmuştur. Kafeik asit, rutin, ellagik asit, mirisetin, pinosembrin ve kurkumin standartlarına ait LOQ değerleri 0,2'nin üzerinde, diğer standartlar ise 0,2'nin altında bulunmuştur. Genel olarak çalıştığımız metodda kullanılan standartların LOD ve LOQ değerlerinin önemli ölçüde düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 31. HPLC-PDA sisteminde standartlara ait gözlenebilme ve tayin limit değerleri

| Standart Madde | Gözlenebilme Limiti (LOD) ($\mu\text{g/ml}$) | Tayin limiti (LOQ) ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------|--|---|
| Gallik Asit | 0,0099 | 0,0331 |
| Protokatekuik Asit | 0,0042 | 0,0139 |
| Klorojenik Asit | 0,0199 | 0,0662 |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | 0,0309 | 0,1031 |
| Epikateşin | 0,0569 | 0,1896 |
| Kafeik Asit | 0,0859 | 0,2865 |
| Şiringik Asit | 0,0203 | 0,0676 |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | 0,0074 | 0,0247 |
| Rutin | 0,0838 | 0,2793 |

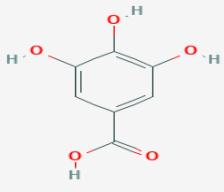
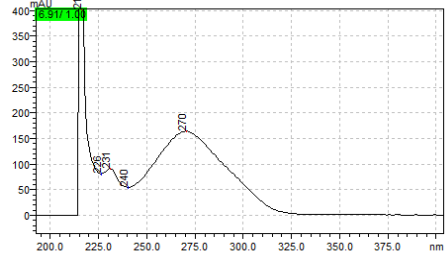
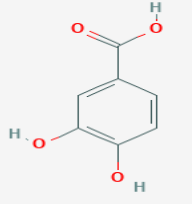
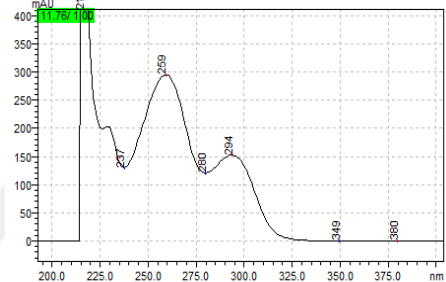
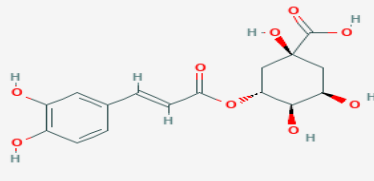
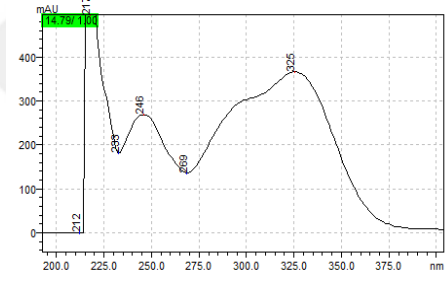
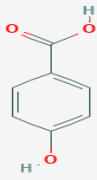
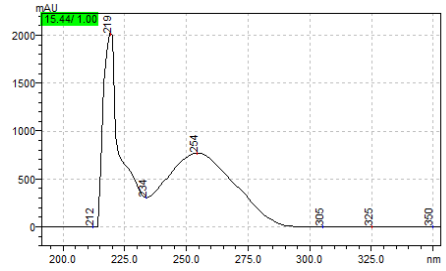
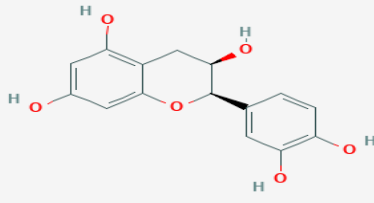
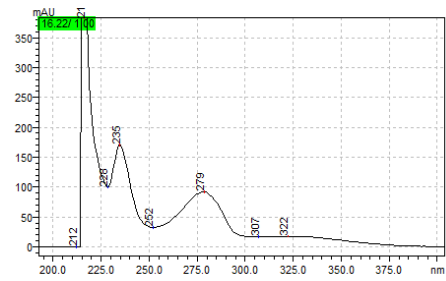
Tablo 31'in devamı

| | | |
|-------------------------|--------|--------|
| Ellagik Asit | 0,0896 | 0,2988 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | 0,0333 | 0,1108 |
| Ferulik Asit | 0,0196 | 0,0653 |
| Mirisetin | 0,0868 | 0,2895 |
| Resveratrol | 0,0336 | 0,1120 |
| Daidzein | 0,0230 | 0,0768 |
| Luteolin | 0,0254 | 0,0847 |
| Kuersetin | 0,0022 | 0,0074 |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | 0,0286 | 0,0954 |
| Apigenin | 0,0439 | 0,1463 |
| Hesperetin | 0,0035 | 0,0117 |
| Ramnetin | 0,0165 | 0,0546 |
| Krisin | 0,0206 | 0,0687 |
| Pinosembrin | 0,0852 | 0,2841 |
| CAPE | 0,0037 | 0,0124 |
| Kurkumin | 0,0908 | 0,3027 |

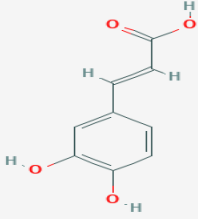
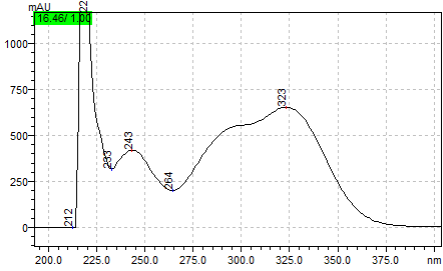
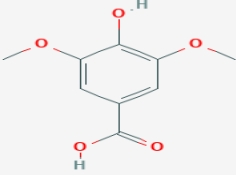
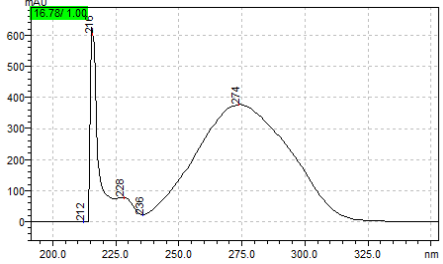
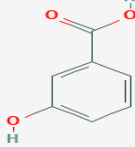
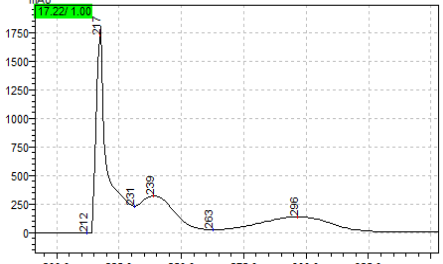
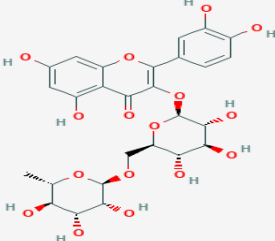
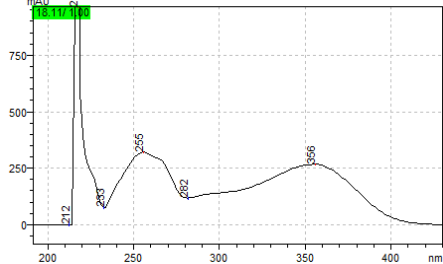
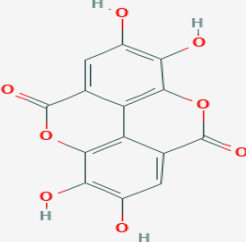
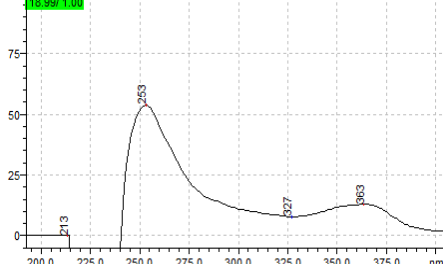
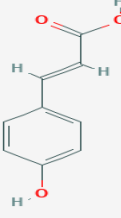
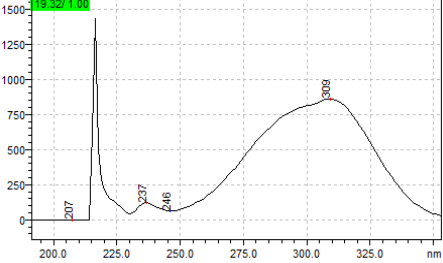
3.3.2. Standart Fenolik Bileşiklerin Spektrum ve Kromatogramları

HPLC ile analizde alıkonma zamanları standartlar hakkında bilgi verir. Ancak aynı alıkonma zamanına sahip farklı bileşiklere ait piklerin görülmesi istenmeyen bir durumdur. Bu durumda elde edilen pikin analizi yapılan standarda mı ait yoksa başka bir maddeye mi ait olduğu soruları ortaya çıkabilir. Kullanılan HPLC sisteminde PDA donanımının olması bu karışıklığı en aza indirmektedir. Çünkü PDA donanımı ile tayin yaparken eş zamanlı olarak ilgili maddelerin spektrum taraması da yapılabilmektedir. Bu sayede elde edilen piklerin spektrumuna bakılarak analizi yapılan standart olup olmadığına karar verilebilir. Çalışmamızda validasyonu yapılan metoddaki standart maddelere ait kimyasal yapılar ve spektrumlar Tablo 32'de verilmiştir.

