

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**PROPOLİS VE ÖZÜTLERİNİN KALİTE PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ VE ENKAPSÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

Merve KESKİN

**MART 2018
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

PROPOLİS VE ÖZÜTLERİNİN KALİTE PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ VE ENKAPSÜLASYONU

Merve KESKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

DOKTOR (KİMYA)

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01 / 03 / 2018

Tezin Savunma Tarihi : 30 / 03 / 2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Trabzon 2018

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Merve KESKİN Tarafından Hazırlanan**

**PROPOLİS VE ÖZÜTLERİNİN KALİTE PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ VE ENKAPSÜLASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 06 /03/2018 gün ve 1743 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

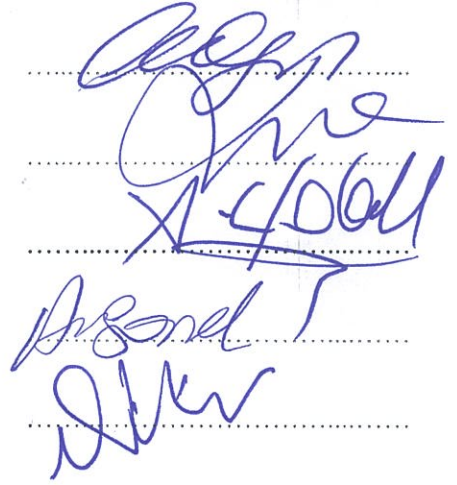
Başkan : Prof. Dr. Ayşe OGAN

Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

Üye : Doç. Dr. Oktay YILDIZ



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın bir kısmı TÜBİTAK tarafından desteklenen **114Z370** nolu projeden sağlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca akademik donanımıyla, çalışma azmiyle, yaratıcılığıyla, hoşgörüsüyle, şefkatiyle her daim yanımda olan, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI' ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın ilerleyişinde emeklerini esirgemeyen ve çalışmalarımın katkıları sağlayan değerli tez izleme jüri üyeleri Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK ve Doç. Dr. Oktay YILDIZ' a gönülden teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca Biyokimya Anabilim Dalı ile ilgili bilgi temellerimin atılmasında katkısı bulunan Prof. Dr. Murat KÜÇÜK'e, Prof. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya, Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a, Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e, SEM görüntülerini elde etmemde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet SARI'ya ve Uzm. Fatih ÖZKALAYCI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Numuneleri temin edebilmemi sağlayan tüm aracı dostlarıma ve firmalara teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Zehra CAN' a, bu zorlu süreçte verdikleri destekler ile laboratuvar çalışma ortamını aile ortamına dönüştüren, desteklerini esirgemeyen Ceren Didar BİRİNCİ, Esra BİRİNCİ ve Yakup ŞİRİN' e canı gönülden teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benimle birlikte olan, desteğini sonsuz bir güç olarak arkamda hissettiğim canım anneme, babama, kardeşlerim Süleyman Emre ve Nurten Gamze' ye, Zehra teyzeme teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimim boyunca her daim yanımda olan, her türlü desteği esirgemediğim eşim Dr. Şaban KESKİN' e ve gözümün nuru biricik oğlum Demir Kağan' a teşekkür ederim.

Merve KESKİN
Trabzon, 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi Olarak Sunduğum ‘‘Propolis ve özütlerinin Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi ve Enkapsölasyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri ve örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, 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.

30/03/2018

Merve KESKİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Propolis Ekstraksiyonunda Çözücü Seçimi.....	5
1.3. Standardizasyon	6
1.4. Polifenoller Ailesi	10
1.5. Tanenler.....	16
1.6. Kafeik Asit fenil Ester (CAPE).....	17
1.7. Vakslar	18
1.8. Balsam Miktarı	20
1.9. Briks Değeri	20
1.10. Kromatografi	20
1.10.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	21
1.10.2. Ultraviyole (UV) Dedektör	23
1.11. Enkapsülasyon.....	24
1.12. Enkapsülant Seçimi	24
1.13. Enkapsülasyon Yöntemleri.....	26
1.13.1. Püskürtmeli Kurutma Yöntemi	26
1.13.2. Koaservasyon Yöntemi	27
1.13.3. Emülsiyon Oluşturma Yöntemi.....	27
1.13.4. Dondurarak Kurutma Yöntemi.....	28
1.13.5. İyonik Jelasyon Yöntemi.....	29
1.14. <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sistem	30

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	32
2.1.	Çalışmada Kullanılan Materyaller	32
2.1.1.	Cihazlar	32
2.1.2.	Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	32
2.1.3.	Çözeltiler	33
2.2.	Numunelerin Temini, Saklama Yöntemi	35
2.3.	Propolislerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
2.3.1.	Propolis Ekstraktların Hazırlanması.....	37
2.3.2.	% Kuru Madde Miktarı Tayini.....	37
2.3.3.	% Briks Değeri Tayini.....	37
2.3.4.	% Balsam Miktarı Tayini	37
2.3.5.	% Vaks (Mum) Değeri Tayini.....	38
2.3.6.	Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	38
2.3.7.	Toplam Flavanoit Tayini	39
2.3.8.	Kondanse Tanen Miktarı Tayini	40
2.3.9.	SEM Görüntüleri	40
2.3.10.	FTIR Görüntüleri.....	40
2.4.	Propolisin Fenolik Profilinin Belirlenmesi	41
2.4.1.	Numunelerin HPLC- UV Analizine Hazırlanması.....	41
2.4.2.	Standartlar ve Kalibrasyon	41
2.4.3.	HPLC- UV Analizi.....	42
2.5.	CAPE Miktarı Tayini	45
2.5.1.	Numunelerin HPLC- UV Analizine Hazırlanması.....	45
2.5.2.	Standartlar ve Kalibrasyon	45
2.5.3.	Kafeik Asit Fenil Ester Tayini	46
2.6.	Enkapsülasyon Çalışmaları	46
2.6.1.	Alginatın Alkol/Su Karışımında Çözünmesi.....	46
2.6.2.	Alginat Propolis Kapsüllerin Hazırlanması.....	47
2.6.3.	Alginat Konsantrasyonunun Etkisi.....	47
2.6.4.	Propolis Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi	48
2.6.5.	Alginat- Propolis Kapsüllerin <i>in vitro</i> Sindirim Sistemi Salınım Özelliklerinin Değerlendirilmesi	48
2.6.6.	Elde edilen Propolis- Alginat Kapsüllerin Raf Ömrünün Belirlenmesi.....	49

3.	BULGULAR	50
3.1.	Ekstraktların Hazırlanması	50
3.2.	Propolislerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	50
3.2.1.	% Kuru Madde Miktarı Tayini	50
3.2.2.	Briks Değeri Tayini	51
3.2.3.	% Balsam Miktarı Tayini	52
3.2.4.	% Vaks Değeri Tayini	53
3.2.5.	Toplam Polifenol Tayini	54
3.2.6.	Toplam Flavonoid Tayini	56
3.2.7.	Kondanse Tanen Miktarı Tayini	58
3.2.8.	FTIR Görüntüleri	61
3.2.9.	HPLC Fenolik Profil	61
3.2.10.	Kafeik Asit Fenil Ester Miktarı Tayini	65
3.2.11.	İstatistik Veriler	67
3.3.	Enkapsülasyon Çalışmaları	68
3.3.1.	Ekstraktların Hazırlanması	68
3.3.2.	Alginatın Alkol/Su Karışımında Çözünmesi	68
3.3.3.	Alginat Propolis Kapsüllerin Hazırlanması	69
3.3.4.	Alginat Konsantrasyonunun Etkisi	70
3.3.5.	Propolis Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi	71
3.3.6.	Alginat- Propolis Kapsüllerin Toplam Polifenol, Toplam Flavonoid, Kondanse Tanen ve Balsam Miktarlarının Belirlenmesi	71
3.3.7.	HPLC-UV Fenolik İçerik Analizi	72
3.3.8.	Alginat- Propolis Kapsüllerin <i>in vitro</i> Sindirim Sistemi Salınım Özelliklerinin Değerlendirilmesi	73
3.3.9.	Elde Edilen Propolis- Alginat Kapsüllerin Raf Ömrünün Belirlenmesi	73
3.3.10.	SEM Görüntüleri	74
3.3.11.	FTIR Görüntüleri	74
4.	TARTIŞMA	75
5.	SONUÇLAR	88
6.	ÖNERİLER	89
7.	KAYNAKLAR	91
8.	EKLER	101

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

PROPOLİS VE ÖZÜTLERİNİN KALİTE PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ VE
ENKAPSÜLASYONU

Merve KESKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2018, 100 Sayfa, 12 Sayfa Ek

Bu çalışmada, propolis ekstraktlarının standardizasyonu amacı ile Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen ham propolis örneklerinin ve ticari propolis örneklerinin kalite parametreleri belirlendi. Yeni, tüketilebilir, alkol içermeyen propolis örneği etanol propolis ekstraktının alginat ile kapsüllenmesi ile oluşturuldu. Örneklerin % kuru madde miktarı, % nem miktarı, % balsam miktarı, Briks değerleri, toplam polifenol, toplam flavonoid, kondanse tanen miktarları belirlendi ve fenolik kompozisyonları tespit edildi. Ham propolis örneklerinin % kuru madde miktarının % 88,42 ile % 98,86 aralığında, % nem miktarının % 1,14 ile % 11,58 aralığında, % balsam miktarının %23,5 ile % 71,1 arasında, Briks değerinin 20 ile 27,5 arasında, toplam polifenol miktarının 16,13- 178,37 mg GAE/mg, toplam flavonoid miktarının 1,24- 51,23 mg KE/g arasında, kondanse tanen miktarının 2,53- 8,47 mg KatE/g arasında değiştiği belirlendi. Ferulik asit, luteolin, p-kumarik asit, t-sinamik asit ve kafeik asitin'in ham propolisler için majör bileşenler olduğu tespit edildi. Propolisin önemli bir bileşeni olan kafeik asit fenil esterinin (CAPE) ise miktarının 0,27- 13,65 mg/g arasında değiştiği belirlendi. Analiz edilen ticari örneklerin içeriklerinin, onların hazırlanışlarında kullanılan çözücü, ham propolis ve ekstrakt hazırlama tekniklerindeki farklılıklardan ötürü birbirinden oldukça farklı olduğu tespit edildi. Elde edilen alginat-propolis kapsüllerinin boyutunun 500-800 µm arasında değiştiği, enkapsülasyon etkinliğinin ise % 99,3 olduğu tespit edildi. +4 °C' de saklanan kapsüllerin 42 gün sonunda içeriğini % 96 oranında koruduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Alginat, Enkapsülasyon, Standardizasyon

PhD Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF QUALITY PARAMETERS OF PROPOLIS AND PROPOLIS
EXTRACTS AND ENCAPSULATION

Merve KESKİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Sevgi KOLAYLI
2018, 100 Pages, 12 Pages Appendix

In this study, some quality parameters of raw propolis samples obtained from different regions of Turkey and commercial propolis extracts were investigated in order to standardize propolis extracts. New, consumable, alcohol free form of propolis was prepared by encapsulating propolis ethanol extract with alginate. The amount of percentage dry matter, moisture content and balsam of samples, their Brix values, total polyphenol, flavonoid and condensed tannin contents were determined. Polyphenolic composition of the samples were investigated by RP-HPLC-UV by comparing with 14 internal standards. It was determined that raw propolis samples contained 88.42% - 98.86% dry matter, 1.14% - 11.58% moisture content, 23.5% - 71.1% balsam and Brix value in the range of 20- 27.5. The amount of total polyphenol, total flavonoid and condensed tannin of samples were found to be in the range of 16.13- 178.37 mg GAE/g sample, 1.24- 51.23 mg QE/ g sample and 2.53- 8.47 mg CatE/g sample respectively. Ferulic acid, luteolin, p-coumaric acid, t-cinnamic acid and caffeic acid were identified as major polyphenolic compounds in raw propolis samples. The amount of caffeic acid phenyl ester (CAPE), an important constituent of raw propolis, was determined to be changed in the range of 0.27- 13.65 mg/g sample. Commercial propolis extracts analyzed in this study were found to be different in their composition since the solvent, raw propolis and extraction technique used in their preparation were different. The average size of alginate-propolis microcapsules were determined in the range of 500-800 μm by Scanning Electron Microscopy analysis. Encapsulation efficiency was calculated as 99.3%. Obtained capsules were incubated at +4 °C to determine their shelf life and it was found that after 42 days of incubation capsules preserved 96% of their polyphenolic composition.

Key Words: Propolis, Alginate, Encapsulation, Standardization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Bal arısı ve propolis.....	1
Şekil 2.	a) Tuzak kullanılarak propolis toplanması b) Kovanda biriken propolisler.....	2
Şekil 3.	Farklı kahverengi ve sarı propolis örnekleri.....	7
Şekil 4.	Brazilya Yeşili ve Kırmızı propolis örnekleri	10
Şekil 5.	Fenolik bileşenlerin sınıflandırılması	11
Şekil 6.	Flavanoidlerin temel iskelet yapısı.	12
Şekil 7.	Farklı fonksiyonel grupları sahip olan flavanoidler..	13
Şekil 8.	Tanen sınıfları.....	17
Şekil 9.	Kafeik asit fenil ester yapısı	18
Şekil 10.	(a) Arının mum taşıyışı (b) Mum kristalleri	19
Şekil 11.	Şematize HPLC cihazı.....	23
Şekil 12.	Sodyum alginatın yapısı	25
Şekil 13.	Şematize püskürterek kurutma yöntemi..	26
Şekil 14.	Şematize koaservasyon yöntemi.....	27
Şekil 15.	Şematize emülsiyon oluşturma yöntemi.....	28
Şekil 16.	Liyafilizatör.	28
Şekil 17.	(a) Şematize iyonik jelasyon yöntemi (b) Şematize kapsüllerin oluşumu.....	29
Şekil 18.	Numunelerin alındığı iller.	35
Şekil 19.	Validasyon parametrelerinin grafik üzerinde gösterimi.....	44
Şekil 20.	Şematize <i>in vitro</i> sindirim sistemi.	48
Şekil 21.	Laboratuvarda yapılan salınım sistemi çalışması.	49
Şekil 22.	Toplam polifenol tayini kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 23.	Toplam flavonoid tayini kalibrasyon grafiği.	56
Şekil 24.	Kondanse tanen miktarı tayini kalibrasyon grafiği.....	58
Şekil 25.	Standartlara ait HPLC fenolik bileşen kromatogramları.	62
Şekil 26.	Kafeik asit fenil ester kromatogramı.	65
Şekil 27.	Toplam polifenol miktarı ile balsam miktarı arasındaki korelasyon.....	67
Şekil 28.	Alginatın etil alkoldeki çözünürlüğü	69

Şekil 29. Alginat- propolis kapsüller.	69
Şekil 30. Alginat derişiminin enkapsülasyon etkinliğine etkisi.....	70
Şekil 31. Propolis ekstrakt hacminin enkapsülasyon verimine etkisi.....	71
Şekil 32. Fenolik bileşenlerin bağlanma oranları..	72
Şekil 33. Alginat- propolis kapsüllerin <i>in vitro</i> salınım özellikleri	73
Şekil 34. Alginat- propolis kapsüllerin raf ömrü.	74



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri	9
Tablo 2. Bazı fenolik bileşenler ve özellikleri	14
Tablo 3. Bal mumu içeriği	19
Tablo 4. Enkapsülasyonda polimerlerin kullanımı, avantaj ve metot kısıtlamaları	30
Tablo 5. Sindirim sistemi bölgeleri ve pH değerleri	31
Tablo 6. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri	32
Tablo 7. Kullanılan kimyasallar ve satın alınan firma bilgileri	33
Tablo 8. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları	34
Tablo 9. Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler	36
Tablo 10. Toplam fenolik madde miktarı pipetleme işlemi	39
Tablo 11. Toplam flavanoid miktarı pipetleme işlemi	39
Tablo 12. Kondanse tanen miktarı pipetleme işlemi	40
Tablo 13. RP-HPLC-UV gradient programı	42
Tablo 14. RP-HPLC-UV fenolik bileşenlerin validasyon parametreleri, mg/L	45
Tablo 15. RP-HPLC-UV gradient program	46
Tablo 16. RP-HPLC-UV kafeik asit fenil ester validasyon parametreleri, mg/L	46
Tablo 17. Ham propolis örnekleri % kuru madde miktarı	51
Tablo 18. Ham propolis örnekleri % nem miktarı	51
Tablo 19. Briks verileri	52
Tablo 20. % Balsam verileri	53
Tablo 21. % Vaks verileri	54
Tablo 22. Toplam polifenol verileri	55
Tablo 23. Toplam flavonoid verileri	57
Tablo 24. Kondanse tanen miktarı verileri	59
Tablo 25. Numuneler ait elde edilen veriler	60
Tablo 26. Propolis fenolik bileşen profili	63
Tablo 27. Numunelere ait CAPE verileri	66
Tablo 28. Korelasyon katsayıları	67

Tablo 29. Alginat- propolis kapsüllere ait elde edilen veriler	72
Tablo 30. Farklı ülkelere ait propolislerin CAPE miktarı.....	82
Tablo 31. Propolis kalite parametreleri.....	89



KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

ATR- FT-IR	: Attenuated total reflectance fourier transform infrakırmızı
Al(NO ₃) ₃	: Alüminyum Nitrat
°C	: Santigrat Derece
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CAPE	: Kafeik Asit Fenil Ester
cm	: Santimetre
DAD	: Diyot Serili Spektrofotometreler
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsulfoksit
e ⁻	: Elektron
g	: Gram
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GC	: Gaz Kromatografisi
GI	: Grup I
GII	: Grup II
GIII	: Grup III
GIV	: Grup IV
-H	: Hidrojen İyonu
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KatE	: Kateşin Eşdeğeri
KCl	: Potasyum Klorür
KE	: Kuersetin Eşdeğeri
KT	: Kondanse Tanen
L	: Litre
LC	: Sıvı Kromatografisi
LOD	: Dedeksiyon Limiti
LOQ	: Tayin limiti

LOL	: Doğrusal Ölçüm Sınırı
m	: Metre
M	: Molar
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
Mo(VI)	: Molibdan (VI)
m/v	: Kütle/ hacim
N	: Normal
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
NaHPO ₄	: Sodyum Hidrojen Fosfat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH ₄ CH ₃ COO	: Amonyum Asetat
nm	: Nanometre
<i>o</i> -	: Orto Pozisyon
-OH	: Hidroksil İyonu
<i>p</i> -	: Para Pozisyon
pH	: Hidrojenin Gücü
<i>p</i> -OH	: Para Hidroksi İyonu
<i>R</i> ²	: Korelasyon Katsayısının Karesi
RE	: Rutin Eşdeğeri
RP-HPLC-UV	: Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultra Viyole
RSD	: Bağlı Standart Sapma
% RSD	: Yüzde Bağlı Standart Sapma
RT	: Alıkonma Zamanı
sa	: Saat
SFC	: Süper Kritik Akışkan Kromatografisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
T.E.	: Tayin Edilemedi
TF	: Toplam Flavanoid Madde
TP	: Toplam Polifenolik Madde
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü

UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Bölge
vd.	: Ve Diğerleri
v/v	: Hacim/Hacim
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
%	: Yüzde
$3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5$: Molibdofosfo Tungstik Heteropoliasit
$\text{MoO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Propolis; çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk vb. kısımlarından işçi arılar tarafından toplanan, reçinemsi, suda az çözünen vizkoz, yapışkan, keskin kokulu doğal bir karışımdır. Bal arıları (*Apis mellifera*) propolisi farklı birçok amaç için toplamaktadır. Kovanları her türlü fiziksel ve kimyasal tehlikeye karşı savunma, kovanlardaki çatlakları sıvama, kovan girişini daraltarak yağmacı arıların girişini engelleme ve kovan iç sıcaklığını 35 °C civarında tutma gibi birçok amaçla bal arıları propolis toplamaktadırlar. Kovan içinden atılmayan yabancı canlıların, ölümlerin mumyalanması ve zarar gören peteklerin tamir edilmesi de arıların propolis kullanma nedenlerindedir (El-Sohaimy vd., 2014). Propolis içerdiği uçucu yağlar ve polifenoller nedeniyle yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitumoral özellikler sergilemektedir. Bu nedenle propolis eski çağlardan beri mumyalamada, vücudun enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmasını arttırmada ve yaraları kapatarak tedavi etmekte doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Ahn vd., 2007; Li vd., 2008; Aliyazıcıoğlu vd., 2013).



Şekil 1. Bal arısı ve propolis

Propolisin üretim miktarı, fiziksel ve kimyasal özellikleri elde edildiği coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Propolis üretimi her yıl ve her koloni için ortalama 10 g ile 300 g arasında değişiklik gösterebilir. Bu farklılık arı ırkına, iklim şartlarına, orman florası çeşitliliğine ve tuzaklama mekanizmalarına bağlı olarak değişir (Mohamed

vd, 2016; Skalicka-Wo'zniak vd., 2017)Şekil 2' de propolisin farklı toplanma şekilleri gösterilmektedir.



Şekil 2. a) Tuzak kullanılarak propolis toplanması b) Kovanda biriken propolisler

Yıllık propolis tüketimi tam olarak bilinmemekle birlikte dünya genelinde propolis tüketiminin yaklaşık 700-800 ton olduğu tahmin edilmektedir. Propolisin kimyasal bileşimi oldukça kompleks olup her bir örnek içinkalitatif ve kantitatif olarak farklılık gösterir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar propolis ekstraktlarına yoğunlaşmıştır ve bu ekstraktlarda doğal olarak bulunan birbirinden farklı 300 civarında farklı bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenler fenolik asitler, flavanoidler, prenillenmiş p- kumarik asit ve asetogener lignanlar, fenolik bileşenler, di ve tri terpenler, şekerler, şeker alkolleri, hidrokarbonlar ve mineral elementler olarak sınıflandırılabilirler (Talla vd., 2014).

Toplandığı bölgenin botanik farklılıklarından ileri gelen farklılıklara rağmen farklı propolislerde pek çok benzerlik de (Propolis örnekleri içerisinde kafeik asit fenil ester, luteolin, kafeik asit vb.fenolik bileşenler farklı miktarlarda da olsa ortak olabilmektedir) bulunmaktadır. Esas olarak propolisin etken maddelerini %50 reçine (fenolik bileşenler) ve % 5 diğer bileşenlerden oluşturmaktadır. Kendine mahsus hoş kokusu olan propolis, krem renginden, sarı, yeşil, kırmızı, açık ya da koyu kahverengiye değişen renklere sahip olabilir. Flavanoidler fenolik asitler ve onların esterlerini de ihtiva eden polifenoller propolisin farmakolojik olarak en aktif bileşenidir.

Apiterapi, arı ürünleri kullanılarak yapılan bir tedavi yöntemi olup, geleneksel ve tamamlayıcı tıp içerisinde yer alan ve son zamanlarda kullanımı bir hayli artmış olan bir uygulama biçimidir. Bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri gibi arı ürünleri apiterapik amaçla çok eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Kemoterapötik ilaçların insan sağlığına

olumsuz etkileri ve antibiyotik dirençliliği gibi nedenlerden dolayı son zamanlarda geleneksel ve doğal yöntemler ile tedavi yöntemlerine eğilimler artmıştır. Hatta bu konuda Sağlık Bakanlıkları yasal mevzuatlar oluşturmuş, apiterapi klinikleri açılmış, sertifika eğitimleri düzenlenmiş ve apiterapi sağlık turizminin de önemli bir parçası haline gelmiştir.

Kardiovasküler ve kan dolaşım sistemi (anaemia), solunum yolları enfeksiyonları, dış hastalıkları tedavisi, deri hastalıkları tedavisi (doku yenileme, ülser, egzama), yara iyileştirme özellikle yanık yaraları (mycosis), müköz zar enfeksiyonları ve lezyonları, kanser tedavisi, bağışıklık sistemi tedavisi ve sağlığı, sindirim rahatsızlıkları alanlarında propolisin ilaç olarak kullanımı oldukça yaygındır (Trusheva vd, 2011; Bonvehi vd., 1994; Talla vd., 2014). Propolis geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmasına rağmen içeriği ile mumsu ve reçinemsu madde oranlarının toplandığı bölge ve bitki türüne bağlı olarak değişmesi, sentetik üretiminin olmaması, ürün bazında standardizasyon problemlerinin olması ve buna bağlı olarak patent sorunlarının oluşmasından dolayı ilaç firmaları tarafından üretilmesi ve piyasaya sürülmesi pek tercih edilmemiştir. Ancak son yıllarda sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin ilaçlara karşı dayanıklı hale gelmesi sonucu insanlar ilaç etkisi olandoğal maddeleri kullanmaya yönelmiştir. Bu yönüyle arı ürünleri tıbbın alternatifini değil destekçisi olarak önem kazanmıştır (Trusheva vd, 2011). Dolayısıyla gıda katkı maddesi olarak kullanımı giderek artan bir ürün haline gelmiştir.

Propolisin sahip olduğu antioksidan, antimikrobiyal etkiler propolisin gıda sektöründe de kullanılmasını cazip kılmaktadır. Propolisin gıda ürünlerinin dayanıklılığı konusunda katkı sağlayan en önemli özelliklerinden biri antimikrobiyal aktivitesidir. Propolisin çeşitli bakteri, mantar, virüs ve diğer mikroorganizmalara etkisi ile ilgili birçok bilimsel çalışma gerçekleştirilmiştir (Ostad vd., 2007; Omar vd., 2017; Vlainić vd. 2017; Alencar vd., 2007; Cui vd., 2013; Popova vd., 2017). Propolisin bu önemli özelliği onu gıda katkı maddesi olarak kullanılmasının önünü açmıştır.

Propolisin en geniş kullanıma sahip olduğu alanlardan biri dermatolojik ve kozmetik uygulamalardır. Propolisin hücre yenileme ve onarma özelliği üzerine oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Propolisin bakteri ve mantar öldürücü özelliği birçok kozmetikte uygulamasına yarar sağlamıştır (Lejeune 1988; Cho vd., 2011). Propolis ekstraktlarının, arı sütü ve E vitamini ile birlikte cildi besleyici ve temizleyici ürünlerin üretiminde geniş ölçüde kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. Kremler, losyonlar, şampuanlar,

burun spreyleri, diş macunları, sabunlar, yüz maskelerive birçok üründe propolis kullanılmaktadır (Monti vd, 1983).

Propolis biyolojik aktif potansiyeli yüksek olduğu için birçok alanda kullanımı son derece umut vaat etmektedir. Ancak ham propolis ortalama %40-50 reçine, %20-30 vaks, %5-10 uçucu yağlar, %1-5 polen, çeşitli fenolik bileşikler ve organik asitlerden oluştuğu belirtilmektedir (Uzel vd., 2005; Rushdi vd., 2017; Miguel vd. 2010). Bu reçinesi kompleks matriks yapısının çözünürlüğü önemli bir problem olup, insan sağlığına zarar vermeyecek güvenilir propolis ekstraktlarının hazırlanarak kullanıma arz edilmesi gerekmektedir. Son 20 yıl içerisinde sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı dirençli olması nedeniyle doğal ilaçların kullanımına karşı eğilim artmıştır. Bu durum propolisi alternatif ve tamamlayıcı tıp ürünü olarak popüler kılmıştır. Ayrıca propolisin kozmetik, gıda ve tarım sektöründe de oldukça geniş bir kullanım alanı bulmaktadır.

Yapılan bilimsel çalışmalarda propolisin bileşiminde bulunan terpen, terpenoid, seskoterpen gibi uçucu bileşenlerin yanında içerdiği sayısız polifenolik bileşiğin biyolojik aktiviteden sorumlu olduğu ve bu bileşenlerin polardan apolara doğru çözünürlüklerinin değiştiği bildirilmektedir (Sahlan vd. 2013 ve Huang vd. 2014). Fenolik asitler nispeten polar karakterde olduğu için suda çözünürlükleri fazladır, fakat flavanoidlerin sudaki çözünürlükleri modifikasyonlarına göre değişmektedir. Hidroksil grupları sayısı fazla ve şekerler ile glikozit bağı oluşturan flavanoidlerin (rutin ve kuersetin gibi) sudaki çözünürlüğü daha yüksek, ancak alkil grubu içeren flavanoidlerin çözünürlüğü düşüktür (Pujirahayu vd. 2014 ve Rocha vd. 2013). Örneğin, kafeik asitin suda çözünürlüğü yüksek olduğu halde kafeik asit fenil esterlerinin (CAPE) düşüktür (Widjaja vd., 2008).

Kafeik asit fenil ester (CAPE) bal arısı propolisinin umut verici bir bileşenidir. Yapılan çalışmalarda CAPE' nin antiinflamator, antioksidant ve antikansorejen özelliklerinin yanı sıra nöroprotektif, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif özellikleri olduğu vurgulanmaktadır. Bu umut verici molekülün *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda oldukça fazla kullanılmaktadır. Ayrıca CAPE' nin antibiyotik ve kemoterapik ilaçların kötü etkilerini ortadan kaldırma özelliği olduğu vurgulanmıştır (Tolba vd., 2016).

Difenolik bir bileşen olan kafeik asit fenil esterinin IUPAC' a göre adı (E)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propionikasit, 2-fenil etil3-(3,4- dihidroksifenil)-2-propeonat olmak üzere iki adettir. C₁₇H₁₆O₄ kapalı formülüne sahip olan CAPE' nin molekül ağırlığı 284,3 g'dır. Ticari olarak da üretimi yapılan CAPE beyaz renkli kristaller halinde bulunmaktadır.

Suda çözünlüğü olmayan CAPE için en iyi çözücü etil alkol olmakla birlikte metanol, aseton ve DMSO' da çözücüsü olarak kullanılmaktadır. Etil alkol çözünlüğü 10 mg/mL olarak belirlenmiştir. CAPE ilk olarak Bankova vd. (1987) tarafından propoliste tespit edilmiştir. Birçok yararı olan CAPE' nin propolis için bir belirteç olduğu düşünülmektedir.

1.2. Propolis Ekstraksiyonunda Çözücü Seçimi

Propolis antioksidan, antimikrobiyal, antitumoral, antiinflamatuvar özellikleri bir arada bulunduran farmasötik biyoaktif bir doğal arı ürünüdür. Reçinemsi yapısından dolayı propolis çeşitli çözücüleri ile muamele edilip ekstraktları hazırlanarak kullanılmaktadır. Ham propolisten en yüksek seviyede faydalanabilmek amacıyla çeşitli çözücüler kullanılarak propolis ekstraktları hazırlanmaktadır. Katı veya sıvı bir karışımdan bir ya da daha fazla bileşimin bir çözücü yardımıyla ayrılması olarak tanımlanan ekstraksiyon işlemi su, metanol, dimetilsülfoksit, zeytinyağı gibi çeşitli çözücüler kullanılarak yapılmaktadır. Bir maddenin çözücü içerisinde dağılması olarak tanımlanan çözünme işlemi çözünen ile çözücünün benzer yapıda olması sonucu meydana gelmektedir. Benzer benzeri çözer temeline dayanan bu işlemde apolar bileşenler apolar çözücülerde, polar bileşenler ise polar çözücülerde en iyi çözünmektedir. Su polar bir moleküldür. Oksijen atomu bölgesi kısmen negatif, hidrojen atomu bölgesi ise kısmen pozitifdir. Elektron dağılımında bir kutuplaşma olması nedeniyle polar çözücü sınıfında yer almaktadır. Eğer molekülün elektron dağılımında benzen molekülünde olduğu gibi bir kutuplaşma yok ise apolar çözücü sınıfında yer almaktadır. İçerisinde polar ve apolar bileşenler bulunduran propolis için (polar bileşenler: fenolik asitler; gallik asit, ferulik asit, şiringik asit, kafeik asit, apolar bileşenler: bazı flavanoidler; CAPE ve onların türevleri ile uçucu yağları) en iyi çözücünün %70' lik etil alkol olduğu birçok çalışmada belirtilmekle birlikte mutlak etanol, mutlak metanol, DMSO yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ham propolisin en pratik çözücüsü % 96'lık etanoldür. Tıbbi amaçlı kullanımlarda propolis % 70'lik etanol ile ekstrakte edilip kullanılırken, kimyasal analiz amaçlı ekstraksiyonlarda % 99'luk etanol veya % 98'lik metanol kullanılmaktadır (Pietta ve ark., 2002). Ancak alkolün insan sağlığına olumsuz etkileri (Ahmet 2008) bulunmaktadır ve bu durum insanları propolis ekstraksiyonu için farklı arayışlara yöneltmiştir. Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliğine (2015) göre içerisinde hacmen en az % 15 alkol bulunan içecekler alkollü içecek olarak adlandırılmaktadır. Alkol tedavi edici veya

takviye edici ilaçlar ile birlikte alındığında ölümcül olabilmektedir. Sürekli kullanımda böbrek, kalp, karaciğer ve mide hastalıkları ortaya çıkabilir; iştah kaybı, vitamin yetersizliği, bağışıklık sistemi, sindirim sistemi ve cinsel işlev bozukluklarına yol açabilmektedir. Ayrıca ekstraktlar hazırlanırken maliyet vb. nedenlerden dolayı etil alkol yerine metil alkolün kullanması körlüğe neden olmaktadır. Alkolün bu zararlı etkilerinden dolayı insanlar çeşitli çözümler kullanarak propolis ekstatte etmeye çalışmaktadır. Bugün çeşitli aktarlar ve eczanelerde alkol, zeytinyağı, gliserol, poletilen glikol, dimetilsulfoksid (DMSO) ve mineral tuzlar, gibi pekçok değişik çözümler ile hazırlanan propolis ekstraktları bulunmaktadır (Kubiliene vd.,2015; Pujirahayu vd., 2014) . Bunların bir kısmı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı izni ile takviye edici gıda olarak satılmakla birlikte pekçoğu merdiven altı tekniklerle üretilmekte ve içeriği analiz edilmeden etiketsiz olarak satılmaktadır. Bu durum insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Haksız kazanç ve insan sağlığına faydadan çok zarar sağlayan ürünlerin önüne geçilebilmesi için propolis ekstraktlarının hazırlanışının ve propolis ekstraktlarının içeriğinin belirli bir standardının olması gerekmektedir.

1.3. Standardizasyon

Belirli bir faaliyetle ilgili olarak ekonomik fayda sağlamak üzere bütün ilgili tarafların yardım ve işbirliği ile belirli kurallar koyma ve bu kuralları uygulama işlemine standardizasyon adı verilir (URL-1, 2017). Standardizasyonun amaçları; üretimde ve malların değişiminde işgücü, malzeme, güç kaynakları vb. faktörlerden en yüksek seviyede tasarruf sağlamak, tatmin edici kalitede mal ve hizmet üretimini sağlayarak, tüketici çıkarlarını gözetmek, insan hayatının sağlık ve güvenliğini korumak ve ilgili grupların, birbirleri ile olan bilgi, alış verişini ve anlaşmalarını kolaylaştırmaktır.

Standardizasyon Üreticiye;

- Üretim belirli bir plana göre yapılması,
- Verimliliği arttırması,
- Maliyeti düşürmesi,
- Kayıp oranını en aza indirmesi gibi.

Tüketicieye;

- Bilinçlenme,

- Kalite ve fiyat yönünden kandırılmanın önüne geçilmesi

Ekonomiye ise,

- Kaliteyi teşvik etmesi,
- Kötü malı piyasadan silmesi gibi avantajlar sağlar.

Standardizasyon çalışması sonucu ortaya çıkan belge, doküman veya esere de standart adı verilir. Standardizasyon; bilimsel, teknik ve deneysel araştırmaların kesinleşmiş sonuçlarını esas alır. Yalnız günümüzün şartlarını tespit etmekle yetinmez aynı zamanda geleceğin gelişme imkânlarını da gözönünde bulundurur, gelişmeye ayak uydurur (TSE, URL- 2).

Propolisin kimyasal bileşiminin değişken olduğu ifade edilmiştir. Bu konuda oldukça fazla sayıda yayın olmasına rağmen propolisin kimyasal içeriği tam olarak çözümlenememiştir. Bu nedenle propolisin standardizasyonu genel olarak zor bir işlemdir ve hala çözüm bekleyen ciddi bir sorundur. Bu durum onun farmasotik kullanımını sınırlamaktadır. Bazı bilim çevrelerine göre ise propolis sadece gıda takviyesi olarak kullanılmalıdır (Bankova vd., 2000).



Şekil 3. Farklı kahverengi ve sarı propolis örnekleri

Propolisin standardizasyonunun tarihine kısaca göz atacak olursak; 1970' li yıllarda standardizasyon (propolis kalite parametreleri) iyot testi, sabunlaşma testi, asit sayısı ve potasyum permanganat renk giderim testi gibi testlerle ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu testler ile propolisin kimyasal yapısı ve biyolojik aktivitesi hakkında açıklayıcı bir ilişki yoktur. Daha sonraları, propolisin yapısının toplandığı bölgeye göre farklılık arz etmesine rağmen fenolik bileşenler özellikle flavanoidlerin hemen hemen bütün propolislerde az yada çok bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında propolis ekstraktlarındaki fenolik

bileşenlerin analizi için spektrofotometrik metotlar geliştirilmiştir. Bu metodların en önemli avantajı fenolik bileşenlerin konsantrasyonlarını toplam olarak belirlemeleridir. Ekstrakt içerisindeki biyolojik aktiviteden sorumlu tür ya da türlerin konsantrasyonlarını belirlemek bu metotlar ile mümkün değildir ancak toplam miktarı belirlemek mümkündür.

Günümüzde kromatografik tekniklerin geliştirilmesi ve yaygınlaşması ile propolis ekstraktlarının içerik analizlerinde ve kalite kontrol parametrelerinin belirlenmesinde bu tür tekniklerden yararlanılması da söz konusu olmuştur. HPLC' nin yanı sıra gaz kromatografisi, kapiler elektroforez gibi teknikler de propolis ekstraktlarındaki aktif fenolik bileşenlerin analizi için kullanılan tekniklerdendir.

Kimyasal içerikle birlikte antibakteriyal, antiülser gibi biyolojik aktiviteleri belirlenerek propolis kalitesi hakkında bilgi sahibi olmak yaklaşımının dışında ekstraktların biyokimyasal özellikleri incelenerek de propolisin kalitesi hakkında bilgi sahibi olunabileceği ileri sürülmüştür.

Bazı araştırmacılar bu amaçla propolisin antioksidan özelliğini belirlemek amacıyla indol-asetik asidin peroksidaz enzimi katalizörlüğünde yükseltgenmesi (ekstrakt içerisinde mono ve di fenol varlığına işaret eder) ve ksantin oksidaz varlığındaki oksidasyonu (radikal temizleme aktivitesi) enzimatik testleri kullanmışlardır. Japon bilim adamları propolis ekstraktlarının antiinflamasyon aktivitesini ortaya koymak amacıyla hyaluronidaz enzim aktivitesi testinden yararlanmışlardır. Kaçınılmaz olarak biyokimyasal testler ile propolis ekstraktlarının diğer biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi sahibi olmak mümkün değildir (Bankova vd, 2000).

1990'lı yılların ortalarında propolis standardizasyonu için birkaç test metodunun kombinasyonları kullanılmaya başlandı. Bonvehi vd (1994) tarafından yapılan bir çalışmada Amerika Birleşik Devletleri ve Çin menşeli 15 farklı propolis örneği analiz edildi. Örneklerdeki vaks, reçine, balsam, nem, kül, toplam fenol (spektrofotometrik, kromatografik), steroidler, esansiyel yağlar belirlendiği bildirildi. Aynı zamanda örneklerin antibakteriyal özellikleri de belirlendi. Bonvehi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göstermiştir ki toplam fenol içeriği ile antibakteriyal etki arasında doğrudan bir ilişki yoktur. Zira toplam fenolik madde miktarı anlamlı düzeyde farklı olan örnekler benzer MIC değerlerine sahip olduğu rapor edildi. İlginç olarak bu araştırmalar ilk defa bütün propolis örneklerinde rutin varlığını bildirdiler.

Propolis standardizasyonunda başka bir yaklaşım ise propolis toplandığı floradaki bitkisel kaynakların incelenmesi yaklaşımıdır. Bu yaklaşıma göre propolis toplandığı

bölgenin bitkisel florası arasında bir ilişki olması gerektiği üzerine inşa edilmiştir. Bitkisel floranın salgılarının içeriği bilindiği ölçüde o kaynaktan elde edilen propolisin de benzer bileşime sahip olacağı düşünülmektedir. Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri Tablo 1’ de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri (Groot vd., 2013)

Propolis Türü	Coğrafik Bölge	Bitki Kaynağı	Ana Bileşenleri
Poplar (Kavak)	Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın bazı Bölgeleri, Yeni Zelanda, Çin	Populus Türleri özellikle Aigeiros Türü ve sıklıkla P. nigra L.	Flavonlar ve flavanonlar (pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin-3-O-asetat, chrysin, galangin, sinnamik asitler, özellikle kafeik asit ve kafeik asitin benzil-, feniletıl-, ve prenil esterleri
Yeşil Birazilya Propolisi (alecrim)	Brazilya	Brazil Baccharis Türleri predominantly B. dracunculifolia DC	Prenil p-kumarik asitler, diterpenik asitler, prenil asetofenonlar
Huş Ağacı Propolisi	Rusya	Betula verrucosa Ehrh	Poplar tipte aynı olmayan flavonlar ve flavanonlar (akasetin, apigenin, ermanin, rhamnositrin, kaempferid, α -asetoksibetulenol)
Kırmızı Propolis	Küba, Brazilya, Meksika	D. ecastophyllum Ve diğer Dalbergia türleri	İzoflavonoidler (terokarpans, izoflavanlar)
Akdeniz Bölgesi Propolisi	Sicilya, Yunanistan, Girit, Malta	Cupressaceae (türler belirlenemedi muhtemelen C. sempervirens) ve Pinaceae	Diterpenler (çoğunlukla labdane tipi), antrakınonlar
Clusia Propolisi	Küba, Venezuela	Clusia türleri içeren C. major, C. minor	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik Propolisi	Pasifik (Okinava, Tayvan, Endonezya)	Macaranga tanarius	C- prenil- flavanonlar

Propolisin kompozisyonunun sürekli değişmesi farmakolojik uygulamarda sorun oluşturmaktadır. Propolisin içeriği arıların resin toplayacağı bitkisel flora ya bağlıdır. Arıların hemen hemen her ekosistemde yaşayabileceği dikkate alındığında, propolisin kimyasal bileşiminin değişmez olmaktan çok uzakta olduğu için kimyasal açıdan evrensel propolis standardı oluşturmak mümkün değildir. Buna rağmen belirli bir alan için o

alandaki arılar benzer bitki kaynakları kullandıklarından propolisin spesifik kimyasal tiplerinin standardizasyonu için bu durum iyi bir temel teşkil eder (Popova vd., 2017).



Şekil 4. Brazilya Yeşili ve Kırmızı propolis örnekleri

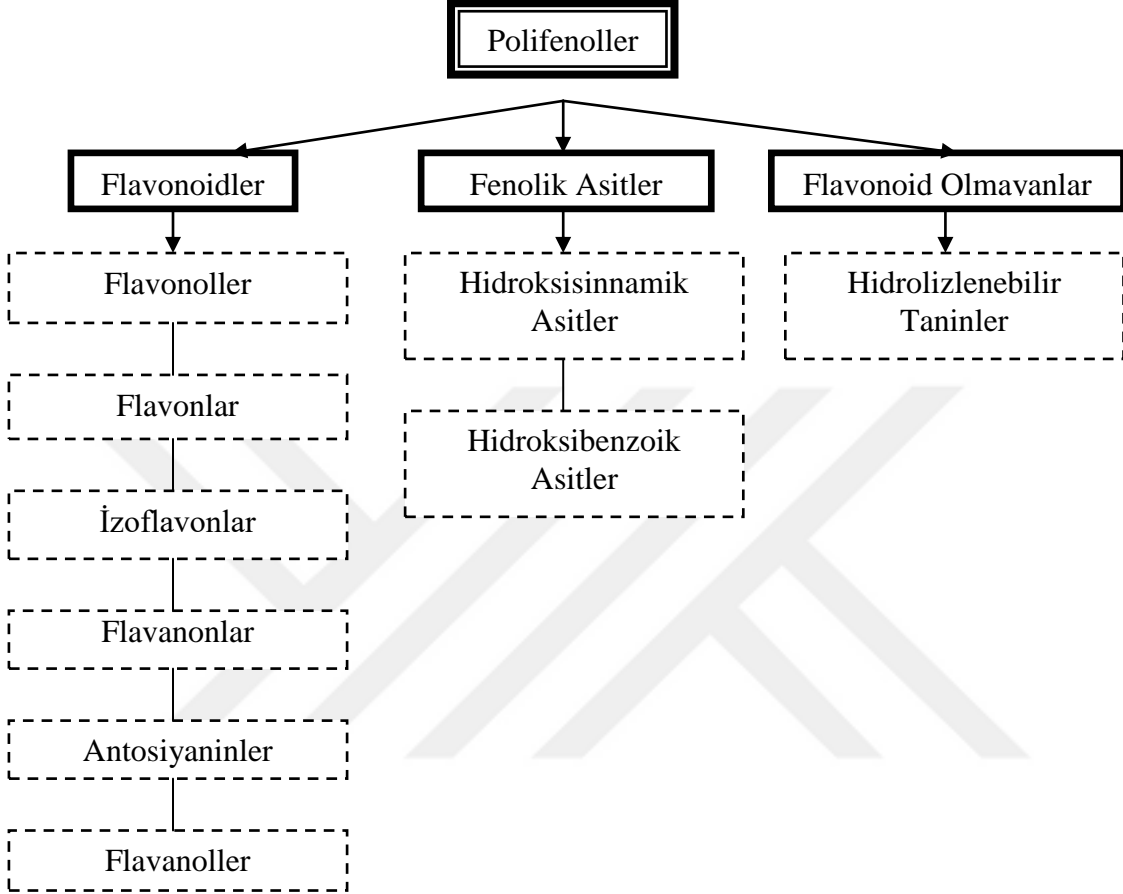
Ekstraktarı (yüksek oranda) veya farklı formları hazırlanarak tüketilmesi gereken propolisin tüketime hazır hale getirilmesi kişiden kişiye ve firmadan firmaya farklılık göstermektedir. Bu durum tüketici ve ekonomi açısından sıkıntıların doğmasına neden olmaktadır. Merdivenaltı üretim yapılması sebebiyle haksız kazanç sağlanmakta ve kalitesi düşük, içerisinde propolis olup olmadığı belli olmayan ürünler piyasaya sunulmaktadır. Bu durumun önüne geçilebilmesi için ivedikle propolis ekstraktlarının hazırlanışı ve ekstraktların kompozisyonunun belirli bir standardının oluşturulması gerekmektedir.

1.4. Polifenoller Ailesi

Bütün bitki metabolizmalarında, bitkinin çevresel stres koşullarına (UV radyasyon, patojenler vb) karşı savunma mekanizmasının sonucunda oluşturduğu sekonder metabolitler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunmaktadır. En küçük molekül yapısına sahip fenolik bileşik, bir tane -OH grubu içeren benzen halkası, yani fenoldür. Şekil 5'te farklı fonksiyonel gruba sahip çeşitli fenolik bileşenler belirtilmiştir.

Polifenoller fenolik asitler (hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler), flavanoidler (flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyaninler ve flavanoller)

ve flavanoid olmayanlar (hidrolizlenebilir tanenler) olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Balasundram vd., 2006).

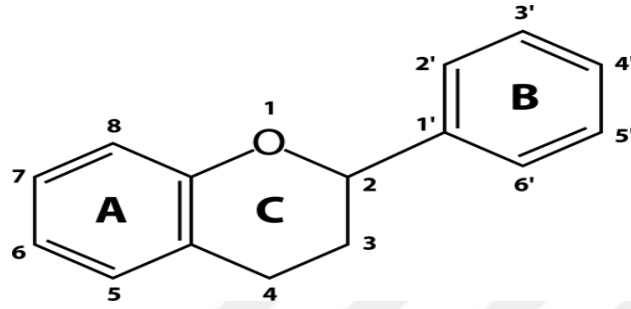


Şekil 5. Fenolik bileşenlerin sınıflandırılması

Fenolik asitler; hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitleri içeren bir grup oluştururlar. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısındadır ve bitkisel gıdalarda az miktarda bulunurlar. Gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, m-OH benzoik asit hidroksibenzoik asit sınıfı üyelerini oluşturmaktadır. Hidroksisinnamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar(Balasundram vd., 2006). Fenilpropan halkasına bağlanan OH-grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir.

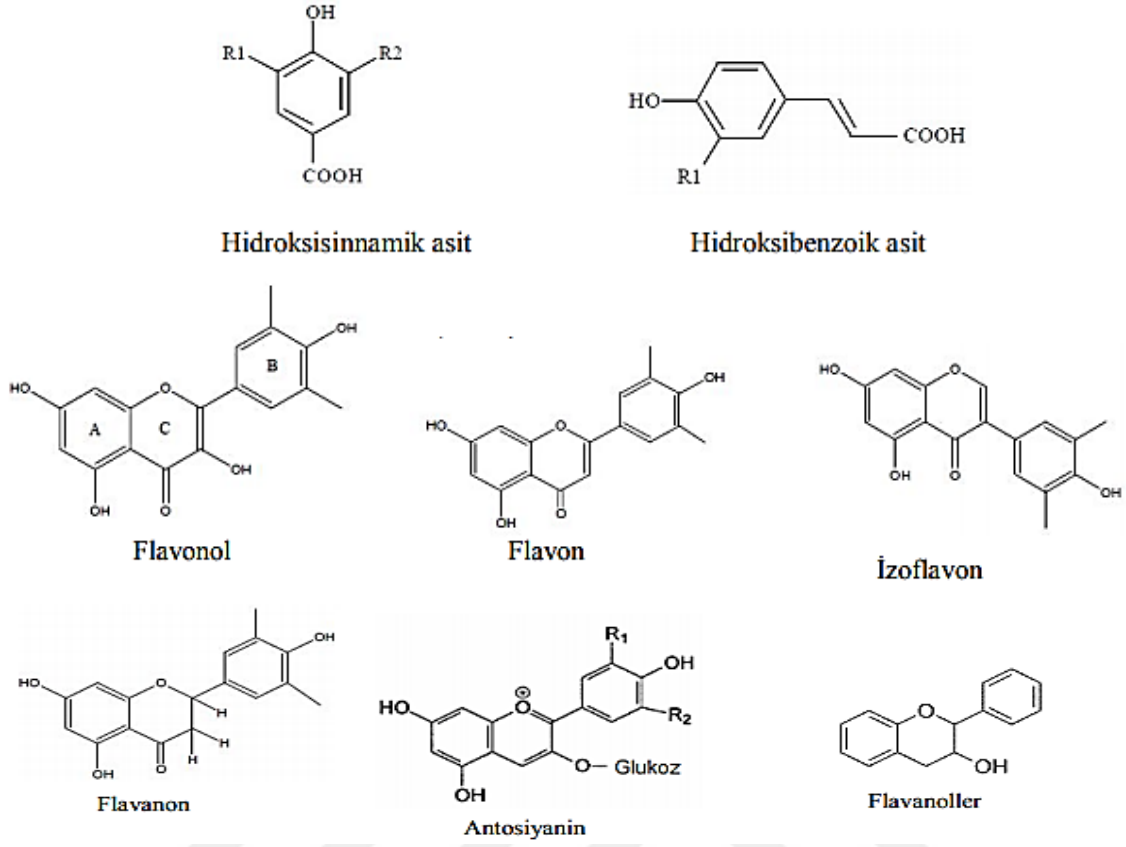
Propolisin yapısındaki flavanoidlerin propolisin kalitesini belirlemede önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Talla vd., 2014).

Flavanoidler polifenollerin en geniş sınıfını oluşturmaktadır., İki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) flavanoidlerin ana karbon iskeletini oluşturmaktadır. Şekil 6'da flavanoidlerin temel iskelet yapısı sunulmuştur.



Şekil 6. Flavanoidlerin temel iskelet yapısı

Fonksiyonel gruplar ve yapılarında bulunan –OH grupları flavanoidlerin farklı özellikler sergilemelerine neden olmaktadır. Şekil 7'de farklı flavanoidleri (flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyaninler ve flavanoller) birbirinden ayıran özellikler gösterilmiştir (Hollman vd., 1999). Bu durum bitkinin büyüme ve gelişmesini etkilediği gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluşturur (Hollman vd., 1999). Ayrıca flavanoidlerin farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen özellikleri olduğu da bilinmektedir (Hollman vd., 1999; Balasundram vd., 2006).



Şekil 7. Farklı fonksiyonel gruplara sahip olan flavanoidler

Bazı fenolik bileşenler, kaynakları ve özellikleri Tablo 2 de belirtilmiştir.

Tablo 2. Bazı fenolik bileşenler ve özellikleri (Munin ve Edwards-Lévy, 2011)

	Karbon İskeleti	Örnekler	Kaynağı	Özellikleri	Ana Biyolojik Özellikleri
Fenolik Asit ve Kumarinler					
Hidroksibenzoik Asitler	C6-C1	Gallik asit, vanilik asit, protokatekik asit, p-hidroksibenzoik asit	Çay, kırmızı meyveler	Tek veya kombine halleri çok yaygın olarak bulunur, sıcaklığa, oksidasyona, ışığa, pH' a karşı duyarlıdır ve suda çözünürler	Terapötik, antimikrobiyal aktivite, fungus toksitide ve antiinflamator özellikleri sınırlıdır
Hidroksisinnamik Asitler	C6-C3	Kafeik asit, p-kumarik asit, sinapik asit, ferulik asit	Meyveler (yaban mersini, elma) Tahıl taneleri (prince, yulaf unu, buğday)	Serbest halde nadiren bulunur, sıklıkla ester hali bulunur, oksidasyona ve pH'ya duyarlıdır ve suda az çözünür	
Kumarinler		Ombelliferon, Aesculetin, skopoletin	Tonka fasülyesi, kestane, tıbbi bitkiler	Serbest kumarinler alkolde ve organik çözücülerde çözünür, heterosidik türleri suda daha az çözünür	Antiinflamatuvar ve antiviral özellikleri vardır, hepatotoksitite gibi sınırlı farmakolojik uygulamaları bulunmaktadır
Stilbenler	C6-C2-C6	Resveratrol	Tıbbi bitkiler (asma)	İnsan diyetinde az miktarda bulunur	Antikarsinogenik ve antiinflamatuvar özellikleri vardır
Flavanoidler	C6-C3-C6				
Flavonoller		Mirisetin, kuersetin, kaempferol ve onların glikosillenmiş türleri	Meyve ve sebzeler (Soğan, brokoli) kırmızı şarap ve çay	Gıdalarda en çok bulunan türdür	Vitamin P faktörü koruyucu kılcal damarlar ve damarlar
Flavanlar		Aspigenin, luteolin, tangeretin, nobiletin, sinensetin	Maydanoz, kereviz, tahıllar (buğday) Narenciye kabuğu	Meyve sebzelerde bulunur ve flavonollerden daha az yaygındırlar	antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral Anti-spazmodik, antibakteriyel, antioksidan ve antikanserojen özellikleri,
Flavanonlar		Hesperetin, naringenin, eriodiktyol	Narenciye (greyfruit, turuncu, limon), domates ve bazı aromatik bitkiler (nane)	Oksidasyona duyarlı, acı tad	hepatoprotector, bazıları güçlü enzimatik inhibitörler

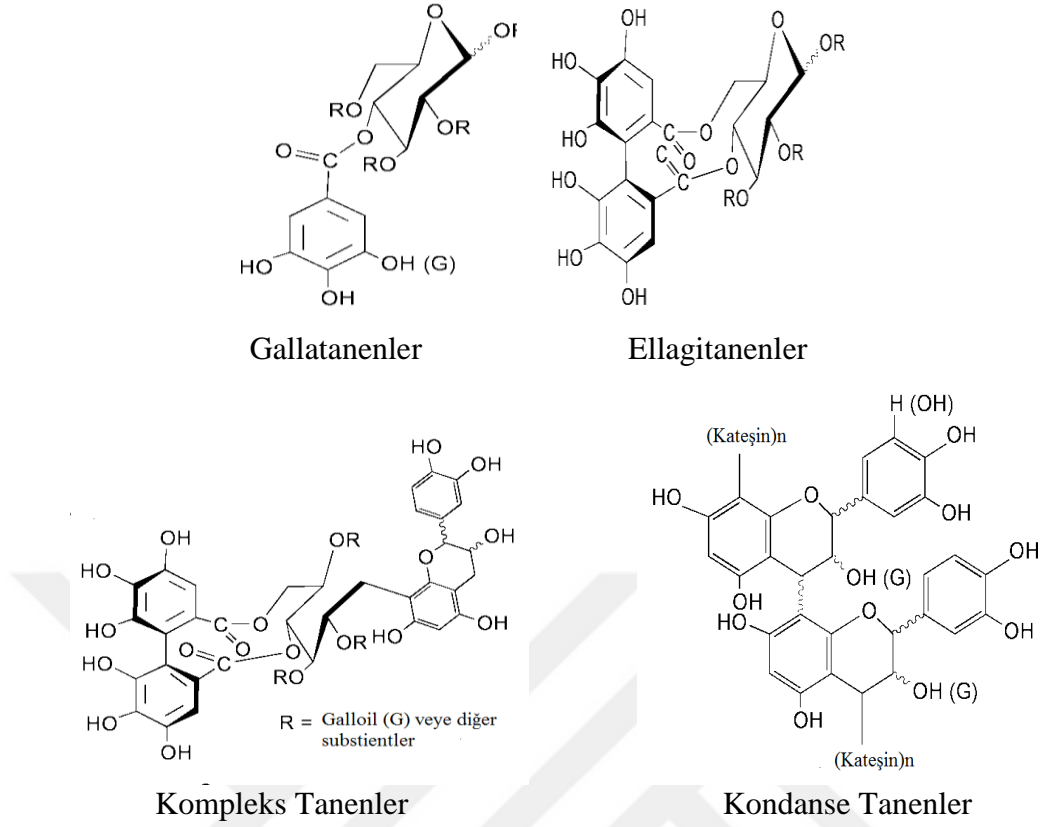
Tablo 2'nin devamı

Isoflavanlar		Genistein, daidzein, glisitein	Baklagiller, soya ve işlenmiş türleri	Östrogen ve pseudohormonal ile benzer özellikler	
Flavanoller					
Monomer Halleri		Kateşin, epikateşin	Meyve (kayısı, kiraz, üzüm, şeftali, elma), yeşil ve siyah çay, kırmızı şarap ve elma şarabı	Oksidasyona duyarlı, ışık ve pH, sıkışan ve acı tad, biraz suda çözünür	Vitamin P faktörü koruyucu kılcal damarlar ve damarlar antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral Anti-spazmodik, antibakteriyel, antioksidan ve antikanserojen özellikleri, hepatoprotector, bazıları güçlü enzimatik inhibitörler
Polimer Halleri Protoantosiyanidinler	(C15)n	Kastalin, veskalin	Meyve (üzüm, şeftali, kakis, elma, çilek), içecekler (şarap, elma şarabı, çay, bira), çikolata	Acı tat yüksek sıcaklık ve oksidasyon, su ve alkolde çözünür	
Antosiyaninler		Siyanidin, pelargonidin, delphinidin, petunidin	Kırmızı şarap, bazı tahıl çeşitleri, bazı yapraklı ve köklü sebzeler (Patlıcan, lahana, fasulye, soğan, turp) çiçekler ve çoğu meyve bol bulunur	Bitki pigmentleri, sıcaklık, oksidasyon, pH ve ışığa karşı duyarlı, suda çözünür	
Lignanlar	(C6-C3) ₂	Pinoresinol, podofilotoksin, steganasin	Keten tohumu, susam tohum, tahıllar (çavdar, buğday, yulaf, arpa), turpgillerden sebzeler (brokoli, lahana), ve meyve (kayısı, çilek)	Büyük sınıflardan biridir, östrojenler, suda çözünür, tatsız, lezzetsiz	Hepatoprotector, antimitotik, antiviral antihipertansif ve sitostatik faaliyetler, inhibitörleri enzimatik reaksiyonları

1.5. Tanenler

Tanenler, polifenol yapısında ikincil metabolitlerden olup yüksek yapılı bitkilerin pek çoğunda bulunmaktadır. Bitkilerin kabuk, kök, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunabilen tanenler buruk tatta ve karakteristik bir kokuya sahip bileşiklerdir. Tanenler ilaç ve gıda sektöründe oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Tanen içeren ekstraktların; antiseptik, antiinflamatuar, antitumoral özellikleri olduğu belirtilmiştir (Ergezer vd, 2008).

Tanenler; ellagitanenler, gallotanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenler olmak üzere dört sınıfa ayrılırlar (Mayworm vd., 2014; Khanbabaee vd., 2001). Galloil üniteleri veya bunların *meta*-depsidik türevlerinin çeşitli şeker, kateşin veya triterpenoid ünitelerine bağlanmasıyla oluşan tanenler gallotanenler olarak adlandırılır (Khanbabaee vd., 2001). En az iki galloil ünitesinin birbirine C-C bağı ile bağlanması ve glikozidik bağ ile bağlanmış kateşin ünitesi içermemesi sonucu oluşan tanenler ellagitanenler olarak adlandırılır. Kompleks tanenler; gallotanenler veya ellagitanenlere kateşin birimlerinin glikozidik bağla bağlandığı tanenlerdir. Kateşin birimlerinin 4., 6. veya 8. karbonlar üzerinden birbirine bağlanmasıyla oluşan oligomerik veya polimerik proantosiyanidinler kondanse tanenler olarak adlandırılır (Khanbabaee vd., 2001; Karaoğul vd., 2017). Şekil 8' de tanenlerin sınıflarına ait moleküler yapılar gösterilmiştir.



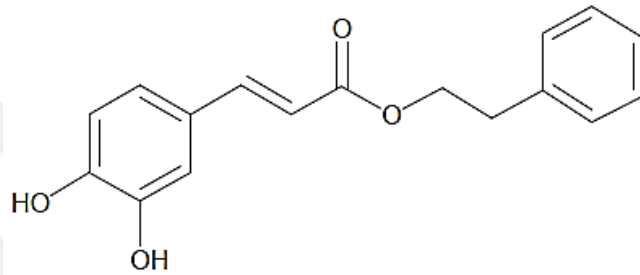
Şekil 8. Tanen sınıfları

Kondanse tanenler (proantosiyanidinler) bir grup polihidroksi flavan-3-ol (kateşin) oligomeri veya polimeri ile flavanol alt birimleri arasında C-C bağlarının oluşması ile meydana gelmektedir (Pell vd., 2001; Khanbabaee vd., 2001). Protoantosiyanidlerin biyolojik önemi olan moleküller ile etkileşimi beslenme açısından ve fizyolojik açıdan öneme sahiptir. Kondanse tanenlerin yapısında yer alan çoklu hidroksil grupları proteinlerle, polisakkaritlerle, metallerle ve diğer makro moleküller ile kompleks oluşturma eğilimindedir (Khanbabaee vd., 2001).

1.6. Kafeik Asit fenil Ester (CAPE)

Kafeik asit fenil ester (CAPE) propolis yapısında bulunan önemli aktif bileşenlerden bir tanesidir. CAPE'nin membranları rahatlıkla geçmesine fırsat verecek fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubu (-OH) moleküle kuvvetli antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuar özellikler kazandırmaktadır. Yapılan literatur araştırmaları sonucu CAPE üzerine yapılan ilk çalışmaların daha çok

tümör hücreleri üzerine olan sitotoksosite, transformasyon, ekspresyon ile apoptozis üzerine olan etkileri ve NF-kappaB (nükleer faktör kappa B) üzerinden etkinlik gösterdiği tahmin edilen enflamasyon çalışmaları üzerine olduğu görülmüştür (Stojko vd., 2015; Chang vd., 2017; Huang vd., 2013; Omene vd., 2014). Daha sonra ise hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmalarında CAPE'nin antioksidan etkileri başta olmak üzere bütün etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Kimyasal ekstraksiyon yöntemleri ile izole edildikten sonra ilgili çalışmalarda kullanılan CAPE tespit edilen birçok özelliğinden dolayı ticari olarak da piyasaya sürülmektedir.



Şekil 9. Kafeik asit fenil ester yapısı

Kafeik asit fenil esterinin çözünürlüğü etil asetat, dimetilsülfoksit (DMSO) ve alkolde yüksektir. Etil alkolde çözünürlüğü yüksek olan propolis için CAPE farklı bileşiklerin yanı sıra bir propolis belirteci olarak kullanılabilir. Yapılan literatür araştırmaları birçok propolis örneğinde CAPE'nin bulunduğu ve CAPE'nin major bileşen olduğu vurgulanmıştır (Abdel-Naim vd., 2013; Maruta vd., 2008; Omene vd., 2012). Bobiş vd. (2014) CAPE miktarının kafeik asit ve krisin ile orantılı olduğunu belirtmiştir.

1.7. Vakırlar

Mumlar genellikle bitki ve hayvan doku yüzeyinde bulunan, uzun karbon zincirli apolar bileşik karışımlarını ifade eder. Arılar mumları petek yapımında kullanırlar. Bal mumu arıların sahip olduğu özel keselerde üretilir. Dört çift salgı bezinden sıvı halde üretimi yapılan bal mumu ayaklar ve ağız vasıtasıyla istenilen bölgeye iletilerek petek yapımı sağlanır.



Şekil 10. (a) Arının mum salgılayışı (b) Mum kristalleri

Bal mumu alkanlar, alkenler, alkadienler, monoesterler, diesterler, aromatik esterler, ketonlar ve yağ asitleri açısından oldukça zengindirler (Whitehouse vd., 2005). Bal mumu içeriği Tablo3'te (Bogdanov, 2016) gösterilmiştir. Propoliste var olan mumların çoğu bal mumundan az bir kısmı ise bitkilerden kaynaklanmaktadır.

Tablo 3. Bal mumu içeriği

Bileşen	% Miktar
Monoesterler	35
Diesterler	14
Triesterler	3
Hidroksi monoesterler	4
Hidroksi poliesterler	8
Asit esterler	1
Asit poliesterler	2
Hidrokarbonlar	14
Serbest asitler	12
Alkoller	1
Diğerleri	6

Literatürde; Propolisin vaks bileşiminin nelerden oluştuğuna dair bilginin çok az miktarda olduğu beyan edilmektedir (Salatino, vd., 2003). Propolis vaksında alkanlar, alkenler, alkadienler, yağ asitleri, mono ester, diester, aromatik ester ve ketonlar bulunmaktadır. Her numunenin vaks bileşenlerinin arı ırkına bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir (Salatino vd., 2000; Custodio 2003).

1.8. Balsam Miktarı

Gliserol, polietilen glikol, DMSO gibi farklı çözücüler kullanılarak propolis ekstraktları hazırlanmaktadır. Fakat propolis en iyi %70' lik etanolde çözünmektedir. Ham propolisin % kaçının alkolde çözündüğü ve alkolik faza geçtiğini balsam miktarı tayin edilerek belirlenmektedir (Bankova 2017). Balsam miktarı propolis için karakteristik bir özelliktir. Yüksek balsam miktarı düşük oranda bal mumu miktarı ve çözünmez madde miktarını ifade etmektedir. Yüksek balsamlı propolis yüksek oranda biyoaktif bileşen miktarını da ifade etmektedir. Yapılan araştırmalar propolis balsam miktarının elde edildiği bölgeye, mevsime, arı ırkına göre değiştiği gösterilmekle birlikte bu miktarın% 40-60 arasında değiştiği belirtilmektedir (Bankova, 2017; Bankova vd., 2000).

1.9. Briks Değeri

Bir çözücüde (genellikle su) çözünen kuru madde miktarı Briks değeri olarak adlandırılır. Briks değeri kırılma indisinin ölçülmesiyle hesaplanır. Bir çözeltinin içerisinde çözülmüş olan madde miktarının yüzdesi bilinmiyorsa reflaktometre kullanılarak maddenin kırılma indisi değerini bulunur ve madde miktarı tespit edilir. Kırılma indisi maddenin fiziksel özelliklerinden birisidir ve her maddenin kendine özgü bir kırılma indisi vardır. Işığın farklı ortamlara geçerken yön değiştirmesine kırılma, ışığın boşluktaki hızının madde içerisindeki hızına oranına da kırılma indisi denilmektedir. Refraktometreler, katı ve sıvı saydam ortamların kırılma indislerini ölçen cihazlardır. Sıvı malzemelerin içindeki katı madde miktarını ve kırılma indislerini ölçmeye yarar (MEB, 2012).

1.10. Kromatografi

Kelime anlamı renk olan kromatografi ilk 1903 yılında uygulamalı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit faz diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adıdır (Skoog vd., 1998). Bu bileşenlerden sabit faz bir kolon içersine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir

katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir (Thammana., 2016). Kromatografik metodların temeli numune içerisindeki maddelerin sabit ve hareketli faza etkileşimi sonucu ayrışmasıdır. Bu ayrışmanın nedeni, maddelerin içinde bulunan bileşenlerinin hareketli veya sabit faz olan farklı ilgileridir. Numune içindeki farklı bileşenler sabit fazdaki dolgu maddesi ile etkileşim sonucunda değişik hızlarda hareketliliği sonunda numunenin bileşenleri kalitatif veya kantitatif olarak ayırt edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998; Thammana., 2016). Kromatografi hareketli fazın özelliğine bağlı olarak değişim göstermektedir. Bunlar; eğer hareketli faz sıvı ise, sıvı kromatografisi (LC), hareketli faz gaz ise, gaz kromatografisi (GC) ve kritik sıcaklığın üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılıp, basınç ile gerçekleştirilen kromatografiye ise süper-kritik akışkan kromatografisi (SFC) denir (Skoog vd., 1998).

Kromatografik yöntemler ayırma mekanizmalarına göre

- İyon değişimi kromatografisi (Molekülün yüküne bağlıdır),
- Adsorpsiyon kromatografisi (Moleküller ile sabit faz arasındaki etkileşimlere bağlıdır),
- Jel filtrasyon kromatografisi (Molekülün boyutuna bağlıdır),
- Partisyon kromatografisi (İki faz arasındaki dağılım farkından yararlanır)
- Afinite kromatografisi (Özel liganlar kullanılır) olarak sınıflandırılır.

1.10.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

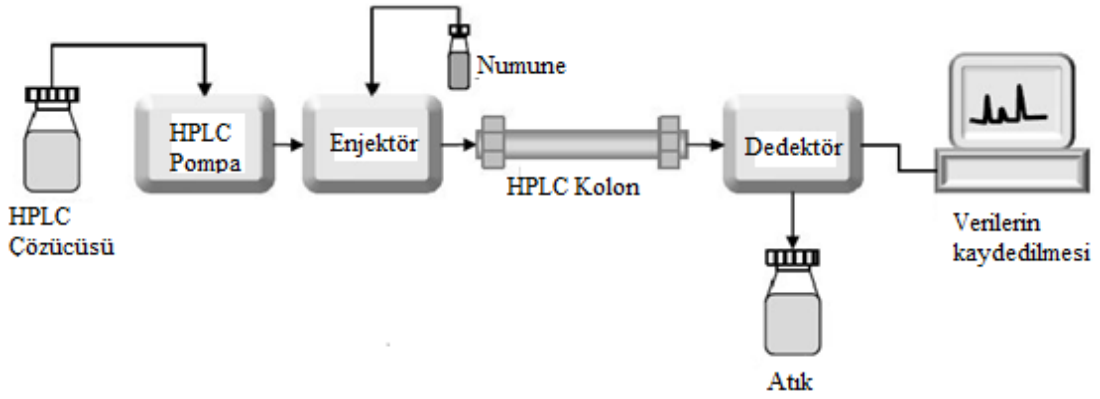
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel alanlarda organik ve anorganik bileşiklerin ayrılması ve belirlenmesi için uygulanan bir tekniktir (Thammana 2016). Ayrımı gerçekleştirilecek olan bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girdiğinden kolon içinde farklı hızlarda ilerler ve bu nedenle kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Bu durumun sonucu olarak da birbirlerinden ayrılmış olurlar. HPLC cihazı; bir mobil faz rezervuarı, pompa, enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), ayırım için ugun dedektör, kolon fırını ve kaydediciden (bilgisayar) oluşmaktadır.

Tayini yapılacak numune HPLC cihazına numune enjeksiyon sisteminden verilir. HPLC cihazları manuel veya oto-enjektörler kullanılarak numunenin sisteme verilmesine

müsaade eder. Manuel olan bir sistemde örnek enjeksiyonunun kolayca yapılabilmesi ve çözücü akışın hızının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir valfe gönderilir. Bu valf yardımıyla örneğin bulunduğu hareketli fazın kolana doğru taşınması sağlanır (Gupta 2014; Can 2015).

HPLC ile numune bileşenlerinin özelliklerine göre ayrımı farklı kromatografik teknikler kullanılarak yapılabilmektedir (Gupta 2014). Fakat genellikle numunelerin dağılma tipi dikkate alınmaktadır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazın bağlı polarlığına dayalı olarak iki temel forma ayrılır (Skoog 1998). Normal faz sıvı kromatografisinde maddeler polar kolonda adsorpsiyon prensibiyle ayrılacaksa, sabit faz olarak genellikle polar katılardan oluşurken, hareketli faz çözücüleri apolar veya çok az polar sıvılar olmaktadır (hekzan, pentan, kloroform, ksilen vb. ya da bunların karışımları). Analitin tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografisi en yaygın kullanılan sıvı kromatografisidir. Burada sabit faz apolar iken hareketli faz polardır. Analitler yüzeye apolar fonksiyon gösteren gruplarıyla bağlanırlar. En polar analit kolonu ilk önce terk eder. Ters faz kromatografisi orta- yüksek polarlılığa sahip olan analitlerin ayrımı için oldukça uygundur. Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilmiş olup, silika jelde modifiye olan oktil (C8) ve oktadesil (C18) en çok kullanılan fazlardır. Maddeler polaritelerine göre ters faz ve normal faz sıvı kromatografisinde bileşenlerine ayrılarak kolondan alıkonulur ve hareketli fazın polaritesine yakın olan bileşenler kolonundan ilk önce çıkar (Gupta vd., 2014; Can vd., 2015; Skoog, 1998).

Kolonda birbirinden ayrılan maddelerin bileşenlerinden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan üniteler HPLC dedektörü olarak adlandırılır ve kolondan sonrasına monte edilir. Uygulanmaya başlandığı günden bu yana HPLC sistemlerinde çok sayıda farklı ölçüm ilkelerine dayanan dedektörler geliştirilmiştir. Fakat bunlardan UV dedektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresi yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 2014; Can vd., 2015; Bhardwaj vd., 2015). Şekil 11'de HPLC cihazı şematize edilmiştir.



Şekil 11. Şematize HPLC cihazı

1.10.2. Ultraviyole (UV) Dedektör

HPLC sistemlerinde; geniş konsantrasyon aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, yüksek seçiciliğe sahip ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı dedektörlerin kullanılması tercih edilmektedir. Böyle bir dedektör analiz yapılacak numunenin cinsine uygun olmasının yanında sıcaklık ve basınçtaki değişimlerde duyarsız olmalıdır. Bu özelliklere sahip olan ve sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan dedektörlerden biri ultraviyole dedektörüdür.

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190- 800 nm aralığında ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltilerden sürekli olarak ışın demeti geçerken analitler tarafından ışığın bir kısmı adsorbe edilebilir. Böylece analiz edilmek istenen bileşiğin kalitatif veya kantitatif tayini yapılmış olur (Bhardwaj vd., 2015). Lambert-Beer kanununun temel alındığı sistemde zamana karşı absorbans değerleri elde edilir. UV dedektörler genellikle tek veya en fazla iki dalga boyunda eş zamanlı ölçüm yapabilmektedir. Diğer dedektörlerin sahip oldukları uygulanabilirlik kısıtlamaları nedeniyle LC sistemlere duyarlı UV dedektörlerin, hem organik hem de inorganik sistemlere uygun, 10^{-4} - 10^{-5} M aralığında duyarlılık değerine sahip olmasından dolayı çalışmalarda en yaygın kullanılan dedektörler olduğu bilinmektedir (Bhardwaj vd., 2015).