Tablo 32. Metotta kullanılan standartlara ait kimyasal yapılar ve spektrumlar

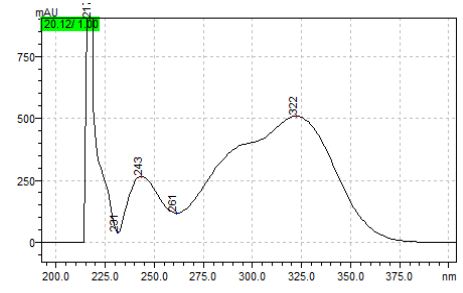
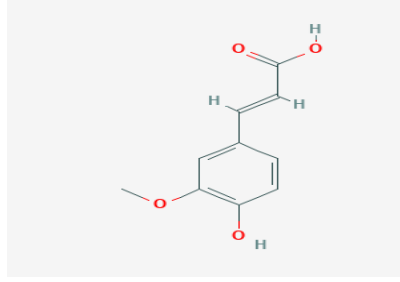
| Standart Madde | Standart Maddelerin Kimyasal Yapısı | Spektrum |
|---------------------------|---|--|
| Gallik Asit |  |  |
| Protokatekuik Asit |  |  |
| Klorojenik Asit |  |  |
| <i>P</i> -OH Benzoik Asit |  |  |
| Epikateşin |  |  |

Tablo 32'nin devamı

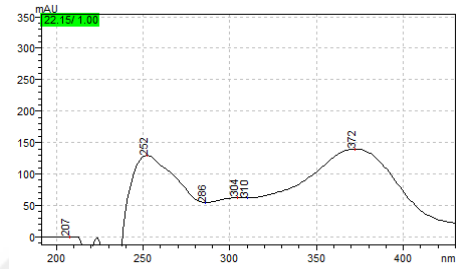
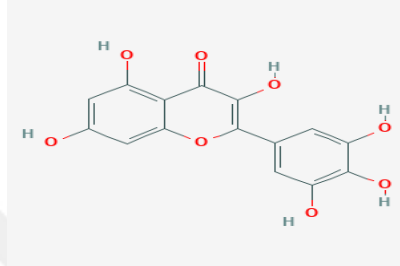
| | | |
|---------------------------|---|--|
| Kafeik Asit |  |  |
| Şiringik Asit |  |  |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit |  |  |
| Rutin |  |  |
| Ellagik Asit |  |  |
| <i>P</i> -Kumarik Asit |  |  |

Tablo 32'nin devamı

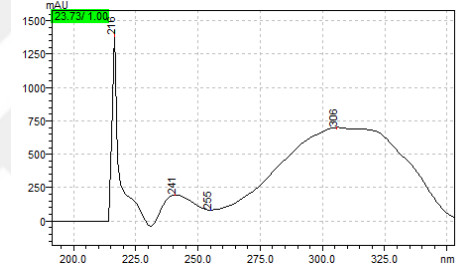
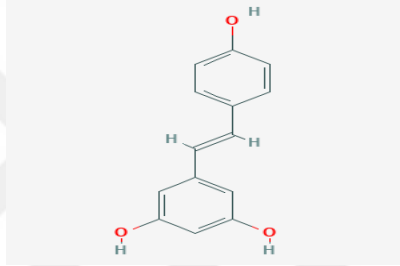
Ferulik Asit



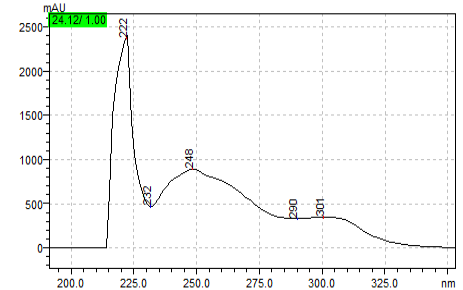
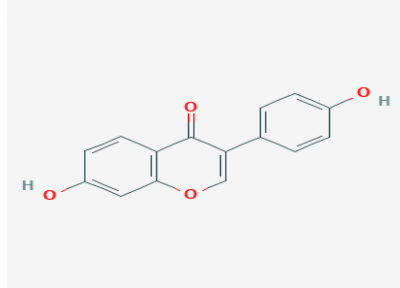
Mirisetin



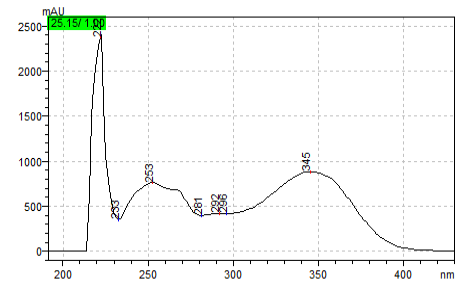
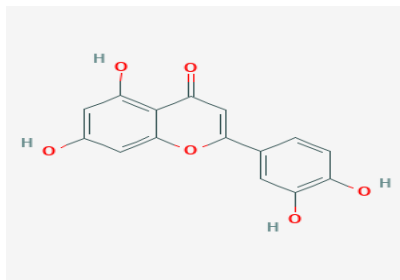
Resveratrol



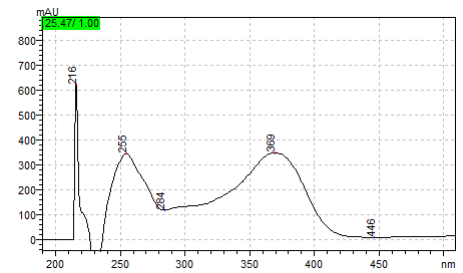
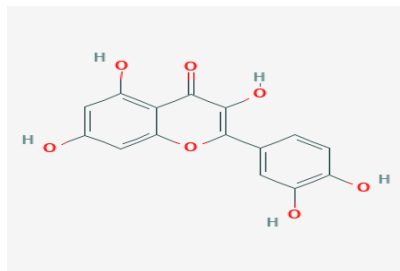
Daidzein



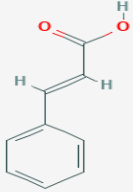
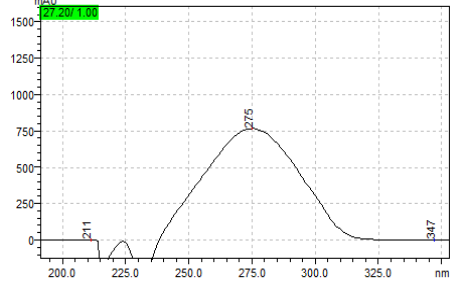
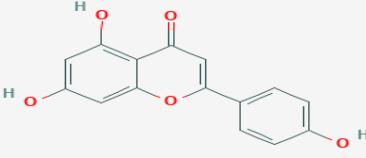
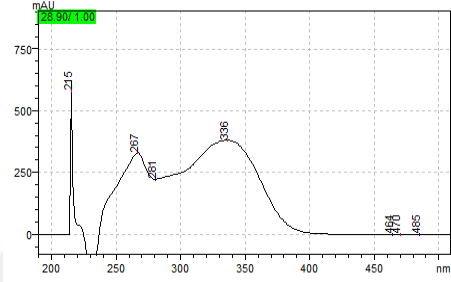
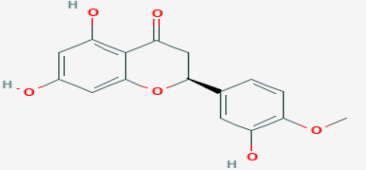
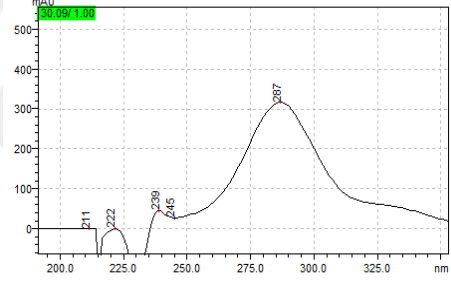
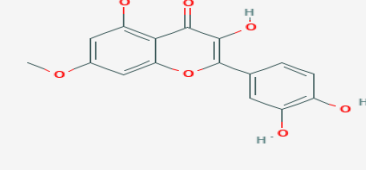
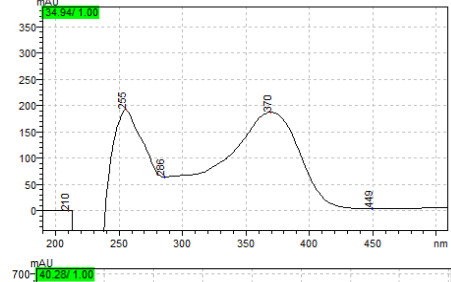
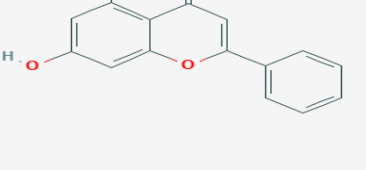
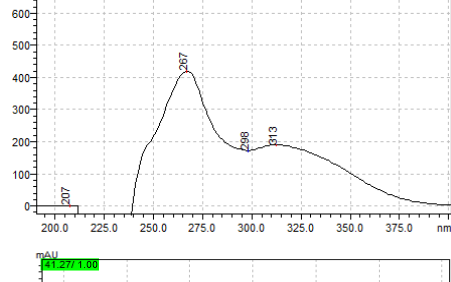
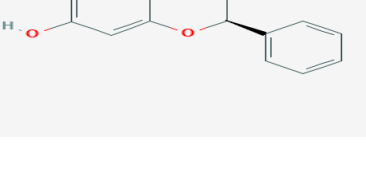
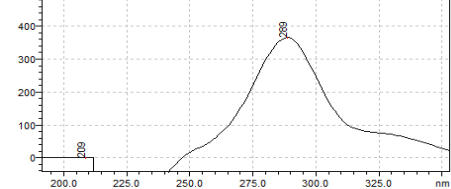
Luteolin



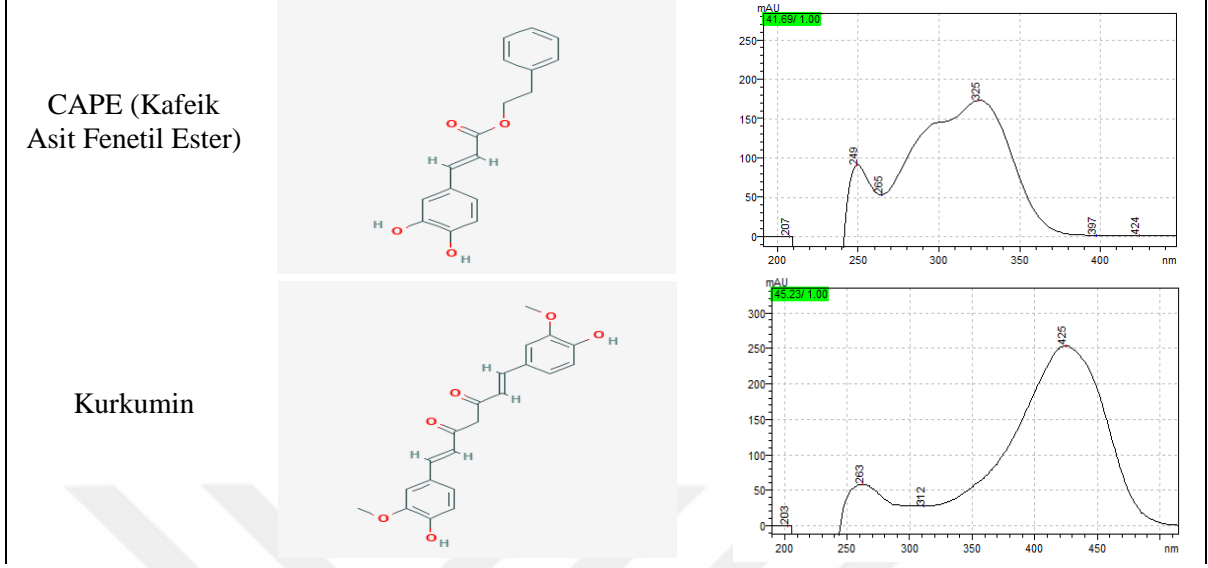
Kuersetin



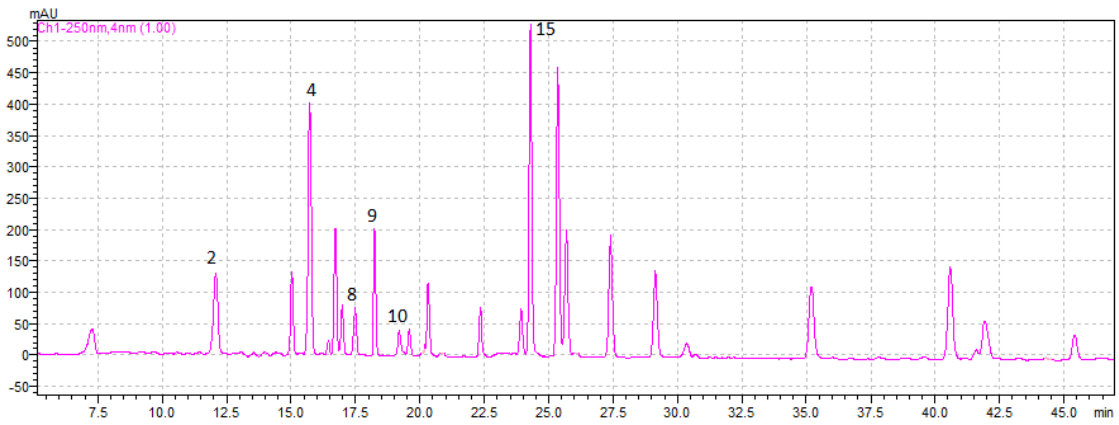
Tablo 32'nin devamı

| | | |
|-------------------------|---|--|
| <i>t</i> -Sinnamik Asit |  |  |
| Apigenin |  |  |
| Hesperetin |  |  |
| Ramnetin |  |  |
| Krisin |  |  |
| Pinosembrin |  |  |

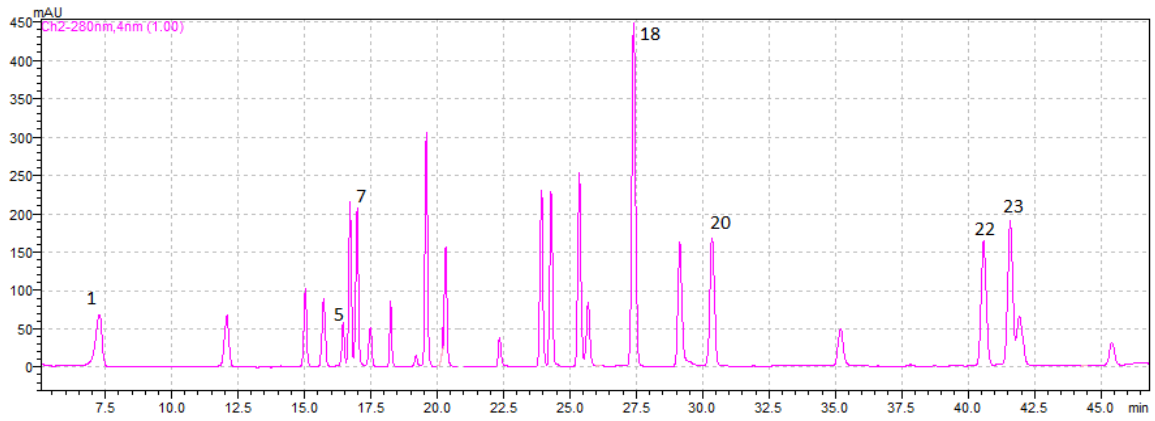
Tablo 32'nin devamı



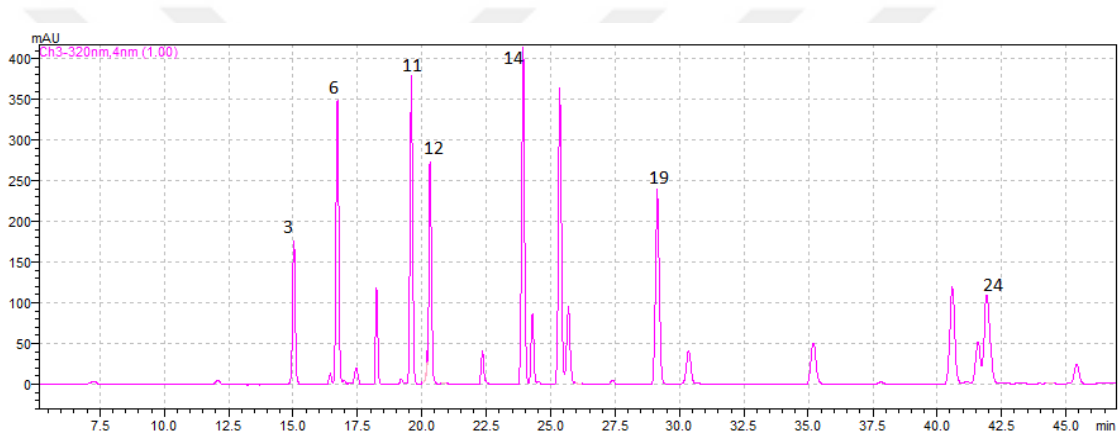
Geliştirilen metotta kullanılan standartlar için maksimum absorbans değerlerine en uygun 4 farklı dalga boyu baz alınarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Kalibrasyon için kullanılan dalga boyları sırasıyla 250, 280, 320 ve 360 nm olarak belirlendi. 250 nm dalga boyundaki kromatogram Şekil 21'de, 280 nm dalga boyundaki kromatogram Şekil 22'de, 320 nm dalga boyundaki kromatogram Şekil 23'te, 360 nm dalga boyundaki kromatogram Şekil 24'de ve 25 standart maddeyi içeren birleştirilmiş standart kromatogram Şekil 25'te verilmiştir.



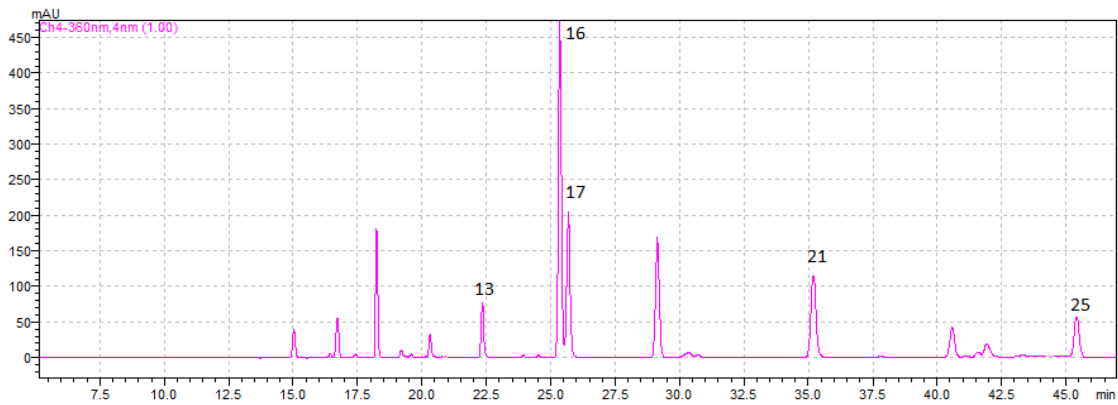
Şekil 21. 250 nm dalga boyundaki standart kromatogram, (2)Protokatekuik asit, (4)*p*-OH Benzoik asit, (8)*m*-OH Benzoik asit, (9)Rutin, (10)Ellagik Asit, (15)Daidzein



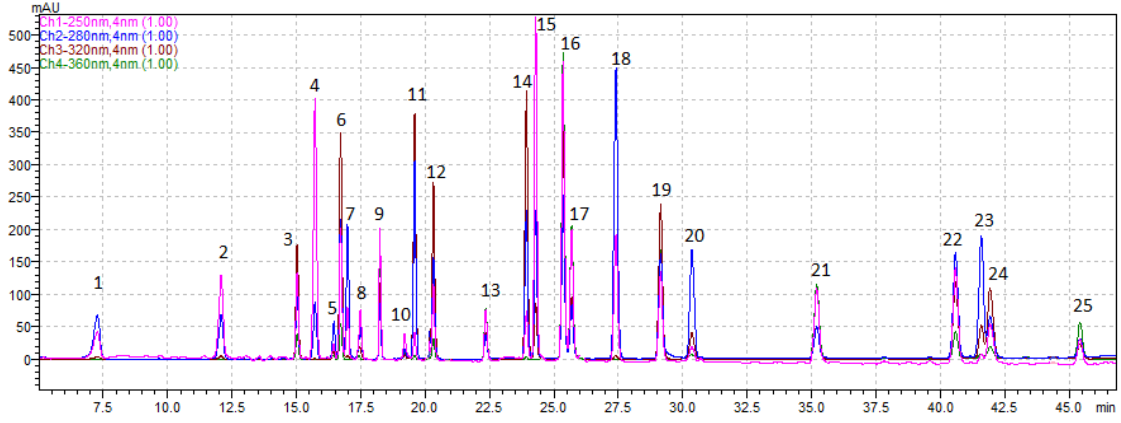
Şekil 22. 280 nm dalga boyundaki standart kromatogram, (1)Gallik asit, (5)Epikateşin, (7)Şiringik asit, (18)-Sinnamik Asit, (20)Hesperetin, (22)Krisin, (23)Pinosembrin



Şekil 23. 320 nm dalga boyundaki standart kromatogram, (3)Klorojenik asit, (6)Kafeik Asit, (11)p-Kumarik Asit, (12)Ferulik Asit, (14)Resveratrol, (19)Apigenin, (24)CAPE



Şekil 24. 360 nm dalga boyundaki standart kromatogram, (13)Mirisetin, (16)Luteolin, (17)Kuersetin, (21)Ramnetin, (25)Kurkumin



Şekil 25. 25 standartı içeren birleştirilmiş kromatogram, (1)Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3)Klorojenik asit, (4)*p*-OH benzoik asit, (5)Epikateşin, (6)Kafeik Asit, (7)Şiringik Asit, (8)*m*-OH benzoik asit, (9)Rutin, (10)Ellagik Asit, (11)*p*-Kumarik Asit, (12)Ferulik Asit, (13)Mirisetin, (14)Resveratrol, (15)Daidzein, (16)Luteolin, (17)Kuersetin, (18)*t*-Sinnamik asit, (19)Apigenin, (20)Hesperetin, (21)Ramnetin, (22)Krisin, (23)Pinosembrin, (24)CAPE, (25)Kurkumin

3.3.3. Anadolu Propolisinin Fenolik İçerik Analiz Sonucu

Çalışmamızda geliştirilen fenolik içerik analiz metodu ile farklı çözücü oranlarında hazırlanmış olan propolis örneklerin analizleri yapılarak fenolik içerikleri aydınlatılmıştır. Normal ekstraksiyon ile hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik içeriği tablo 32’de, ultrasonik banyo ile hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik analiz sonucu tablo 33’te verilmiştir. Her iki ekstraksiyon yönteminde de %0 ve %20 etanol içeren çözücüler haricinde gallik asit ve protokatekuik asit tespit edilmemiştir. %60 ve daha fazla etanol içeren çözücülerle yapılan ekstraksiyonlarda fenolik içerikte zenginleşme olduğu gözlemlendi. Özellikle krisin, pinosembrin ve CAPE seviyelerinde artış olmakla birlikte, %60, %70 ve %80 oranında kullanılan çözücülerdeki fenolik içeriğin diğer çözücü oranlarına göre daha yüksek olduğu görüldü. Buna ek olarak ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyonda, normal ekstraksiyona kıyasla çok büyük olmamakla birlikte fenolik içerik seviyelerinde artış olduğu bulundu. Propolis ekstraktının hazırlanmasında etanol yüzdesinin belirli seviyeye kadar artışı olumlu olurken, yüksek oranda etanol kullanmanın fayda sağlamadığı görülmektedir.