1.11. Enkapsülasyon

Katı, sıvı ve gaz halinde bulunan materyallerin tüm özelliklerini koruyarak belirli koşullar altında kapsüller içerisine alınması ve kapsüllenen materyallerin kontrollü salınımının yapılmasının sağlanması enkapsülasyon teknikleri ile sağlanmaktadır (Nedovic vd., 2011; Navarro vd., 2008). Kaplanan materyal öz olarak adlandırılırken kaplamada kullanılan materyal ise taşıyıcı, kabuk veya enkapsülant olarak adlandırılmaktadır (Gharsallaoui, vd. 2007).

Enkapsülasyon ile elde edilen kapsüllerin boyutuna göre isimlendirilmektedir. Elde edilen kapsüllerin boyutu 200 nm (0,2 µm) ve altında ise nanoenkapsülasyon, 0,2-5000 µm arasında ise mikroenkapsülasyon ve kapsül boyutu 5000 µm' dan büyük ise makroenkapsülasyon olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen kapsüller farklı yapı ve morfolojiye sahip olabilir. Bu farklılık kullanılan yöntem, kullanılan kaplama materyaline ve enkapsüle edilen materyale göre değişiklik göstermektedir.

Enkapsülasyon tekniği kullanılarak bir sistem içerisinde bulunan materyalin o sistem ile ilişkisinin sınırlanması sağlanabilir. Elde edilen kapsüller sayesinde materyelin sistem içerisinden ayrılması kolaylaşmaktadır. Ayrıca enkapsülasyon ile depolama veya üretim esnasında meydana gelen fonksiyonellik kaybı, kötü aroma, koku oluşumu, yapı bozulması, aktivite kaybı azaltılabilir veya engellenebilirken; nem kontrolü, oksidasyona karşı koruma, aktif indirgenlerin korunması sağlanır ve biyoyararlılık artırılır (Carvajal vd 2010). Gıda, kimya, ziraat, tıp, eczacılık, veterinerlik ve biyoteknoloji gibi birçok alanda enkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır (Li vd, 2012). Bu teknikler gıda katkılarında oldukça yaygın olarak kullanılır. Vitaminler, mineraller, enzimler, proteinler, organik asitler, probiyotikler ve prebiyotikler, esansiyel yağlar, tatlandırıcılar, koruyucular, renklendiriciler, aromalar, yağ asitleri (ω -3, konjuge linoleik asit), karotenoidler (β -karoten, likopen) ve antioksidanlar (tokoferol, flavonoidler, polifenoller) enkapsülasyon çalışmalarında kullanılan materyallere örnek olarak verilebilir.

1.12. Enkapsülant Seçimi

Enkapsülasyon işlemindeki en önemli basamak uygun kaplama materyalinin (kapsül) seçilmesidir. Kaplama materyallerin seçimi kapsülün boyutu, şekli, stabilite ve geçirgenlik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Kullanılan kapsüllerin genel olarak

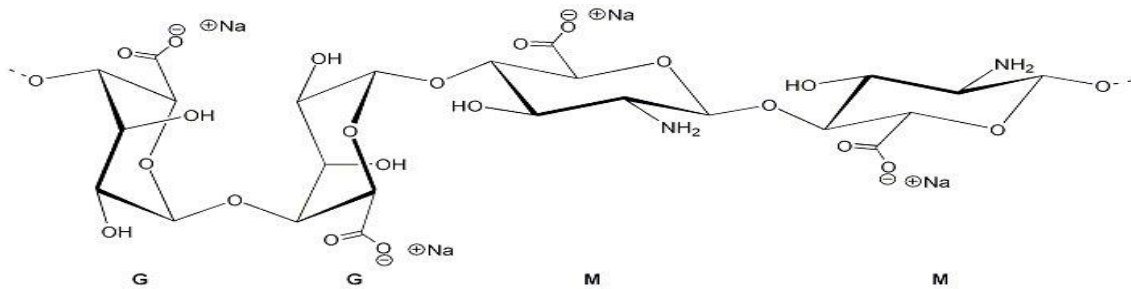
stabilitelerinin yüksek, geçirgenliklerinin uygun, boyutlarının istenilen düzeyde ve ortamla uyumunun yüksek olması istenmektedir. İdeal bir kaplama materyali toksik olmamalı, kolay uygulanabilmeli, tam koruma sağlamalıdır. Kapsüllerin yapıldığı destek materyal bir karışımdan oluşabileceği gibi tek bir maddeden de oluşabilir. Kaplama materyalleri olarak gamlar, proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, yağlar veya sentetik polimerler, jelâtin, pektin, nişasta, peyniraltı suyu gibi maddeler kullanılabilir (Gaserod vd., 1998).

Enkapsülasyon materyalinin sahip olması gereken özellikler;

- İstenilen miktardaki fonksiyonel ajanı etkili bir şekilde kapsülleyebilmeli,
- Kapsülleme sonrası raf ömrü uzun olmalı,
- Kontrollü salınım yapılabilmesi,
- Kapsülleme sonrası materyalin aromasında, tadında ve görüntüsünde bozukluk yaratmamalı,
- Üretimden depolamaya her aşamada çevresel etkilere karşı dirençli olmalı,
- Maliyeti düşük olmalı,
- Enkapsülenen materyalin biyoyararlılığını bozucu yönde etki etmemeli (Edwards-Lévy, vd., 2011).

olarak sıralanabilir.

Alginat, kahverengi su yosunlarının hücre duvarlarında ve hücreler arası boşluklarında bulunan, β -(1-4) bağlı D-mannuronik asit (M) ve α -(1-4) bağlı L-gluronic asit (G) birimlerinden oluşan bir lineer heteropolisakkarittir (Onsquen vd 1992 ve Mortazavian vd, 2007; Gaserod vd., 1998). Kalsiyum aljinat, kolayca jel matriksi oluşturması, insan vücudu için toksik olmaması, ucuz olması ve enkapsülasyon işleminin ılımlı proses koşullarında gerçekleştirilmesi, kolayca hazırlanması ve barsakta çözünerek kapsüllenen ajanı serbest bırakabilmesi nedenleriyle enkapsülasyon işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Mortazavian vd.,2007; Bhat vd., 2007).



Şekil 12. Sodyum alginatın yapısı

1.13. Enkapsülasyon Yöntemleri

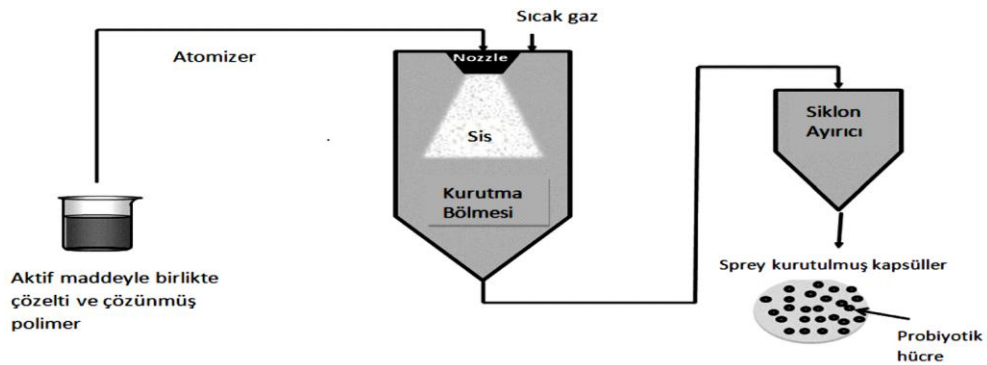
Günümüzde çeşitli enkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikleri kabaca üç sınıfta birleştirmek mümkündür.

1. Fiziksel Yöntemler: Püskürtmeli kurutma, püskürtmeli soğutma, ekstrüzyon ve akışkan yataklı kaplama
2. Fizikokimyasal Yöntemler: Lipozomların kullanılması ve koaservasyon
3. Kimyasal Yöntemler: Moleküler inklüzyon ve ara yüz polimerizasyonu (Park vd., 2005; Poshadri vd., 2010).

Son yıllarda yaygın olarak kullanılan enkapsülasyon yöntemleri aşağıda belirtilmiştir.

1.13.1. Püskürtmeli Kurutma Yöntemi

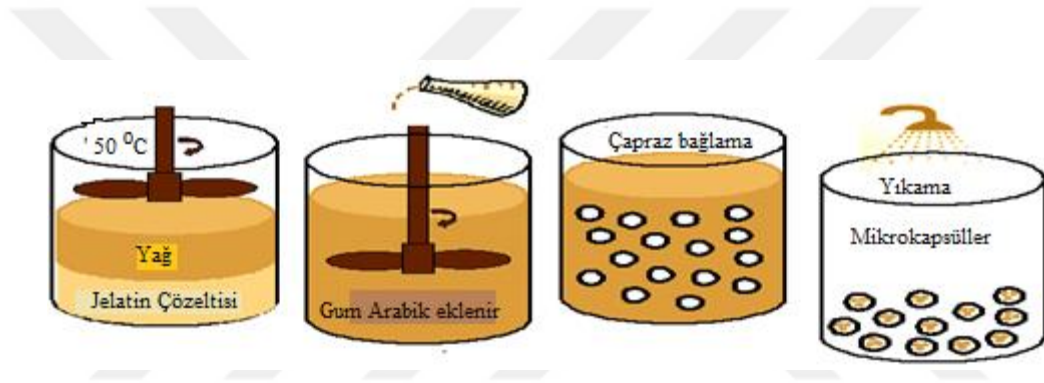
Enkapsülasyon teknolojisinde geleneksel olarak kullanılan yöntem püskürtmeli kurutma metodudur. Bu metot ekonomik, kolay kullanımı ve kapsülasyon sonunda ideal partiküller elde edilmesi gibi avantajları nedeniyle gıda sanayisinde kullanılmaktadır. Kaplanacak materyal taşıyıcı sistem ile homojenize edilir ve püskürtmeli kurutucuya verilir. Atomize döner başlığı sıcak hava ile temas ettiğinde su buharlaşırken, kapsüller kurutulur. Yöntem Şekil 13 şematize edilmiştir (Gharsallaoui, vd. 2007). Bu yöntemin dezavantajları ise kullanılan suda çözünebilir kaplama malzemesi çeşitliliğinin kısıtlı olması, ayrıca ısıya duyarlı biyoaktif maddelerin yüksek sıcaklıkta kolaylıkla bozulmasına sebep olmasıdır (Peanparkdee vd., 2016; Gouin, 2004).



Şekil 13. Şematize püskürterek kurutma yöntemi

1.13.2. Koaservasyon Yöntemi

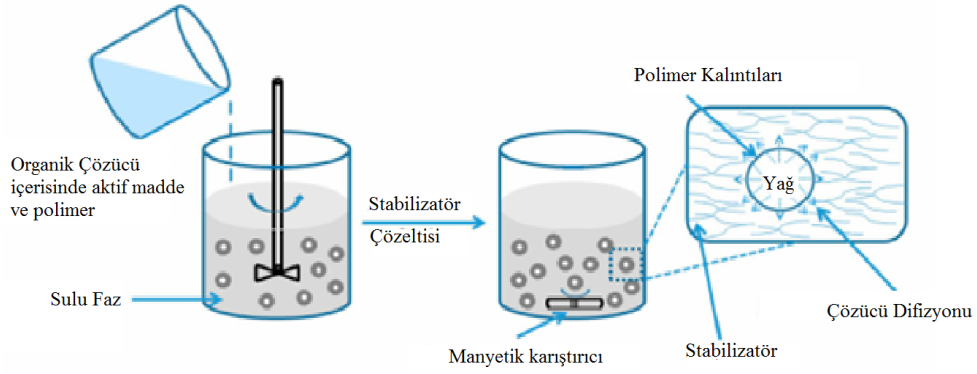
Koaservasyon yöntemi bir veya birden fazla hidrokolloidin ana çözeltisinden faz ayrımı ve yeni oluşan koazervat fazın aktif ingrediye etrafında aynı reaksiyon ortamında süspanse veya emülsifiye olmasıdır (Favaro-Trindade vd., 2011). Koaservasyon genellikle aroma yağlarının enkapsülasyonunda kullanılırken, balık yağı, vitaminler, koruyucular ve enzimler için de kullanışlı bir metottur. Bu yöntemin dezavantajları isepahalı oluşu, karmaşık adımlara sahip olması ve ikincil kabuki materyali olarak pek çok ülkenin yasal düzenlemesinde kullanımı kısıtlı olan gluteraldehit kullanımı gerektirmesidir (Gouin, 2004).



Şekil 14. Şematize koaservasyon yöntemi

1.13.3. Emülsiyon Oluşturma Yöntemi

Emülsiyon birbirleriyle karışmayan iki fazın (yağ ve su), sıvılardan birinin diğeri içinde çok küçük damlacıklar halinde dağıtılması ile elde edilmektedir. Yüksek hızlı karıştırıcı ve homojenizatör emülsiyon oluşturmada kullanılan cihazlardır. Suda çözünür ingrediye su/yağ emülsiyonları veya su/yağ/su gibi çift emülsiyonlar ile enkapsüle edilebilir (Edwards-Lévy, vd., 2011).



Şekil 15. Şematize emülsiyon oluşturma yöntemi

1.13.4. Dondurarak Kurutma Yöntemi

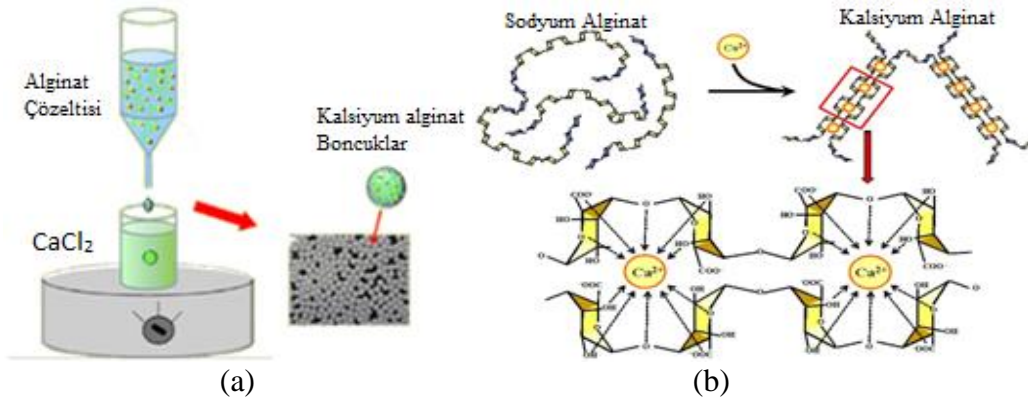
Yöntemin diğer adı liyofilizasyondur. Isıya duyarlı bileşenlerin ve aromaların dehidrasyonunda kullanılan bir metottur. Numune -90 ile -40°C 'ye dondurulur ve düşük basınç ile düşük sıcaklık altında süblimleşme yoluyla kurutulur (Gouin, 2004). Bu yöntemde aktif bileşen ve taşıyıcı malzeme suda çözünür ve porlu yapıda dondurarak kurutulmuş ürünler elde edilir. Dondurarak kurutmanın dezavantajları yüksek enerji kullanımı ve uzun işlem süresi gerektirmesi, göreceli olarak pahalı bir yöntem olması (püskürtmeli kurutmadan 30-50 kat pahalı) ve açık delikli yapıda kapsüller elde edilmesi sebebiyle iyi bariyer özellikleri taşınamamasıdır (Zuidam ve Shimoni, 2010).



Şekil 16. Liyofilizatör

1.13.5. İyonik Jelasyon Yöntemi

İyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Enkapsülant ile aktif madde homojen bir şekilde karıştırılır ve bir şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır. Bu metod daha çok kalsiyum- alginat kapsüllerin elde edilmesinde kullanılır. Metodun temel prensibi CaCl_2 molekülündeki kalsiyum ile sodyum alginatın çapraz bağlar oluşturmasıdır (yumurta kutusu modeli). Aljinatın yanı sıra pektin çözeltisinin kalsiyum çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), kitosan çözeltisinin tripolifosfat çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), peynir altı suyu proteininin sıcak sıvıya damlatılması (sıcak jelasyon) veya jelatin çözeltisinin soğuk sıvıya damlatılması (soğuk jelasyon) ile de mikrotanecikler elde edilebilmektedir (Kong vd., 2016; Kumar, 2000).



Şekil 17. (a) Şematize iyonik jelasyon yöntemi (b) Şematize kapsüllerin oluşumu

Hidrofilik veya hidrofobik, ısıya duyarlı, akışkan veya viskoz, katı veya sıvı hemen hemen tüm ingrediyanların bu metotla enkapsüle edilebilmesi yöntemin avantajları arasındadır. Az miktarda kapsül elde edilmesi yani ürünlerin ticari boyutta elde edilmesinin oldukça güç olması ve kapsül gözeneklerinin fazla olması metodun dezavantajlarıdır. Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar bu dezavantajları bertaraf etmeye yöneliktir. Negatif yüklü aljinat ile zıt yüklü kitosan yarı geçirgen bir membran oluşturarak kapsül yüzeyinin daha düzgün ve suda çözünür molekülleri daha az geçiren bir yapı oluşturmasını sağlamaktadır (Kong vd., 2016). Son yıllarda geliştirilen şırınga – ekstrüzyon sistemi (hava jeti, elektriksel, potansiyel ve titreşimli üniteler ile aljinat akışını sağlayan) gibi bazı

teknolojiler sayesinde yüksek miktarda aljinat tanecikleri üretilerek enkapsüle gıda ingrediyei içeren aljinat taneciklerin ticarileştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Gouin, 2004).

Tablo 4. Enkapsülasyonda polimerlerin kullanımı, avantaj ve metot kısıtlamaları (Reis vd., 2006)

Metot	Prosedür Kolaylığı	Saflaştırma İhtiyacı	Çoğaltma Kolaylığı	% Enkapsülasyon Etkinliği	Bileşen Güvenliği
Monomerlerin Polimerizasyonu					
Emülsiyon Polimerizasyonu	-	-	-	-	-
Organik	Düşük	Yüksek	-	Düşük	Düşük
Sulu	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
Arayüz Polimerizasyonu	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Düşük
Sentetik Polimerler					
Elmülsifikasyon/ Evaporasyon	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Orta
Çözücü Değişirme	Yüksek	-	-	Yüksek	Orta
Salting out	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Çözücü Difizyonu	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek	Orta
Doğal Polimerler					
Albumin	Bilgi Yok	Yüksek	-	Orta	Düşük
Jelatin	Bilgi Yok	Yüksek	-	Orta	Düşük
Alginat	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Kitosan	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Agaroz	Orta	Yüksek	-	-	Yüksek
Çözünmeyen Polimerler	-	Yüksek	-	Düşük	Düşük

Tablo 4'de enkapsülasyon işleminde kullanılan polimerlerin kullanımı, avantaj ve kullanım kısıtlamaları belirtilmektedir. Tabloda doğal bir polimer olan alginatın enkapsülasyon esnasında prosedür kolaylığı, çoğaltma kolaylığı, % enkapsülasyon etkinliği ve bileşen güvenliği açısından avantajlara sahip olduğu görülmektedir.

1.14. *in vitro* Gastrointestinal Sistem

Besinlerin vücuda alınımından itibaren ağızdan anüse kadar ilerlemesi, besinlerin vücudumuzda kullanılabilir hale gelmesi için gerekli olan enzimlerin, hormonların sentez

ve salınımı, besinlerin sindirimi, emilimi ve atılımı gastrointestinal sistemi oluşturmaktadır.

Sindirim olayı ağızda çiğnemeyle başlar. Sindirim mekanik ve kimyasal olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Mekanik sindirim ağızda çiğneme ve mide- barsak hareketleri ile gerçekleşir. Kimyasal sindirim mekanik olarak parçalanmış besinlerin tükürük, mide asitleri, safra, karaciğer, pankreas ve barsak enzimleri ile değişime uğrayarak barsak epitelinden dolaşıma geçebilecek forma dönüşüm sürecidir. Sindirim sistemi farklı pH değerlerine sahiptir. Mide sıvısı asidik bölgede yer alırken barsak sıvısı bazik bölgede yer almaktadır. Tablo 5 sindirim sistemi bölgeleri ve pH değerleri belirtilmiştir.

Tablo 5. Sindirim sistemi bölgeleri ve pH değerleri

Anatomik Bölge	Gıda Kalış Süresi	pH
Ağız	1 dakikaya kadar	~ 6,5- 7,5
Mide Girişi	30- 60 dakika	~ 4,0-6,5
Mide	1-3 saat	~ 1,5- 4,0
Duodenum	30-60 dakika	~ 7,0- 8,5
İnce Barsak	1-5 saat	~ 4,0- 7,0
Kalın Barsak	10 saat veya birkaç gün	~ 4,0- 7,0

Hazırlanan kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışını görmek amacıyla *in vitro* sindirim sistemi ortamları oluşturulmaktadır (Yavaş vd., 2016). Bu amaçla; pH değerleri değişen (mide sıvısı için pH 1,5 ve barsak sıvısı için pH 6,8-7,4) ortamlar vücut ısısı (37 °C) altında sindirim sistemi taklit çözeltileri hazırlanarak kapsüllerin salınım özellikleri değerlendirilmektedir (McClements vd., 2010).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Mevcut çalışmada kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
LC-UV	Thermo Scientific Surveyor™, San Jose, CA, USA
UV-VİS Spektrofotometre	Spectro UV-Vis Double Beam PC LaboMed Inc., Los Angeles, CA, USA
pH metre	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland
Hassas Terazi	Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland
Saf Su Cihazı	Human, Zeneer Navi UP, Song Pa-Ku, Seoul, Korea
Refraktometre	Atago
Vorteks karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Germany
Rotary evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Germany
Vakum Pompası	Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, Switzerland
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Germany

2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Mevcut çalışmada kullanılan temel kimyasal madde ve malzemeler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan kimyasallar ve satın alınan firma bilgileri

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Gallik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
p-OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Vanilik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kafeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
p-kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kuersetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Daidzein	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE)	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetonitril-LC Safılıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC Safılıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Etanol	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Metanol	Merck, Darmstadt, Germany
Sodyum Karbonat	Merck, Darmstadt, Germany
Amonyum Asetat	Merck, Darmstadt, Germany
Alüminyum Nitrat	Merck, Darmstadt, Germany
Vanilin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Sodyum Alginat	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kalsiyum Klorür	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Tween 20	Fisher Bioreagents, USA
Sodyum Hidroksit	Merck, Darmstadt, Germany
Sodyum Hidrojen Fosfat	Merck, Darmstadt, Germany
Sodyum Dihidrojen Fosfat	Merck, Darmstadt, Germany

2.1.3. Çözeltiler

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 8'de ayrıntılarıyla verildi.

Tablo 8. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
HPLC-UV İle Fenolik Bileşen Analizleri İçin	
Gallik asit Protokatekuik asit <i>p</i> -OH benzoik asit Vanilik asit Kaffeik asit Şiringik asit <i>p</i> -Kumarik asit Ferulik asit	%50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%50-50 metanol-saf su) seyreltilir.
Kateşin Epikateşin Rutin Kuersetin	%100 metanolle hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden, 1-2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir.
Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE)	%100 metanolle hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden, 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir.
% 2'lik Asetik Asit	20 mL glasiyel asetik asit balon jojede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
%70-30 Asetonitril-Saf Su	700 mL asetonitril balon jojede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin	
0,2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanılır.
% 10'luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ 90 mL saf suda çözülür, 100 mL'ye tamamlanır.
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 hazırlanır.
Toplam Flavonoid Madde Miktarı İçin	
1 M NH ₄ CH ₃ COO	7,7 g NH ₄ CH ₃ COO 90 mL saf suda çözülür, 100 mL'ye tamamlanır.
%10 Al(NO ₃) ₃	1 g Al(NO ₃) ₃ 9 mL saf suda çözülür 10 mL' ye tamamlanır.
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.
Kondanse Tanen Madde Miktarı İçin	
%4' lük Vanilin	4g vanilin tartıldı, 90mL metanolde çözüldü, 100 mL' ye tamamlandı.
<i>in vitro</i> Sindirim Sistemi İçin	
Fosfat Tamponu (0,1M, pH 6,8) Fosfat Tamponu (0,1M, pH 7,4)	10,6 g Na ₂ HPO ₄ ve 5,97 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O tartılarak aynı reaktif kabında yaklaşık 900mL saf suda çözülür. Seyreltik kuvvetli asit ya da baz ile pH ayarlaması yaptıktan sonra yine saf suyla hacmi 1L'ye tamamlanır.
%1' lik Tween 20	1g Tween 20 tartılır, 90 mL saf suda çözülür, 100 mL' ye tamamlanır.
pH 1,50 HCl/KCl Tamponu	0,2 M 100 mL HCl ile 0,2 M 85 mL KCl karıştırılır, pH 1,5 ayarlanır.
Alginat Kapsüller İçin	
0,5 M Kalsiyum Klorür	5,5 g kalsiyum klorür tartılır, 90 mL saf suda çözülür, 100 mL tamamlanır.
%1' lik sodyum alginat	1g sodyum alginat tartılır, 90 mL saf suda çözülür, 100 mL' ye tamamlanır.

2.2. Numunelerin Temini, Saklama Yöntemi

Türkiye' nin değişik bölgelerinde bulunan arıcılardan (Bilecik, Kayseri, İstanbul, Rize, Kars, Sivas, Kırklareli, Zonguldak, Balıkesir, Ağrı, Yığılca, Siirt (Bıttım), Ardahan) ham propolis örnekleri (2016 ve 2017 yılı örnekleri) ve değişik üretici firmalara ait ticari propolis örnekleri temin edildi. Kullanılmayan örnekler +4 °C' da buzdolabında saklandı.



Şekil 18. Numunelerin alındığı iller

Tablo 9. Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler

Adı	Numarası	Yapılan Analizler						Kuru Madde Miktarı %
		Briks	Balsam %	TP	TF	KT	HPLC Fenolik Bileşenler	
Grup I								
Kayseri	GI- 1	*	*	*	*	*	*	*
Beykoz	GI- 2	*	*	*	*	*	*	*
Bilecik	GI- 3	*	*	*	*	*	*	*
Sivas	GI- 4	*	*	*	*	*	*	*
Bahkesir	GI- 5	*	*	*	*	*	*	*
Demirköy	GI- 6	*	*	*	*	*	*	*
Zonguldak	GI- 7	*	*	*	*	*	*	*
Hemşin	GI- 8	*	*	*	*	*	*	*
Kars	GI- 9	*	*	*	*	*	*	*
Bıttım	GI- 10	*	*	*	*	*	*	*
Yığılca	GI- 11	*	*	*	*	*	*	*
Ardahan	GI- 12	*	*	*	*	*	*	*
Ağrı	GI- 13	*	*	*	*	*	*	*
Grup II								
Bilecik	GII- 1	*	*	*	*	*	*	
Zonguldak	GII- 2	*	*	*	*	*	*	
Beykoz	GII- 3	*	*	*	*	*	*	
Sulu 1	GII- 4	*	*	*	*	*		
Sulu 2	GII- 5	*	*	*	*	*	*	
Grup III								
K.....i	GIII- 1	*	*	*	*	*	*	
Y.....z	GIII- 2	*	*	*	*	*	*	
K.....ı	GIII- 3	*	*	*	*	*	*	
K.....r	GIII- 4	*	*	*	*	*	*	
A.....a	GIII- 5	*	*	*	*	*	*	
H.....1	GIII- 6	*	*	*	*	*	*	
H.....e	GIII- 7	*	*	*	*	*	*	
D.....e	GIII- 8	*	*	*	*	*	*	
T.....t	GIII- 9	*	*	*	*	*	*	
Grup IV								
S.....P	GIV- 1	*	*	*	*	*		
E.....r	GIV- 2	*	*	*	*	*	*	
A.....a	GIV- 3	*	*	*	*	*		

2.3. Propolislerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.1. Propolis Ekstraktların Hazırlanması

Dondurulan ham propolis örneklerinden belirli bir miktar (yaklaşık 3,000g) tartıldı, havanda ezilerek yüzey alanı arttırıldı ve üzerine mutlak etil alkol ilave edildi. Elde edilen karışım 24 saat boyunca sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen karışım Wattman 1 süzgeç kağıdından süzülde, elde edilen çözeltinin hacmi mutlak etanol ile 30 mL' ye tamamlandı. +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Alginat- propolis kapsüllerin hazırlanması amacıyla Artvin ve Zonguldak illerine ait propolis örnekleri homojen bir şekilde karıştırıldı ve yukarıda belirtildiği şekliyle ekstraksiyon işlemi yapıldı.

2.3.2. % Kuru Madde Miktarı Tayini

% kuru madde miktarı Wosky ve Slantino (1997)' nun belirttiği metoda göre yapıldı. Bu amaçla sabit tartıma gelmiş tartım kapları ile 10g ham propolis örneği tartıldı. 105 °C' de 5 saat boyunca kurutuldu. 5 saatin sonunda numuneler desikatöre alındı ve soğumasının ardından tartıldı. İlk tartım ve son tartım arasındaki farktan yola çıkılarak % kuru madde miktarı hesaplandı.

2.3.3. Briks Değeri Tayini

Hazırlanan ve ticari olarak temin edilen numunelerin % çözünen katı miktarını tayin edebilmek amacıyla refraktometre cihazı (Atago, Germany) kullanıldı. Refraktometre kullanılarak ölçülen değerler etanolik propolis ekstraktı Briks değeri olarak ifade edildi.

2.3.4. % Balsam Miktarı Tayini

Balsam miktarı tayini etil alkol ekstraksiyon yöntemine göre yapıldı (Popova vd., 2017). Bu amaçla sabit tartıma gelmiş evaporatör balonu tartılarak ağırlığı tayin edildi (boş

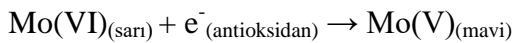
tartım) daha sonra balona 2 mL propolis ekstraktı ilave edildi ve etil alkol evapore edildi. Evaporasyondan sonra sabit tartıma getirilen balonun ağırlığı belirlendi (dolu tartım). Dolu ve boş tartım arasındaki fark üzerinden % balsam değeri hesaplandı.

2.3.5. % Vaks Değeri Tayini

Ham propolisın vaks değeri Feas vd. (2014)' ün belirttiği metotta bazı değişiklikler yapılarak belirlendi. Bu amaçla derin dondurucuda bekletilen ham propolis örnekleri havanda öğütülerek yüzey alanları arttırıldı. Daha sonra belirli miktarda (her bir örnek için ortalama 3,000g) örneklerden tartıldı ve üzerlerine 15 mL mutlak metanol ilave edildi. Elde edilen karışım sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat çalkalandı. Daha sonra karışım derin dondurucuda (-18 °C) bir gece boyunca bekletildi. Elde edilen çözelti sabit tartıma getirilmiş ve darası alınmış süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzgeç kâğıdında kalan vaks miktarı tartılarak belirlendi. Son tartım ile ilk tartım arasındaki fark üzerinden % vaks (mum) değeri hesaplandı. Ticari olarak temin edilen örneklerin vaks içeriği numunelerin koyu renkli ve viskoz oluşundan dolayı belirlenemedi.

2.3.6. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Folin metodu fenolik maddelerin Folin Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır ve doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için en çok kullanılan yöntemdir (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi molibdofosfotungstik heteropoliasiti ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) olup bileşiğin aktif merkezinde Mo(VI) bulunur. Fenolik maddelerin folin reaktifi ile oluşturduğu mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Bu rengin spektrofotometrik ölçümü ile toplam fenolik madde miktarı tespit edilir.



Gallik asit (GA) standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği hazırlandı (Slinkard vd., 1977; Singleton ve Rossi, 1965). Gallik asitin farklı konsantrasyonlarda (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 ve 0,03125 mg/mL) çözeltileri hazırlandı. Konsantrasyona karşılık ölçülen

absorbans değerleri ile standart grafiği çizildi. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar mg GAE/ mL propolis ekstraktı olarak ifade edildi. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 10'daki gibidir.

Tablo 10. Toplam fenolik madde miktarı pipetleme işlemi

	Kör	Standart	Test
Distile Su	700 µL	680 µL	680 µL
Standart (Değişik Konsantrasyonlarda)	-	20 µL	-
Propolis Numunesi	-	-	20 µL
0,2 N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
% 10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL

2.3.7. Toplam Flavanoid Tayini

Flavanoid miktarı tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi olarak da adlandırılan bu metodun prensibi, alüminyum klorürün, flavonoidlerin 4-keto ve C-3 ya da C-5 (ya da her ikisi) hidroksil grubu ile kararlı bir asit kompleksinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Alüminyum klorür ayrıca flavonoidlerin A ve B halkalarındaki orto-dihidroksil grupları ile kararsız bir asit kompleksi de oluşturur (Pallab vd., 2013). Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 ve 0,0078125 mg/mL) kuersetin (KE) kullanıldı. Pipetlemeler bittikten 40 dakika sonra 415 nm' de saf suya karşı tüplerin absorbansları kaydedildi. Konsantrasyona karşılık kaydedilen absorbans değerleri ile standart grafiği çizildi. Çizilen standart grafiğine göre propolis ekstraktlarının toplam flavanoid madde miktarı hesaplandı ve toplam flavanoid miktarı mg KE/ mL propolis ekstraktı olarak ifade edildi. Toplam flavanoid miktarı analizi için pipetleme işlemi Tablo 11'deki gibidir.

Tablo 11. Toplam flavanoid miktarı pipetleme işlemi

	Kör	Standart	Numune
Numune	-	-	0,5 mL
Standart (Değişik Konsantrasyonlarda)	-	0,5 mL	-
Mutlak Metanol	4,8 mL	4,3 mL	4,3 mL
% 10 Al(NO ₃) ₃	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
1 M NH ₄ .CH ₃ COO	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

2.3.8. Kondanse Tanen Miktarı Tayini

Kondanse tanen miktarı tayini Julkunen-Titto (1985)' in belirttiği metoda göre yapıldı. Bu metot flavanollere özgüdür. Hidrolizlenebilir tanenlerin ve diğer fenoliklerin varlığında kondanse tanen tayinini spesifik olarak yapılmasını mümkün kılar. Vanilin reaktifi unsubstitue resorsinol veya floroglusinol birimleri olan bütün fenoller ile etkileşim yapmaktadır. Bu etkileşim neticesinde renkli bir çözelti oluşmaktadır. Standart olarak kateşin kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 ve 0,03125 mg/mL) kateşin içeren tüplerin 500 nm' de ölçülen absorban değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen kalibrasyon grafiğine göre propolis ekstraktının kondanse tanen madde miktarı hesaplandı. Örneklerinkondanse tanen madde miktarı mg KatE/ mL propolis ekstraktı olarak ifade edildi. Yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 12'deki gibidir.

Tablo 12. Kondanse tanen miktarı pipetleme işlemi

	Kör	Standart	Numune
Numune	-	-	25 µL
Standart (Değişik Konsantrasyonlarda)	-	25 µL	-
Mutlak Metanol	25 µL	-	-
Vanilin (%4'lük metanol içerisinde)	750 µL	750 µL	750 µL
%37' lik HCl	375 µL	375 µL	375 µL

2.3.9. SEM Görüntüleri

SEM görüntüleri Karadeniz Teknik Üniversitesi, Malzeme Mühendisliği Laboratuvarında elde edildi. ZEISS EVO LS 10 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alginat ve alginat-propolis kapsüllerin boyutları belirlendi. SEM görüntülerini alabilmek amacıyla örnekler altın ile kaplanarak numune hazırlık işlemlerine tabii tutuldu.

2.3.10. FTIR Görüntüleri

ATR-FT-IR spektrumları Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümünde bulunan Perkin Elmer, FT- IR 2000 model spektrofotometre cihazı kullanılarak elde edildi.

Örnekler hiçbir ön hazırlık yapılmaksızın doğrudan numune kısmına yerleştirildi ve analiz edildi.

2.4. Propolisin Fenolik Profilinin Belirlenmesi

2.4.1. Numunelerin HPLC- UV Analizine Hazırlanması

Bölüm 2.3.1'e göre hazırlanan ekstraktların son konsantrasyonunu belirledikten sonra 15 mL' lik ekstrakt (ticari olarak temin edilen numunelerden işlem yapılmaksızın 15 mL alındı) çözücüsü 50°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalıntı pH'sı 2 olan 10 mL saf suda çözüldü. Daha sonra 3'er defa 5 mL'lik önce dietileter sonra etilasetat ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen ekstraktlar evaporatör balonlarına alındı ve çözücülerini 50°C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve son olarak balon içeriği 2 mL metanolle çözümlenerek ekstraktlar HPLC-UV ile fenolik bileşen ve CAPE analizi yapılmaya hazır hale getirildi (Can 2015). Su bazlı numuneler liyofilizasyon işlemi sonrasında analize aynı yöntem kullanılarak hazırlandı.

2.4.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Benzoik asit türevlerinden; gallik asit, protokatekuik asit, vanilik asit, şiringik asit, flavanollardan; kateşin, epikateşin 280 nm'de, sinamik asit türevlerinden; kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve flavonollardan; rutin, kuersetin, 315 nm'de analiz edildi.

Standart çözeltiler; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, kaffeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit % 50- 50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltisinden 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm'lik, kateşin, epikateşin, rutin, kuersetin % 100 metanolle hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm'lik ara stok çözeltileri kalibrasyon eğrileri için kullanıldı. Kalibrasyon eğrileri Ek-4'te verildi.

2.4.3. HPLC- UV Analizi

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde yapıldı. Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x4.6 mm, 5 μ m; Fortis) kullanarak ve asetonytril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (De Villers vd., 2004). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70- 30 asetonytril-saf su bulunan gradient program Tablo 12’de verildi. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 μ L’ye, mobil faz akış hızı 1,2 mL.dk⁻¹,ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C’ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı. Fenolik bileşenler için valisayon parametreleri Tablo 13’ de belirtildi.