Tablo 32. Normal ekstraksiyon ile hazırlanan Anadolu propolisi fenolik içerik analiz sonucu

| Standart Madde (µg/g) | %0* | %20* | %40* | %60* | %70* | %80* | %90* | %99,9* |
|---------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Gallik Asit | 14,163 | 37,735 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Protokatekuik Asit | 41,904 | 33,595 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Klorojenik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | 40,146 | 69,911 | 14,873 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Epikateşin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Kafeik Asit | 683,661 | 4857,096 | 707,539 | 3453,752 | 3226,815 | 3304,275 | 2293,397 | 1984,866 |
| Şiringik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Rutin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Ellagik Asit | 131,514 | 703,013 | 69,009 | 555,776 | 574,012 | 626,913 | 450,969 | 294,335 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | 459,128 | 2795,255 | 588,756 | 3306,868 | 2927,647 | 2803,141 | 1824,239 | 1631,936 |
| Ferulik Asit | 445,072 | 3394,999 | 720,230 | 4140,532 | 3405,609 | 3627,712 | 2334,915 | 2070,237 |
| Mirisetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Resveratrol | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Daidzein | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Luteolin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Kuersetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | 180,712 | 706,089 | 225,865 | 1802,303 | 1795,839 | 1661,121 | 1381,376 | 1171,323 |
| Apigenin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Hesperetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Ramnetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Krisin | 11,767 | 81,267 | 331,361 | 8725,685 | 9203,726 | 8623,053 | 7928,035 | 6920,838 |
| Pinosembrin | 15,654 | 188,795 | 351,389 | 8312,823 | 7932,835 | 8161,853 | 7275,603 | 6247,575 |
| CAPE | t.e. | t.e. | 1301,694 | 8138,150 | 7489,384 | 6500,732 | 8228,549 | 7807,528 |
| Kurkumin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |

*%Etanol-Saf Su, t.e.: tespit edilemedi

Tablo 33. Ultrasonik ekstraksiyon ile hazırlanan Anadolu propolisi fenolik içerik analiz sonucu

| Standart Madde ($\mu\text{g/g}$) | %0* | %20* | %40* | %60* | %70* | %80* | %90* | %99,9* |
|------------------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Gallik Asit | 28,378 | 35,540 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Protokatekuik Asit | 90,024 | 28,275 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Klorojenik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>p</i> -OH Benzoik Asit | 80,723 | 57,336 | 85,677 | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Epikateşin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Kafeik Asit | 1170,54 | 2140,26 | 2530,469 | 2938,776 | 2930,411 | 3123,336 | 2309,578 | 2279,844 |
| Şiringik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>m</i> -OH Benzoik Asit | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Rutin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Ellagik Asit | 169,555 | 523,284 | 666,489 | 595,592 | 739,989 | 632,949 | 508,382 | 255,510 |
| <i>p</i> -Kumarik Asit | 710,533 | 1306,346 | 2096,105 | 2558,694 | 2486,914 | 2620,527 | 1658,269 | 1943,154 |
| Ferulik Asit | 800,079 | 1534,509 | 2756,617 | 3248,327 | 3268,124 | 3373,755 | 2211,548 | 2521,193 |
| Mirisetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Resveratrol | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Daidzein | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Luteolin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Kuersetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| <i>t</i> -Sinnamik Asit | 288,911 | 365,612 | 1018,165 | 1551,674 | 1509,422 | 1693,779 | 1467,111 | 1239,852 |
| Apigenin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Hesperetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Ramnetin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |
| Krisin | 86,805 | 47,125 | 1507,322 | 7323,429 | 8487,307 | 9630,287 | 8342,319 | 8058,243 |
| Pinosembrin | 81,797 | 110,744 | 1631,853 | 6845,388 | 8316,671 | 8630,583 | 7260,073 | 7232,472 |
| CAPE | t.e. | t.e. | 3695,082 | 7652,571 | 7433,264 | 8139,308 | 7856,681 | 8277,650 |
| Kurkumin | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. | t.e. |

* %Etanol-Saf Su, t.e.: tespit edilemedi

4.TARTIŞMA

Bal, polen, arı sütü ve propolis gibi çeşitli arı ürünleri toplum tarafından yüzyıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda ise özellikle propolis birçok çalışmanın ilgi odağı haline gelmiştir. Propolis arılar tarafından bitkinin yaprak, kabuk ve tomurcuk gibi bölgelerinden toplanan kovani ve arı kolonisini mikroorganizmalardan koruma görevini üstlenmiş reçinemsi bir maddedir. Geçmişten günümüze çeşitli arı ürünleri kullanılmış olup propolis mumyalama ve enfeksiyon hastalıklarına karşı kullanımı ile yüksek derecede öneme sahip bir üründür (Ahn vd., 2007; Li vd., 2008; Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Gelişen tıp alanında sentetik ilaçların kullanılmasına karşın doğal yöntemlerle hastalık tedavisi amacıyla veya direnci arttırmaya yönelik takviye edici besin olarak doğal ürünlere ilgi artmaktadır. Propolis bünyesinde bulundurduğu uçucu yağlar ve fenolikler gibi bileşenler ile antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özelliği sayesinde arı ürünleri içinde dikkati üzerine çekmeyi başarmıştır (Keskin ve Kolaylı, 2018). İlaç, kozmetik ve apiterapi merkezlerinde kullanımı da göz önüne alındığında çeşitli sağlık alanlarında kullanıldığı görülmektedir (Bankova vd., 2014; Oruç vd., 2017). Bununla birlikte propolis sadece besin veya tedavi edici olarak değil ahşap koruma özelliği ile de cilalama ve vernikleme işlemlerinde de kullanılmasıyla ahşabın ömrünü uzatmaktadır (Doğan ve Hayoğlu 2012; Karlıdağ ve Genç, 2019).

Propolisin kimyasal kompozisyonu, rengi ve tadı üretildiği bölgenin iklimine, coğrafi yapısına, bitki örtüsüne, alındığı koloniye, toplanma yöntemine ve toplanma zamanına göre farklılık gösterir (Sforcin vd., 2000; Bankova vd., 2014, Karlıdağ ve Genç, 2019; Neto vd., 2017; Silva vd., 2015; Popova vd., 2017; Sarıkaya vd., 2009). Aynı zamanda propolisin kompozisyonu koloninin gereksinimine göre de farklılık gösterir. Örneğin, koloninin ihtiyacı yalıtım ve izolasyon ise propolis bal mumu ve vaks yönünden zengindir. Koloninin ihtiyacı mikroorganizmalara ve hastalıklara karşı korunma ise balsam yönünden zengin propolis üretilmektedir (Keskin ve Kolaylı, 2018). Propolis içeriği ile ilgili yapılan çalışmalarda, propolisin uçucu yağlar ve fenolikler ana bileşen olmakla üzere terpenler, hidrokarbonlar, şekerler ve mineral elementler gibi 300'den fazla bileşene sahip olduğu bildirilmiştir (Talla vd., 2014; Saral, 2018). Propoliste bulunan bu zengin bileşikler insanlar olarak tüketebilmemiz için ekstraktının hazırlanarak kullanılması gerekir. Ancak hazırlanan ekstraktların etken madde içeriği konusunda net bilginin olmaması kullanıcı

açısından kuşku ve endişeye sebep olmaktadır. Bu konu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılsa da propolis konusunda tam bir standardizasyon henüz yapılamamıştır (Bankova vd., 1987; Keskin ve Kolaylı, 2018).

Literatür incelemeleri neticesinde propolis ekstraksiyon işlemine dair farklı yöntemler kullanıldığı görülmüştür. Örneğin, Tosi ve arkadaşları %30 propolis-çözücü oranında %60 etanol, gliserol, propilen glikol ve tahıl yağı kullanarak ekstraksiyonlar yapmış ve propolisin antimikrobiyal aktivitesinde çözücü seçiminin önemli bir yere sahip olduğunu bildirmiştir (Tosi vd., 1996). Propolis ekstraksiyon işleminde en yaygın kullanılan çözücü olarak etanol tercih edilmektedir. Kullanılan etanolik çözücü karışımlarının ve etanolik ekstraksiyon metodlarının literatürdeki farklılığı dikkat çekmektedir. Araştırmacılar en ideal çözücü yüzdesini ve yöntemini bulmak için çeşitli çalışmalar planlamaktadırlar. Örnek olarak, Mello ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada %80 etanol kullanmış ve ortam pH'sının ekstraksiyon verimine etkisini görmek için ekstraksiyon işlemine HCl ilave etmiştir. pH değişimine bağlı olarak antioksidan aktivite ve antioksidan kapasitenin değiştiğini bildirmiştir (Mello ve Hubinger, 2012). Karlıdağ ekstraksiyon işlemini 1:10 oranında %96 etanol ve 1 haftalık işlem ile yaparken, Keskin 1:10 oranında %98'lik etanol kullanmış ve 24 saatte işlemi tamamlamıştır (Karlıdağ ve Genç, 2019; Keskin ve Kolaylı, 2018). Bruschi ve Cottica ise turbo ekstraksiyon yöntemiyle daha kısa sürede alkolik ekstraktı hazırlamıştır (Bruschi vd., 2003; Cottica vd., 2011). Alencar, Oldoni ve Yang birbirinden bağımsız olarak yaptıkları çalışmalarda propolis ekstraksiyon işlemi için %80 etanol kullanarak yüksek sıcaklıklarda işlemi yaparak 30 dakikadan 240 dakikaya kadar kısa süre içerisinde ekstraksiyon işlemi tamamlamışlardır (Alencar vd., 2007; Oldoni vd., 2011; Yang vd., 2011). Shouqin ve arkadaşları oda sıcaklığında 1 hafta ve 85 °C'de 4 saat olacak şekilde farklı yüzdedeki iki etanolik ekstraksiyon işlemi yapmış ve kazanımlarının eşit olduğunu belirtmişlerdir (Shouqin vd., 2005). Trusheva ve arkadaşları yaptıkları çalışmada %70 etanol ile 1:50 oranında propolis-çözücü kullanmışlar ve farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verimini incelemişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre maserasyon ile ekstraksiyona kıyasla ultrasonik ve mikrodalga ile yapılan yöntemlerde yüksek ekstraksiyon verimi sağladıklarını belirtmişlerdir (Trusheva vd., 2007). Bu bilgiler ışığında görülüyor ki en ideal yöntem ve çözücünün belirlenmesi için araştırmacılar büyük bir çaba harcamıştır ancak literatürde ki boşluk doldurulamamıştır. Bu çalışmayla en ideal çözücü oranı belirlenerek literatürdeki boşluğun doldurulması amaçlanmıştır. İdeal çözücü oranı için

hazırlanan ekstraktların % briks değerleri, pH değişimleri, TP, TF, DPPH ve FRAP analizleri yapıldı.