Tablo 13. RP-HPLC-UV gradient programı

Zaman (dk)	A	B
	% 2 Asetik Asit(ultra saf su)	% 70-30 Asetonytril(ultra saf su)
0,01	95,00	5,00
3,00	95,00	5,00
8,00	85,00	15,00
10,00	80,00	20,00
12,00	75,00	25,00
20,00	60,00	40,00
30,00	20,00	80,00
35,00	95,00	5,00
50,00	95,00	5,00

Analiz için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi ardından metodun geçerli kılınması yani kullanılan metot ile elde edilen sonuçların doğru ve kesin olarak belirlenen amaçlara uygunluğunun belirlenmesi gerekmektedir. Validasyon olarak adlandırılan geçerli kılma işleminin belirlenen parametreler ve değerler ile kontrolü ile metot validasyonu yapılır (Açar vd., 2013). Bu parametreler;

- Kesinlik (precision),
- Gerçeklik (trueness, bias),
- Algılama limiti (limit of detection-LOD),
- Ölçüm limiti (limit of quantitation-LOQ),

- Seçicilik/özgünlük (selectivity/specificity),
- Hassasiyet (sensitivity),
- Doğrusallık/ölçüm aralığı (linearity/working range)' dır.

Kesinlik (Precision): Metodun tekrar üretilebilirliğinin (reproducibility) bir ölçüsüdür; aynı şekilde elde edilen sonuçların birbirlerine ne kadar yakın olduğunun göstergesidir. Rastgele (random) hatalar standart sapmayla izlenebilir. Genellikle % relatif sapma değeriyle ifade edilir (%RSD).

$$(\%)RSD = (s/X_{ort}) * 100$$

s: standart sapma, X_{ort} : ortalama değer

Gerçeklik (trueness): Numunede bulunan gerçek analit miktarı ile ölçüm sonuçları arasındaki uyumun derecesidir. Gerçeklik, sistematik hatanın bir göstergesidir.

Bias: Bir analizin sistematik hatasının göstergesidir; cihaz, analiz sorumlusu ve metod hatalarından kaynaklanır. Mutlak hata olarak ifade edilir.

Seçicilik (spesificity): Aranılan analitin yöntem ile numune matrissindeki diğer maddelerden ayrılabilme özelliğidir.

Hassasiyet (sensitivity): Analitin bir birim artışının, sinyal büyüklüğüne etkisini gösteren bir kriterdir.

$$\text{hassasiyet} = \text{ölçüm sinyali/konsantrasyon}$$

Bunun dışında kalibrasyon eğrisinden bir birimlik ölçüm artışın analit konsantrasyonundaki değişimine etkisi hesaplanarak iki değer arasındaki korelasyon katsayısı belirlenir (R^2).

Tespit limiti (LOD): Analitin kör örnektekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük konsantrasyon (makul kararlılıkta) düzeyidir. S/N (sinyal/gürültü) üç (3) katıdır; gürültünün standart sapmasına dayanır. Üç şekilde tespit edilmesi mümkündür.

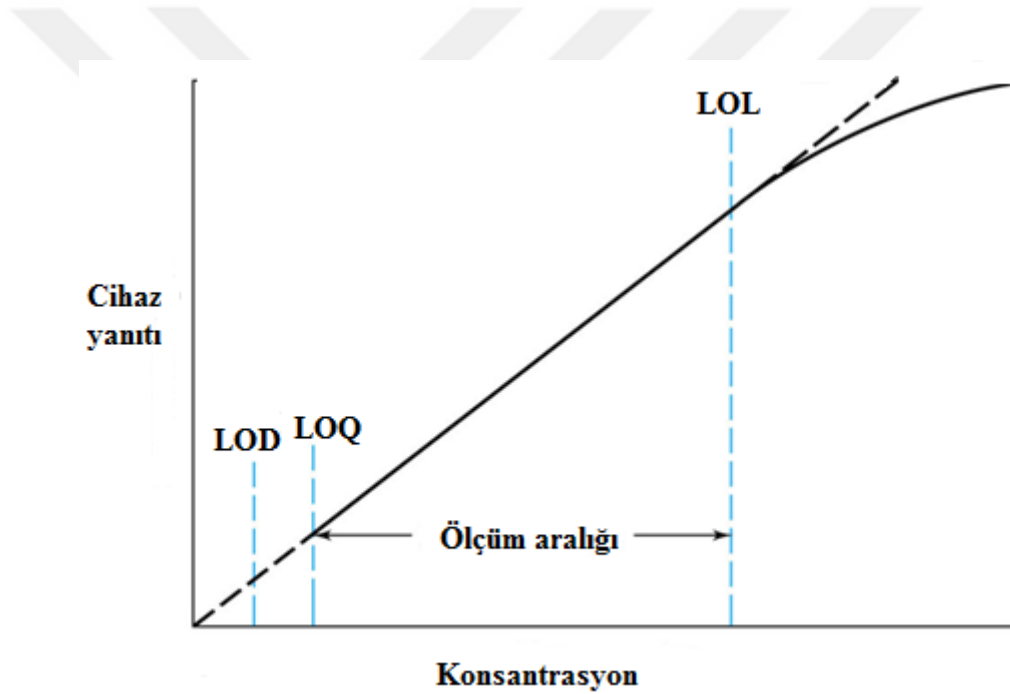
1. Boş örneğin tekrarlı analizleri ile; 10 ayrı boş örnek analiz edilir, ortalama ve standart sapmaları hesaplanır.

$$LOD = X_{ort} + k * \text{Std Sapma} \text{ (%95 güvenirlilik için } k=2)$$

2. Analiti çok düşük düzeyde içeren örneğin tekrarlı analizleri ile 10 ayrı spiked örnek analiz edilir ve standart sapmaları hesaplanır.
3. Analiti düşük düzeyde farklı konsantrasyonlarda içeren örneklerle oluşturulan kalibrasyon denklemi ile hesaplanır (Açar vd., 2013).

Ölçüm Limiti (LOQ): Uygulanan test koşulları altında, kabul edilebilir hassasiyet (tekrarlanabilirlik) ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. S/N'nün 10 katı LOQ değerinin hesaplanmasında kullanılır. Ölçüm aralığının alt sınırı ölçüm limiti (LOQ)'dır.

Doğrusal Ölçüm Sınırı (LOL): Bir cihaz dedektörünün doygunluk noktasıdır; bu noktadan sonra sinyalde doğrusal bir respons üretemez.



Şekil 19. Validasyon parametrelerinin grafik üzerinde gösterimi (Tübitak UME, 2014)

Tablo 14. RP-HPLC-UV fenolik bileşenlerin validasyon parametreleri, mg/L

No	Bileşen	R^2	%RSD(Retention Time)	%RSD(Alan)	LOD	LOQ
1	Gallik Asit	0,999	0,210	1,941	0,022	0,067
2	Protokatekuik Asit	0,999	0,871	1,920	0,042	0,128
3	p-OH Benzoik Asit	0,999	0,351	3,055	0,036	0,109
4	Kateşin	0,990	0,492	4,279	0,040	0,121
5	Vanilik Asit	0,999	0,828	2,066	0,025	0,075
6	Kafeik Asit	0,998	0,179	4,039	0,062	0,187
7	Şiringik Asit	0,999	0,550	0,848	0,009	0,027
8	Epikateşin	0,999	0,429	3,819	0,030	0,090
9	p-Kumarik Asit	0,999	0,204	1,562	0,010	0,030
10	Ferrulik Asit	0,999	0,222	1,301	0,011	0,033
11	Rutin	0,999	0,234	3,139	0,041	0,123
12	Daidzein	0,998	0,174	1,545	0,018	0,054
13	t-Sinamik Asit	0,999	0,262	1,071	0,014	0,042
14	Luteolin	0,994	0,229	5,833	0,043	0,130

2.5. CAPE Miktarı Tayini

2.5.1. Numunelerin HPLC- UV Analizine Hazırlanması

Kafeik asit fenil ester (CAPE) tayini için kullanılan numuneler Bölüm 2.3.1.' de belirtildiği şekliyle hazırlandı. Fenolik bileşen tayini yapılan örnekler CAPE tayini için de kullanıldı.

2.5.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Kafeik asit fenil ester (CAPE)%100 metanolle hazırlanarak 1000 ppm'lik stok çözeltilerden, 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm'lik ara stok çözeltileri kalibrasyon eğrileri için kullanıldı.

Tablo 15. RP-HPLC-UV gradient programı

Zaman	%A (0,1 Formik Asit-ultra saf su)	%B (0,1 Formik Asit- Asetonitril)
0:02	90	10
3:00	75	25
15:00	70	30
30:00	50	50
35:00	40	60
40:00	10	90
45:00	40	60
50:00	75	25

2.5.3. Kafeik Asit Fenil Ester Tayini

Kafeik asit fenil ester (CAPE) miktarı 270 nm’ de UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC kullanılarak belirlendi. Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x4.6 mm, 5µm; Fortis) kullanarak ve formik asit su ve asetonitril gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (Can vd., 2015). A rezervuarında % 0,1 formik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 0,1 formik asit asetonitrilde bulunan gradient program Tablo 15’de verildi. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL’ye, mobil faz akış hızı 1,0 mL.dk⁻¹’ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C’ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı (Pellati vd., 2011).

Kafeik asit fenil ester validasyon parametreleri Tablo 16’ de belirtildi.

Tablo 16. RP-HPLC-UV kafeik asit fenil ester validasyon parametreleri, mg/L

No	Bileşen	R ²	%RSD(Retention Time)	%RSD (Alan)	LOD	LOQ
1	CAPE	0,998	0,228	2,129	0,023	0,068

2.6. Enkapsülasyon Çalışmaları

2.6.1. Alginatın Alkol/Su Karışımında Çözünmesi

Alginat suda çözünebilen bir biyopolimer olduğundan propolis ekstraksiyonunda %70’ lik etanol kullanıldı. Çünkü literatür araştırmaları neticesinde alginatın mutlak etanol

içerisinde çözünmediğini görüldü. Kapsüllerin elde edilmesinde alginat çözeltisi (% 1'lik) ile propolis ekstraktının homojenize edilmesi gerekmektedir. Bu işlem saf su ile hazırlanan % 1'lik alginat çözeltisi ile gerçekleştirildiğinde propolis ekstraktında bulunan balsamın sulu fazdan ayrılmasına neden olmaktadır. Bu problemin aşılması homojenizatta bulunan alkol miktarının artırılması ile aşılabileceği düşünülmüştür. Homojenizattaki alkol miktarı ise ancak % 1'lik alginat çözeltisinin etanol-su karışımlarında hazırlanması ile mümkün olabileceğinden dolayı alginatın alkol-su karışımlarındaki çözünürlüğünün belirlenmesine karar verildi. Bu amaçla % 1 (m/v)'lik alginat değişik oranlarda hazırlanmış alkol-su karışımları ile karıştırıldı (%10- %50 v/v) ve alginatın çözünebildiği en yüksek alkol miktarı belirlendi.

2.6.2. Alginat Propolis Kapsüllerin Hazırlanması

Alginat- propolis kapsülleri Abinden (2011)' ün belirttiği metotta bazı değişiklikler yapılarak elde edildi. % 1 (m/v)' lik alginat % 30 (v/v)' luk etanol çözeltisinde çözüldü ve daha sonra üzerine 2 mL propolis ekstraktı ilave edildi. Elde edilen homojen karışım bir şırınga yardımı ile 0,05 M CaCl₂ çözeltisi üzerine damlatıldı. Oluşan kapsüllerin sertleşmesi için 15 dk boyunca sabit hız altında karıştırılmaya devam edildi ve oluşan karışımlar süzülerek ayrıldı. Kalan kısım toplam polifenol tayini yapılması amacıyla +4 °C'de saklandı. Elde edilen kapsüller 5 saat boyunca 60 °C'da vakum etüvünde kurutuldu. Alginat kapsüller ise propolis çözeltisi ilave edilmeksizin aynı metot kullanılarak elde edildi.

2.6.3. Alginat Konsantrasyonunun Etkisi

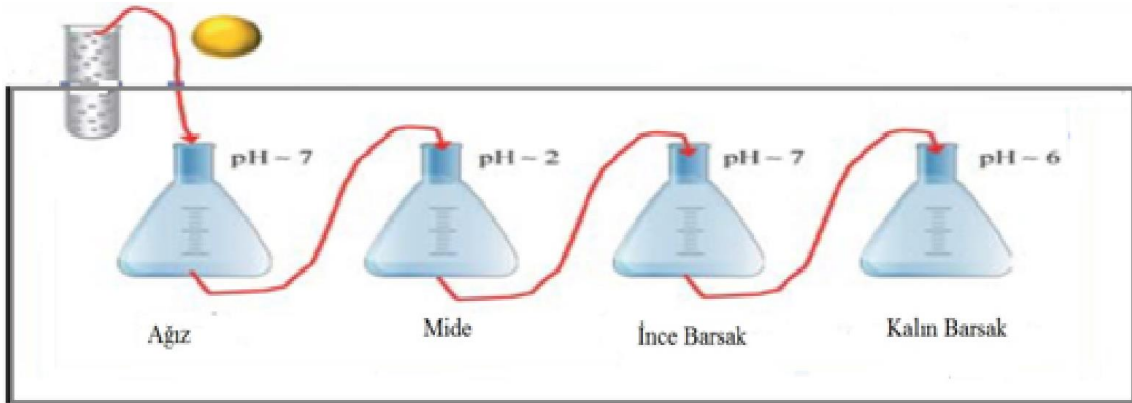
Kapsülleme etkinliğine alginat derişiminin etkisini araştırmak amacıyla değişik konsantrasyonlarda (% 0,5- % 3 m/v) % 30' luk etanol içerisinde hazırlanan alginat çözeltisi ile 1 mL propolis ekstraktı karıştırıldı. Karışım bir şırınga yardımıyla 0,05 M CaCl₂ çözeltisi içerisine damlatıldı ve kapsül oluşumu gözlemlendi. Daha sonra kapsüller süzülerek ayrıldı ve süzüntüde toplam polifenol analizi yapılarak kapsülasyon verimi hesaplandı.

2.6.4. Propolis Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi

Kapsülleme etkinliğine propolis ekstrakt miktarının etkisini araştırmak amacıyla değişik oranlarda (1- 2,5 mL) propolis ekstraktı %1 lik alginat çözeltisi (%30' luk etanol içerisinde) ile karıştırıldı. Karışım bir şırınga yardımıyla 0,05 M CaCl₂ çözeltisi içerisine damlatıldı ve kapsül oluşumu gözlemlendi. Daha sonra kapsüller süzülerek ayrıldı ve süzüntüde toplam polifenol analizi yapılarak kapsülasyon verimi hesaplandı.

2.6.5. Alginat- Propolis Kapsüllerin *in vitro* Sindirim Sistemi Salınım Özelliklerinin Değerlendirilmesi

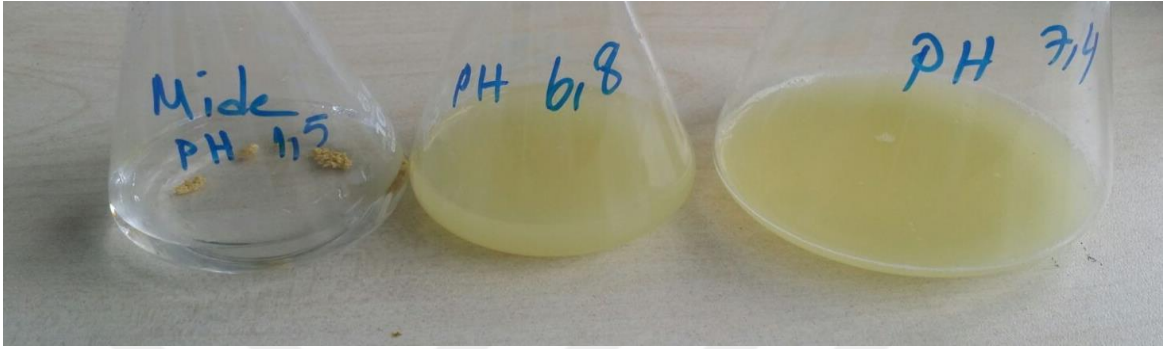
Mide ortamı *in vitro* olarak pH 1,50 HCl/KCl çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Bir erlen içerisinde 37 °C' de ve ağzı kapalı durumdaki 30 mL karışan ortam (pH 1,5) içerisine alginate- propolis 0,1500 g kapsüllerden eklendi. Her 30 dakikada bir ortamdan 2 mL çözelti alınarak santrifüjlendi. Her seferinde alınan çözelti kadar erlene kullanılan ortam çözeltisinden (pH 1,5) eklendi. Bu işlem 2 saat boyunca tekrarlandı. Elde edilen süpernatantlara toplam polifenol analizi yapıldı ve salınım miktarı % olarak hesaplandı (Yavaşer vd., 2016).



Şekil 20. Şematize *in vitro* sindirim sistemi

Barsak ortamı *in vitro* olarak pH 6,8 fosfat ve pH 7,4 fosfat tamponları kullanılarak hazırlandı. Ayrı ayrı erlenler içerisinde 37 °C' de ve ağzı kapalı durumda bulunan ve sabit hız altında karıştırılan 30 mL pH 6,8 ve pH 7,4 potasyum fosfat tamponları içerisine 3 mL % 1'lik Tween 20 çözeltisi ve 0,1500 g alginat- propolis kapsül ilave edildi. Her 30

Her seferinde alınan çözelti 2 mL çözelti alınarak santrifüjlendi. Her seferinde alınan çözelti kadar erlene kullanılan ortam çözeltisinden (pH 6,8 ve pH 7,4) eklendi. Bu işlem 2 saat boyunca tekrarlandı. Elde edilen süpernatantlara toplam polifenol analizi yapıldı ve salınım miktarı % olarak hesaplandı (Yavaş vd., 2016).



Şekil 21. Laboratuvarında yapılan salınım sistemi çalışması

Kontrol grubu olarak enkapsülasyon çalışması için ekstraktı hazırlanan ham propolis kullanıldı, aynı ortamlarda aynı yöntemler ile ham propolis salınım özellikleri belirlendi.

2.6.6. Elde edilen Propolis- Alginat Kapsüllerin Raf Ömrünün Belirlenmesi

Elde edilen propolis-alginat kapsüllerin raf ömrünün belirlenebilmesi amacıyla belirlenen standart şartlar altında yaklaşık 5gpropolis-alginat kapsüller elde edildi. Elde edilen kapsüller +4 °C' de saklandı. Belirli periyotlarla örnek alınarak ekstrakte edildi ve ekstraktın toplam polifenol analizi yapıldı. Zamana bağlı olarak propolis alginat kapsüllerin toplam polifenol miktarındaki değişiklik belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Ekstraktların Hazırlanması

Türkiye' nin değişik illerinden toplanan ham propolis örneklerinin her birinden ayrı ayrı ortalama 3,0000g hassas bir şekilde tartıldı. Birer falkon içerisine alınan karışımın üzerine 15 mL mutlak etanol ilave edildi ve 24 saat boyunca, sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalandı. Süre sonunda elde edilen karışım Wattman 1 süzgeç kağıdı ile süzüldü ve ekstrakt hacmi 30 mL' ye tamamlandı. Kullanıma hazır hale getirilen ekstraktlar +4 °C buzdolabında bekletildi. Su bazlı örneklerde aynı işlem yapıldı fakat çözücü olarak mutlak etanol yerine saf su kullanıldı. Farklı firmalardan toplanan numuneler numaralandırıldı ve numuneler ekstrakt halinde olduğundan dolayı ekstra bir işlem yapılmaksızın +4 °C buzdolabında bekletildi.

Standardizasyon çalışmaları için örnekler dört farklı gruba ayrıldı. Birinci grup mutlak etanolde çözülmüş ham ekstraktlar, ikinci grup saf su kullanılarak hazırlanmış ekstraktlar, üçüncü grup etanol kullanılarak hazırlanan ticari ekstraktlar ve dördüncü grup su kullanılarak hazırlanan ticari ekstraktlardır.

3.2. Propolislerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1. % Kuru Madde Miktarı Tayini

% kuru madde miktarı nem miktarı ile orantılıdır. Yapılan analiz ile birlikte Türkiye propolislerinin nem miktarı belirlendi. Türkiye propolislerinin % kuru madde miktarının % 88,42 ile % 98,86 aralığında değiştiği belirlendi. Elde edilen verilere göre Türkiye propolislerinin nem miktarının % 1,14 ile % 11,58 aralığında değiştiği tespit edildi.

Tablo 17. Ham propolis örnekleri % kuru madde miktarı

Ham propolis örnekleri		% Kuru Madde Miktarı
Kayseri	GI- 1	97,15 ± 0,04
Beykoz	GI- 2	95,18 ± 0,07
Bilecik	GI- 3	92,61 ± 0,04
Sivas	GI- 4	96,25 ± 0,05
Balıkesir	GI- 5	98,86 ± 0,05
Demirköy	GI- 6	90,55 ± 0,06
Zonguldak	GI- 7	88,74 ± 0,03
Hemşin	GI- 8	96,74 ± 0,05
Kars	GI- 9	98,61 ± 0,01
Bıttım	GI- 10	94,83 ± 0,03
Yığılca	GI- 11	92,24 ± 0,06
Ardahan	GI- 12	88,74 ± 0,02
Ağrı	GI- 13	88,42 ± 0,05

Tablo 18. Ham propolis örnekleri % nem miktarı

Ham propolis örnekleri		% Nem Miktarı
Kayseri	GI- 1	2,73 ± 0,2
Beykoz	GI- 2	4,82 ± 0,07
Bilecik	GI- 3	7,39 ± 0,04
Sivas	GI- 4	3,74 ± 0,05
Balıkesir	GI- 5	1,14 ± 0,05
Demirköy	GI- 6	9,45 ± 0,06
Zonguldak	GI- 7	11,26 ± 0,03
Hemşin	GI- 8	3,26 ± 0,05
Kars	GI- 9	1,39 ± 0,02
Bıttım	GI- 10	5,17 ± 0,03
Yığılca	GI- 11	7,76 ± 0,06
Ardahan	GI- 12	11,26 ± 0,02
Ağrı	GI- 13	11,58 ± 0,05

3.2.2. Briks Değeri Tayini

Refraktometre katı ve sıvı saydam ortamların kırılma indislerini ölçen ve sıvı malzemelerin içindeki katı madde miktarını belirlenmesinde kullanılan bir cihazdır. Ham ve ticari örneklerin % çözünür kuru madde miktarını bulmak amacıyla cihaz saf su ile temizlendi ve kalibrasyonu kontrol edildi. Daha sonra numuneden iki damla okumanın

yapılacağı kısma damlatıldı ve okunan değer % çözünür kuru madde olarak kaydedildi. Briks değerleri Grup I, II, III ve IV için en yüksek değerler sırasıyla 27,5, 0, 100 ve 37 olarak belirlenirken en düşük değerler 21, 0, 0 ve 0 olarak belirlendi. Numunelere ait kuru madde miktarları Tablo 19’ da belirtildi.

Tablo 19. Briks verileri

			Briks
Ham propolis örnekleri etanolik ekstraktları	Kayseri	GI- 1	21,5
	Beykoz	GI- 2	22
	Bilecik	GI- 3	27,5
	Sivas	GI- 4	25,5
	Balıkesir	GI- 5	21
	Demirköy	GI- 6	26,5
	Zonguldak	GI- 7	25
	Hemşin	GI- 8	22,5
	Kars	GI- 9	25
	Bıttım	GI- 10	22,5
	Yığılca	GI- 11	23
	Ardahan	GI- 12	20,5
	Ağrı	GI- 13	21,5
Ham propolis sulu ekstraktları	Bilecik	GII- 1	0
	Zonguldak	GII- 2	0
	Beykoz	GII- 3	0
	Sulu 1	GII- 4	0
	Sulu 2	GII- 5	0
Ticari propolis etanolik ekst.	K.....i	GIII- 1	29
	Y.....z	GIII- 2	27
	K.....ı	GIII- 3	53
	K.....r	GIII- 4	100
	A.....a	GIII- 5	35
	H.....ı	GIII- 6	61
	H.....e	GIII- 7	42
	D.....e	GIII- 8	36,5
	T.....t	GIII- 9	0
Ticari propolis sulu ekst.	S.....P	GIV- 1	0
	E.....r	GIV- 2	0
	A.....a	GIV- 3	37

3.2.3. % Balsam Miktarı Tayini

Etanolik ekstrakt içerisinde çözülmüş madde miktarı olarak ifade edilen balsam miktarı tayini Popova vd. (2017) belirttiği metoda göre yapıldı. Sabit tartıma gelmiş olan balonlara 2 mL ekstrakt ilave edilerek evapore edildi ve son tartım kaydedilerek gerekli hesaplamalar yapıldı. Bulunan değer % balsam miktarı olarak ifade edildi. Her bir numune

için işlemler ayrı ayrı yapıldı. Balsam değerleri Grup I, II, III ve IV için en yüksek değerler sırasıyla % 71,1, % 0,6, % 95 ve % 0,2 olarak belirlenirken en düşük değerler % 23,6, % 0,1, % 6,83 ve % 0,1 olarak belirlendi. Bulunan balsam değerleri Tablo 20' de verildi.

Tablo 20.% Balsam verileri

			% Balsam
Ham propolis örnekleri etanolik ekstraktları	Kayseri	GI- 1	28,7 ± 0,05
	Beykoz	GI- 2	33,3 ± 0,08
	Bilecik	GI- 3	71,1 ± 0,08
	Sivas	GI- 4	53,7 ± 0,2
	Balıkesir	GI- 5	23,6 ± 0,2
	Demirköy	GI- 6	65,5 ± 0,2
	Zonguldak	GI- 7	56,3 ± 0,1
	Hemşin	GI- 8	37,4 ± 0,1
	Kars	GI- 9	41,8 ± 0,2
	Bıttım	GI- 10	29,2 ± 0,08
	Yığılca	GI- 11	51,2 ± 0,1
	Ardahan	GI- 12	42,8 ± 0,2
	Ağrı	GI- 13	38,3 ± 0,1
Ham propolis sulu ekstraktları	Bilecik	GII- 1	0,1 ± 0,01
	Zonguldak	GII- 2	0,1 ± 0,01
	Beykoz	GII- 3	0,1 ± 0,02
	Sulu 1	GII- 4	0,5 ± 0,02
	Sulu 2	GII- 5	0,6 ± 0,01
Ticari propolis etanolik ekst.	K.....i	GIII- 1	9,2 ± 0,08
	Y.....z	GIII- 2	8,1 ± 0,2
	K.....ı	GIII- 3	33,6 ± 0,02
	K.....r	GIII- 4	-
	A.....a	GIII- 5	63,0 ± 0,1
	H.....l	GIII- 6	95,0 ± 0,05
	H.....e	GIII- 7	19,2 ± 0,2
	D.....e	GIII- 8	32,1 ± 0,05
	T.....t	GIII- 9	34,8 ± 0,05
Ticari propolis sulu ekst.	S.....P	GIV- 1	0,1 ± 0,02
	E.....r	GIV- 2	0,2 ± 0,02
	A.....a	GIV- 3	-

3.2.4. % Vaks Değeri Tayini

Feas (2014) metodu tarafımızdan modifiye edilerek yapılan % vaks değerleri Tablo 21' de bildirildi. Ticari propolis ekstraktlarının koyu ve viskoz yapısından dolayı vaks

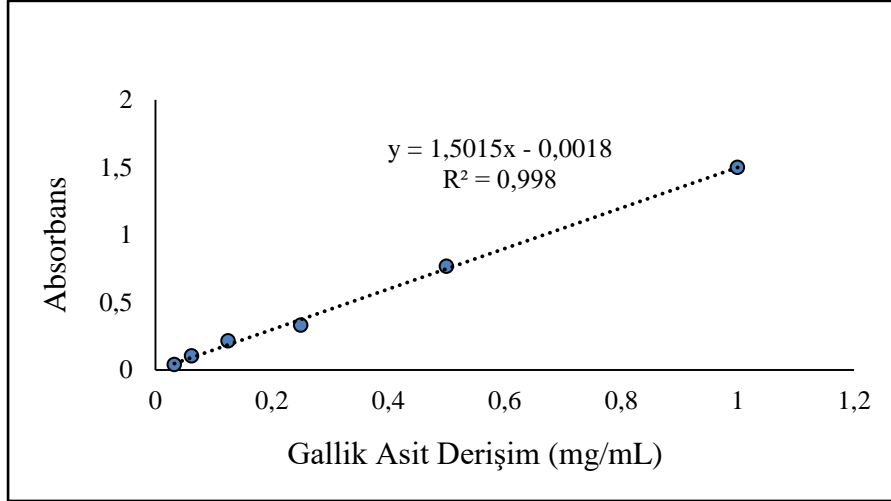
analizi yapılamadı. Grup I için yapılan vaks analizi sonucu en yüksek vaks değeri % 9,8 olarak belirlenirken en düşük değer % 1,4 olarak belirlendi.

Tablo 21. % Vaks verileri

Ham propolis örnekleri		% Vaks
Kayseri	GI- 1	5,2 ± 0,02
Beykoz	GI- 2	5,0 ± 0,06
Bilecik	GI- 3	8,7 ± 0,02
Sivas	GI- 4	4,8 ± 0,02
Balıkesir	GI- 5	4,7 ± 0,03
Demirköy	GI- 6	8,5 ± 0,02
Zonguldak	GI- 7	9,8 ± 0,01
Hemşin	GI- 8	6,6 ± 0,02
Kars	GI- 9	1,4 ± 0,02
Bıttım	GI- 10	1,70 ± 0,03
Yığılca	GI- 11	1,60 ± 0,02
Ardahan	GI- 12	4,45 ± 0,1
Ağrı	GI- 13	2,01 ± 0,08

3.2.5. Toplam Polifenol Tayini

Toplam fenolik madde miktarı gallik standardına göre tayin edildi. Farklı derişimlerde hazırlanan standart gallik asit çözeltilerinin 765 nm'deki absorbans değerleri elde edilerek standart çalışma grafiği oluşturuldu. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g ham propolis ve 1 mL propolis ekstraktının içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlendi, propolislerin toplam fenolik madde miktarları Tablo 22'deki gibidir. Toplam fenolik madde miktarı belirlenen gruplara göre değişiklik göstermektedir. Grup I, II, III ve IV için en yüksek değerler sırasıyla; 178,34 mg GAE/g, 0,22 mg GAE/g, 77,68 mg GAE/ mL ve 3,40 mg GAE/ mL olarak tespit edilirken en düşük değerler 16,13 mg GAE/g, 0,07 mg GAE/g, 6,83 mg GAE/ mL ve 0,25 mg GAE/ mL olarak tespit edildi.



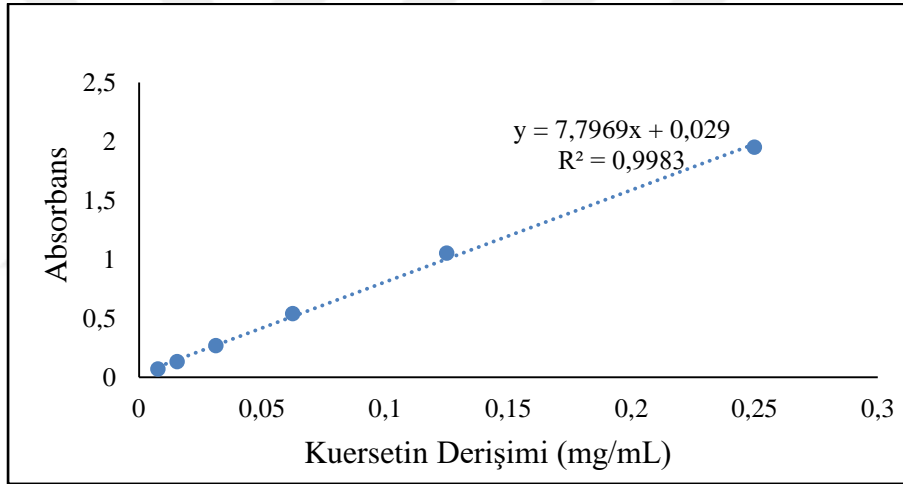
Şekil 22. Toplam polifenol tayini kalibrasyon grafiği

Tablo 22. Toplam polifenol verileri

Toplam Polifenol Miktarı			
Ham propolis örnekleri etanolik ekstraktlarımg GAE/g	Kayseri	GI- 1	40,91±3,2
	Beykoz	GI- 2	56,98±0,0
	Bilecik	GI- 3	137,60±2,06
	Sivas	GI- 4	152,99±1,90
	Balıkesir	GI- 5	42,73±0,15
	Demirköy	GI- 6	166,93±8,88
	Zonguldak	GI- 7	98,29±1,84
	Hemşin	GI- 8	17,76±0,82
	Kars	GI- 9	125,49±0,87
	Bitüm	GI- 10	16,13±0,35
	Yığılca	GI- 11	178,37±0,31
	Ardahan	GI- 12	116,37 ± 2,32
	Ağrı	GI- 13	57,87 ± 1,53
Ham propolis sulu ekstraktları mg GAE/g	Bilecik	GII- 1	0,09±0,01
	Zonguldak	GII- 2	0,20±0,02
	Beykoz	GII- 3	0,22±0,002
	Sulu 1	GII- 4	0,09±0,001
	Sulu 2	GII- 5	0,07±0,01
Ticari propolis etanolik ekst. mg GAE/mL	K.....i	GIII- 1	21,12±0,90
	Y.....z	GIII- 2	11,15±0,25
	K.....ı	GIII- 3	41,89±1,30
	K.....r	GIII- 4	58,70±1,09
	A.....a	GIII- 5	28,85±0,21
	H.....1	GIII- 6	77,68±6,34
	H.....e	GIII- 7	38,85±0,63
	D.....e	GIII- 8	11,47±0,01
	T.....t	GIII- 9	6,83±0,09
Ticari propolis sulu ekst. mg GAE/mL	S.....P	GIV- 1	0,25±0,01
	E.....r	GIV- 2	0,90±0,07
	A.....a	GIV- 3	3,40±0,32

3.2.6. Toplam Flavanoid Tayini

Toplam flavanoid madde miktarları kuersetin standardına göre tayin edildi. Farklı derişimlerde hazırlanan standart kuersetin çözeltilerinin 415 nm'deki absorbans değerleri elde edilerek standart çalışma grafiği oluşturuldu. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1g ham propolis ve 1 mL propolis ekstraktının içerdđi mg cinsinden toplam flavanoid madde miktarı bellirlendi, propolislerin toplam flavanoid madde miktarları Tablo 23' deki gibidir. Toplam flavanoid miktarı belirlenen gruplara göre değişiklik göstermektedir. Grup I, II, III ve IV için en yüksek değerler sırasıyla; 51,23 mg KE/g , 0,02 mg KE/g, 23,33 mg KE/ mL ve 0,75 mg KE/ mL olarak tespit edilirken en düşük değerler 1,24 mg KE/g, 0,01 mg KE/g, 1,24 mg KE/ mL ve 0,01 mg KE/ mL olarak tespit edildi.



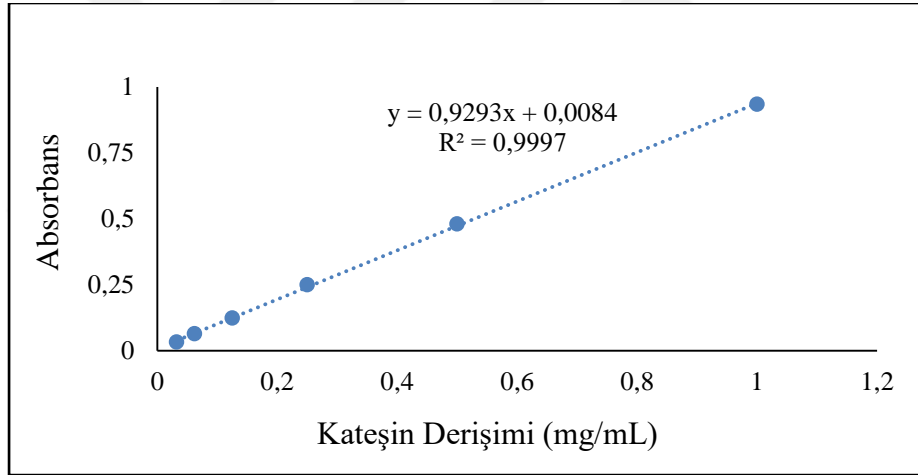
Şekil 23. Toplam flavanoid tayini kalibrasyon grafiği

Tablo 23. Toplam falavanoid verileri

Toplam Flavanoid Miktarı			
Ham propolis örnekleri etanolik ekstraktlarımg KE/g	Kayseri	GI- 1	11,10±0,02
	Beykoz	GI- 2	10,21±0,1
	Bilecik	GI- 3	17,37±0,25
	Sivas	GI- 4	30,48±0,57
	Balıkesir	GI- 5	10,53±0,26
	Demirköy	GI- 6	51,23±0,63
	Zonguldak	GI- 7	22,57±0,05
	Hemşin	GI- 8	1,24±0,04
	Kars	GI- 9	28,20±0,12
	Bitüm	GI- 10	2,13±0,01
	Yığılca	GI- 11	20,20±0,57
	Ardahan	GI- 12	5,13 ± 0,08
	Ağrı	GI- 13	3,18 ± 0,03
Ham propolis sulu ekstraktları mg KE/g	Bilecik	GII- 1	0,001±0,00
	Zonguldak	GII- 2	0,01±0,00
	Beykoz	GII- 3	0,01±0,00
	Sulu 1	GII- 4	0,02±0,00
	Sulu 2	GII- 5	0,01±0,00
Ticari propolis etanolik ekst. mg KE/mL	K.....i	GIII- 1	4,65±0,05
	Y.....z	GIII- 2	2,45±0,07
	K.....ı	GIII- 3	5,77±0,32
	K.....r	GIII- 4	1,24±0,03
	A.....a	GIII- 5	-
	H.....1	GIII- 6	23,33±0,23
	H.....e	GIII- 7	5,74±0,37
	D.....e	GIII- 8	2,01±0,02
	T.....t	GIII- 9	-
Ticari propolis sulu ekst. mg KE/mL	S.....P	GIV- 1	0,01±0,00
	E.....r	GIV- 2	0,04±0,00
	A.....a	GIV- 3	0,75±0,11

3.2.7. Kondanse Tanen Miktarı Tayini

Kondanse tanen miktarları kateşin standardına göre tayin edildi. Farklı derişimlerde hazırlanan standart kateşin çözeltilerinin 500 nm'deki absorbands değerleri elde edilerek standart çalışma grafiği oluşturuldu. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1g ham propolis ve 1 mL propolis ekstraktının içerdiği mg cinsinden kondanse tanen miktarı bellirlendi, propolislerin kondanse tanen miktarları Tablo 24' deki gibidir. Kondanse tanen miktarı belirlenen gruplara göre değişiklik göstermektedir. Grup I, II, III ve IV için en yüksek değerler sırasıyla; 8,47 mg KatE/g , 0,04 mg KatE /g ve 2,29 mg KatE / mL (Grup IV tanen miktarı tayin edilemedi) olarak tespit edilirken en düşük değerler 2,53 mg KatE /g, 0,02 mg KatE /g ve 0,11 mg KatE / mL (Grup IV tanen miktarı tayin edilemedi) olarak tespit edildi.