Gıda ve kimya sanayisinde kırılma indisinden yararlanılarak geliştirilmiş refraktometrik teknikler ile maddelerin veya karışımların kuru madde miktarı belirlenir. Gıda başta olmak üzere kimya sanayisi ve eczacılık gibi alanlarda madde veya karışımların briks değeri kontrol edilen bir parametredir. Örneğin Gabriel 2008 yılında yapmış olduğu bir çalışmada sofralık üzümlerin propolis bazlı bir bileşen ile kaplanmasının etkilerini incelerken briks değerlerini kontrol parametrelerinden biri olarak kullanmıştır (Gabriel, 2008). Çalışmamızda ise propolis ekstraksiyon işleminin en verimli yapılabilmesi için kullanılacak çözücü karışımının ve yönteminin belirlenmesinde briks değerinin bize ışık tutacağı düşünüldü. Elde edilen sonuçlara baktığımızda çalıştığımız her iki ekstraksiyon yönteminde de %40'a kadar olan çözücülerde briks değeri çözücü yüzdesi ile doğru orantılı olarak artmakta %60'dan sonra ise briks değerinde anlamlı bir artış olmadığı görülmektedir. Buradan yola çıkarak %60 ve üzerinde alkol içeren çözücülerdeki kuru madde miktarı ile bu ekstraktlardaki antioksidan kapasite arasında bir ilişki kurulabilir. Kuru madde miktarının artması ile antioksidan kapasitenin arttığı, plato oluşturmaya başladığı çözücü yüzdelilerindeki ekstraktların antioksidan kapasitelerinde de platolaşma olduğu görülmektedir.

Mantar ve bakteri gibi mikroorganizmalara etkisinden dolayı gıdalardaki asidik düzey belirli sınırlar çerçevesinde kontrol edilir. Arı ürünleri içinde önemi gün geçtikçe artan propolis bünyesinde barındırdığı fenolik asitlerden dolayı ekstraktları asidik bir pH değerine sahiptir. Propolisin bünyesinde bulunan bu maddelerin mikroorganizmalara etkisinin pH yükseldikçe azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Ivančajić vd., 2010). Çalışmamızda ekstraksiyon için kullanılan çözücü karışımlarındaki etanol yüzdesinin artması ile ekstraktların pH değerinin arttığı görülmüştür. Çözücü etanol yüzdesinin artması pH değerini arttıran sebeplerden biri olabilir. Ancak ortamdaki yüksek oranda etanol artışına istinaden düşük ivmede artan pH değeri bize, çözücüye geçen etken maddelerin asidik değerlerinden ötürü düşük ivmenin gözlemlendiğini düşündürmektedir. Propolisten çözücü ortamına geçen bileşenler her iki ekstraksiyon yönteminde de hızlı pH yükselmesini engellemektedir. Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyonla elde edilen ekstraktların pH değerinin normal ekstraksiyon ile yapılan ekstraktlara yakın bulunması ultrasonik etkinin pH'yı etkilemediğini düşündürdü.

Propolisin bünyesinde bulunan çeşitli bileşikler antioksidan etkilerden sorumludur. Bu bileşiklerin başında fenolik maddeler gelir. Literatürde propolisin ister standardizasyonu ister en verimli ekstraktının hazırlanması olsun, yapılan işlemin kontrolü amacıyla TP ve TF gibi antioksidan kapasite ile DPPH ve FRAP gibi antioksidan aktivite testlerinin yapıldığı görülmektedir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri veya alkolik çözücü oranlarında yapılan çalışmalarda TP değerinin 48 – 232 mg GAE/g propolis arasında gözlemlendiği bildirilmiştir (Aliyazıcıoğlu vd., 2013; Cottica vd., 2011; Alencar vd., 2007). Bununla beraber TP madde miktarının 570 mg GAE/g propolis olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (Erdoğan, 2011). Yapılan bazı çalışmalarda ise TP değeri yüzde olarak verilmiş ve %10 ile %52 arasında değiştiği bildirilmiştir (Keskin ve Kolaylı, 2018, Cunha vd., 2004; Trusheva vd., 2007). Gram propolis başına bulunan TP değerlerindeki bu tarz farklılıklara propolisin elde edildiği bölge, elde edilmiş şekli, ekstrakte edildiği yöntem ve ekstraksiyonda kullanılan çözücüler gibi etkenler sebep olabilir. Örneğin İran'ın farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin TP değerinin %3-%8 arasında değiştiği bir çalışmada bildirilmiştir (Mohammadzadeh vd., 2007). Etanolün farklı yüzdelerinde gerçekleştirilen çalışmamızda %70 etanol ile yapılan normal ekstraksiyon işleminde en yüksek TP değeri olarak $244,90 \pm 1,57$ mg GAE/g elde edilmiştir. Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyon için ise %70 ve %100'lük ekstraksiyon işlemlerinde ise en yüksek değer olarak sırasıyla $286,27 \pm 1,64$ ve $304,05 \pm 2,75$ mg GAE/g bulunmuştur. Literatürde farklı yüzdeler de etanol içeren ekstraksiyon işlemlerinin neticesine bakıldığında etanolün miktarı ile ilgili farklı kullanımların olduğu görülmektedir (Sun vd., 2015; Keskin ve Kolaylı, 2018; Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Çalışmamızda en verimli etanol yüzdesinin belirlenmesi amaçlanmış ve ister normal ekstraksiyon olsun ister ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyon olsun %70 etanol içeren çözücü sisteminin kullanılmasının faydalı olabilir. Ekstraksiyon işleminde ultrasonik banyo kullanımının TP miktarında artış sağladığı bulunmuş olup literatürde buna yakın sonuçlar bildirilmiştir (Trusheva vd., 2007).

Ekstraksiyon işleminde propolis-çözücü oranı kullanılan çözücünün etanol yüzdesi kadar önemli bir konudur. Araştırmacılar bu konuda en verimli oranı bulmak ve en iyi şekilde fenolikleri elde etmek için birbirinden farklı propolis-çözücü oranları kullanmaktadır (Trusheva vd., 2007; Karlıdağ ve Genç, 2019). Çalışmamızda bu farklılıkların azaltmak adına farklı propolis-çözücü oranlarında ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır. Hacim sabit tutularak 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20 ve 1:40 oranlarında propolis ilave edilmiş ve hazırlanan ekstraktların fenolik içeriğinin belirlenmesi için TP

analizi yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde ekstraksiyonda kullanılan propolis miktarındaki azalmaya kıyasla TP madde miktarında iki farklı veri grubu görülmektedir. Bu veri gruplarındaki eğimler incelendiğinde 1:5 ve 1:10 oranlarının önemli bir yere sahip olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra TP madde miktarını g propolis başına incelediğimizde sabit hacimde kullanılan propolis miktarındaki azalmaya karşın TP değerinde artış olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında TP değerinin hacim bazında düşünüldüğü zaman azaldığı, ağırlık bazında düşünüldüğü zaman arttığı görülmektedir. Bu sebeple 1:5 ile 1:10 oranlarında propolis ekstraksiyonu yapıldığında en verimli propolis-çözücü oranının kullanılmış olacağını düşünmekteyiz.

Literatürde propolis örneklerinin içerdiği TF madde miktarına yönelik yapılan çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılmış olması sunulan sonuçlar arasında farklılık olmasını kaçınılmaz kılmıştır. Örneğin Trusheva ve arkadaşları ultrasonik ekstraksiyon ile farklı propolis-çözücü oranlarında TF değerlerini %8,6 ile %9,6 arasında bulduklarını bildirmiştir (Trusheva vd., 2007). Mello ve arkadaşları ise pH'sını değiştirdikleri sulu ve etanolik ekstraksiyonlarda 11,41-68,40 mg QE/g aralığında TF tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Mello ve Hubinger, 2012). Başka bir çalışma ise hekzan ile fraksiyonlamada, etanolik ekstraksiyona kıyasla 4 kat daha fazla TF elde edildiğini göstermiştir (Alencar vd., 2007). Çalışmamızda su yüzdesinin yüksek olduğu çözücülerde düşük düzeyde TF tespit edilmiş, etanol yüzdesi arttıkça TF miktarının da arttığı görülmüştür. %70 etanol-saf su karışımında her iki ekstraksiyon yönteminde de normal ve ultrasonik ekstraksiyon için sırasıyla 12,86±0,06 ve 16,11±0,15 mg QE/g propolis değerleri elde edilmiştir. Bu etanol yüzdesinin üzerindeki çözeltilerde TF değerlerinin çok fazla değişmediği görülmektedir. Bununla beraber ultrasonik ekstraksiyonun TF madde miktarını arttırdığı bulunmuştur. Özetle %70 etanol-saf su karışımı ve ultrasonik ekstraksiyon kullanılarak propolisten TF madde eldesinin en verimli yol olabileceğini düşünmekteyiz.

DPPH radikali ticari olarak satın alınabilen bir sentez ürünüdür. Antioksidan çalışmalarında güçlü bir oksitleyici ajan olarak kullanımı yaygındır. Sun ve arkadaşları sulu ve alkolik olarak hazırladıkları propolis ekstraktlarının DPPH temizleme gücünü sırasıyla 13,798 mg/ml, 0,633 mg/ml olarak bildirmişlerdir (Sun vd., 2015). Cottica ve arkadaşları ise Brezilya'nın Maringa yerleşiminden sağladıkları propolisin DPPH aktivitesini incelemiş ve 0,047-0,160 mg/ml aralığında bir değere sahip olduğunu bildirmişlerdir (Cottica vd., 2011). Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücü kadar

çözücünün pH değerinin önemine dikkat çekmek isteyen Mello ve arkadaşları, pH'nın 4 olduğu çözücü sisteminde yapılan ekstraksiyon işlemi neticesinde %90 oranında DPPH temizleme aktivitesi elde ettiklerini beyan etmişlerdir (Mello ve Hubinger, 2012). Bir başka çalışmada Azerbeycan'dan temin edilen propolislerin ekstraksiyon işlemi için %95 etanol kullanılmış ve 15-198 mg/ml aralığında DPPH temizleme aktivitesi bulmuşlardır (Can vd., 2015). Çalışmalar göstermektedir ki propolisin temin edildiği bölge, propolis ekstarktının hazırlandığı çözücü ve çözücü sistemin asitlik düzeyi gibi pek çok etken DPPH aktivitesine etki etmektedir. Çalışmamızda kullanılan Anadolu propolisi normal ekstraksiyon ve ultrasonik banyo ile ekstraksiyon olmak üzere iki farklı yöntemle ekstrakte edilmiştir. Normal ekstraksiyonda DPPH temizleme konsantrasyonu olarak 0,022-0,647 mg/ml arasında değişen değerler elde edilmiştir. En etkili konsantrasyon olan 0,022 mg/ml değeri %60 etanol-saf su çözücü sisteminin kullanıldığı ekstraksiyonda elde edilmiştir. Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyon için de 0,021-0,671 mg/ml aralığında sonuçlar bulunmuş ve %60 etanol-saf su sisteminin en etkili sistem olduğu görülmüştür. Normal ve ultrasonik banyo ile yapılan iki ekstraksiyon yönteminde de %60 etanol-saf su çözücü sistemi en etkili sonucu sağlamıştır.

Ferrik indirgeme güç analizi (FRAP), ferrik-tripiridiltriazin kompleksindeki Fe^{+3} 'ün örnekte bulunan antioksidanlar tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenmesi esas alınarak gerçekleştirilir. Propoliste bulunan antioksidanların ferrik indirgeme gücünü belirlemek için yapılmış çeşitli çalışmalar vardır. Dünyanın farklı ülkelerine ait propolis örneklerinin FRAP analiz sonuçlarına bakıldığında farklı FRAP değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Cottica vd., 2011; Mello ve Hubinger, 2012; Can vd., 2015; Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Brezilya propolislerin farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen FRAP değerleri 528-1365 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis olarak bildirilmiştir (Cottica vd., 2011). Türkiye'nin farklı illerinden toplanan propolisler ile ilgili yapılan bir çalışmada ise FRAP değerlerinin 182-325 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Çalışmamızda farklı etanol su karışımı içeren çözücü sistemleri kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktlarına ait değerler normal ekstraksiyon için 36,120-1486,124 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis aralığında, ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyon için ise 42,508-1204,604 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ propolis aralığında değiştiği bulunmuştur. İki ekstraksiyon yöntemine ait sonuçlar incelendiğinde %60 etanol-saf su çözücü sistemindeki ferrik indirgeme gücünün en etkin olduğu görülmektedir.

Literatürde propolisin ekstraksiyonu için farklı yöntemler ve koşullar denenmiş ve en ideal sistemin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar olduğu görülmektedir (Trusheva vd., 2007; Alencar vd., 2007; Mello ve Hubinger, 2012; Cottica vd., 2011; Sun vd., 2015). Yaptığımız çalışmada etanol-saf su karışımı için ideal oranı belirlemeyi amaçladık. Bu bağlamda verilerimizi incelediğimizde TP ve TF gibi analizler için %70'lik etanol-saf su sisteminin, DPPH ve FRAP gibi analizler için ise %60'lık etanol-saf su sisteminin optimum koşul olduğu düşüncesine varıldı.

Bununla beraber antioksidan parametreler arasındaki ilişki incelenmiş ve DPPH ile TP arasında orta düzeyde, FRAP ile TP ve TF arasında yüksek düzeyde ve DPPH ile FRAP arasında orta düzeyde bir ilişki olduğunu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Can vd., 2015; Mello ve Hubinger, 2012). Çalışmamızda çözücü sistemdeki etanol yüzdesi ile antioksidan parametreler arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. Ancak optimum çözücü sistemindeki etanolden fazla alkol kullanımının, değerlerde gözle görülür seviyede bir değişime yol açmadığı görülmüştür. Bununla birlikte ekstraksiyonu yapılan propolis miktarı ile çözücü arasındaki oran belirlenmeye çalışılmış ve 1:5 ile 1:10 oranlarının ideal oranlar olabileceği görülmüştür. Hem elde edilebilen antioksidan maddelerin miktarı hem de kullanılan sarf malzemelerin kullanımı göz önüne alındığında optimum yöntemin kullanımı fayda sağlayacaktır.

Örneklere ait fiziksel ve antioksidan parametreler arasında korelasyon analizi yapıldı. Briks ve pH değerlerinin farklı çözücü ve ortam koşullarında birbiri ile pozitif korelasyon gösterdiği görüldü. Çözücü ortamına geçen madde miktarının briks ve pH'yı birbiri ile ilişkili olarak arttırdığı bulundu. TP ile TF ve FRAP arasında pozitif korelasyon gözlenirken, TP ile DPPH arasında negatif korelasyon gözlemlendi. Bu durum çözücü ortamına geçen toplam fenolik madde miktarı arttıkça daha düşük konsantrasyonlardaki ekstraktın DPPH radikalini temizlemesi ile açıklanabilir.

Propolis bünyesinde 300'den fazla fenolik madde barındırır. Bu fenoliklerin metabolizmada önemli bir yere sahip olması araştırmacılar tarafından onların belirlenmesi ve kullanılabilir hale getirilmesi konusunda fikir birliği ortaya çıkarmıştır. Propolis bünyesindeki fenolik maddelerin belirlenmesi için farklı yöntemler denenmiştir. Bunlardan birisi olan kromatografik analizler araştırmacıların en sık kullandıkları yöntemlerdir. Bu sebeple çalışmamızda propolis ve diğer doğal kaynaklardaki fenolik maddelerden tek bir analiz işlemi ile en fazla sayıda fenolik standartın analizinin yapılabilmesi amaçladı. Bu bağlamda 25 standart maddenin analizi için ters faz HPLC-PDA sisteminde gradientli bir

program üzerinde çalışıldı. Çalışılan metodun validasyonu için kesinlik, doğruluk, lineer ölçüm aralığı, LOD ve LOQ değerleri belirlendi. Her bir standart için kalibrasyon eğrileri kullanılarak standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Standartlar için yapılan kalibrasyon eğrisindeki verilerin doğrusal kalibrasyon eğrisine uygunluğunun gösterilmesi için determinasyon katsayısı (R^2) değerleri hesaplandı. Standartların R^2 değerleri 0,9952-0,9999 aralığında bulundu. Aynı koşulunda yapılan analiz ile elde edilen verilerin birbirine yakınlığını ölçmek için standart pik alanlarının bağıl standart sapma değerleri 0,0190-0,2885 aralığında bulundu. Yapılan analizde 40 ppm'lik standart için geri kazanım testi uygulandığında %98,44 ile %101,68 oranında geri kazanım olduğu görüldü. Analizdeki verilerin gerçek değere yakınlığının belirlenmesinde ise bağıl hata değerleri hesaplandı ve 0,0012-0,0290 aralığında bulundu. Her bir standart için gözlenebilme ve tayin limitleri belirlendi. Standartlar için gözlenebilme limitlerinin 0,0022-0,0908 $\mu\text{g/ml}$ aralığında, tayin limitinin ise 0,0074-0,2988 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değiştiği gözlemlendi. Çalışmamızda geliştirdiğimiz fenolik analiz metodunun yüksek determinasyon değerine sahip olması ve bağıl hata değerinin düşük olması kalibrasyon eğrisi ve örnek analiz sonuçlarının doğruluğunun bir göstergesidir.

Literatüre baktığımızda farklı yöntemler ile fenolik madde analizi yapıldığı görülmektedir. Örneğin Jieang ve arkadaşları elektroforez ile yaptıkları fenolik madde tayininde propoliste bulunan flavonoidlerin analizini ortalama 20 dakika içerisinde gerçekleştirebildikleri bir yöntem üzerinde çalışmışlardır (Jiang vd., 2008). Bu analizi elektroforez ile yapmalarında HPLC sisteminde yapılan analizlerin uzun sürmesi ve kullanılan kolonun uzun ömürlü olmaması gibi dezavantajlardan bahsetmiştir. Jiang'ın aksine, literatüre baktığımızda çoğu çalışmanın HPLC sistemi ile yapıldığı görülmektedir (Cunha vd., 2004; Can vd., 2015; Paulino Zunini vd., 2010; Guo vd., 2011; Mian ve Mohamed, 2001). Bunun nedenleri arasında aynı anda çok sayıda standartın analizini gerçekleştirme imkanı, ilgili gradient programlar uygulanması ile analiz süresinin kısaltılabilmesi ve analiz öncesi numunenin gerekli işlemlerden geçirilerek analiz edilmesi ile kolon ömrünün uzatılabilmesi gibi etkenler sayılabilir.

Kullanılan HPLC sistemlerinde seçilen dedektör de HPLC sisteminin verimliliğini arttıran bir diğer parametredir. Genel anlamda HPLC sistemlerinde UV ve PDA dedektörlerin kullanıldığı görülmektedir. Can ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları metodda flavanoller 280 nm'de, sinamik asit türevi bileşikler ise 315 nm'de olmak üzere 15 standart fenolik maddenin analizini HPLC-UV sistemi ile yaptıkları görülmektedir (Can

vd., 2015). Aynı HPLC-UV sistemini kullanan bir diğ er araştırmacı ise 62 farklı bitkide flavonoid analizi yapmak için pH'sı 2 olan metanol-su mobil fazı ile 3.9x150 mm, 4 µm özelliklerindeki bir C18 kolon kullanarak 1 ml/dk akış hızında mirisetin, kuersetin, luteolin, kamferol ve apigenin analizini yapmıştır (Miean ve Mohamed, 2001). Cunha ve arkadaşları ise HPLC-PDA sisteminde metanol ile su-formik asit mobil fazlarını kullanarak Brezilya propolisinde kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit ve 10'dan fazla hidroksi sinnamik asit türevinin 280 ve 340 nm dalga boyunda analizini, 4x125 mm, 5 µm özelliklerindeki kolon kullanarak yapmışlardır (Cunha vd., 2004). Propolisin etanolik ekstraktlarında PDA dedektörü ile farklı kolon özelliklerinde farklı gradient program uygulanarak 8-25 arası fenolik standartın analizinin yapıldığı literatürde bildirilmektedir (Paulino Zunini vd., 2010; Guo vd., 2011; Pelloti vd., 2011; Aliyazıcıoğlu vd., 2013). Analiz edilebilecek fenoliklerin sayısını ve yapılan analizin verimini arttırmak için HPLC-PDA sistemlerine MS sistemlerinin dahil edildiği çalışmalarda literatürde mevcuttur (Sun 2015). Çalışmamızda HPLC-PDA sisteminde C18 (4,6x250 mm, 5 µm) kolonu kullanıldı. Asetonitril-ultra saf su (%70-30) ve %2 asetik asit içeren ultra saf su mobil faz olarak kullanıldı. Analiz şartları, kolon fırını sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 20 µl, akış hızı 1 ml/dk olarak belirlendi. Uyguladığımız bu metod ile 25 adet fenolik standartın analizini 1 saat gibi bir süre içerisinde gerç ekleştirildi.