Şekil 24. Kondanse tanen miktarı tayini kalibrasyon grafiği

Tablo 24. Kondanse tanen miktarı verileri

Kondanse Tanen Miktarı			
Ham propolis örnekleri etanolik ekstraktları mg KatE/g	Kayseri	GI- 1	3,96±0,22
	Beykoz	GI- 2	8,47±0,63
	Bilecik	GI- 3	7,65±0,39
	Sivas	GI- 4	4,21±0,30
	Balıkesir	GI- 5	5,66±0,01
	Demirköy	GI- 6	2,53±0,06
	Zonguldak	GI- 7	5,92±0,05
	Hemşin	GI- 8	4,53±0,39
	Kars	GI- 9	5,80±0,13
	Bıttım	GI- 10	7,15±0,06
	Yığılca	GI- 11	4,80±0,18
	Ardahan	GI- 12	4,27 ± 0,13
	Ağrı	GI- 13	2,73 ± 0,05
Ham propolis sulu ekstraktları mg KatE/g	Bilecik	GII- 1	T.E.
	Zonguldak	GII- 2	T.E.
	Beykoz	GII- 3	T.E.
	Sulu 1	GII- 4	0,02±0,00
	Sulu 2	GII- 5	0,04±00
Ticari propolis etanolik ekst. mg KE/mL	K.....i	GIII- 1	0,36±0,05
	Y.....z	GIII- 2	0,34±0,04
	K.....1	GIII- 3	2,29±0,18
	K.....r	GIII- 4	1,14±0,00
	A.....a	GIII- 5	0,57±0,13
	H.....1	GIII- 6	2,21±1,30
	H.....e	GIII- 7	0,90±0,28
	D.....e	GIII- 8	0,11±0,01
	T.....t	GIII- 9	0,29±0,03
Ticari propolis sulu ekst. mg KatE/mL	S.....P	GIV- 1	T.E.
	E.....r	GIV- 2	T.E.
	A.....a	GIV- 3	T.E.

T.E: Tayin edilemedi

Elde edilen veriler bir tabloda birleştirildiğinde;

Tablo 25. Numuneler ait elde edilen veriler

		Briks	% Balsam	Toplam Polifenol Miktarı	Toplam Flavanoid Miktarı	Kondanse Tanen Miktarı	% Vaks	% Kuru Madde Miktarı	% Nem Miktarı
Kayseri	GI- 1	21,5	28,7±0,05	40,91±3,2	11,10±0,02	3,96±0,22	5,2± 0,02	97,15 ± 0,04	2,73 ± 0,2
Beykoz	GI- 2	22	33,3±0,08	56,98±0,0	10,21±0,1	8,47±0,63	5,0± 0,06	95,18 ± 0,07	4,82 ± 0,07
Bilecik	GI- 3	27,5	71,1±0,08	137,60±2,06	17,37±0,25	7,65±0,39	8,7± 0,02	92,61 ± 0,04	7,39 ± 0,04
Sivas	GI- 4	25,5	53,7 ± 0,2	152,99±1,90	30,48±0,57	4,21±0,30	4,8± 0,02	96,25 ± 0,05	3,74 ± 0,05
Balıkesir	GI- 5	21	23,6 ± 0,2	42,73±0,15	10,53±0,26	5,66±0,01	4,7± 0,03	98,86 ± 0,05	1,14 ± 0,05
Demirköy	GI- 6	26,5	65,5 ± 0,2	166,93±8,88	51,23±0,63	2,53±0,06	8,5± 0,02	90,55 ± 0,06	9,45 ± 0,06
Zonguldak	GI- 7	25	56,3 ± 0,1	98,29±1,84	22,57±0,05	5,92±0,05	9,8± 0,01	88,74 ± 0,03	11,26 ± 0,03
Hemşin	GI- 8	22,5	37,4 ± 0,1	17,76±0,82	1,24±0,04	4,53±0,39	6,6± 0,02	96,74 ± 0,05	3,26 ± 0,05
Kars	GI- 9	25	41,8 ± 0,2	125,49±0,87	28,20±0,12	5,80±0,13	1,4± 0,02	98,61 ± 0,01	1,39 ± 0,02
Bitüm	GI- 10	22,5	29,2 ± 0,08	10,58±0,35	1,46±0,01	7,15±0,06	1,70 ± ,03	94,83 ± 0,03	5,17 ± 0,03
Yığılca	GI- 11	23	51,2 ± 0,1	178,37±0,31	20,20±0,57	4,80±0,18	1,60 ± 0,02	92,24 ± 0,06	7,76 ± 0,06
Ardahan	GI- 12	20,5	42,8 ± 0,2	116,37±2,32	5,13 ± 0,08	4,27±0,13	4,45 ± 0,1	88,74 ± 0,02	11,26 ± 0,02
Ağrı	GI- 13	21,5	38,3 ± 0,1	57,87 ± 1,53	3,18 ± 0,03	2,73±0,05	2,01 ± 0,08	88,42 ± 0,05	11,58 ± 0,05
Bilecik	GII- 1	0	0,1 ± 0,01	0,09±0,01	0,001±0,00	T.E	-	-	-
Zonguldak	GII- 2	0	0,1 ± 0,01	0,20±0,02	0,01±0,00	T.E	-	-	-
Beykoz	GII- 3	0	0,1 ± 0,02	0,22±0,002	0,01±0,00	T.E	-	-	-
Sulu 1	GII- 4	0	0,5 ± 0,02	0,09±0,001	0,02±0,00	0,02±0,00	-	-	-
Sulu 2	GII- 5	0	0,6 ± 0,01	0,07±0,01	0,01±0,00	0,04±00	-	-	-
K.....i	GIII- 1	29	9,2 ± 0,08	21,12±0,90	4,65±0,05	0,36±0,05	-	-	-
Y.....z	GIII- 2	27	8,1 ± 0,2	11,15±0,25	2,45±0,07	0,34±0,04	-	-	-
K.....ı	GIII- 3	53	33,6±0,02	41,89±1,30	5,77±0,32	2,29±0,18	-	-	-
K.....r	GIII- 4	100	T.E	58,70±1,09	1,24±0,03	1,14±0,00	-	-	-
A.....a	GIII- 5	35	63,0 ± 0,1	28,85±0,21	T.E	0,57±0,13	-	-	-
H.....ı	GIII- 6	61	95,0±0,05	77,68±6,34	23,33±0,23	2,21±1,30	-	-	-
H.....e	GIII- 7	42	19,2 ± 0,2	38,85±0,63	5,74±0,37	0,90±0,28	-	-	-
D.....e	GIII- 8	36,5	32,1±0,05	11,47±0,01	2,01±0,02	0,11±0,01	-	-	-
T.....t	GIII- 9	0	34,8±0,05	6,83±0,09	T.E	0,29±0,03	-	-	-
S.....P	GIV- 1	0	0,1 ± 0,02	0,25±0,01	0,01±0,00	T.E	-	-	-
E.....r	GIV- 2	0	0,2 ± 0,02	0,90±0,07	0,04±0,00	T.E	-	-	-
A.....a	GIV- 3	37	T.E	3,40±0,32	0,75±0,11	T.E	-	-	-

T.E: Tayin edilemedi

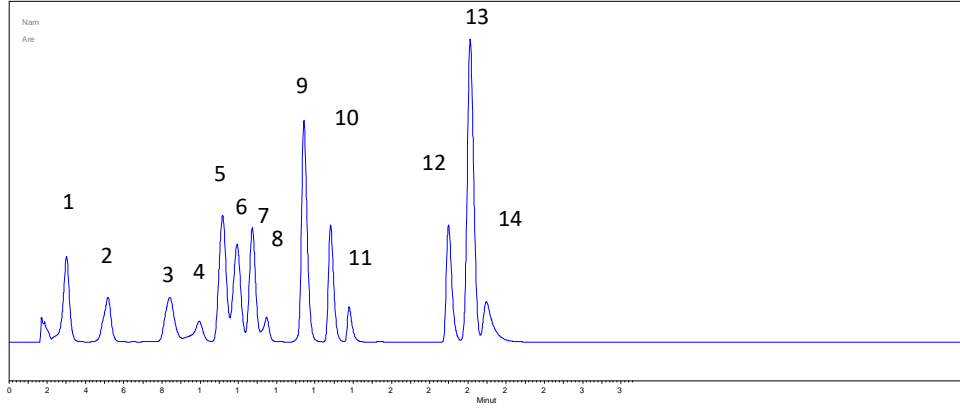
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde balsam miktarının toplam polifenol miktarı, toplam flavanoid miktarı ve kondanse tanen miktarı ile orantılı olduğu görülmektedir. Etanol kullanılarak hazırlanan ekstraktların Briks değerleri % 21 ile % 27,5 arasında değişiklik göstermektedir. Su kullanılarak hazırlanan ekstraktların nem oranı oldukça yüksek olduğundan Briks değerleri 0 olarak bulundu. Vaks miktarı ise %1,4 ile % 9,8 arasında değişiklik göstermektedir. Tablo 25' de gruplara ait veriler sunulmuştur.

3.2.8. FTIR Görüntüleri

Numuneler içerisinde rastgele seçilen ham propolis ekstraktı ve ticari propolis ekstraktlarının FT- IR görüntüleri Perkin Elmer, FT- IR 2000 model spektrofotometre cihazı kullanılarak elde edildi. Elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde propolis ekstraktı 3357, 2924, 2852 ve 1693-1000 cm^{-1} pikleri oldukça benzer olduğu görüldü. 3357 cm^{-1} fenolik bileşenlerin –OH grubuna, 2924 and 2852 cm^{-1} C-H vibrasyonuna, 1700-1000 cm^{-1} aromatik halka C=C, flavonoidlerin C=O, aminoasitlerin asimetrik N-H ve ester gruplarının –C-O- titreşimlerine ait olduğu söylenebilir (Oliveria 2016).

3.2.9. HPLC Fenolik Profil

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde ve on dört standarda göre yapılan fenolik bileşen analizi sonucu; kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, t-sinamik asit ve luteolinin her numunede olduğu; bu standartlar içerisinde ise luteolinin en yüksek miktarda bulunduğu tespit edildi.



Şekil 25. Standartlara ait HPLC fenolik bileşen kromatogramları 1.Gallik asit. 2.Protokatequikasit. 3. *p*-OH benzoik asit. 4. Kateşin. 5. Vanilik asit. 6. Kafeik asit. 7. Şiringik asit. 8. Epikateşin. 9. *p*-Kumarik asit. 10. Ferulik asit. 11. Rutin. 12. Daizein 13. *t*-Sinnamik asit.14. Luteolin

Tablo 26. Propolis fenolik bileşen profili

mg (fenolik bileşen)/ g numune														
	Gallik Asit	Protokatekük Asit	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	Kateşin	Vanilik Asit	Kafeik Asit	Şiringik Asit	Epikateşin	<i>p</i> -Kumarik Asit	Ferulik Asit	Rutin	Daidzein	<i>t</i> -sinnamik Asit	Luteolin
Grup I														
Kayseri	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	1,75	T.E.	T.E.	0,84	0,72	T.E.	T.E.	1,41	11,20
Beykoz	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2,75	T.E.	T.E.	0,71	0,83	8,30	T.E.	T.E.	1,83
Bilecik	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0,2	4,04	0,07	9,50	2,60	9,83	T.E.	T.E.	0,26	9,06
Sivas	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	7,33	0,20	T.E.	4,30	0,45	55,62	T.E.	0,36	32,28
Balikesir	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	5,00	T.E.	T.E.	T.E.	1,30	0,83	4,37	T.E.	1,85	12,00
Demirköy	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	8,86	0,40	T.E.	T.E.	1,08	1,31	T.E.	T.E.	1,07	10,80
Zonguldak	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3,01	T.E.	T.E.	6,27	1,60	2,38	T.E.	T.E.	0,28	3,53
Hemşin	0,24	0,05	T.E.	T.E.	T.E.	0,61	T.E.	T.E.	0,27	T.E.	T.E.	T.E.	0,01	1,03
Kars	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	7,00	T.E.	T.E.	1,65	0,80	19,55	T.E.	0,2	4,20
Bıttım	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0,61	T.E.	T.E.	0,89	0,52	0,63	T.E.	0,13	1,09
Yığılca	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	6,43	T.E.	T.E.	2,78	6,67	T.E.	T.E.	1,34	13,65
Ardahan	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3,12	0,16	T.E.	1,16	1,96	T.E.	T.E.	0,53	6,62
Ağrı	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2,94	0,27	T.E.	1,03	1,13	2,11	T.E.	0,32	2,47
Grup II														
Bilecik	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	1,14	T.E.	T.E.	0,7	1,94	0,1	T.E.	0,70	T.E.
Zonguldak	1,55	0,23	T.E.	0,6	T.E.	1,037	T.E.	T.E.	7,13	10,75	1,408	T.E.	4,80	T.E.
Beykoz	0,7	0,6	0,4	3,91	T.E.	4,981	T.E.	T.E.	8,00	9,11	3,289	T.E.	4,41	4,31

Tablo 26'nın devamı

Sulu 1	Numune yetersizliğinden analiz yapılamadı.													
Sulu 2	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	13,78	T.E.	T.E.	19,07	3,98	7,625	T.E.	T.E.	T.E.
Grup III														
K.....i	T.E.	T.E.	T.E.	0,45	8,86	T.E.	T.E.	6,11	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0,92	14,83
Y.....z	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0,15	6,65	T.E.	6,86	1,85	4,25	7,66	T.E.	0,73	15,44
K.....ı	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2,22	T.E.	T.E.	0,90	2,20	4,10	T.E.	0,20	9,58
K.....r	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	18,51	T.E.	1,11	1,18	T.E.	19,67	0,66	1,84	2,93
A.....a	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0,06	4,02	T.E.	0,30	1,41	0,73	11,12	T.E.	0,14	2,64
H.....r	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	4,11	0,11	3,00	1,63	2,85	8,71	T.E.	0,25	9,97
H.....e	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	4,90	T.E.	T.E.	1,87	1,25	7,60	T.E.	2,42	5,42
D.....e	0,005	0,07	T.E.	0,12	T.E.	0,01	0,20	0,10	0,63	0,10	0,12	0,20	0,02	0,42
Tablet	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	11,48	T.E.	5,51	5,87	4,16	19,92	T.E.	0,84	11,67
Grup IV														
S....p	Numune yapısından dolayı analiz yapılamadı.													
E.....r	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	44,47	T.E.	T.E.	30,181	10,27	258,0	T.E.	T.E.	T.E.
A.....a	Numune yapısından dolayı analiz yapılamadı.													

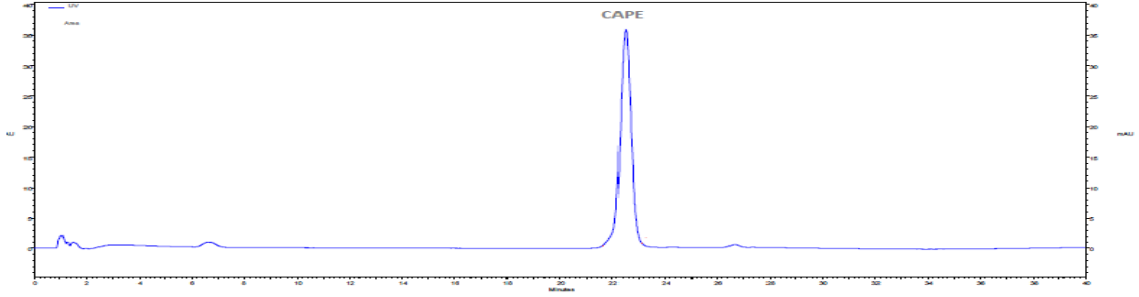
*Analiz sonuçları üç tekrarlı olarak elde edilmiş, standart sapma $< 0,01$ olduğu için tablo değerlerine yansıtılmamıştır.

T.E: Tayin edilemedi

Propolis ekstraktlarının standardizasyonu için yapılan bu çalışma sonucu elde edilen propolis fenolik bileşen profili Tablo 26’ da sunuldu.

3.2.10. Kafeik Asit Fenil Ester Miktarı Tayini

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde yapıldı. Şekil 26’ de CAPE’ ye ait kromatogramı göstermektedir.



Şekil 26. Kafeik asit fenil ester kromatogramı

Propolisin önemli bir belirteci olan CAPE’ nin kantitatif tayini sonucunda etil alkol kullanılarak hazırlanan numunelerde CAPE’ nin varlığı görülürken su ile hazırlanan numunelerde CAPE tespit edilemedi. Ticari olarak temin edilen numunelerde ise CAPE bazı numunelerde tespit edilirken bazılarında tespit edilemedi. CAPE ile tüm numunelerde bulunan kafeik asit miktarı arasında bir korelasyon olduğu tespit edildi.

Tablo 27. Numunelere ait CAPE verileri

Kafeik asit fenik ester (CAPE)			
Ham propolis etanolik eks. mg/g	Kayseri	GI- 1	1,54
	Beykoz	GI- 2	3,03
	Bilecik	GI- 3	1,76
	Sivas	GI- 4	13,35
	Balıkesir	GI- 5	2,18
	Demirköy	GI- 6	3,66
	Zonguldak	GI- 7	2,52
	Hemşin	GI- 8	0,27
	Kars	GI- 9	7,95
	Bitüm	GI- 10	0,41
	Yığılca	GI- 11	11,63
	Ardahan	GI- 12	6,61
	Ağrı	GI- 13	2,67
Ham sulu ekst. mg/g	Bilecik	GII- 1	T.E.
	Zonguldak	GII- 2	T.E.
	Beykoz	GII- 3	T.E.
	Sulu 1	GII- 4	T.E.
	Sulu 2	GII- 5	T.E.
Ticari etanolik propolis ekst. mg/mL	K.....i	GIII- 1	T.E.
	Y.....z	GIII- 2	5,64
	K.....1	GIII- 3	3,36
	K.....r	GIII- 4	3,66
	A.....a	GIII- 5	2,56
	H.....1	GIII- 6	2,36
	H.....e	GIII- 7	6,44
	T.....t	GIII- 9	3,21
	D.....e	GIII-10	2,66
	Ticari sulu propolis eks. mg/mL	S.....P	GIV- 1
E.....r		GIV- 2	T.E.
A.....a		GIV- 3	T.E.

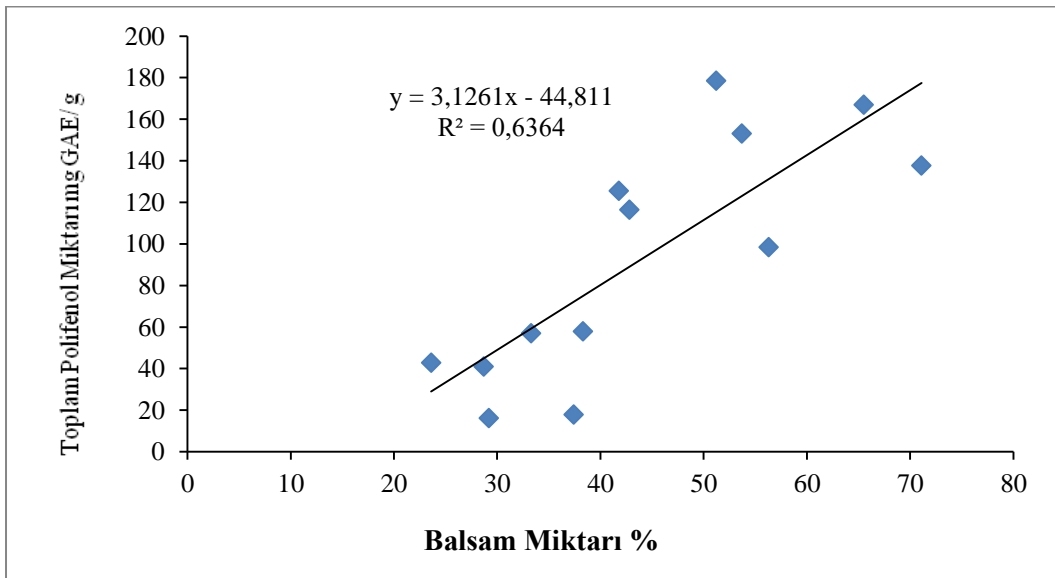
T.E: Tayin edilemedi

3.2.11. İstatistiki Veriler

Elde edilen analiz sonuçları arasındaki korelasyon incelendiğinde balsam miktarı, toplam polifenol miktarı, toplam flavonoid miktarı ve Briks değerleri arasında oldukça iyi bir oran olduğu görüldü (Tablo 28). Vaks miktarının ise balsam miktarı ile orantılı olduğu, kondanse tanen miktarının ise toplam flavonoid miktarı arasında bir oran olduğu görüldü. Ayrıca toplam polifenol ve toplam flavonoid madde miktarı arasında ortalama 5:1 (TP/TF) oranı olduğu tespit edildi. Balsam miktarı arttıkça; Briks değeri, toplam polifenol miktarı ve toplam flavonoid miktarı orantılı bir şekilde artmaktadır. Şekil 27' de balsam miktarı ile toplam polifenol miktarı dağılımı göstermektedir.

Tablo 28. Korelasyon katsayıları

	Briks	Balsam	TP	TF
Briks	1			
Balsam	0,85481	1		
TP	0,62613	0,79772	1	
TF	0,62613	0,79772	1	1



Şekil 27. Toplam polifenol miktarı ile balsam miktarı arasındaki korelasyon

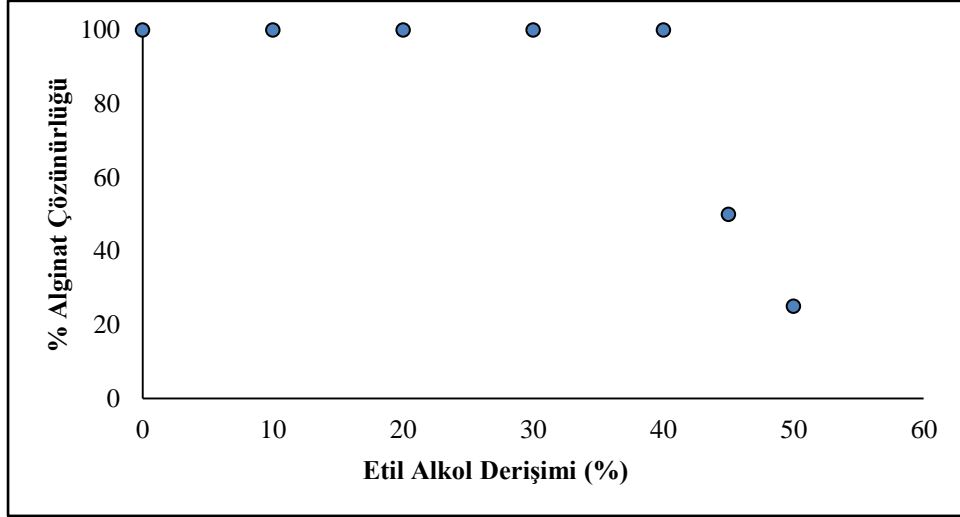
3.3. Enkapsülasyon Çalışmaları

3.3.1. Ekstraktların Hazırlanması

Alginat-propolis kapsüllerin elde edilmesi amacıyla etanolik propolis ekstraktı hazırlandı. Bu amaçla Artin ve Zonguldak illerinden ham propolis temin edildi. Eşit miktarda iki propolis örneği homojen bir şekilde karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 3,1518g hassas bir şekilde tartıldı. Bir beher içerisine alınan karışımın üzerine 15 mL mutlak etanol ilave edildi ve 24 saat boyunca, sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalandı. Süre sonunda elde edilen karışım Wattman 1 süzgeç kağıdı ile süzüldü ve ekstrakt hacmi 30 mL' ye tamamlandı. Kullanıma hazır hale getirilen ekstrakt +4 °C buzdolabında bekletildi.

3.3.2. Alginatın Alkol/Su Karışımında Çözünmesi

Propolis reçinemsî yapısından dolayı en iyi etil alkolde çözünmektedir. Kapsülasyon çalışmasında kullanılan iyonik jelasyon tekniği gereği biyopolimer ile aktif bileşenin homojen bir şekilde karıştırılabilmesi gerekmektedir. Suda çözünen alginat ile etil alkol içerisinde hazırlanmış olan propolis ekstraktı karıştırıldığında su ile etkileşen propolis ekstraktı çökmektedir. Bu nedenle alginatın etil alkol içerisindeki çözünürlüğü belirlendi. Yapılan literatür araştırmaları (McHuag 1988) ve laboratuvar uygulamaları sonucu alginatın mutlak etanol içerisinde çözünmediği, çöktüğü gözlemlendi. Bu amaçla %1' lik alginat değişik oranlarda etil alkol- su karışımı ile muamele edildi ve alginatın yapısını bozunmadan koruyabildiği en yüksek etil alkol-su karışım oranı belirlendi. Etil alkol miktarı %40' ın üzerine çıktığında alginat yapısında bozunma meydana geldiğinden %30' luk etil alkol- su karışımının alginat çözünürlüğü için uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 28. Alginatın etil alkoldeki çözünürlüğü

3.3.3. Alginat Propolis Kapsüllerin Hazırlanması

Alginat- propolis kapsülleri Abinden vd. (2011) belirtildiği metotta bazı değişiklikler yapılarak elde edildi. %1' lik alginat %30' luk (v/v) etil alkol ile çözüldü ve 2 mL propolis ekstraktı ile karıştırıldı. Elde edilen karışım bir şırınga yardımıyla 0,05 M CaCl₂ çözeltisi üzerine damlatıldı. Oluşan boncuklar sertleşmenin tamamlanabilmesi için 15 dk boyunca sabit hız altında karıştırılmaya devam edildi. Oluşan kapsüller Şekil 29' da görülmektedir.



Şekil 29. Alginat- propolis kapsüller

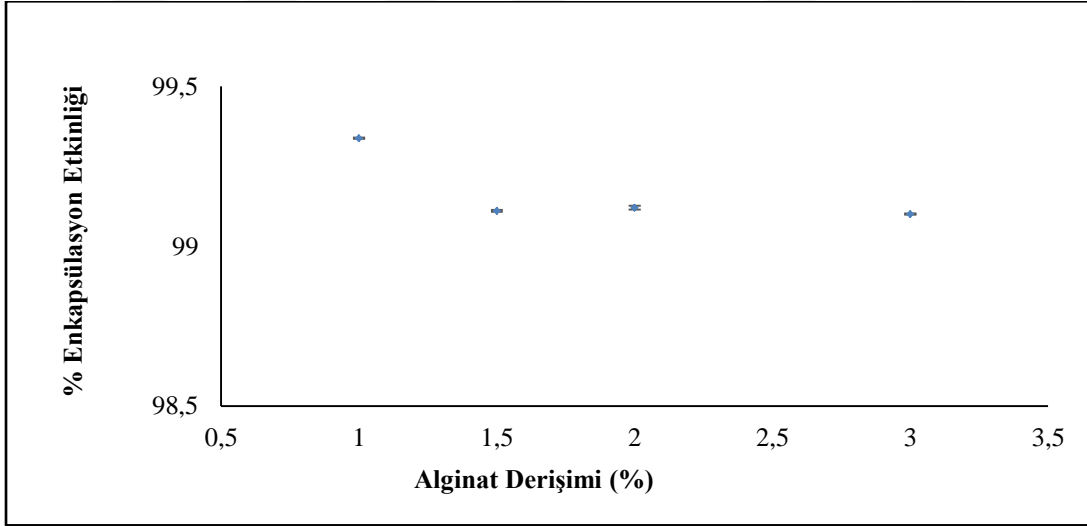
3.3.4. Alginat Konsantrasyonunun Etkisi

Elde edilen boncuklara alginat derişimin etkisinin belirlenebilmesi amacıyla %1- %3 arasında değişen derişimlerde alginat (%30' luk etil alkol çözültisi içerisinde) çözültileri hazırlandı ve 1 mL propolis ekstraktı ile homojen olarak karıştırıldı. Elde edilen karışımlardan belirtilen metot ile ayrı ayrı kapsüller elde edildi, süpernatant ve propolis ekstraktına toplam polifenol analizi yapılarak enkapsülasyon etkinliği hesaplandı. Enkapsülasyon etkinliği sonuçları birbirine oldukça yakın olmakla birlikte %1 alginat derişimi en iyi bağlanma oranına sahip olduğu görüldü. Alginat miktarı arttıkça boncukların oluşumu güçleşmekte ve maliyet oranı artmaktadır.

% Enkapsülasyon etkinliği = $\frac{A-B}{A} * 100$ eşitliğinden hesaplandı.

A: Propolis ekstraktı toplam polifenol miktarı (mg GAE/ mL)

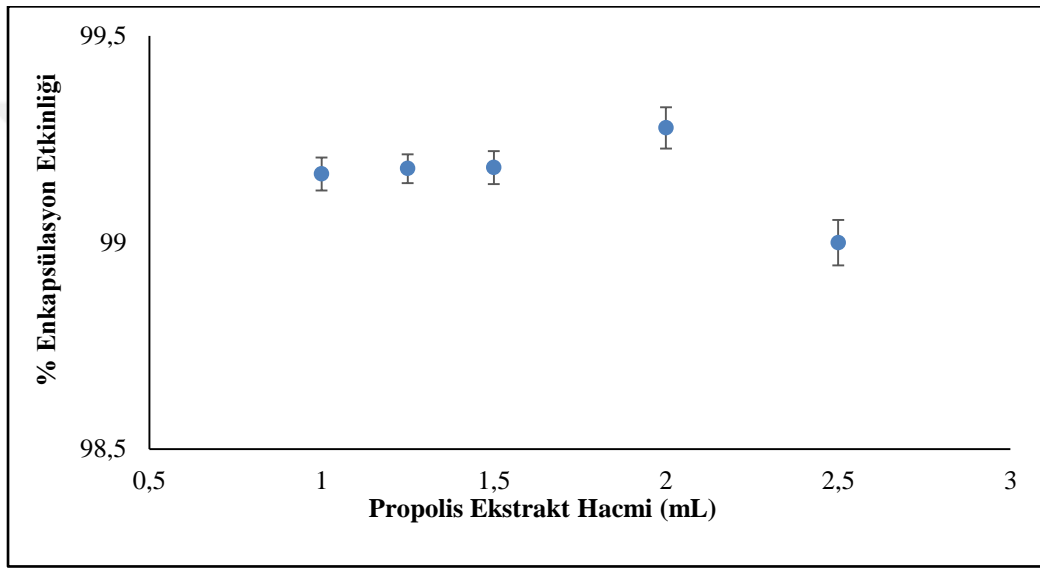
B: Süpernatant toplam polifenol miktarı (mg GAE/ mL)



Şekil 30. Alginat derişiminin enkapsülasyon etkinliğine etkisi

3.3.5. Propolis Ekstrakt Konsantrasyonunun Etkisi

Belirlenen alginat derişiminin kapsülleyebildiği en fazla propolis miktarını belirlemek amacıyla %1' lik alginat ile farklı miktarlarda (1-2,5 mL) propolis ekstraktı homojen olarak karıştırıldı ve boncuklar elde edildi. Propolis ekstrakt miktarı 2,5 mL olduğunda çözelti içerisindeki alkol oranı %44' e yükseldiğinden alginatın yapısında bozunma olduğu gözlemlendi.



Şekil 31. Propolis ekstrakt hacminin enkapsülasyon verimine etkisi

3.3.6. Alginat- Propolis Kapsüllerin Toplam Polifenol, Toplam Flavonoid, Kondanse Tanen ve Balsam Miktarlarının Belirlenmesi

Kapsüllerin eldesinde kullanılacak alginat miktarı ve propolis ekstrakt miktarı belirlendikten sonra elde edilen kapsüllerin kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla toplam polifenol Bölüm 2.3.6 belirtilği şekilde, toplam flavonoid Bölüm 2.3.7 belirtilği şekilde, kondanse tanen Bölüm 2.3.8 belirtilği şekilde ve balsam miktarları Bölüm 2.3.4.' te belirtilği şekilde belirlendi. Elde edilen değerler Tablo 29' da belirtildi.

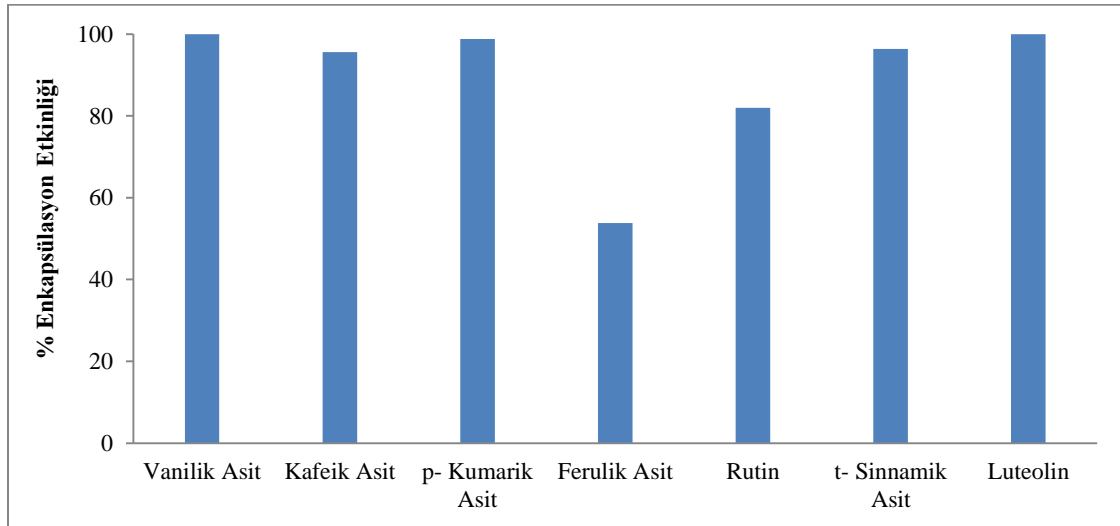
Tablo 29. Alginat- propolis kapsüllere ait elde edilen veriler

	Enkapsülasyon Etkinliği %	Toplam Polifenol mg GAE	Toplam Flavanoid mg KE	Kondanse Tanen mg KatE	Balsam %
Propolis ekstrakt	% 99,3	25.00± 0.1	4.80± 0.06	4.90±0.02	14.30± 0.2
Alginat- propolis Kapsüller		24.60±0.04	4.78± 0.002	4.80± 0.01	14.10± 0.2

3.3.7. HPLC-UV Fenolik İçerik Analizi

Elde edilen alginat- propolis kapsüllerin fenolik içerikleri HPLC- UV kullanılarak bölüm 2.4.3. belirtilği şekilde belirlendi. Bu amaçla propolis ekstraktı ve kapsülasyon sonunda kalan süpernatantın 14 standarda göre fenolik içerikleri belirlendi. Propolis ekstraktında vanilik asit, kafeik asit, p- kumarik asit, ferulik asit, rutin, t- sinnamik asit ve luteolin olduğu belirlendi. Yapılan analize ait kromatogramlar Ek-1 verildi.

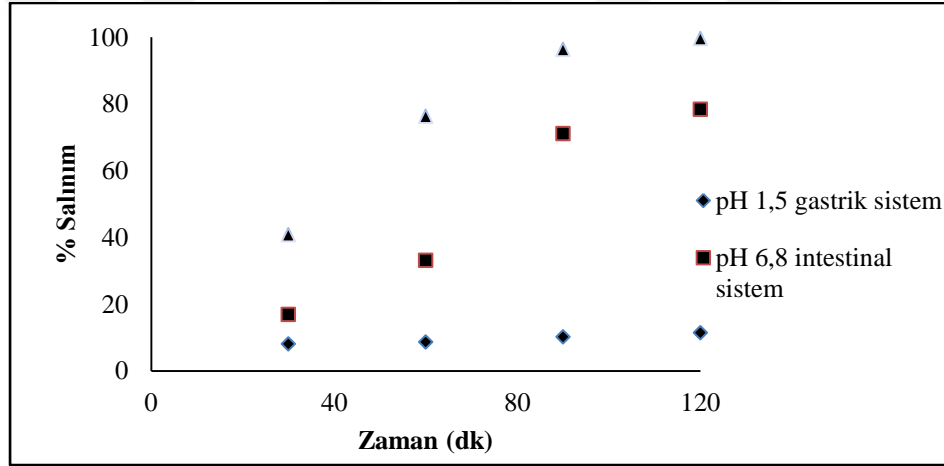
Kapsülasyon sonrası süpernatantta isekafeik asit, p- kumarik asit, ferulik asit, rutin ve t- sinnamik asit olduğu belirlendi. Enkapsülasyon etkinliği hesabı yapılarak bileşenlerin kapsüllere bağlanma oranları tespit edildi. Vanilik asit ve luteolin tamamen kapsüllenirken ferulik asitin %58' inin kapsüllenebildiği gözlemlendi.



Şekil 32. Fenolik bileşenlerin bağlanma oranları

3.3.8. Alginat- Propolis Kapsüllerin *in vitro* Sindirim Sistemi Salınım Özelliklerinin Değerlendirilmesi

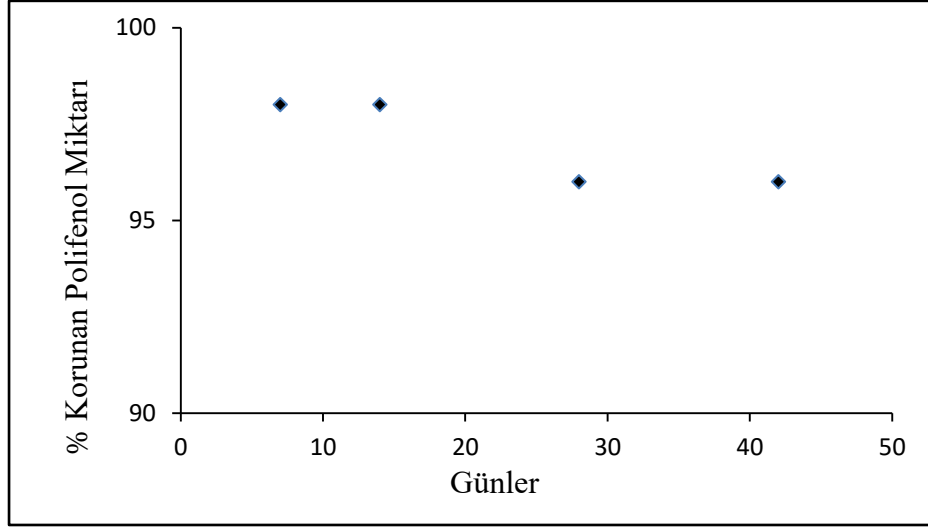
Elde edilen alginat- propolis kapsüllerin tüketim sonrasında sindirim sisteminin hangi bölgesinde ne kadar salınım yaptığını belirlemek amacıyla *in vitro* sindirim sistem ortamı oluşturuldu. Bu amaçla hazırlanan çözelti ortamlarına 0,1500g alginat- propolis kapsül ilave edildi ve belirli aralıklarla çözelti ortamından numune alındı. 2 saat sonunda pH 7,4 barsak ortamında kapsüllerin tamamen dağıldığı gözlemlendi. Mide şartlarında ise salınımın oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Ham propolis örneğinin aynı şartlar ve ortamlar altında salınım oranının ise kapsüllenen örneklerden oldukça düşük olduğu belirlendi.



Şekil 33. Alginat- propolis kapsüllerin *in vitro* salınım özellikleri

3.3.9. Elde edilen Propolis- Alginat Kapsüllerin Raf Ömrünün Belirlenmesi

Elde edilen propolis-alginat kapsüllerin raf ömrünü belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma neticesinde +4 °C' de saklanan kapsüllerden 7, 14, 28 ve 42 gün sonunda örnek alındı ve toplam polifenol analizi yapıldı. 42 gün sonunda kapsüllerin aktivitelerini % 96 oranında koruduğu tespit edildi.



Şekil 34. Alginat- propolis kapsüllerin raf ömrü

3.3.10. SEM Görüntüleri

SEM görüntüleri 15 kV altında ZEISS EVO LS 10 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapıldı. Kapsüllerin küresel, gözenekli ve pürüzlü olduğu görüldü.

Kapsül boyutları 500- 800 μm arasında değiştiği belirlendi. Elde edilen kapsül görüntüleri Ek-2 verildi.

3.3.11. FTIR Görüntüleri

FT- IR görüntüleri Perkin Elmer, FT- IR 2000 model spektrofotometre cihazı kullanılarak elde edildi. Elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde propolis ekstraktı ve alginat- propolis kapsül 3357, 2924, 2852 ve 1693-1000 cm^{-1} piklerinin oldukça benzer olduğu görüldü. 3357 cm^{-1} fenolik bileşenlerin -OH grubuna, 2924 and 2852 cm^{-1} C-H vibrasyonuna, 1700-1000 cm^{-1} aromatic halka C=C, flavonoidlerin C=O, aminoasitlerin asimetrik N-H ve ester gruplarının -C-O- titreşimlerine ait olduğu söylenebilir (Oliveria 2016). Elde edilen FT-IR spektrumları Ek-3 verildi.

4. TARTIŞMA

Arı tutkalı veya arı zankı olarak adlandırılan propolis, bal arılarının kovanlarını her türlü tehdit ve tehlikeye karşı korumak amacıyla kullandığı bitkisel ve hayvansal kökenli doğal bir karışımdır. Yüksek antimikrobiyal özelliğinden dolayı insanoğlu propolisi başlangıçta doğal bir antibiyotik olarak kullanmış, ancak daha sonraları propolisin yüksek antioksidan, antiinflammatuar, antitumoral ve immunoprotektif özelliklerinin ortaya çıkmasıyla propolis fitoterapi ve apiterapinin vazgeçilmez doğal ürünü haline gelmiştir (Bonhei 1994; Dias 2012; Bankova 2017).

Kovanlardan başlangıçta kazıntı ile elde edilen propolisin daha sonraları özel tuzaklarla toplanması kalitesini de artırdı. Günümüzde çok geniş kullanım alanı bulan propolis'in bileşimi ve biyolojik aktif değeri başta toplandığı bölgenin florası olmak üzere, toplanma zamanına, toplanış biçimine bağlı olarak değişim göstermektedir.

Propolis çok kompleks, reçinemsî bir macundur. Propolisin sudaki çözünürlüğü azdır ancak etanol, metanol gibi polaritesi sudan daha düşük olan çözücülerde yüksektir. %70'lik etanol propolis için en iyi çözücüdür. Ancak etanolün insan sağlığı üzerine olumsuz etkisi insanları su, zeytinyağı, gliserol, etilen glikol, lesitin gibi farklı çözücüler kullanılarak propolis ekstraktları hazırlamaya yöneltmiştir.

Piyasada çok değişik tarz ve konsantrasyonlarda hazırlanmış ticari propolis ekstraktları mevcuttur. Bunların standardize edilmesi acil olarak çözüm bekleyen sorunlardan biridir. Öte yandan diğer bir sorun ise apiterapötik uygulamalar için yöresel bazda kaliteli propolis örneklerinin belirlenmesi ve bu örneklerin hangi kalite parametrelerine göre belirlendiğinin tespit edilmesidir.

Türkiye bulunduğu coğrafik konumdan dolayı üç farklı iklim kuşağının hakim olduğu zengin bitki florası ile tüm dünyanın bal, polen, propolis ihtiyacını karşılayacak zengin potansiyele sahip bir ülkedir. Türkiye Çin' den sonra dünyada en fazla arı kovanına sahip olan ülkedir ve bal üretiminde 2. veya 3. sırada yer almaktadır. Ancak aynı şeyi propolis için söylemek mümkün değildir, çünkü arıcıların çok az bir kısmı (yaklaşık %5) propolisi toplamaktadır.

Dolayısıyla bu tezin planlanmasının temel amacı propolisle ilgili akıllardaki sorulara cevap bulabilmektir. Propolisle ilgili sorular ise;

- Türkiye propolis'i standardı oluşturulabilir mi?
- Bölgelere göre ham propolis bileşimlerinde değişiklikler nelerdir?
- Ticari propolis ekstraktlarında standardizasyon mümkün müdür?
- Ticari propolis ekstraktlarında bulunması gereken parametreler neler olmalıdır?
- Propolis'in mide ve barsaktaki çözünürlüğü nasıldır?
- Apiterapik değeri yüksek propolis nasıl olmalıdır?
- Etanolik propolis ekstraktlarının alkolden uzaklaştırılarak tüketilebilir propolis kapsülleri oluşturmak mümkün müdür?
- Propolis kapsüllerinin propolis tutma kapasiteleri nedir ve mide ile barsak ortamlarındaki salınım oranları nedir?

Tüm bu sorulara cevap bulunabilmesi temel amaçlarımız olup, çalışma bulgularının literatürdeki boşluğu doldurması hedeflenmektedir.

Propolisin bileşimi elde edildiği coğrafi bölge özelliklerine göre, toplama biçimine göre, toplandığı mevsime göre ve üretildiği arı ırkına göre değişiklik gösterdiği birçok çalışmada bildirilmektedir (Mohamed vd, 2016; Skalicka-Woźniak vd., 2017). Genel olarak ham propolisin %40-50 reçine, %20-30 vaks, %5-10 uçucu yağlar, %1-5 polen, çeşitli fenolik bileşikler ve organik asitlerden oluştuğu çalışmalarda belirtilse de dünya genelinde böyle bir oran vermek, yani standart özelliklere sahip ham propolis elde etmek tam olarak mümkün değildir (Bankova, 2005). Yapılan birçok araştırma ve çalışmada aynı kovandan, aynı yöntemle, farklı mevsimde elde edilen propolislerin dahi, biyoaktif bileşen oranlarının birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir (Kumazawa 2004; Bakchiche 2017).

Son 15 yılda biyolojik değeri yüksek olduğu bilinen ve yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitumoral özellikler sergileyen propolis'in etken maddelerini polifenoller ve uçucu bileşenler oluşturmaktadır (Bonhei 1994; Dias 2012; Bankova 2017).

Kemoterapötik ilaçların yaygın kullanımı sentetik ilaçlara olan duyarsızlaşma reaksiyonları ile birlikte, bu ilaçların sayısız yan etkileri insanoğlunu daha doğal ve geleneksel ilaçları kullanmaya yöneltmektedir. Hatta bu konularda yeni bilim dalları olan fitoterapi ve apiterapi üzerine çalışmalar artmakta, geleneksel ve tamamlayıcı tıp merkezleri kurulmaktadır. Fakat doğal ürünlerin kullanımının yaygınlaşması ve özellikle arı ürünlerine olan ilginin giderek artması beraberinde bazı sorunları da getirmiştir. Ham

propolisin reçinemi yapısından dolayı doğrudan tüketilmesi pek mümkün değildir. Bu nedenle su, etanol, gliserol, DMSO, gibi çözücüler kullanılarak propolis ekstraktları hazırlanmakta ve tüketime sunulmaktadır. İçeriği belirli olmayan, içerisinde propolis olup olmadığı belirli olmayan ve hangi çözücü kullanılarak hangi koşullar altında hazırlandığı belli olmayan propolis ekstraktları etiketsiz ve kontrolsüz bir şekilde piyasaya arz edilmektedir. Bu durum insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır.

Ham propolisin standardize edilmesi, yani aynı özelliklere sahip propolislerin üretilmesi mümkün değildir, ancak hazırlanan ekstraktların standardize edilmesi mümkündür. Bu amaçla çalışmamızda ham ve ticari olarak elde edilen propolis örneklerinin Briks değerleri, % Balsam değerleri, % Vaks değerleri ile birlikte etken madde miktarları değişik testler ile tayin edildi. Bu amaçla, ham ve ticari örnekleri toplam polifenol miktarları, toplam flavanoid madde miktarları ve fenolik profilleri tespit edilerek standart oluşturulması amaçlandı. Elde edilen veriler arasında istatistiki değerlendirmeler ve karşılaştırmalar ile korelasyonlar araştırıldı.

Balsam miktarı ile Briks, toplam polifenol ve toplam flavanoid miktarları arasında bir pozitif korelasyon olduğu görüldü. Hazırlanan etanolik propolis ekstraktlarının Briks değerlerinin 20-27,5 arasında değiştiği, ticari olarak temin edilen numunelerin Briks değerlerinin ise oldukça yüksek olduğu görüldü. Yapılan balsam analizi esnasında aynı şartlar altında çözücüyü uzaklaştırılan bazı numunelerin çözücülerinin tam olarak uzaklaştırılmadığı tespit edildi. Bir kalite parametresi olarak değerlendirilen balsamın kullanılan çözücünün ağırlığı nedeniyle yüksek çıkması ticari numuneler açısından yanıltıcı olabilmektedir. Ayrıca hazırlanan ekstraktların mum içeriğinin ortalama % 5,0 olduğu tespit edildi. Kaliteli bir propolisin yüksek balsam miktarına ve düşük vaks miktarına sahip olması gerektiği literatür çalışmalarında belirtilmektedir (Wosky ve Slantino, 1997). Yapılan fenolik bileşen belirleme analizleri ile propolis için belirteç diyebileceğimiz kafeik asit fenil ester (CAPE), luteolin, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit miktarları tayin edildi.

Türkiye' nin farklı bölge ve illerinden toplanan ham propolis örneklerinin, toplam polifenol miktarının 16,13 mg GAE/g ile 178,37 mg GAE/g arasında değişim gösterdiği, farklı ticari firmaya ait olan ticari propolis ekstraktlarının toplam polifenol miktarının ise 6,83 mg GAE/mL ile 77,68 mg GAE/mL arasında değiştiği tespit edildi. Propolisin önemli kalite parametrelerinden biri olan toplam flavanoid miktarı ise yapılan çalışmada ham propolis örnekleri için 1,24 mg KE/g ile 28,20 mg KE/g arasında

değişirken bazı ticari örneklerde flavanoid miktarı tespit edilemedi. Ticari örnekler içerisinde tespit edilen en büyük değer 23,33 mg KE/mL' dir. Yapılan fenolik içerik belirleme analizlerinde luteolin, p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit ve t-sinamik asitin ham ve ticari örneklerde major bileşen olduğu tespit edildi. Ham propolis örneklerin de sırası ile luteolin, p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit ve t-sinamik asitin miktarı 1,03-32,28 mg/g, 0,27- 5,87 mg/g, 0,80- 9,83 mg/g, 0,41- 11,48 mg/g ve 0,01- 1,41 mg/g olarak belirlenirken ticari örneklerde ise 0,42- 15,44 mg/mL, 0,63- 1,87 mg/mL, 0,1- 4,25 mg/mL, 0,01- 18,51 mg/mL ve 0,02- 2,42 mg/mL olarak belirlendi.

Bonhei vd. (1994) 15 propolis örneğinin aktif bileşenlerini belirlemiş ve propolisin bakteriyostatik etkilerini araştırmışlardır. Numuneler Brezilya, Çin ve Uruguay' dan temin edilmiştir. Alkolik Uruguay propolis ekstraktında vaks bulunamazken diğer bölgeler için % 2,40 ile % 30,60 arasında vaks miktarının değiştiği belirtilmiştir. Toplam polifenol miktarı % 10,10 ile % 28,60 arasında değiştiği, toplam flavanoid madde miktarının ise % 3,00 ile % 6,60 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Fenolik içeriği belirlenen numunelerin sadece bir tanesinde gallik asit tayin edildiği belirtilirken vanilin, ferulik asit, rutin ve kuersetine neredeyse tüm numunelerde rastlanılmıştır. Woisky vd. (1998) Brezilya'dan temin ettiği numunelerin bazı parametrelerini çalışmıştır. Toplam polifenol miktarı % 8,8 ile 13,7 arasında değiştiği rapor edilirken; flavonoid miktarının minimum % 0,35 maksimum % 2,7 olduğunu, Bulgaristan propolisinin kimyasal bileşenlerini belirlemek ve basit bir standardizasyon çalışması yapmak amacıyla Bulgaristanın farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam polifenol ve flavonoid miktarını belirlenmiş ve toplam polifenol miktarının % 11,2- 41,9 ve toplam flavonoid miktarının ise % 2,9-13,5 değiştiğini beyan etmişlerdir (Bankova vd. 2017). Cunha vd. (2004) Brezilya propolis ekstraktları fenolik bileşenlerini araştırmıştır. Farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak metotların fenolik içeriğe etkisi araştırılmıştır. Propolis ekstraktı Sokslet ile, ayrı ayrı 10 gün ve 20 gün boyunca alkolle muamele edilmiştir. Sırasıyla polifenol değerleri % 13,34, 11,50 ve 11,87 bulunmuştur. Fenolik içerikler % 30,50 ve % 70'lik alkol çözeltileri kullanılarak ekstaksiyon sonucu elde edilmiştir. Alkol oranı arttıkça bileşenlerin miktarının da arttığı rapor edilmiştir. Kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit in tayini yapılan tüm numunelerde olduğu beyan edilmiştir. Miguel ve ekibi (2010) Portekiz propolis numunelerinin antioksidan özelliklerini araştırmıştır. % 70' lik etanol çözeltisi kullanılarak hazırlanan örneklerin toplam polifenol değerlerini 6,27 mg GAE/mL flavonoid miktarını ise 1,30 mg KE/mL olarak bulduklarını beyan etmişlerdir.

Estevinho vd. (2008) Portekiz numunelerinin toplam polifenol ve antioksidan özelliklerini belirlemişlerdir. Portekiz'in iki farklı bölgesinden elde edilen örneklerin toplam polifenol miktarları arasında oldukça fark olduğunu beyan etmişlerdir. Bölge 1 de 329 mg GAE/g bölge 2 ise 151 mg GAE/g toplam polifenol içerdiği rapor edilmiştir. Cezayir' e ait propolis örneklerinin toplam polifenol, toplam flavonoid ve antioksidan özelliklerini belirlemişlerdir (Bakchiche vd. 2017). Propolis'in toplam polifenolün 2385 mg GAE/100g olarak toplam flavonoid miktarını ise 379 mg RE/100g olduğunu beyan etmişlerdir. Japonya'nın değişik bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin antioksidan özelliklerini belirlemişlerdir (Kumazawa vd. 2004). Bu özelliklerin bölgeden bölgeye değiştiğini vurgulayarak toplam polifenol özelliğinin 61-432 mg GAE/g arasında toplam flavonoid miktarının ise 18-113 mg KE/g arasında değiştiğini belirtmiştir. 14 standart kullanılarak fenolik içerik belirlenmiştir. Numunelerin yarısından fazlasında kafeik asit ve p-kumarik asite rastlanıldığı beyan edilmiştir. Kore'den elde edilen propolislerin antioksidan özelliklerini belirlemiştir (Ahn vd. 2013). 18 örnek için yapılan analizler içerisinde toplam polifenol miktarının 135-293 mg GAE/g arasında toplam flavonoid miktarının ise 36-108 mg KE/g arasında değiştiğini belirtmiştir. 18 standart kullanılarak yapılan fenolik içerik analizi neticesinde kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asitin birçok numunede olduğunu elde ettikleri sonuçlar göstermiştir. Juszczak vd. (2015). Polonya' nın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin antioksidan özelliklerini belirlemişlerdir. Toplam polifenol miktarının 150,05- 197,14 mg GAE/g toplam flavonoid miktarının 35,64– 62,04 mg KE/g arasında değiştiğini beyan etmişlerdir. Yapılan fenolik içerik belirleme çalışmaları neticesinde p-kumarik asidin en yüksek oranda bulunduğunu belirtmişlerdir. Khacha-ananda ve ekibi (2013) iki farklı ekstraksiyon metodu kullanarak propolis örneklerinin aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Alkol ile muamele sonucu elde edilen toplam polifenol miktarı 17,2 mg GAE/g toplam flavonoid miktarı ise 18,6 mg KE/g olduğu rapor edilmiştir. Yunanistan'dan temin edilen propolis örneklerinin fenolik kompozisyonu belirlemiş ve antioksidan aktivite tayinini yapılmıştır (Lagouri vd. 2014). Toplam polifenol miktarı 77,6 mg GAE/g toplam flavonoid miktarı ise 54,5 mg KE/g olarak bulunmuştur. Örnekte kafeik asit, kafeik asit fenil ester, ferulik asit, p-kumarik asit, kuersetin ve luteolinin majör bileşenler olarak tespit edilmiştir. Malezya'dan temin edilen propolis örneklerinin sulu ve etanolik ekstraktlarını hazırlanmış ve hazırlanan örneklerin antioksidan özelliklerini karşılaştırılmıştır (Usman vd. (2016). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde toplam polifenol özellikleri sulu örnek için 119 mg GAE/g etanolik

örnek için 646,7 mg GAE/g toplam flavonoid sulu örnek için 87,6 mg KE/g etanolik örnek için ise 209,8 mg KE/g olduğu belirtilmiştir. Cezayir' in farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin antioksidan özellikleri dönüşümlü voltametre tekniği kullanarak tayin edilmiş, numunelerin toplam polifenol özelliklerini Folin metodu kullanarak belirlenmiştir (Rebai vd. 2014).Yapılan analizler sonucu bölge 1 için toplam polifenol miktarı 493,5 mg GAE/100g,bölge 2 için 1423,3 mg GAE/g olduğu beyan edilmiştir. Cezayir' in farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin antioksidan kapasitesini elektrokimyasal teknikler kullanarak tayin edilmiştir (Belfar vd. 2015). Toplam polifenol ve toplam flavonoid miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Toplam polifenol miktarı 81-262,3 mg GAE/100 g arasında toplam flavonoid miktarının ise 19,6- 210,9 mg KE/100 g arasında değiştiği rapor edilmiştir. Brezilya propolisi içerisinde bulunan Artepillin C miktarını ve antioksidan özelliklerini tayin edilmiştir (Kanazawa vd. 2004). *p*-kumarik asit ve sinamik asit miktarı 24 mmol/100 g propolis olarak belirlenmiştir. Stan vd. (2011). propolis standardizasyonu için kalite kontrol parametrelerini belirlemeye çalıştıklarını beyan etmişlerdir. Romanya'dan temin edilen örneklerin toplam polifenol miktarı % 28 ve toplam flavonoid miktarını % 9 olarak bulunduğu beyan edilmiştir. Alencar vd. (2007) Brezilya kırmızı propolisinin biyolojik aktivitesini incelemişlerdir. Toplam polifenol miktarını 232 mg GAE/g toplam flavonoid miktarını ise 43 mg KE/g olarak belirlemişlerdir. Kuersetin, ferulik asit ve daidzeinin hazırlanan etanolik ekstrakta bulunduğunu rapor etmişlerdir. Hazırlanan Irak bölgesine ait etanolik ekstraktların kanserler üzerine etkisini araştırılmıştır (Naama vd. 2010). HPLC ile 9 bileşen tayin edebildiklerini beyan etmişlerdir. Alkol ile 7 gün muamele sonucu 21,56 mg GAE/g toplam polifenol olduğunu görmüşlerdir. Kafeik asit, *p*-kumarik asit tayin edebildikleri fenolik bileşenler içerisinde yer almaktadır. İran propolisinin antimikrobiyal özellikleri ve fenolik bileşimini tayin etmek istemişlerdir. Toplam polifenol miktarını % 36 toplam flavonoid miktarını ise % 7 olarak bulmuşlardır Yaghoubi vd. (2007). Kafeik asitin İran propolisi major bileşenlerinden biri olduğunu vurgulamışlardır. Etiyop' yanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam polifenol miktarını belirlemiş ve antioksidan özelliklerini irdelemişlerdir (Atlabachew vd. 2015) Yapılan çalışmaya göre toplam polifenol miktarı ortalama 617 mg GAE/g toplam flavanoid miktarı ise ortalama 224 mg KE/g olarak tespit edilmiştir. Cezayir propolis ekstraktları hazırlanışına çözücünün etkisi, antioksidan ve toplam polifenol miktarı arasındaki korelasyonu belirlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır (Narimane vd. 2017). Elde edilen örneklerin toplam polifenol

miktarının 0,81- 9,97 mg GAE/g arasında değiştiğini toplam flavanoid miktarının ise 0,57- 3,53 mg KE/g arasında değiştiğini beyan etmişlerdir. Kafeik asit, rutin, gallik asit ve ferulik asidin Cezayir propolisi major bileşenlerinden olduğu vurgulanmıştır.

Romanya propolisinde bulunan kafeik asit fenil ester miktarını belirlemek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada toplam polifenol miktarını 73,66 mg GAE/g toplam flavanoid miktarını 38,96 mg KE/g olduğunu belirtilmiştir (Bobış vd. 2014). CAPE miktarının 0,86- 3,87 mg/g arasında değiştiği rapor edilirken CAPE ve krisin arasında bir korelasyon olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Romanya propolisinin kafeik asit, p- kumarik asit ve ferulik asit bileşenlerini de içerdiği vurgulanmıştır.

Konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar değerlendirildiğinde propolis bileşenin, ekstrakt hazırlanışının, propolisin farklı bölgelerden elde edilişi gibi parametrelerin farklı olmasından dolayı farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Fakat bu duruma rağmen yapılan bütün çalışmalarda propolisin antimikrobiyal, antitümoral, antiviral, vb. zellikleri vurgulanmıştır. Son derece kıymetli olan bu arı ürününün ticarileştirilmesi esnasında oluşan sorunlara çözüm bulmak amacıyla yapmış olduğumuz bu çalışma neticesinde Türkiye propolislerinin toplam polifenol miktarının ve toplam flavanoid madde miktarının literatür ile uyumlu olduğu görüldü.

Ayrıca yapılan fenolik içerik belirleme analizleri sonucu hazırlanan tüm örneklerde kafeik asit, p- kumarik asit, ferulik asit, t- sennamik asit ve luteolin olduğu görüldü. Elde edilen bileşenlerin literatür verileri ile uyumlu olduğu belirlendi (Vlaine vd., 2017; Uzel vd., 2005; Juszcak vd., 2015; Aliyazıcıoğlu vd., 2013).

Eski ađlardan beri geleneksel ve tamamlayıcı tıp alanında, enfeksiyonlara karşı özellikle de mumyalamada kullanılmakta olan propolisin antikanser etki göstermesine neden olan major biyoaktif bileşenin kafeik asit fenil ester olduğu 1980'li yıllarda tespit edilmiştir (Watson, 2009). CAPE' nin güçlü antikansorejen etkisinin tepsinin ardından CAPE sentetik olarak, enzimatik reaksiyonlar (Widjaja vd., 2008) ile elde edilmiş, propolis içerisinde bulunan CAPE' nin çeşitli kanser türleri üzerine etkisi araştırılmıştır (Murtaza vd., 2015; Maruta vd., 2008; Coral vd., 2012; Kabała-Dzik vd., 2017; Tang vd., 2017; Biray vd., 2006).

Farklı coğrafik bölgelere ait olan propolis rneklerinin CAPE miktarları belirlenmiştir. Tablo 30' da farklı bölgelere ait olan propolis rneklerinin CAPE miktarları belirtilmiştir.

Tablo 30. Farklı ülkelere ait propolislerin CAPE miktarı

Ülke	CAPE miktarı (ortalama)
Yeni Zelanda	% 6,5
Çin	% 2,9
İtalya	% 1,2
Avusturalya	% 0,4
Hollanda	% 0,4
Brezilya, Mısır, Hindistan	Tayin edilemedi.

Brezilya green ve red olarak adlandırılan propolis örneklerinde CAPE bulunmadığı fakat antikanserojen etkisi CAPE kadar yüksek olan Artepillin C bileşenini içerdiği rapor edilmiştir (Watson, 2009). CAPE' nin daha çok ılıman bölgelerden (Avrupa, Batı Asya, Çin, Kore ve Japonya) elde edilen propolisler de yüksek olduğu, poplar (kavak) tipi propolislerin CAPE açısından zengin olduğu rapor edilmiştir (Watson, 2009).

İlman bölge kuşağında bulunan Türkiye' de poplar tip propolis hakimdir. Farklı bölgelerden topladığımız propolis ham örneklerinin CAPE miktarları 0,27-13,35 mg/g aralığında ticari örneklerin CAPE miktarının ise 2,36-6,44 mg/g arasında değiştiği tespit edildi. CAPE miktarı ile kafeik asit miktarı arasında bir ilişki olduğu tespit edildi. Kafeik asit varlığı tespit edilen her numunede kafeik asit fenil esteri olduğu da tespit edildi.

Balsam miktarı ve vaks miktarı propolis için diğer kalite parametrelerindedir. Etanolde çözünen kısım olarak tanımlanan balsam miktarı arttıkça propolisin kalitesi artmaktadır denilmektedir. Vaks miktarı ile balsam miktarı arasında ters bir oran bulunmaktadır. Vaks miktarı arttıkça ham propolis içerisinde bulunun bal mumu miktarının arttığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Türkiye ham propolislerinin ortalama vaks değeri % 5 olarak tespit edilirken balsam miktarının % 23,6 ile % 71,1 arasında değiştiği tespit edildi. Ticari örneklerin koyu ve partiküllü yapılarından dolayı vaks analizi yapılamazken örneklerde kullanılan çözücülerin farklı olması ve evaporasyon sonrası kalıntı bırakmalarından dolayı balsam miktarının yükseldiği tespit edildi.

Bankova vd. (2017) Bulgaristan' ın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. Etanolde çözünen kısım olarak ifade edilen balsam miktarı %33 ile % 88 arasında değiştiği belirtilmektedir.

İspanyadan toplanan propolis örneklerinin bazı değerlerini belirlenmiştir (Bonhevie vd. 2011). Bu çalışmaya göre balsam değeri %52,5-76,2 arasında değişirken vaks değeri

ise % 1,8 ile 27,7 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Farklı Portekiz propolis örneklerinin bazı kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirlemek istenmiştir(Dias vd. 2012). Bu amaçla yapılan çalışmalar sonucunda örneklere ait vaks miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar % 4,8- % 16,0 aralığında değiştiği rapor edilmiştir. Custodio vd. (2003) propolis vaksı ile petek vaksını karşılaştıran bir çalışma yapmıştır. Bu amaçla 41 Brezilya propolisi ile 9 petek vaksı analiz edilmiştir. Propolis vaksında alkanlar, alkenler, alkadienler, monoesterler, diesterler, aromatik esterler, ketonlar ve yağ asitleri olduğu vurgulanmıştır. Değişen arı ırkı ve floradan dolayı numuneler arası vaks bileşiminin değiştiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada propolise ait fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlemişlerdir (Feas vd. 2014). Yapılan alışma sonucu propolis içeriğindeki vaks miktarının % 9,9 ile 11,6 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Brezilya'dan elde edilen propolis örneklerinin vaks bileşenlerini belirlemiştir. Bu vaksların petek mumlarına benzer olduğunu alifatik bileşenler, hidrokarbonlar, esterler ve serbest yağ asitleri açısından zengin olduğunu belirtilmiştir (Negri vd. 2000). Monoesterlerin propolis vaksının ana bileşeni olduğunu vurgulanmıştır. Negri vd. (1988) 23 propolis numunesinde vaks analizi yapmıştır. Brezilya' nın değişik bölgelerinden toplanan örneklerde % 4,1 ile % 16,4 arasında değişen vaks oranları tespit edilmiştir. Bu vaksların çoğunun monoesterlerden oluştuğu vurgulanmıştır. Başka bir araştırma da Vaks oranının ticari numunelerde % 25' ten fazla olmaması gerektiğini vurgulamıştır (Nicodemo vd. 2012). Negri vd. (2000) Brezilya' nın farklı bölgelerine ait propolis örneklerinin vaks miktarları tespit edilmiştir. Bu çalışmada % 1,5 ile % 19,3 arasında değişen vaks miktarları tespit edilmiştir. Ham propolis örneklerinden elde edilen ekstraktlar ile ticari olarak temin edilen örneklerin balsam ve vaks miktarları sırasıyla % 23,6- 71,1 ve % 1,4- 9,8 arasında değiştiği belirlendi. Elde edilen sonuçların yukarıda bahsi geçen literatür verileri ile oldukça uyumlu olduğu görüldü. Vaks miktarının % 4,6 ile % 7,8 arasında değiştiği bir başka çalışmada beyan edilmiştir (Stan vd. 2011). Romanya propolisinin vaks miktarının ortalama % 35 olduğunu belirtilmiştir. Elde edilen balsam ve vaks miktarı verilerinin literatür ile uyumlu olduğu görüldü.

Kondanse tanenler (proantosiyanidinler) bir grup polihidroksi flavan-3-ol oligameri veya polimerinin flavanol grupları ile C-C bağı yaparak oluşurlar. Kondanse tanenler çoklu fenolik hidroksil grupları nedeniyle proteinlerle, metal iyonlarıyla ve polisakkarit gibi diğer makromoleküller ile bağ yapma eğilimindedir (Pell vd., 2001). Literatürde propolisin polifenol özellikleri ile ilgili birçok çalışma mevcutken antimikrobiyal, antiinflamatuvar,

antiallerjenik, antioksidan ve antihelminitik özellikleri bulunan kondanse tanenler ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır.

Çalışmamızda Türkiye'nin değişik illerinden toplanan ham propolis örneklerinin ve farklı üreticilere ait ticari propolis örneklerinin kondanse tanen miktarı belirlendi. Ham propolis örneklerinin kondanse tanen miktarları 2,53-8,47 mg KE/g arasında değişirken ticari propolis örneklerinin kondanse tanen miktarlarının 0,11- 2,29 mg KE/mL arasında değiştiği tespit edildi. Propolisin kondanse tanen içerip içermediğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada Brezilya'nın değişik bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin kondanse tanen miktarlarının % 0,6- 4,8 arasında değiştiği belirtilmiştir (Mayworm vd. 2014). Elde ettiğimiz sonuçların bu çalışma verileri ile uyumlu olduğu görüldü. Kondanse tanen miktarının propolis için bir kalite parametresi olması gerekmektedir.

Bir çözelti içerisinde çözülmüş olan maddenin miktarı bilinmiyorsa maddenin kırılma indisini bularak miktarını tayin etmek mümkündür. Kırılma indisi maddenin fiziksel özelliğidir ve her maddenin kendine özgü bir kırılma indeksi vardır. Refraktometreler çözelti içerisindeki madde miktarını ve kırılma indeksini ölçmeye yarar. Maddenin diğer fiziksel özellikleri ile birlikte değerlendirilmesi gereken kırılma indisi ve refraktif indeks değerleri ile çözelti içerisindeki maddenin ne olduğunu belirlenmektedir. Refraktometrelerin kuru madde çözelgesi 20 °C' deki sakkaroz çözeltilerine göre ayarlanmıştır. Bu nedenle elde edilen Briks değerlerinin % çözünür kuru madde miktarı sakkaroz cinsinden ifade edilmektedir.

Propolis ekstraktları için kalite parametrelerinden biri olan toplam çözünen kuru madde miktarının Briks değeri belirlenerek ifade edilmesi mümkündür (Cardoso vd., 2016; Sánchez-González vd., 2011). Çalışmamızda ham propolisler kullanılarak hazırlanan propolis ekstratlarının Briks değerleri 20-27,5 Briks arasında değişirken ticari numunelerin Briks değerlerinin içerdikleri safsızlıklar veya çözünürlüğü etkileyen farklı çözücüler nedeniyle oldukça değişken olduğu tespit edildi. Cardoso ve ekibi (2016) hazırladıkları propolis ekstraktlarının Briks değerini 25,9 Briks bulurken, Sánchez-González ve ekibi (2011) ekstraktların Briks değerini 18,5-20 Briks arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Elde edilen verilerin literatür verileriyle uyumlu olduğu tespit edildi.

Uçucu maddelerden arındırılmış kuru kalıntı olarak da ifade edilen kuru madde miktarı tayini ile birlikte Türkiye' nin değişik illerinden toplanan propolis örneklerinin nem miktarları ve kuru madde miktarları belirlendi. Ham propolis örneklerinin kuru madde miktarının % 88,43 ile % 98,86 arasında değiştiği tespit edildi. Nem miktarlarının ise %

1,14 ile % 11,57 arasında değiştiği belirlendi. Woisky ve Salatino (1997) yaptıkları çalışmada propolis örneklerinin kuru madde miktarının % 90,2- 94,2 arasında değiştiğini nem miktarının %10 ve üstü olamayacağını vurgulamışlardır.

Piyasaya sürülen propolis ekstraktlarının içeriğinin bilinmemesi ve kullanılan çözücülerin olumsuz etkileri nedeniyle su bazlı ekstraktlar hazırlanmaktadır. Yaptığımız alışma bulguları değerlendirildiğinde sulu propolis ekstraktların biyolojik aktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu soruna çözüm olarak alkol bağımsız tüketebilir mikro kapsüller elde edilmesi tasarlanmıştır.

Son yıllarda gıda sektöründe enkapsülasyon teknikleri kullanılarak ürünlerin elde edilmesi, depolama sürelerinin uzatılması vb. alışmalar artan bir ivme kazanmıştır. Biyouyumlu polimerler ya da biyopolimerle kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Fakat propolisin kullanılması ile yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Propolis reçinemi yapısından dolayı en iyi alkolde çözünmektedir. Çalışmamızda alkol ile muamele edilen propolisin aktif bileşenlerinin alkol fazına geçmesi sağlanıldıktan sonra kapsülleme işlemi yapıldı. Elde edilen kapsüllerin etüvde kurutulması ile alkol bağımsız tüketebilir propolisli kapsüller elde edildi. İyonik jelasyon tekniğini kullandığımız çalışmamız farklı bağlayıcı çözücüler ve ajanlar içermemesi, kullanılan biyopolimerin ucuz ve biyouyumlu olması, ekstra bir cihaz kullanımını gerektirmemesi ve yüksek kapsülasyon verimi elde edilmesini sağlamasından dolayı diğer metotlara göre avantajlıdır.