Farklı çözücü oranlarında hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik içerik analizi çalışmamızda geliştirdiğimiz metod ile yapıldı ve ortak olarak kafeik asit, ellagik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *t*-sin namik asit, krisin ve pinosembrin varlığı tespit edildi. %0, %20 ve %40 etanol içeren çözücülerle yapılan ekstraktlarda kafeik asit birincil pik görüldü, %60 ve üzeri etanol içeren çözücülerle yapılan ekstraktlarda ise krisin ve pinosembrin birincil pik olarak görüldü. Etanol yüzdesi ile ters orantılı olarak gallik asit ve protokatekuik asitte azalma görüldü. CAPE, krisin ve pinosembrin düzeylerinin ise etanol yüzdesindeki artışa kıyasla arttığı %70'ten sonraki yüzdelerde fazla değişmediği gözlemlendi. Yüzde etanol oranlarına bakıldığında standartların en yüksek değerde elde edildiği çözücü yüzdesinin %60 ve %70 olduğu bulundu.

5. SONUÇLAR

Arılar ister ürünleri olsun ister kolonilerindeki yaşamları olsun insanlar tarafından yüzyıllardır incelenmiş ve yaşamımıza entegre edilmiştir. En yaygın kullanılan arı ürünü bal olsa da propolis, arı sütü ve arı zehrinin de değeri gün geçtikçe artmaktadır. Propolis bünyesinde barındırdığı çeşitli maddeler sayesinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyel gibi özellikler göstermektedir. Propolisin bu metabolik etkileri yapısında bulunan organik maddeler, esansiyel yağlar ve mineraller gibi bileşenlerinden ileri gelmektedir. Bunun yanı sıra propolisin elde edildiği bölgeye, iklime ve toplanma şekline göre içeriğinin değiştiği bilinmektedir. Bu sebeple kullanılacak olan propolisin içeriğinin aydınlatılması, propolisin etkisi hakkında bilgi sağlar. Propolisin ham halinde reçine ve zamksı maddeler bulunması nedeniyle direk olarak kullanılamaz. Kullanılacak olan propolis ekstraktının hazırlanması için farklı yöntemler denenmiş ve propolisin içerdiği 300'den fazla bileşen aydınlatılmıştır. Ancak araştırmacılar arasında halen bir propolis standardizasyonunun olmadığı görülmektedir.

Propoliste bulunan organik maddelerin belirlenmesi için organik çözücüler ile ekstraktları hazırlanmaktadır. Çalışmamızda farklı etanolik yüzdeliğe sahip çözücü sistemleri kullanılarak propolis örneğinde bulunan organik maddelerin en yüksek düzeyde elde edildiği etanolik sistemin belirlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda %70'lik etanol-saf su sistemi kullanılarak en yüksek düzeyde fenolik bileşik elde edildiği bulundu. Propolisin sahip olduğu antioksidan güç ise %60'lık etanol-saf su çözücü sisteminde en aktif şekilde olduğu görüldü.

Optimum çözücü seçiminin yanı sıra optimum propolis-çözücü oranının belirlenmesi ile elde edilecek fayda maksimum seviyeye çıkarılabilir. Araştırmacılar ve üreticiler farklı oranlarda ve farklı yöntemlerle propolis ekstraktları hazırlamaktadır. Ancak hangi oranda propolis-çözücü kullanılması gerektiği bilinirse en üst düzeyde verim alınabilir. Bu amaçla optimum propolis-çözücü oranının belirlenmesi için yaptığımız çalışma neticesinde 1:5 ve 1:10 oranlarında hazırlanan ekstraktlarda, fenolik maddeleri daha yüksek seviyede çözücü sisteme alındığı bulundu.

Propolislerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için çeşitli HPLC yöntemleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda tek seferde 25 fenolik standardın analizinin yapılabilmesi için RP-HPLC-PDA sistemi kullanıldı. Analizde uygulanacak programda, asetonitril-ultra

saf su ve asetik asit içeren ultra saf su ile oluşturulan gradientli mobil faz ve sabit faz olarak C₁₈ (4,6x250 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Analiz 20 µl enjeksiyon hacmi, 30 °C kolon fırın sıcaklığı ve 1 ml/dk akış hızı ile gerçekleştirildi. Geliştirilen yöntemin validasyonu için standartların lineer ölçüm aralığı, kesinlik, doğruluk, LOD ve LOQ değerleri incelendi.

Farklı çözücü sistemlerinde hazırlanan ekstraktların fenolik içeriği çalışmamızda geliştirilen yöntemle analiz edildi. Analiz neticesinde su oranının yüksek olduğu çözücü sistemlerinde gallik asit ve protokatekuik asit gibi benzoik asit türevlerinin yüksek düzeyde olduğu buna karşılık etanol oranının yüksek olduğu çözücü sistemlerinde ise krisin ve pinosembrin gibi flavonoidlerin ve CAPE'in yüksek düzeyde olduğu bulundu. Sonuç olarak, %60 ve %70 etanol içeren çözücü sistemleri ile hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik içeriğinin diğer çözücü sistemlerine göre en yüksek seviyede olduğu görüldü.

6. ÖNERİLER

Propolis bünyesinde bulundurduğu fenolik maddeler sayesinde arı ürünleri arasında önemli bir yere sahiptir. Çeşitli ülkelerin bal kodeksleri mevcutken propolis için böyle bir kodeks bulunmamaktadır. Propolis ile ilgili geçmişten günümüze çalışmalar yapılsa da artan önemi ve kullanımı sonucunda araştırmacıların ilgisini daha fazla üzerine çekmektedir.

Çalışmamızda propolis ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan farklı yüzdeliklerdeki etanol-saf su sistemleri içinde ideal çözücü oranının belirlenmesi ve iki farklı ekstraksiyon yönteminin kıyaslaması yapıldı. Ancak farklı çözücü (propilen glikol, zeytin yağı, hekzan vb.) ve ekstraksiyon yöntemleri (maserasyon, mikrodalga, süreye bağlı ultrasonik vb.) için antioksidan içerik, fiziksel analizler ve propolis-çözücü oranları gibi parametrelerin belirlenmesi ile standardizasyon çalışmaları yapılmalı ve ideal koşullar belirlenmelidir.

Propolis için dünya çapında kabul gören en ideal ekstraksiyon yöntemi, süresi, çözücü sistemi, fenolik ve diğer bileşen analizi için kullanılacak metodu ve propolisin fizikokimyasal analizleri gibi pek çok parametreyi kapsayan bir standardizasyona ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., ve Nakayama, T., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry, 101,4, 1383-1392.
- Akalın, A. C. Y., ve Anlı, R. E., 2011. Nar şaraplarında antioksidan fenolik bileşiklerin belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Akyüz, E., 2011. Digitalis ferruginea ssp. schischkinii ve bazı endemik digitalis türlerinin ekstraktlarında mevcut kardiyak glikozitleri ve fenolik bileşiklerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Alencar, S. M. D., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A. ve Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of ethnopharmacology, 113,2, 278-283.
- Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Ertürk, O., Ulusoy, E., ve Kolaylı, S., 2013. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. International Journal of Food Properties, 16,2, 277-287.
- Bankova, V. S., Popov, S. S., ve Marekov, N. L., 1983. A study on flavonoids of propolis. Journal of Natural Products, 46,4, 471-474.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., ve Marekov, N., 1987. A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. Zeitschrift für Naturforschung C, 42,1-2, 147-151.
- Bankova, V., Popova, M., ve Trusheva, B., 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. Chemistry Central Journal, 8,1, 28.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., ve Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy research, 15,7, 561-571.
- Benzie, I. F., ve Strain, J. J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In Methods in enzymology Vol. 299, pp. 15-27. Academic Press.
- Bilaloğlu, G. V., ve Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Blomhoff, R., 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. Current opinion in lipidology, 16,1, 47-54.

- Bogdanov, S., 1997. Antibacterial substances in honey. Artikel Swiss Bee Research Centre, Switzerland.
- Borbalan, A. M. A., Zorro, L., Guillen, D. A., ve Barroso, C. G., 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography–mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. Journal of Chromatography A, 1012,1, 31-38.
- Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., ve Gremião, M. P. D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. International journal of pharmaceutics, 264,1-2, 45-55.
- Can, Z., 2014. Biyoaktiviteleri yönünden türkiye florasına ait baskın ballar ile manuka ballarının karşılaştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Can, Z., Yıldız, O., Şahin, H., Asadov, A., ve Kolaylı, S., 2015. Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. Mellifera, 15,1, 16-28.
- Casagrande, F., ve Darbon, J. M., 2001. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. Biochemical pharmacology, 61,10, 1205-1215.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., ve Ozkan, M., 2001. Meyve ve sebzelerin bileşimi ve sogukta depolanmaları. Gıda Tek. Dergisi Yayınları, Ankara.
- Cemeroğlu, B., 2009. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. 1. cilt. 3. baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 38.
- Cook, N. C., ve Samman, S., 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. The Journal of nutritional biochemistry, 7,2, 66-76.
- Cottica, S. M., Sawaya, A. C., Eberlin, M. N., Franco, S. L., Zeoula, L. M., ve Visentainer, J. V., 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22,5, 929-935.
- Crane, E., 1990. Bees and beekeeping: science, practice and world resources. Heinemann Newnes.
- Cuendet M., Hostettmann K., Poterat O. ve Dyatmiko W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimi Acta, 80, 1144-1152.
- Cunha, I., Sawaya, A. C., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., ... ve Carvalho, P. D. O., 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15,6, 964-970.
- Diplock, A., 1998. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59.

- Doğan, N., ve Hayoğlu, İ., 2012. Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16,3, 39-48.
- Dursun, İ., 2011. *Butomus umbellatus* L. ve *Sparganium emersum* Rehmman Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit İçeriklerinin HPLC-UV ile Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Dünder, Y., ve Aslan, R., 1999. Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 9,1-2, 32-39.
- Elliott, J. G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages: developing nutraceuticals for the new millenium. *Food technology*, 53,2, 46-48.
- Erdem, G. B., 2002. Propolisin diş ürüklüğü oluşumuna etkisinin sıan dişlerinde araştırılması. *Teknik Arıcılık*, 77, 27-28.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., ve Pekel, T., 2013. Denel organik kimya. Gazi Kitabevi.
- Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., ve Seckin, T., 2011. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49,7, 1592-1597.
- Ettre, L. S., 2003. MS Tswett and the invention of chromatography. *LC GC North America*, 21,5, 458-467.
- Eu, J. P., Liu, L., Zeng, M., ve Stamler, J. S., 2000. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*, 39,5, 1040-1047.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., ve Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12,6, 707-715.
- Fang, Z., Zhang, M., ve Wang, L., 2007. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. *Food Chemistry*, 100,2, 845-852.
- Francis, F., 1985. Pigments and Other Colorants, *Food Chemistry*, 2nd Ed, 545-584. Fennema, OR, Ed., Markel Dekker Inc., USA, 991p.
- Fukumoto, L. R. ve Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48,8, 3597-3604.
- Gabriel, A. A., 2008. Estimation of water activity from pH and Brix values of some food products. *Food chemistry*, 108,3, 1106-1113.
- Ghisalberti, E. L., 1979. Propolis: a review. *Bee world*, 60,2, 59-84.

- Guo, X., Chen, B., Luo, L., Zhang, X., Dai, X., ve Gong, S., 2011. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. Journal of agricultural and food chemistry, 59,23, 12610-12616.
- Gündüz, T., 2015. Kromatografi ve elektroforez. Gazi Kitabevi.
- Hallaç, T. F., 2009. Bazı sofralık üzüm çeşitlerinde farklı dönemlerde alınan yapraklardaki fenolik ve mineral madde değişimlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Halliwell, B. A. R. R. Y., Gutteridge, J. M., ve Cross, C. E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. The Journal of laboratory and clinical medicine, 119,6, 598-620.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., ve Aruoma, O. I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35,1-2, 7-20.
- Harvey, D., 2000. Modern analytical chemistry. Boston: McGraw-Hill Companies, Inc..
- Havsteen, B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and therapeutics, 96,2-3, 67-202.
- Hepşen, İ. F., Tilgen, F., ve Er, H., 1996. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 3,4, 386-391.
- Hulme, A. C., 1971. The biochemistry of fruits and their products. Vol. 2.
- Ivančajić, S., Mileusnić, I., ve Cenić-Milošević, D., 2010. In vitro antibacterial activity of propolis extracts on 12 different bacteria in conditions of 3 various pH values. Archives of Biological Sciences, 62,4, 915-934.
- Jiang, L., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G., ve Wang, S., 2008. Analysis of flavonoids in propolis and Ginkgo biloba by micellar electrokinetic capillary chromatography. Journal of agricultural and food chemistry, 56,24, 11571-11577.
- Karlıdağ, S., ve Genç, F., 2019. Farklı Yöntemler Kullanılarak Üretilen Propolis Örneklerinde Biyolojik Olarak Aktif Bileşenlerin Belirlenmesi. Uludag Bee Journal, 19,1.
- Keskin, M., ve Kolaylı, S., 2018. Propoliste Standardizasyon Mümkün Mü?. Uludag Bee Journal, 18,2.
- Koca, N., ve Karadeniz, F., 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 16, 32-37.
- Kolaylı, S., ve Keha, E., 1999. A comparative study of antioxidant enzyme activities in freshwater and seawater-adapted rainbow trout. Journal of biochemical and molecular toxicology, 13,6, 334-337.

- Koyunoğlu, S., 2008. Paeonia türleri içerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Krell, R., 1996. Value-added products from beekeeping No. 124. Food and Agriculture Org..
- Kumazawa, S., Hayashi, K., Kajiya, K., Ishii, T., Hamasaka, T., ve Nakayama, T., 2002. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,17, 4777-4782.
- Kumova, U., 2002. Önemli bir arı ürünü: Propolis. Uludağ Arıcılık Dergisi, 2,2, 10-24.
- Kurilich, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W., ve Novotny, J. A., 2005. Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. Journal of agricultural and food chemistry, 53,16, 6537-6542.
- Kutluca, S., Genç, F., ve Korkmaz, A., 2006. Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, 57.
- Lejeune, B., Pourrat, A., ve Dehmouche, H., 1988. Propolis: utilisation en dermocosmétique. Parfums, cosmétiques, arômes, 82, 73-77.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., ve Kadota, S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16,10, 5434-5440.
- Linsay, S., 1987. High performance liquid chromatography, analytical chemistry by open learning. John Willey, New York,, 17-36.
- Maciejewicz, W., 2001. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. Journal of liquid chromatography and related technologies, 24,8, 1171-1179.
- Maciejewicz, W., Daniewski, M., Bal, K., ve Markowski, W., 2001. GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. Chromatographia, 53,5-6, 343-346.
- Mello, B. C., ve Hubinger, M. D., 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different p H values. International Journal of Food Science and Technology, 47,12, 2510-2518.
- Meyer, V. R., 2013. Practical high-performance liquid chromatography. John Wiley and Sons. P019 8SQ United Kingdom

- Miean, K. H., ve Mohamed, S., 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. Journal of agricultural and food chemistry, 49,6, 3106-3112.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S. E. S., ve Ostad, S. N., 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. Food chemistry, 103,3, 729-733.
- Neto, M. R., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., do Socorro Costa, M., Boligon, A. A., Matias, E. F. ve Coutinho, H. D. M., 2017. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. Food and Chemical Toxicology, 107, 572-580.
- Nibbs, A. E., ve Scheidt, K. A., 2012. Asymmetric methods for the synthesis of flavanones, chromanones, and azaflavanones. European journal of organic chemistry, 2012,3, 449-462.
- Nizamlioglu, N., ve Nas, S., 2010. The phenolic compounds in vegetables and fruit; structures and their importance. Electronic Journal of Food Technologies, 5,1, 20-35.
- Oldoni, T. L. C., Cabral, I. S., d'Arce, M. A. R., Rosalen, P. L., Ikegaki, M., Nascimento, A. M., ve Alencar, S. M., 2011. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. Separation and purification Technology, 77,2, 208-213.
- Oruç, H. H., Sorucu, A., Ünal, H. H., ve Aydin, L., 2017. Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of propolis. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 64, 13-20, 2017
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., ve Deemer, E. K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Journal of agricultural and food chemistry, 50,11, 3122-3128.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 44,6, 307-315.
- Paulino Zunini, M., Rojas, C., De Paula, S., Elingold, I., Alvareda Migliaro, E., Casanova, M. B. ve Dubin, M., 2010. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. Journal of the Chilean Chemical Society, 55,1, 141-146.
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., ve Benvenuti, S., 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55,5, 934-948.
- Pietta, P. G., Gardana, C., ve Pietta, A. M., 2002. Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia, 73, S7-S20.

- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V. ve Chinou, I., 2017. Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. Molecules, 22,7, 1159.
- Pyrzynska, K., ve Biesaga, M., 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. TrAC trends in analytical chemistry, 28,7, 893-902.
- Russell, K. M., 1983. The antibacterial properties of honey, Doctoral dissertation, The University of Waikato, New Zeland.
- Saldamli, İ., 2007. Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Saral, Ö., 2018. Determination of antioxidant activities of the chestnut and flower honeys collected from Eastern Black Sea Region in Turkey. Apiterapi ve Doğa Dergisi, 1,1, 28-32.
- Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., ve Kolayli, S., 2009. Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania sativa* Mill.) honey and propolis. Journal of food biochemistry, 33,4, 470-481.
- Semiz, A., 2018. Gıda Takviyesi Tabletlerinde Bulunan Glukozamin Etken Maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Hplc) Yöntemi ile Tayini İçin Metot Optimizasyonu ve Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Sewell, P. A., Clarke, B. A., ve Kealey, D., 1987. Chromatographic separations, 0-471-91371-5 (paperback); 0-471-91370-7.
- Sforcin, J. M., Fernandes Jr, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., ve Funari, S. R. C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 73,1-2, 243-249.
- Shahidi F. ve Nacz, M., 1995. Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225.
- Shouqin, Z., Jun, X., ve Changzheng, W., 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology, 80,1, 50-54.
- Silva, R. O., Andrade, V. M., Rêgo, E. S. B., Dória, G. A. A., dos Santos Lima, B., da Silva, F. A. ve Gomes, M. Z., 2015. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. Journal of ethnopharmacology, 170, 66-71.
- Singleton, V. L., ve Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16,3, 144-158.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., ve Lamuela-Raventós, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Methods in enzymology, Vol. 299, pp. 152-178. Academic press.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., ve Crouch, S. R., 2007. Principles of Instrumental Analysis. Thomson Brooks. Cole, Canada.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., ve Crouch, S. R., 2017. Principles of instrumental analysis. Cengage learning.
- Slinkard, K., ve Singleton, V. L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture, 28,1, 49-55.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., ve Glajch, J. L., 2012. Practical HPLC method development. John Wiley & Sons.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., ve Zhang, H., 2015. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Şahin, H., 2014. Orman gülü balı ve bitkisindeki grayanotoksin-III (GTX-III) izoformunun LC-MS/MS ile analizi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Talla, E., Tamfu, A. N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F. P., Mbafor, J. T. ve Ndjouenkeu, R., 2014. Phytochemical screening, antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids content of different extracts of propolis from Tekel (Ngaoundal, Adamawa region, Cameroon). The Journal of Phytopharmacology, 3,5, 321-329.
- Thomas, M. J., 1995. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35,1-2, 21-39.
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., ve Bruni, A., 1996. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. Phytotherapy research, 10,4, 335-336.
- Trathnigg, B., Fraydl, S., ve Veronik, M., 2004. Thermodynamic study of retention in liquid exclusion-adsorption chromatography. Journal of Chromatography A, 1038,1-2, 43-52.
- Trusheva, B., Trunkova, D., ve Bankova, V., 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chemistry Central Journal, 1,1, 13.
- Tsao, R., ve Deng, Z., 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. Journal of chromatography B, 812,1-2, 85-99.

- Ulusoy, E., 2010. Anzer balı ve polenin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fenolik bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan özellikleri Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Vermerris, W., ve Nicholson, R., 2006. Isolation and identification of phenolic compounds: A practical guide. Phenolic Compound Biochemistry, 151-196.
- Wollgast J. ve Anklam E., 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Research Institutes, 33, 347- 423.
- Yang, S. Z., Peng, L. T., Su, X. J., Chen, F., Cheng, Y. J., Fan, G., ve Pan, S. Y., 2011. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. Food Chemistry, 127,1, 210-215.
- Yazıcı, E., 2013. *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin antosiyanidinlerinin HPLC-UV ile aydınlatılması, Doktora Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı, Rize.
- Yıldız Kınık, M., 2019. Etofenamate Etkin Maddesinin Biyoanalitik Yöntem Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Yıldız, A., Genç, Ö., ve Bektaş, S., 1993. Enstrümental Analiz. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Young, I. S., ve Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. Journal of clinical pathology, 54,3, 176-186.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Mersin'in Erdemli ilçesinde doğdu. İlk ve orta eğitimini Erdemli'de bitirdi. 2009 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne başladı. Lisans eğitim hayatı süresince Eczacılık yan dal eğitimi aldı. 2014 yılında Kimya Bölümünden mezun oldu. 2018 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Yüksek Lisans mezuniyetini aldı. Bu süreçte klinik araştırma sektöründe çalıştı. 2018 yılı güz döneminde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı.