Propolis içeren etil selüloz mikrokapsülleri bir çalışmada hazırlamış olup emülsiyon tekniği kullanılarak hazırlanan kapsüllerin boyutları ortalama 85,8 mikrometre olarak belirtilmiştir (Avano vd. 2008). Favaro-Trindade vd. (2011)Kapsllenme etkinliği % 62,99 olarak beyan edilmiştir. Pektin ve soya proteinine kompleks koaservasyon tekniği vasıtasıyla propolis kapsllemişlerdir. Kapsllenme etkinliğini % 72,01 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. Propolis ekstraktlarının poli (epsilon/kaprolakton) ile emülsiyon tekniğini kullanarak kapsülleri elde edilmiştir (Duran vd. 2007). Kapsül boyutlarını oldukça küçük elde etmelerine rağmen kapsülleme etkinliğini % 25 olarak bulmuşlardır. Propolisin ticari olarak satılan bir kapsülleme ajanına sprey kurutma metodu kullanarak kapsüllerini elde edilmiş ve kapsüllerin et ürünlerindeki mikrobiyal bozunmaya etkisi incelenmiştir (Capes vd. 2017). Kapsülasyon etkinliği % 76 olarak rapor edilmiş ve kapsül içerisinde en çok kumarik asit ve epikateşinin bulunduğu belirtilmiştir. Endonezya propolisini kazein miseller ile kapsllemişlerdir. Elde edilen kapsüllerin mikro ve nano boyutlu olduğu beyan

edilmiştir (Sahlan vd. 2013). Kapsülasyon etkinliği toplam flavanoidler için % 94 toplam polifenol miktarı için ise % 36 olarak bulunmuştur. Chang vd (2014) propolis flavanoidlerini suda çözünür olan polietilen glikol (PEG) ile karbon dioksit basınçlı bir sistem altında çözücü uçurulmasıyla kapsüllemişlerdir. Flavanoidlerin % 97 sinin kapsüllendiği beyan edilmiştir. Kapsül boyutlarının 81 mikron olduğu belirtilmiştir. Hazırlanan propolis ekstraktlarının sprey kurutma metodu kullanılarak jelatin ve mannitol ile kapsülasyonu yapılmıştır (Gremiao vd. 2003). Kapsülleme etkinliği mannitol kullanıldığında % 41 mannitol kullanılmadığında ise % 39 olarak bulunmuştur. Mannitol varlığı kapsülleme etkinliğini düşürmüş fakat kapsül boyutunu da düşürmüştür. Favaro-Trindade vd. (2011) Alkol bağımsız toz propolis elde edebilmek amacıyla sprey kurutma metodunu kullanmışlardır. Bu amaçla cihazın sıcaklık değerlerini en az fenolik kaybı olacak şekilde optimize etmişlerdir. % 30 oranında fenolik bileşenlerde kayıp olduğu rapor edilmiştir. Arabik gum ve nişasta kullanarak elde ettikleri propolis kapsüllerin etkilerini araştırılmıştır (Favaro-Trindade vd. 2013). Sprey kurutma tekniği kullanılmıştır. Kapsül boyutlarının 15-24 mikron arasında değiştiği belirtilmiştir. Bağlanma etkisinin % 85 olduğu belirtilirken ortalama % 3 fenolik bileşen kaybı olduğu vurgulanmıştır. Propolis kapsülleri elde ederek kapsüllerin balık raf ömrü üzerine etkilerini araştırılmıştır (Spinelli vd. 2014). Sprey kurutma metodunun kullanıldığı bu çalışmada enkapsülant olarak Arabic gum ve ticari olarak temin edilebilen kapsül kullanılmıştır. Elde edilen kapsüllerden % 5 oranında balık numunelerine ilave edilmiş ve raf ömrünün arttığı belirtilmiştir. Çözücü evaporasyon tekniği kullanarak propolisin nano kapsüllerini elde edilmiştir (Hasan vd. 2014). Enkapsülant olarak maltodekstrin kullanılmıştır. Elde edilen kapsüllerin boyutlarının 175 nm olduğu belirtilmektedir. Beta siklodekstrin kullanarak propolis ekstraktlarını kapsüllenilmiştir (Kalogeropoulos vd. 2009). Kapsülleme etkinliği % 9-24 arasında değiştiği belirtilmiştir. Propolis ekstraktı su kullanılarak hazırlandığı için ekstrakt içerisinde bulunan aktif bileşenlerin miktarının düşük olduğu belirtilmiştir. Sinamik asit, ferulik asit ve vanilik asidin kapsülleme oranın diğer bileşenlere göre daha yüksek olduğu beyan edilmiştir. Propolis ekstraktlarının alginat ve jelatin enkapsülantı kullanarak kompleks koaservasyon metodu ile kapsüllerini elde edilmiştir (Onbas vd. (2016). Kapsül boyutlarının 22-36 mikron arasında değiştiği ve kapsülleme etkinliğinin % 98,77 olarak bulunduğu belirtilmiştir. Kalsiyum alginat-kitosan kullanarak propolis ekstraktları kapsüllenmişlerdir (Guo vd. 2016). Kapsül boyutlarının 265 nm olduğunu belirtilmiş,

kapsülasyon etkinliğinin % 72 olduğunu ifade edilmiştir. Aktif bileşenlerin kapsül içerisinde korunumunun yüksek olduğu beyan edilmiştir.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalar ile yaptığımız çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; diğer tekniklere göre biyopolimer olarak alginatın kullanılması ve iyonik jelasyon tekniğinin kullanılması ile elde edilen alginat propolis kapsüllerin kapsülleme veriminin % 99,3 olduğu ve bu değer diğer tekniklere göre oldukça yüksek bir değer olduğu görüldü. Kullanılan tekniğe de bağlı olarak kapsül boyutunun değişmesi nedeniyle en küçük kapsül boyutunun 480 µm olduğu görüldü. Kapsül boyutlarının literatürde belirtilen değerler ile uyumlu olduğu ve elde edilen kapsüllerin biyobileşenleri koruma açısından oldukça dayanıklı olduğu görüldü. Fenolik bileşenlerin alginat ile kapsüllendiği çalışmalarında 30 gün boyunca +4 °C' de saklanan kapsüllerin süre sonunda tüm aktivitelerini koruduklarını beyan etmişlerdir (Arriola vd. 2016). Çalışmamızda elde edildikten sonra +4 °C' de saklanan alginat- propolis kapsüllerin 42 gün sonunda aktivitelerini % 96 oranında koruduğu tespit edildi. 176 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilen propolis- alginat kapsüllerin ise aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybettiği tespit edildi. Elde edilen bu sonucun literatür verileri ile uyumlu olduğu görüldü.

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışma neticesinde elde edilen verilerin literatür verileriyle kıyaslanması neticesinde;

- Propolisin kimyasal bileşiminin elde edildiği bölgeye göre oldukça değişken olduğu,
- Standart ham propolis üretilmesinin mümkün olmadığı fakat ekstraktları halinde tüketilen propolisin ticarileştirilmesi esnasında bir standardının olması gerektiği ve bu standardı oluşturmanın mümkün olduğu,
- Ticari propolis ekstraktlarının toplam polifenol, toplam flavanoid, balsam, vaks, Briks değerlerinin belirli bir aralık içerisinde olması gerektiği,
- Propolisin fenolik içeriği belirlendiğinde numunenin propolis olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla; kafeik asit ve türevleri; ferulik asit ve türevleri; p-kumarik asit ve türevleri; sinamik asit ve türevleri gibi belirlenen bileşenlerden en az üç tanesinin olması gerektiği,
- Tüketimi zor, mide ve barsaktaki çözünürlüğü oldukça düşük bu nedenle biyoyararlılığı zayıf olan ham propolisin, ekstraktları hazırlandıktan sonra biyoyumlu/ biyopolimerler ile kapsüllendikten sonra tüketilmesinin mümkün olduğu,
- Hazırlanan kapsüller içerisinde çözücü bulunmadığından, çözücülerin insan sağlığına olan zararlı etkilerini ortadan kaldırmanın mümkün olduğu,
- Hazırlanan kapsüllerin içerdiği aktif bileşen miktarı ve türü belirlenebilir bu nedenle içeriği belirli doz ayarlaması yapılmış kapsüller elde etmek mümkün olduğu görüldü.

6. ÖNERİLER

Türkiye ham propolisinin bir profilini çıkarmayı, piyasaya sürülen propolis ekstraktlarının standardizasyon şartlarını belirlemeyi ve çözücü bağımsız tüketilebilir propolis kapsülleri elde edilmesi hedeflenen çalışmamızda 13 farklı ile ve 12 farklı firmaya ait propolis örneği kullanıldı.

Çalışmamız esnasında, Türkiye’ de bulunan arıcıların propolis hakkında olan yetersiz bilgileri, bal hasadı sonrası propolisi kazıyıp çöpe atmaları vb. sebeplerden dolayı ham propolis temininde güçlükler yaşandı. Bu nedenle propolisin önemi, toplanma biçimleri gibi konularda arıcılar bilgilendirilmeli ve bilinçlenmeleri sağlanmalıdır.

Fitoterapi ve apiterapinin öneminin artması ile birlikte apitrörapik ve fitoterapik ürün kullanımı da artmıştır. Piyasada bulunan propolis içeriği, hazırlanışı, kullanılan çözücünün belirli olmadığı ticari ürünler halk tarafından bilinçsizce kullanılmaktadır. Etanolik propolis ekstraktı olduğu beyan edilen bir örneğin birinden günde 10 damla kullanılması A satıcısı tarafından önerilirken; B satıcısı diğer örneği günde 20 damla olarak önermekte ya da aynı ürünü farklı satıcılar farklı tüketim miktarlarında önermektedir. Bu sorunun önüne geçilebilmesi amacıyla piyasaya sürülen ekstraktların üzerinde son tüketim tarihi, fenolik içerik bilgileri, toplam polifenol veya toplam flavanoid miktarları gibi bilgilerin yer almalı; mümkünse detaylı bir prospektüsü oluşturulmalıdır.

Etanolik propolis ekstraktı kalite parametreleri Tablo 31’ de belirtildiği şekli ile düzenlenmelidir.

Tablo 31. Propolis kalite parametreleri

Kalite Parametresi		
% Kuru madde miktarı	% 94 ± 3,8	Ham Propolis İçin
% Nem Miktarı	% 6 ± 3,8	Ham Propolis İçin
% Balsam Miktarı	% 45 ± 14,6	Ham Propolis İçin
% Vaks Miktarı	% 5 ± 2,8	Ham Propolis İçin
Briks Değeri	23 ± 2,3	Etanolik Propolis Ekstraktı İçin
Toplam Polifenol Miktarı	% 10 ± 5,7	Ham Propolis İçin
Toplam Flavanoid Miktarı	% 2 ± 1,4	Ham Propolis İçin
Kondanse Tanen Miktarı	% 1 ± 0,5	Ham Propolis İçin
Kafeik Asit Fenil Ester Miktarı	% 1 ± 0,5	Ham Propolis İçin
Kafeik asit, ferulik asit, luteolin, t-sinamik asit, p-kumarik asit türevlerinden en az üçünü	% 2 ± 1,0	Ham Propolis İçin

Uçucu bileşenler propolis örnekleri için tazeliğin bir göstergesi olmakla birlikte propolis örneklerinin antioksidan, antikansorejen, antiinflamuar etkilerini olumlu yönde etkilemektedir. Bu bileşenlerin gaz kromatografisi (GC) veya gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GC/MS) gibi ileri analitik cihazlar kullanılarak aydınlatılmalı, bitki florası-propolis arasındaki ilişki ortaya konulmalıdır.

pH bağımlı *in vitro* ortamda salınım çalışmaları yapılan propolis-alginat kapsüllerin *in vivo* hayvan deneyleri ile biyoyararlılıkları belirlenmelidir. Elde edilen çözücü bağımsız kapsüllerin belirli bir hedef noktaya varabilme kapasiteleri, etkin dozunun ne olduğu ve etkinin geçici olup olmaması durumları değerlendirilerek, ilaç olarak kullanılma kapasiteleri belirlenmelidir.



7. KAYNAKLAR

- Abinden, P., Deladino, L., Navarro, A., Amaly, J. ve Martino, M. 2011. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems, Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers, Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 1, 80-87.
- Açar, Ö.Ç., Kırış, S., Filer, F. ve Avcı, A. 2013. Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi, T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi
- Ahmet, F. 2008. Toxicological Effects of Ethanol on Human Health, Critical Reviews in Toxicology, 25 (4), 347-367.
- 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, 1383-1392.
- Alencar, S. M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Neto- Costa, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L. ve Ikegaki, M. 2007. Chemical Composition and Biological Activity of a new type of Brazilian Propolis: Red propolis, Journal of Ethnopharmacology, 113, 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, 277-287.
- Al-Ghamdi, A., Bayaqoob, N., Ahmed, I., Rushdi, A., Alattal, Y., Simoneit, B., El-Mubarak, A. ve Al-Mutlaq, K. 2017. Chemical Compositions and Characteristics of Organic Compounds in Propolis From Yemen, Saudi Journal of Biological Sciences, 24, 1094-1103.
- Anonim, 2012. Refraktometre, Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara.
- Arriola, A.D.N., Medeiros, P.M., Prudencio, E.S., Müller, C.M.O., Mello, R. D. ve Amboni, C. 2016. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content, Food Bioscience, 13, 32-40.
- Avanço, G.B. ve Bruschi, M.L. 2008. Preparation and Characterisation of Ethylcellulose Microparticle Containing Propolis, Rev. Cienc. Basica Apl, 29, 2, 129-135.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, Journal of Ethnopharmacology, 100, 114-117.

- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. ve Marekov, N.1987. A GC/MS Study of the Propolis Phenolic Constituents, Z. Naturforsch, 42, 147–151.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S. 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, And Potential Uses, Food Chemistry, 99, 191–203.
- Belfar, M.L., Lanez, T., Rebiai, A. ve Ghiaba, Z. 2015. Evaluation of Antioxidant Capacity of propolis Collected in Various Areas of Algeria Using Electrochemical Techniques, Int. J. Electrochem. Sci., 10,9641-9651.
- Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K. ve Agarwala, D. D. 2015. A Review: HPLC Method Development and Validation, International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 5, 4, 76-81.
- Bhat, S.D. ve Aminabhavi, T. M. 2007. Pervaporation Separation Using Sodium Alginate and Its Modified Membranes—A Review, Separation & Purification Reviews, 36, 203–229.
- Biray, Ç., Gündüz, C., Yılmaz, B., Şahin, F. ve Topçuoğlu, N. 2006. The Evaluation of Cytotoxic And Apoptotic Effect Of Propolis And Its Extracts Caffeic Acid Phenethyl Ester And Cinnamic Acid In Human Acute T Cell Lymphoblastic Leukemia Cell Line (CCRF-CEM), Ege Tıp Dergisi, 45, 2, 83-92.
- Bogdanov, S.2016. Beeswax: Production, Properties Composition and Control, Beeswax Book, Bölüm 1
- Bonvehi, J.S., Coll, F.V. ve Jorda, R.E. 1994. The Composition Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics, JAOCS, 71, 5, 18-25.
- Bonvehi, J. S. ve Gutierrez, A. L. 2011.Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain), Am. Oil Chem. Soc., 88, 1387–1395.
- Bonvehf, J. ve Coll, F. V. 1994.Phenolic Composition of Propolis from China and from South America, Z. Naturforsch, 49, 712 -718.
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Luchesi, M.B. ve Gremiao, M.P.D. 2003. Gelatin Microparticles Containing Propolis Obtained by Spray-drying Technique: Preparation and Characterization, Int. J. Pharmaceutics, 264, 45-55.
- C. de Groot, A. 2013. Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects, Dermatitis, 24, 6-15.
- Can, Z., Yıldız, O., Şahin, H., Turumtay, E., Silici, S. ve Kolaylı, S. 2015. An Investigation of Turkish Honeys, Their physico-chemical Properties, Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles, Food Chemistry, 180, 133–141.

- Cardoso, J.G., Ioriob, N.L.P., Rodrigues, L.F., Courib, M.L.B., Farah, A., Maia, L.C. ve Antonio, A.G.2016. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and Streptococcus mutans' count in dental biofilm, Archives of Oral Biology, 65, 77–81.
- Chang, H., Wang, Y., Yin, X., Liu, X. ve Xuan, H. 2017. Ethanol Extract of Propolis and Its Constituent Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibit Breast Cancer Cells Proliferation in Inflammatory Microenvironment By Inhibiting TLR4 Signal Pathway and Inducing Apoptosis and Autophagy, BMC Complementary and Alternative Medicine,17,471-479.
- Cho, E., Deuk Lee, J. ve Hyun Cho, S. 2011. Systemic Contact Dermatitis from Propolis Ingestion Systemic Contact Dermatitis from Propolis, Ingestion Ann Dermatol, 23, 1-10.
- Choi, S.J., Shimomura, K., Kumazawa, S. ve Ahn, M. R. 2013. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Propolis from Diverse Geographic Regions in Korea, Food Sci. Technol. Res., 19, 2, 211-222.
- Cui, K., Lu, W., Zhu, L., Shen, X. veHuang, J. 2013. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), An Active Component of Propolis, Inhibits Helicobacter Pylori Peptide Deformylase Activity, Biochemical and Biophysical Research Communications, 435, 289–294.
- Cunha, I.B. S., Sawaya, A. C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S. ve Carvalho, P. 2004. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts, J. Braz. Chem. Soc., 15, 6, 964-970.
- Custodio, A., Ferreira, M., Negri, G. ve Salatino, A. 2003. Clustering of Comb and Propolis Waxes Based on the Distribution of Aliphatic Constituents, J. Braz. Chem. Soc.,14, 3, 354-357.
- De Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A. ve Sandra, P. 2004. Development of A Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, Chromatographia, 59, 403–409.
- Deladino, L., Anbinder, P.S.,Navarro, A.S. ve Martino, M. N. 2008. Encapsulation of Natural Antioxidants Extracted from *Ilex paraguariensis*, Carbohydrate Polymers, 71, 126–134.
- Demestre, M.,Messerli, S. M., Celli, N., Shahhossini, M., Kluwe,L., Mautner,V. ve Maruta, H. 2008. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human Neurofibromatosis (NF) Tumor Xenografts in Mice, Phytother. Res., 23, 2, 226-30.
- Desai, K. G. vePark, H.J. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients Drying Technology, 23, 1361–1394.

- Duran, N., Marcato, P.D., Buffo, C.M.S., De Azevedo, M.M. M. ve Esposito, E. 2007. Poly(ϵ -caprolactone)/Propolis Extract: Microencapsulation and Antibacterial Activity Evaluation, Pharmazie, 62, 287-290.
- Dias, L.G., Pereira, A.P. ve Estevinho, L. M. 2012. Comparative Study of Different Portuguese Samples of Propolis: Pollinic, Sensorial, Physicochemical, Microbiological Characterization and Antibacterial Activity, Food and Chemical Toxicology, 50, 4246–4253.
- El-Sohaimy, S.A. and Masry, S.H.D.2014. Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Egyptian and Chinese Propolis, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 14, 10, 1116-1124.
- Ergezer, H. ve Çam, M. 2008. Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Mayıs 2008, Erzurum, Bildiriler Kitabı: 229-232.
- Feás, X., Pacheco, L., Iglesias, A. ve Estevinho, L.M. 2014. Use of Propolis in the Sanitization of Lettuce,Int. J. Mol. Sci.,15, 12243-12257.
- Fukumoto L. R. ve Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, Journal Agriculture Food Chemistry, 48, 3597-3604.
- Gajger, I.T., Pavlović, I., Bojić, M., Kosalec, I., Srećec S., Vlajnić, T. ve Vlajnić, J., 2017. The Components Responsible for the Antimicrobial Activity of Propolis from Continental and Mediterranean Regions in Croatia, Czech J. Food Sci., 35, (5): 376–385.
- Gaserod, O., Smidsrod, O. ve Skjask-Brñik, G., 1998. Microcapsules of Alginate-Chitosan – I: A Quantitative Study of the Interaction Between Alginate and Chitosan, Biomaterials, 19, 1815-1825.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. ve Saurel, R., 2007. Applications of Spray-drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview, Food Research International, 40, 1107–1121.
- Gouin, S., 2004. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends, Trends in Food Science & Technology, 15, 330–347.
- Gupta, V., Jain, A.D. , Gill, N. S. ve Gupta, K., 2012. Development and Validation of HPLC Method - A review, Int. Res J Pharm. App Sci., 2,4, 17-25.
- Guo, X. Y., Zou, Y., Li, X. ve Luo, L., 2016. Preparation and Characterization of EEP Calcium Alginate-chitosan Microcapsules, Modern Food Science and Technology, 10.
- Hasan, A .E. Z., Ambarsari, L., Widjaja, W. K. ve Prasetyo, R., 2014. Potency of Nanopropolis Stinglessbee Trigona spp Indonesian as Antibacterial Agent, IOSR Journal of Pharmacy, 4 (12), 01-09.
- Hollman, P. C. H. ve Katan, M. B., 1999. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability Food and Chemical, Toxicology, 37, 937-942.

- Huang, S., Zhang, C., Wang, K., Li, G. ve Hu, F., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis, Molecules, 19,19610-19632.
- Julkunen-Titto R., 1985. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics, J. Agric. Food Chem.,33, 213–217.
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Z.,Stojko, R., Wojtyczka, R.D. ve Jerzy Stojko, J., 2017. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231, Molecules, 22, 1554.
- Kalogeropoulos; N., Konteles, S., Mourtzinis, I., Troullidou, E., Chiou, A. ve Karathanos, V. T., 2009. Encapsulation of Complex Extracts in β - cyclodextrin: An Application to Propolis Ethanolic Extract, Journal of Microencapsulation, 26, 7, 603-613.
- Karaoğul, E., Altundaş, E. ve Alma, M. H., 2017. Tanenlerin Quercus Türlerinde Sınıflandırılması ve Kantitatif Analizi, H U Muh. Der., 03, 17-24.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., Kubilius, R., Kasparaviciene, G. ve Savickas, A., 2015. Alternative Preparation of Propolis Extracts: Comparison of Their Composition and Biological Activities . BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 156.
- Khanbabaee, K.ve Ree, T., 2001. Tannins: Classification and Definition, Nat. Prod. Rep., 18, 641–649.
- Korkmaz, O., Girgin, B.,Sunna, Ç., Yavaşer, R. ve Karagozler, A. A., 2016. Production and Investigation of Controlled Drug Release Properties of Tamoxifen Loaded Alginate-Gum Arabic Microbeads, JOTCSA, 3, 3, 47-58.
- Kuznesof, P. ve Whitehouse, B., 2005. Beeswax Chemical and Technical Assessment (CTA), Chemical and Technical Assessment, 65th JECFA.
- Lagouri, V., Prasianaki, D. ve Krysta, F., 2014. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts, International Journal of Food Properties, 17, 511-522.
- Lejeune, B., Pourrat, A. ve Dehmouche, H. 1988. Propolis Utilisation en Dermocosmetologie, Parfums, Cosmetiques, Aromes, 8-2, 73- 77.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. ve Kadota, S., 2008. Cytotoxic Constituents From Brazilian Red Propolis and Their Structure–Activity Relationship, Bioorg., Med., Chem., 16, 5434–5440.
- Majeti, N. V.ve Ravi Kumar, R., 2000. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, J Pharm Pharmaceut Sci, 3, 2, 234-258.

- Mărghitaș, L., Dezmirean, D., Drâglă, F. Ve Bobiș, O., 2014. Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape) In Romanian Propolis, Bulletin Uasvm Animal Science And Biotechnologies, 71, 2.
- Marco A. S. Mayworm, M., Lima, C., Tomba, A., Fernandes-Silva, C., Salatino, M. ve Salatino, A., 2014. Does Propolis Contain Tannins? Complementary and Alternative Medicine, 4.
- Mayworm, M. A. S., Lima, C. A., Tomba, A. C. B., Fernandes-Silva, C. C., Salatino, M. L. F. ve Salatino, A., 2014. Does Propolis Contain Tannins?, Hindawi Publishing Corporation Complementary and Alternative Medicine, 4.
- McClements, D. J. ve Li, Y., 2010. Structured Emulsion-Based Delivery Systems: Controlling The Digestion and Release of Lipophilic Food Components, Advances in Colloid and Interface Science, 159, 213–228.
- McHuag, D. J., 1988. Chapter 2. Production, Properties and Uses of Alginates. Production and Utilization of Products From Commercial Seaweeds, Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 5.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M. ve Antunes, M. D., 2010. Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal, Food and Chemical Toxicology, 48, 3418-3423.
- Monti, M., Berti, E., Carminati, G. ve Cusini, M., 1983. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. Contact Dermatitis 9, 163.
- Moreira, L., Dias, L., Pereira, J. A. ve Estevinho, L., 2008. Antioxidant Properties, Total Phenols and Pollen Analysis of Propolis Samples from Portugal, Food and Chemical Toxicology, 46, 3482-3485.
- Munin, A. ve Edwards-Lévy, F., 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review, Pharmaceutics, 3, 793-829.
- Murtaza, G., Sajjad, A., Mehmood, Z., Shah, S. H. ve Siddiqi, A. R., 2015. Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer, Journal of Food and Drug Analysis, 23, 11 -18.
- Naama, J. H., Nima, Z. A. ve Suleiman, G. M., 2010. Effects of Active Materials in Alcoholic Extract of Iraqi Propolis on Growth of Some Cancer Lines in the Laboratory and Cancer of Mammary Gland in Mice, Report and Opinion, 2, 5, 76-85.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Özçelik, B. ve Salah, R., 2017. Correlation Between Antioxidant Activity and Phenolic Acids Profile and Content of Algerian Propolis: Influence of Solvent, Pak. J. Pharm. Sci., 30, 4, 1417-1423.
- Nedovica, V., Kalusevica, A., Manojlovic, V., Levica, S. ve Bugarski, B., 2011. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications, Procedia Food Science, 1, 1806 – 1815.

- Negri, G., Marcuccia, M., Salatino, A. ve Salatino, M., 2000. Comb and Propolis Waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná), J. Braz. Chem. Soc., 11, 5, 453-457.
- Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A. ve Salatino, M. L. F., 2000. Comb And Propolis Waxes From Brazil: Triterpenoids In Propolis Waxes, Journal of Apicultural Research, 39, 1-2, 86—88.
- Nicodemo, D., Couto, R. H. N., Malheiros, E. B. ve De Jong, D., 2012. Propolis Production and its Relation to Wax Production Rate in Apis Mellifera Beehives, Journal of Agrarian Sciences, 32, 2.
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J. ve Castillo, C., 2011. Microencapsulation of Propolis Extract by Complex Coacervation, LWT - Food Science and Technology, 44, 429- 435.
- Onbaş, R., Kazan, A., Nalbantsoy, A. ve Yeşil- Çelikleş, Ö., 2016. Cytotoxic and Nitric Oxide Inhibition Activities of Propolis Extract along with Microencapsulation by Complex Coacervation, Plant Foods for Human Nutrition, 71, 3.
- Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S., Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. S. ve McGinness, G. B., 2016. FTIR Analysis and Quantification of Phenols and Flavonoids of Five Commercially Available Plants Extracts Used in Wound Healing, Revista Matéria, 21, 3, 767– 779.
- Omene, C., Kalac, M., Wu, J., Marchil, E., Frenkel, K. ve O'Connor, O., 2013. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action, J Cancer Sci Ther., 5, 10, 334–342.
- Omene , C., Wu, J. ve Frenkel, K., 2012. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Derived From Propolis, A Honeybee Product, Inhibits Growth of Breast Cancer Stem Cells, Invest New Drugs, 30, 1279–1288.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M. ve Chelo González-Martínez, C., 2011. Quality and Safety of Table Grapes Coated With Hydroxypropylmethylcellulose Edible Coatings Containing Propolis Extract, Postharvest Biology and Technology, 60, 64–70.
- Pallab, K., Tapan, B. K., Tapas, P. K. ve Ramen, K., 2013. Estimation of Total Flavonoids Content (TFC) And Antioxidant Activities of Methanolic Whole Plant Extract of *Biophytum Sensitivum* Linn., Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 3, 4, 33-37.
- Peanparkdeea, M., Iwamotoa, S. ve Yamauchi, R., 2016. Microencapsulation: A Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries, Reviews in Agricultural Science, 4, 56 – 65.
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D. ve Benvenuti, S., 2011. HPLC- DAD and HPLC-ESI-MS/MS Methods For Metabolite Profiling of Propolis Extracts, J Pharm Biomed Anal, 55, 934-48.

- Pietta, P. G., Gardana, C. ve Pietta, A. M., 2002. Analytical Methods for Quality Control of Propolis, Fitoterapia, 73, 1, 7–20.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., Kalofonos, H., Sivolapenko, G., Gawel-Beben, K., Antosiewicz, B. ve Chinou, I., 2017. Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland, Molecules, 22, 1159.
- Popova, M., Trusheva, B. ve Bankova, V., 2017. Content of Biologically Active Compounds in Bulgarian Propolis: a Basis for its Standardization, Bulgarian Chemical Communications, 49, 115-120.
- Poshadri, A. ve Kuna, A., 2010. Microencapsulation Technology: A Review, J.Res. Angra, 38, 1, 86-102.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H. ve Uslinawaty, Z., 2014. Properties an Flavonoids Content in Propolis of Some Extraction Method of Raw Propolis, Innovare Academic Sciences, 6, 6, 338-340.
- Rebiai, A., Lanez, T. ve Belfar, M. L., 2014. Total Polyphenol, Radical Scvenging and Cyclic Voltammetry of Algerian Propolis, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6, 1, 395-400.
- Reis, A. S., Diedrich, C., Moura, C., Pereira, D., Almeida, J., Silva, L. D., Plata-Oviedo, M. S., Tavares, R. A. ve Carpes, S. T., 2017. Physico-chemical Characteristis of Microencapsulated Propolis Co-product Extract and its Effect on Storage Stability of Burger Meat During Storage at -15°C , LWT- Food Science and Technology, 76,306-313.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. ve Veiga, F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2,8 – 21.
- Ross, R., 2009. Complementary and Alternative Therapies in the Aging Population Academic Press is an imprint of Elsevie Copyright, Elsevier
- Rzepecka-Stojko, A., Kabała-Dzik, A., Moździerz, A., Robert Kubina, R., Wojtyczka, R., Stojko, R., Dziedzic, A., Jastrzębska-Stojko, Z., Jurzak, M., Buszman, E. ve Stojko, J., 2015. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Ethanol Extract of Propolis Induce the Complementary Cytotoxic Effect on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines, Molecules, 20, 9242-9262.
- Sahlan, M. ve Supardi, T., 2013. Encapsulation of Indonesian Propolis by Casein Micelle, International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4, 1, 297-305.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. ve Pell, A. N., 2001. Analysis of Condensed Tannins: a Review, Animal Feed Science and Technology, 91, 21-40.
- Shimizu, K., Ashida, H., Matsuura, Y. ve Kanazawa, K., 2004. Antioxidative Bioavailibilty of Artepillin C in Brazilian Propolis, Archives of Biochemistry and Biophysics, 424, 181-188.

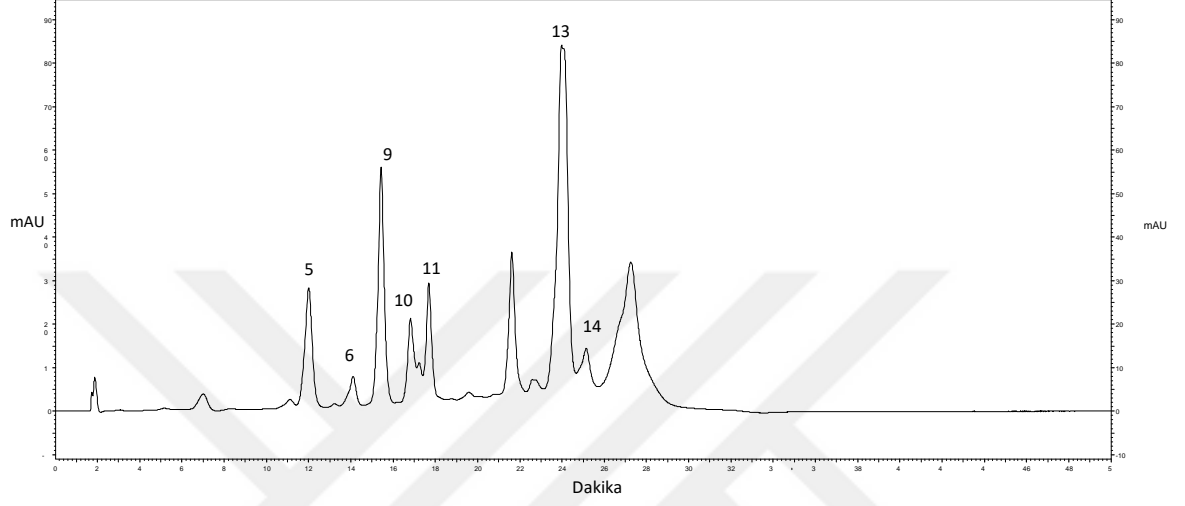
- Sime, D., Atlabachew, M., Redi- Abshiro, M. ve Zewde, T., 2015. Total Phenols and Antioxidant Activities of Natural Honeys and Propolis Collected from Different Geographical Regions of Ethiopia, Bull. Chem. Soc. Ethiop., 29, 2, 163-172.
- Singleton V. L. ve Rossi J. A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer R. ve Lamuela-Raventos R. M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, Methods in Enzymology, 299, 152-178.
- Silva, F., Favaro- Trindade, C., Alencar, S., Thomazini, M. ve Balierio, J., 2011. Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Stability of Spray-dried Propolis, Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 3, 2, 94-100.
- Silva, F., Fonseca, C., Alencar, S., Thomazini, M., Balierio, J., Pittia, P. Ve Favaro-Trindade, C., 2013. Assessment of Production Efficiency, Physicochemical Properties and Storage Stability of Spray-dried Propolis, a Natural Food Additive, Using Gum Arabic and OSA Starch-based Carrier Systems, Food and Bioprocess Technology, 91, 28-36.
- Socha, R., Galkowska, D., Bugaj, M. ve Juszczak, L., 2015. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Various Regions of Poland, Natural Product Research, 29 (5), 416-422.
- Spinelli, S., Conte, A., Lecce, L., Incoronato, A. L. ve Nobile, M. A., 2015. Microencapsulated Propolis to Enhance the Antioxidant Properties of Fresh Fish Burgers, Journal of Food Process Engineering, 38, 527-535.
- Stan, L., Marghitaş, L. ve Dezmirean, D., 2011. Quality Criteria for Propolis Standardization, Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 44, 2.
- Talla, E., Tamfu, A., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F., Mbafor, J., Tchuengue, N. F. 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.
- Tang, H., Yao, X., Yao, C., Zhao, X., Zuo, H. ve Li, Z., 2017. Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitro-phenethyl ester *in vitro* and *in vivo* and detection of its metabolites, Scientific Reports, 7, 7599
- Thammana, M., 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis, 5, 2.
- Tolba, M., Omar, H., Azab, S., Khalifa, A., Abdel-Naim, A. ve Abdel-Rahman, S., 2016. Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Protective Effects against Ischemiareperfusion Injury and Drug Adverse, Reactions Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56, 2183-2190.

- Tolba, M., Azab, S., Khalifa, A., Abdel-Rahman, S. ve Abdel-Naim, A., 2013. Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Promising Component of Propolis with a Plethora of Biological Activities: A Review on its Anti-inflammatory, Neuroprotective, Hepatoprotective, and Cardioprotective Effects, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 65, 8, 699–709.
- Trusheva, B., Popovaa, M., Koendhorib, E., Tsvetkovac, I., Naydenskic C. ve Bankova, V., 2011. Indonesian Propolis: Chemical Composition, Biological Activity and Botanical Origin, Natural Product Research, 25, 6, 606–613.
- Tübitak UME, 2014. Validasyon Ders Notları, Ankara.
- Türk Gıda Kodeksi, 2015. Distile Alkollü İçecekler Tebliği, 11.
- URL-1, Ulusal Standardizasyon, www.tse.org.tr/tr/icerikdetay/2250/4630/ulusal-standardizasyon.aspx, 20.02.2017
- URL- 2, <http://uzak.mersin.edu.tr/UZAK/eski/kalite2.pdf>, 20.02.2017.
- Usman, Z. U., Bakar, A. B. A. ve Mohamed, M., 2016. Phytochemical Screening and Comparison of Antioxidant Activity of Water and Ethanol Extract Propolis From Malaysia, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8(5), 413-415.
- Uzel, A., Sorkun, K., Öçağ, Ö., Coğulu, D., Gencay, Ö. ve Salih, B., 2005. Chemical Compositions And Antimicrobial Activities Of Four Different Anatolian Propolis Samples, Microbiological Research, 160, 189-195.
- Widjaja, A., Yeh, T. ve Ju, Y., 2008. Enzymatic Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester, Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 39, 413–418.
- Yaghoubi, S. M. J., Ghorbani, G. R., Soleimanian, Z. S. ve Satari, R., 2007. Antimicrobial Activity of Iranian Propolis and its Chemical Composition, DARU, 15,1.
- Yang, S. J., Wu, J. J., Wang, Y. C., Huang, C. F., Wu, T. M., Shieh, C. J. ve Chang, C. M., 2014. Encapsulation of Propolis Flavonoids in a Water Soluble Polymer Using Pressurized Carbon Dioxide Anti-solvent Crystallization, J. of Supercritical Fluids, 94, 138-146.
- Wang, Y., Li, P., Tran, T., Zhang, J. ve Kong, L., 2016. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer, Nanomaterials, 6, 26.
- Zuidam, N. J. ve Shimoni, E., 2010. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products and Processes, Bölüm 2, Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.

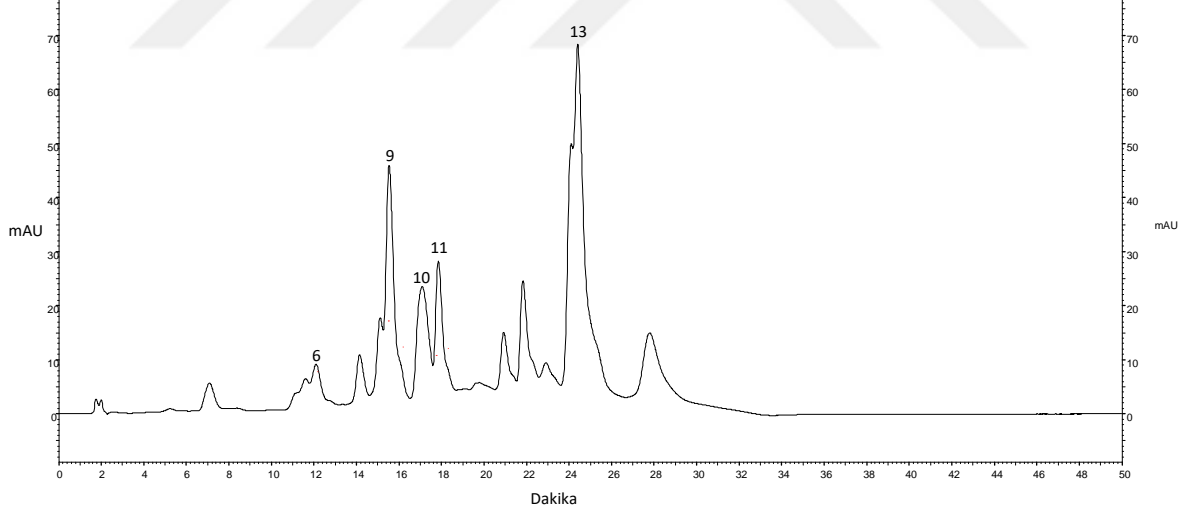
8. EKLER

Ek- 1

Etanolik Propolis Ekstraktı

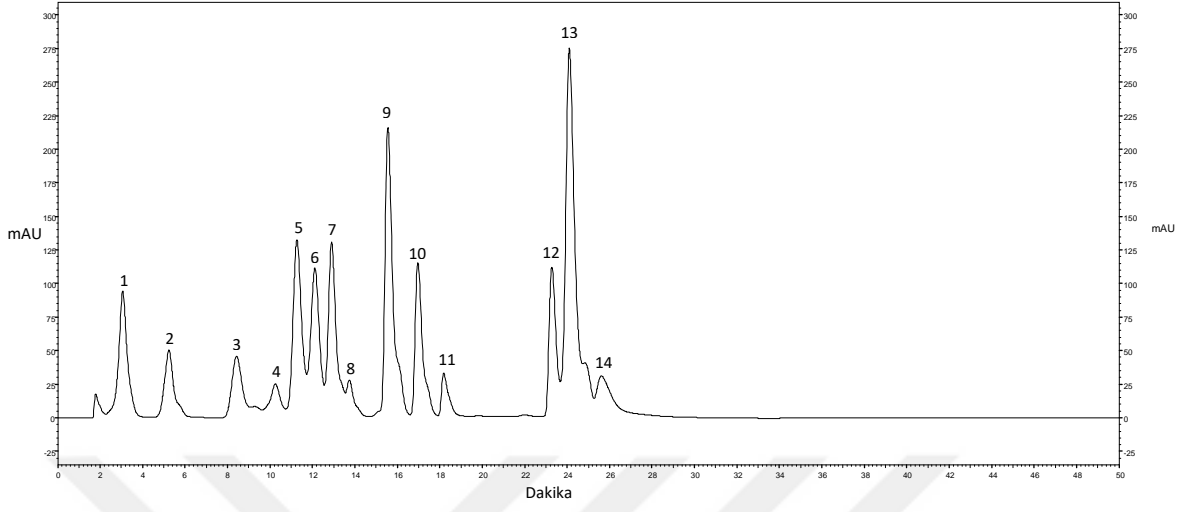


Kapsülasyon sonrası kalan çözelti

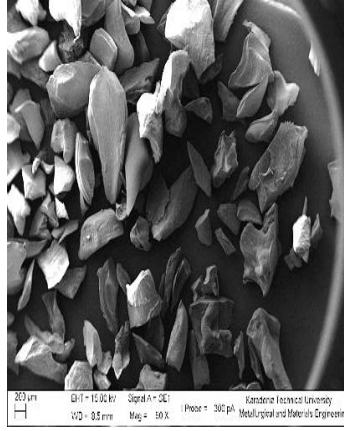


EK- 1' in devamı

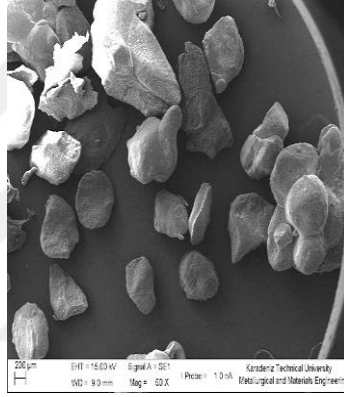
Standart Çözeltileri



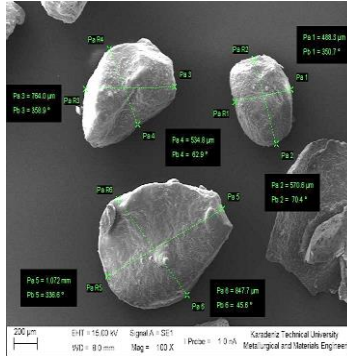
Ek-2. Kapsüllere ait SEM görüntüleri



(a) Alginat Kapsüller,



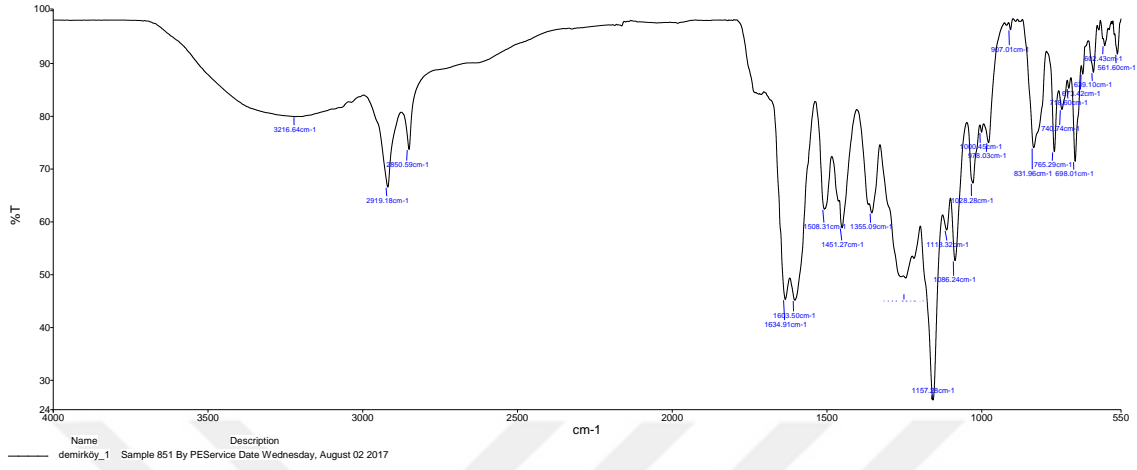
(b) Alginat- Propolis Kapsülleri,



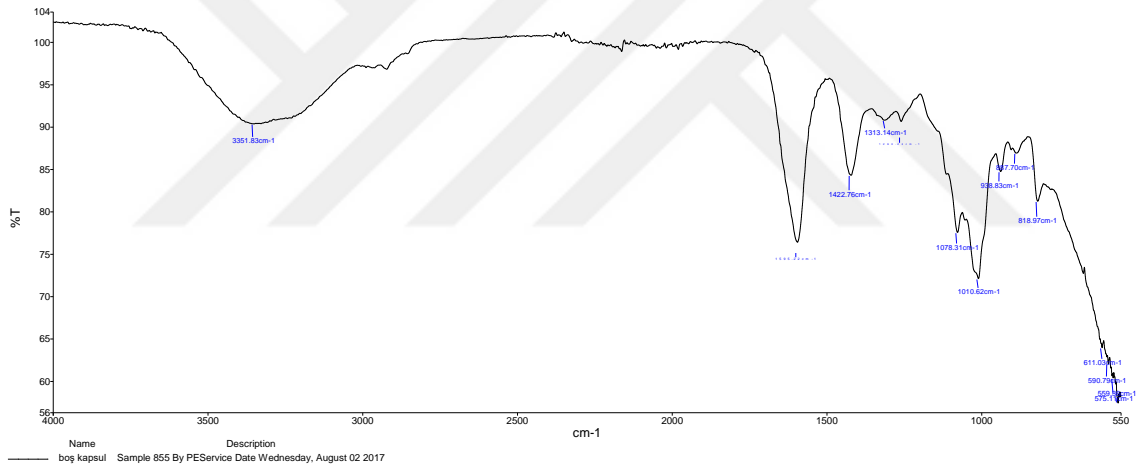
(c) Alginat- Propolis Kapsül Boyutları

Ek-3

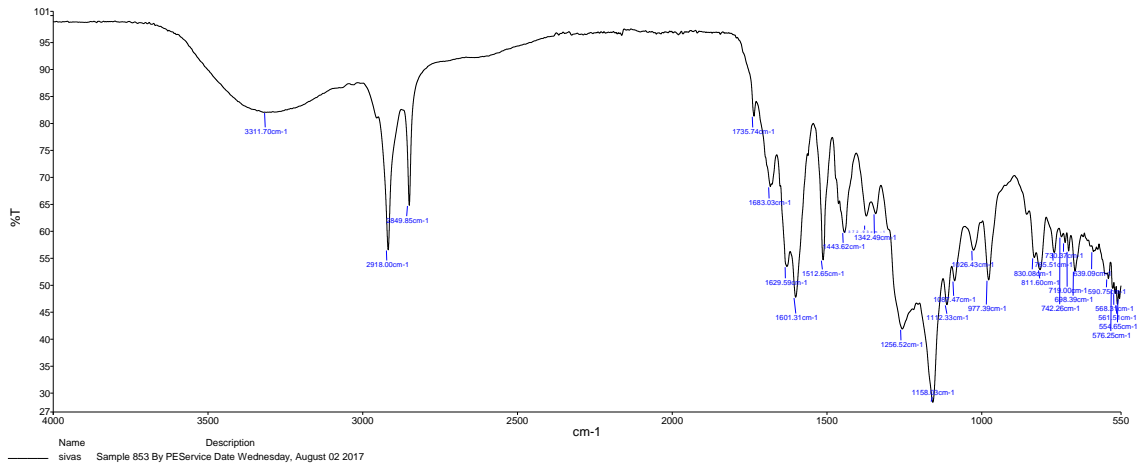
Demirköy Etanolik Propolis Ektraktı



Alginat Kapsüller

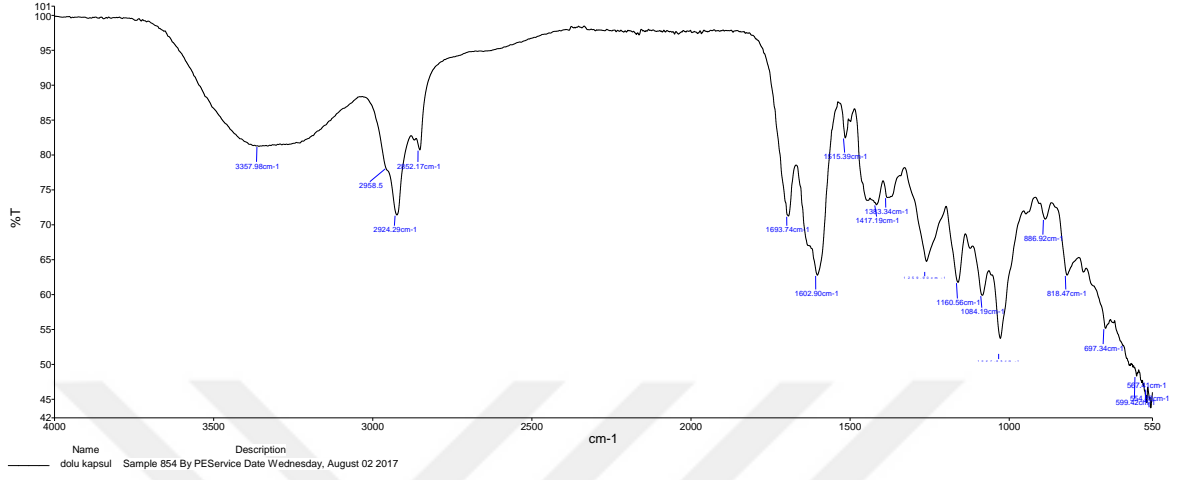


Sivas Etanolik Propolis Ektraktı

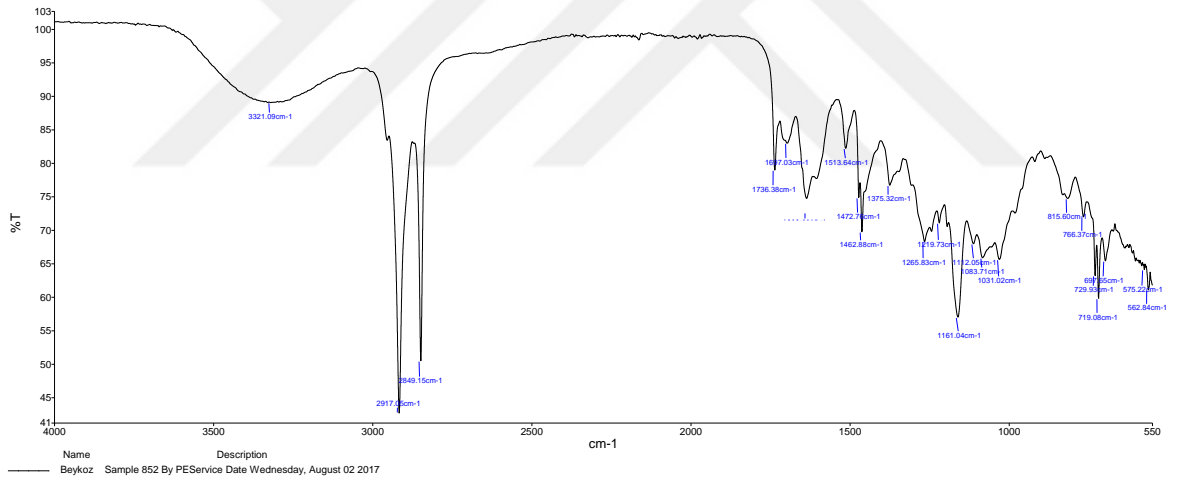


Ek-3'ün devamı

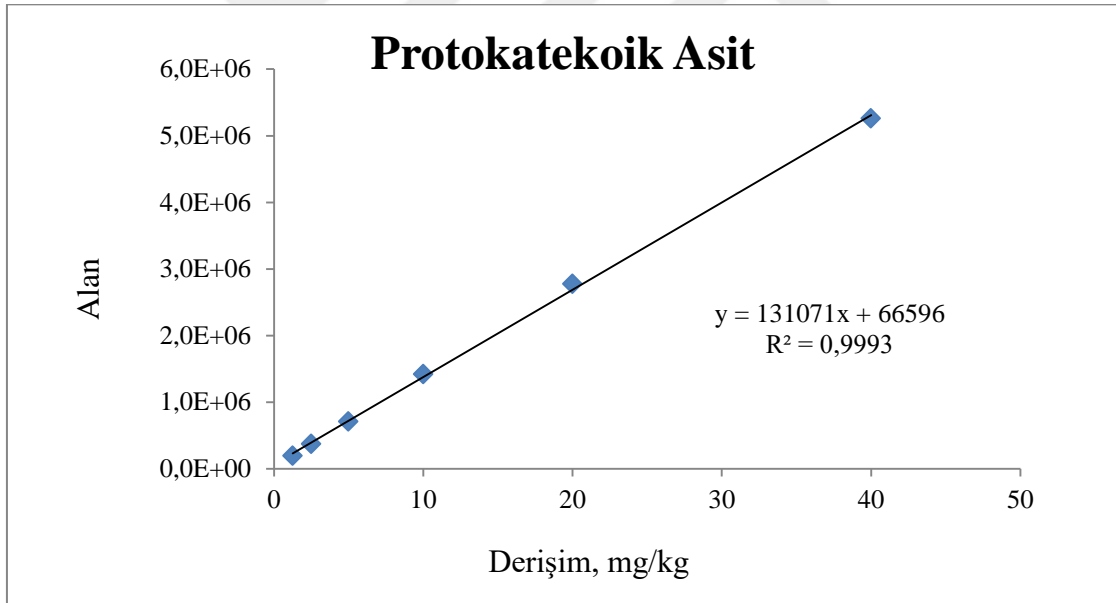
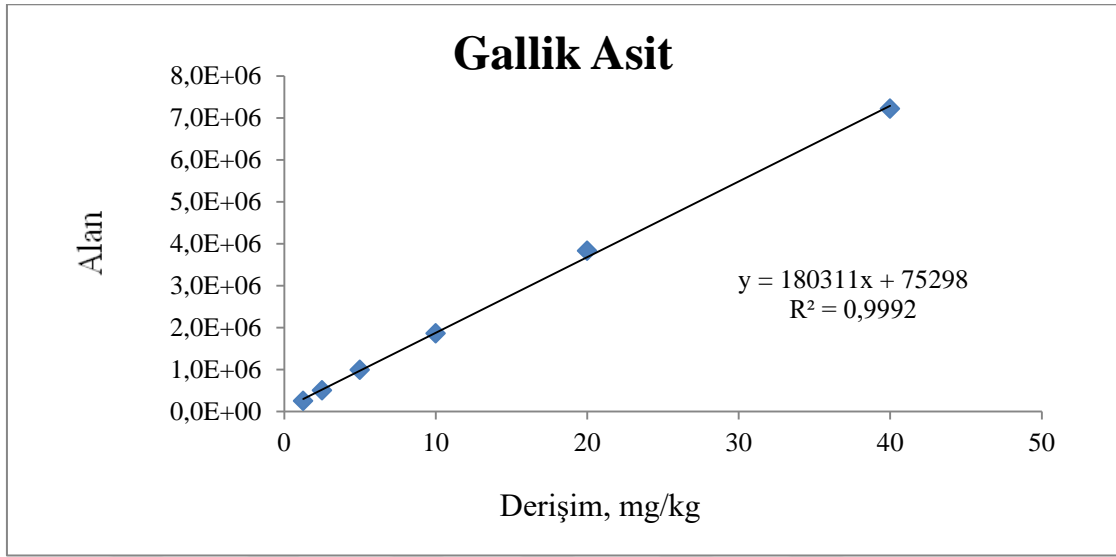
Alginat-Propolis Kapsüller



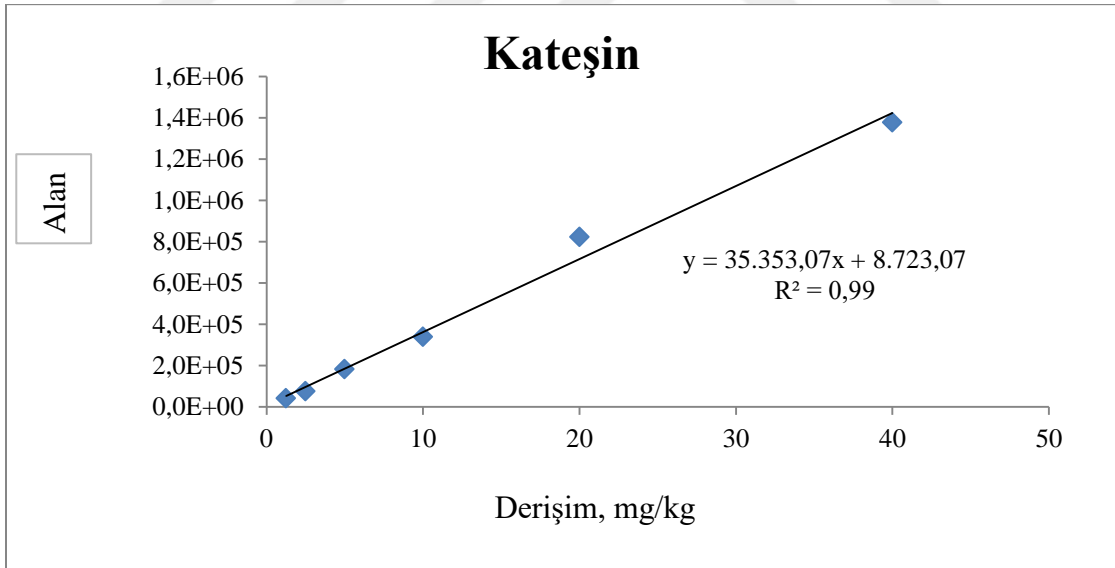
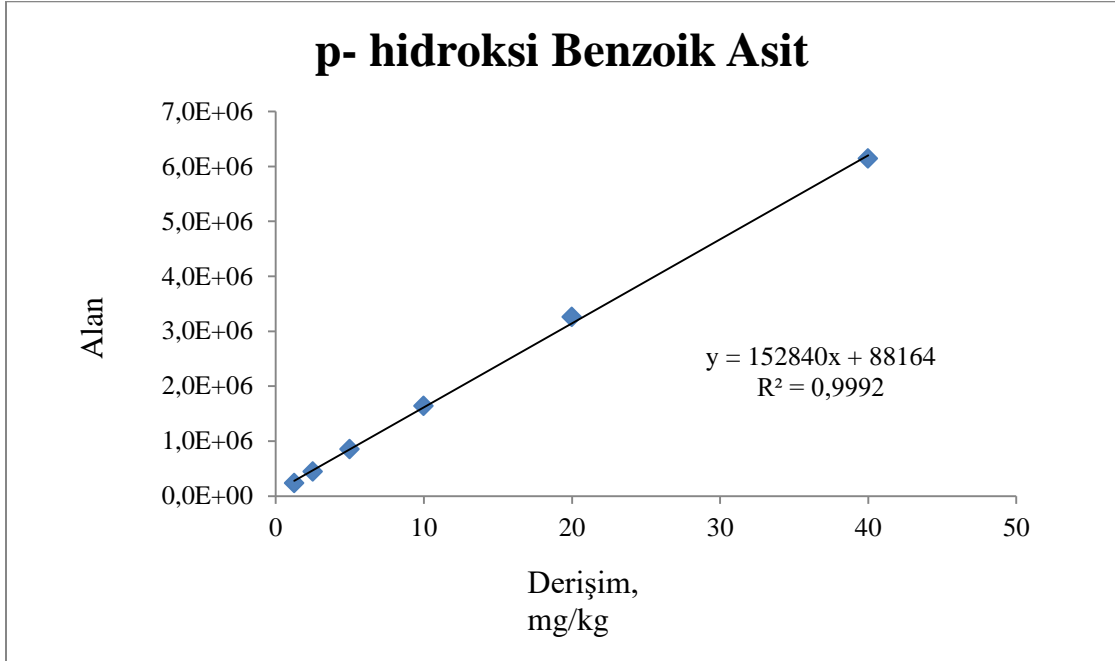
Beykoz Etanolik Propolis Ektraktı



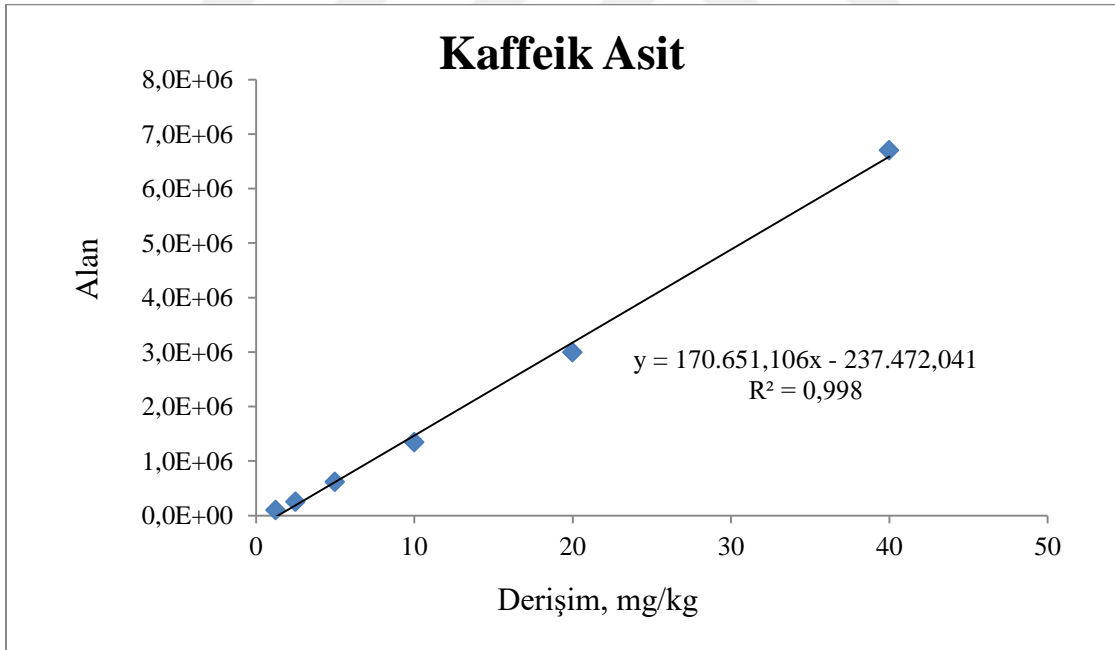
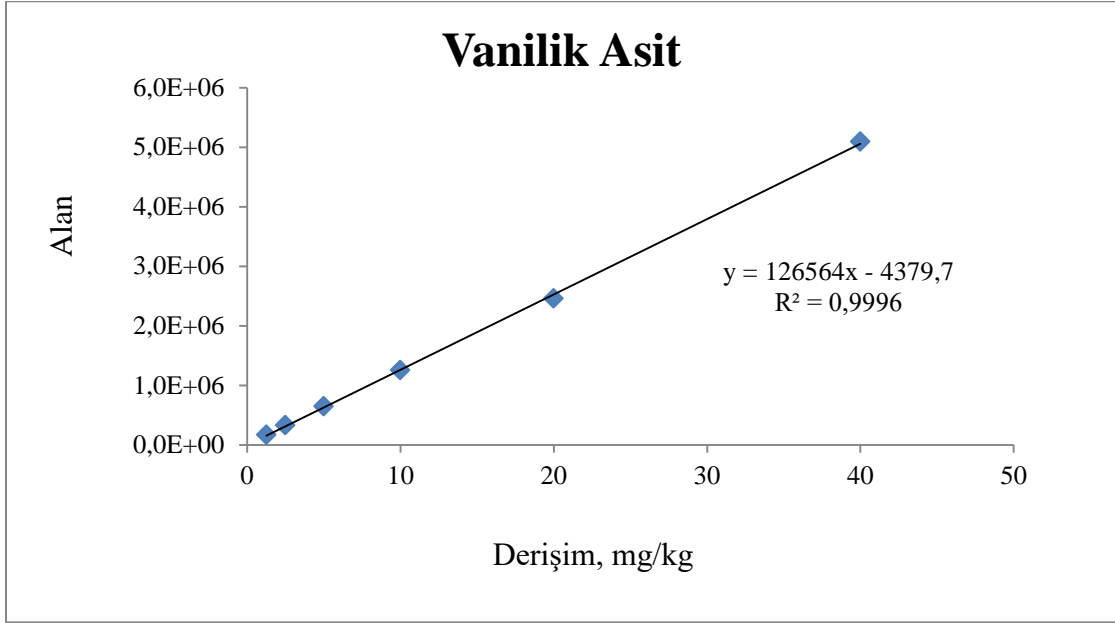
Ek- 4



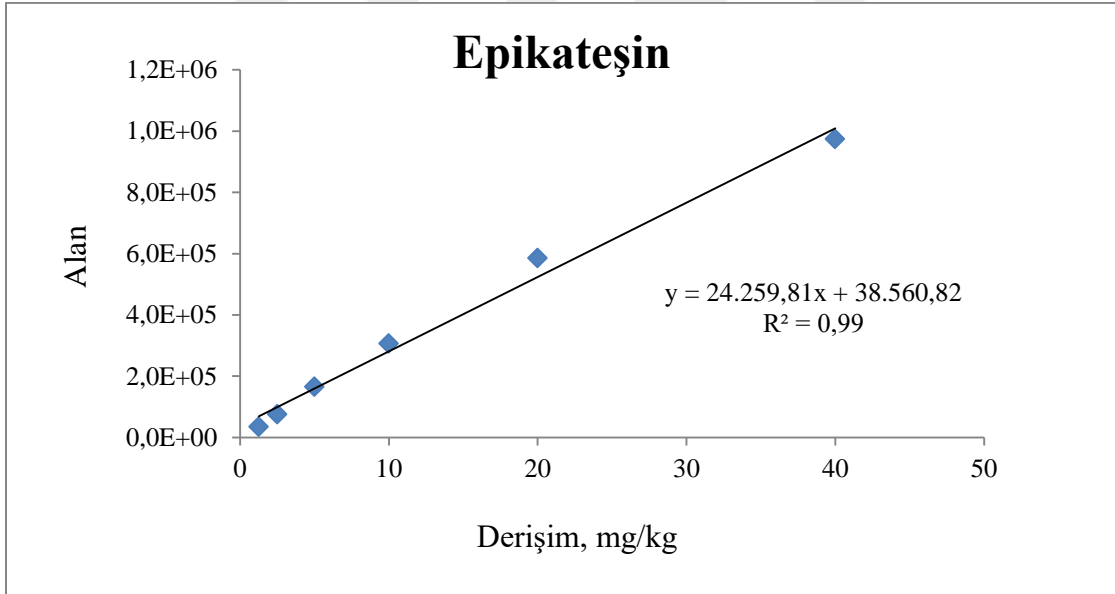
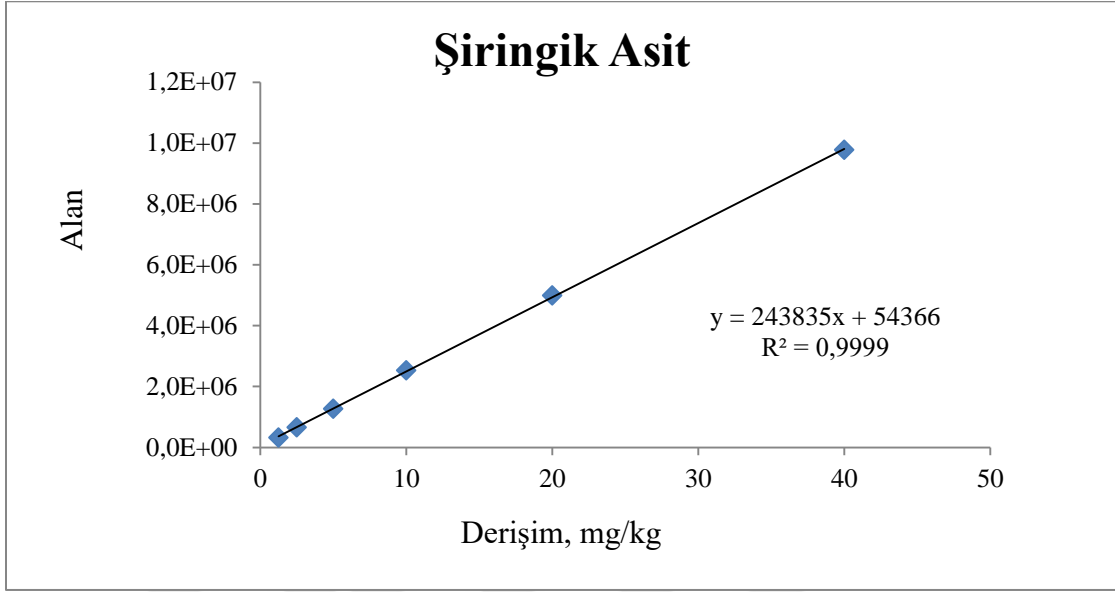
EK- 4' ün devamı



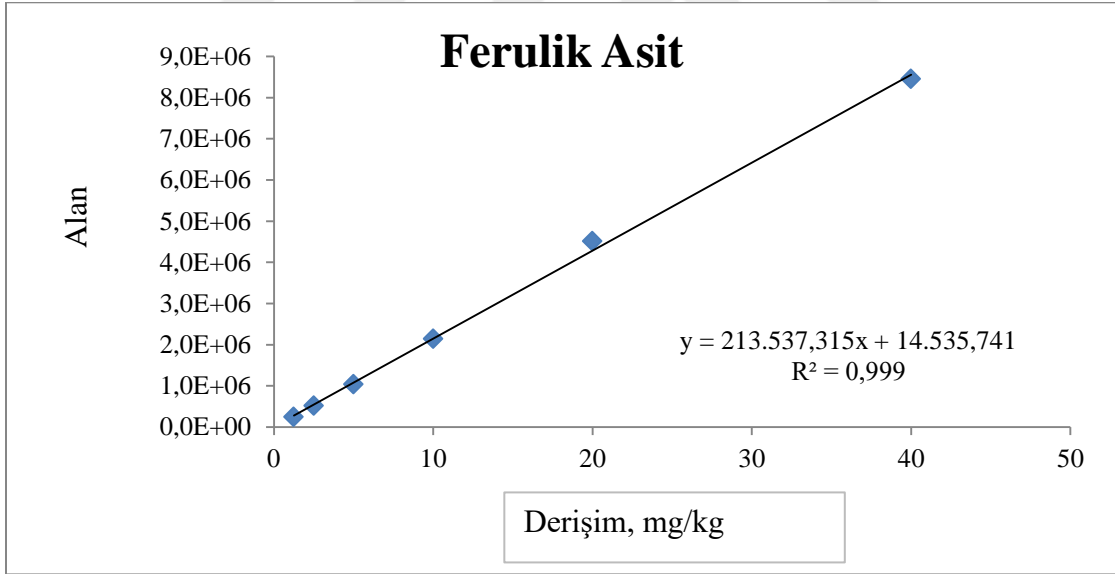
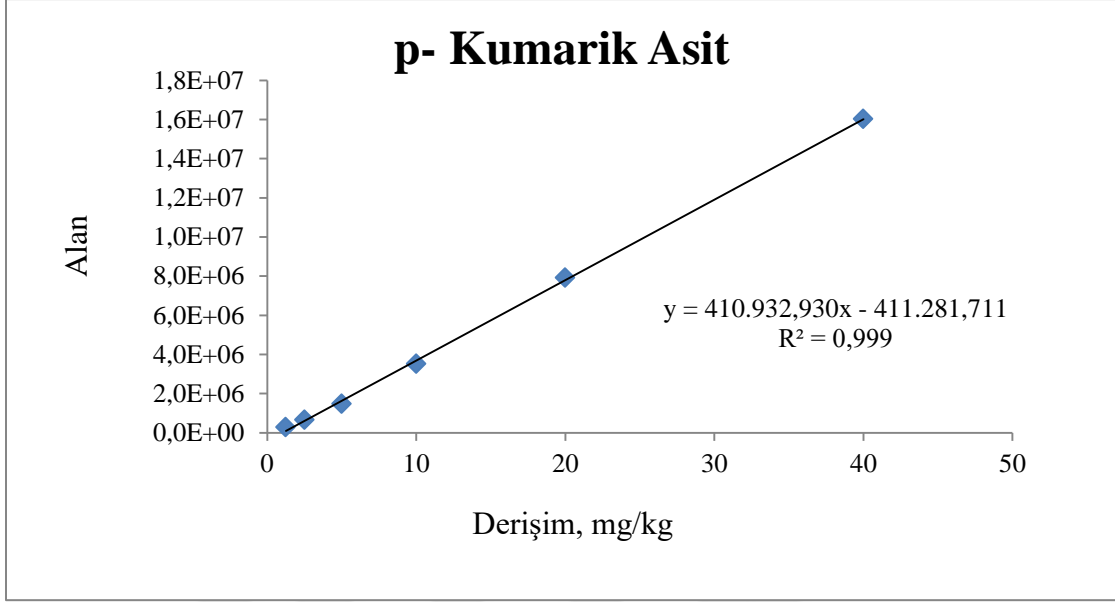
EK- 4' ün devamı



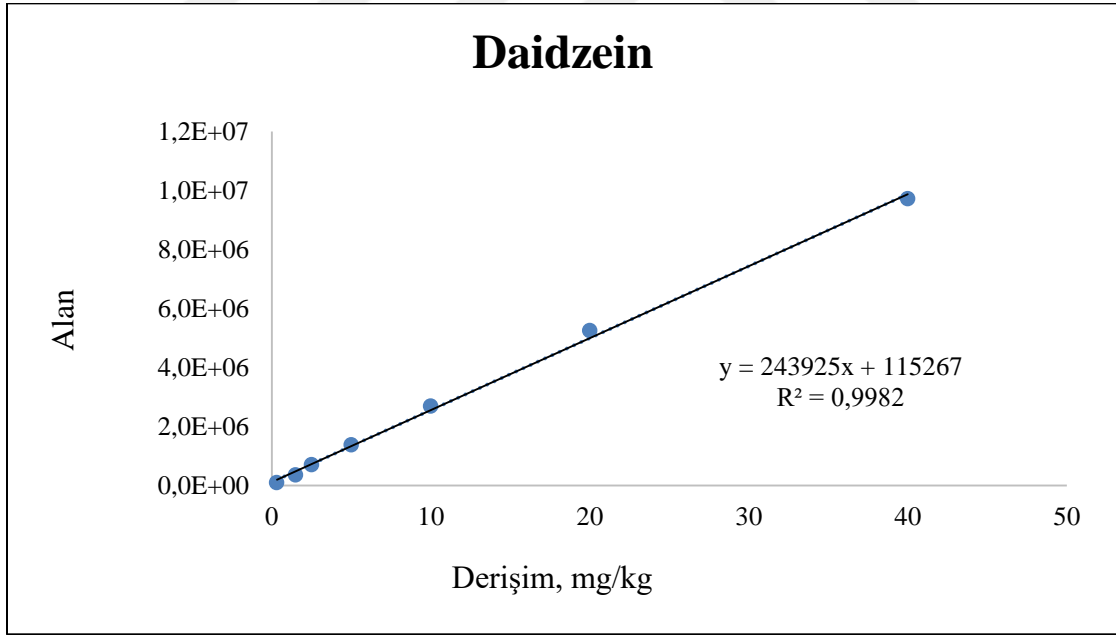
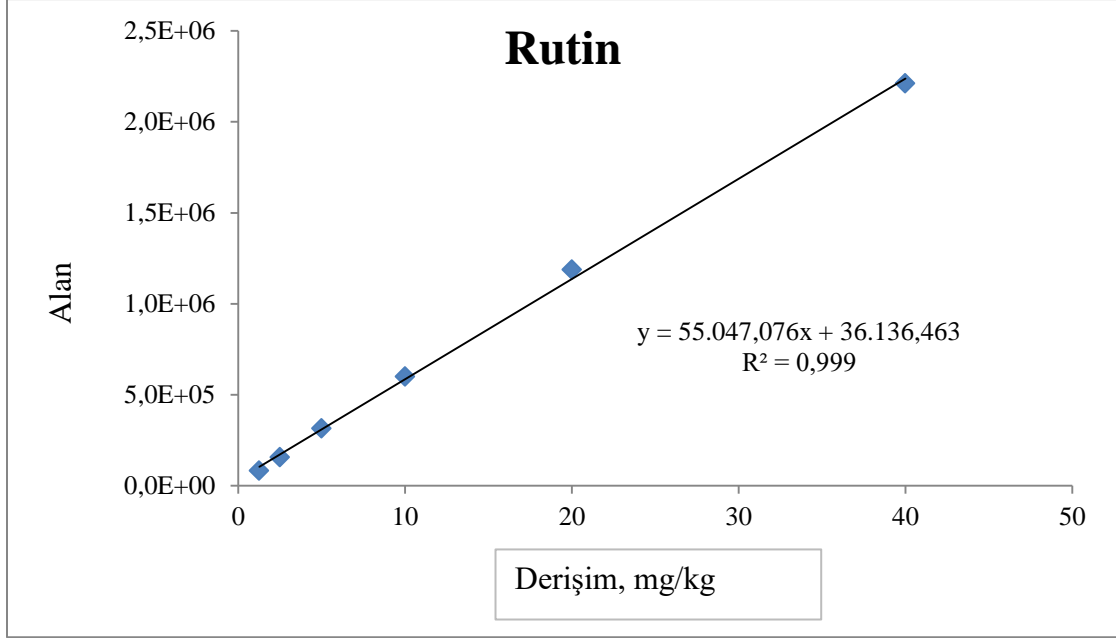
EK- 4' ün devamı



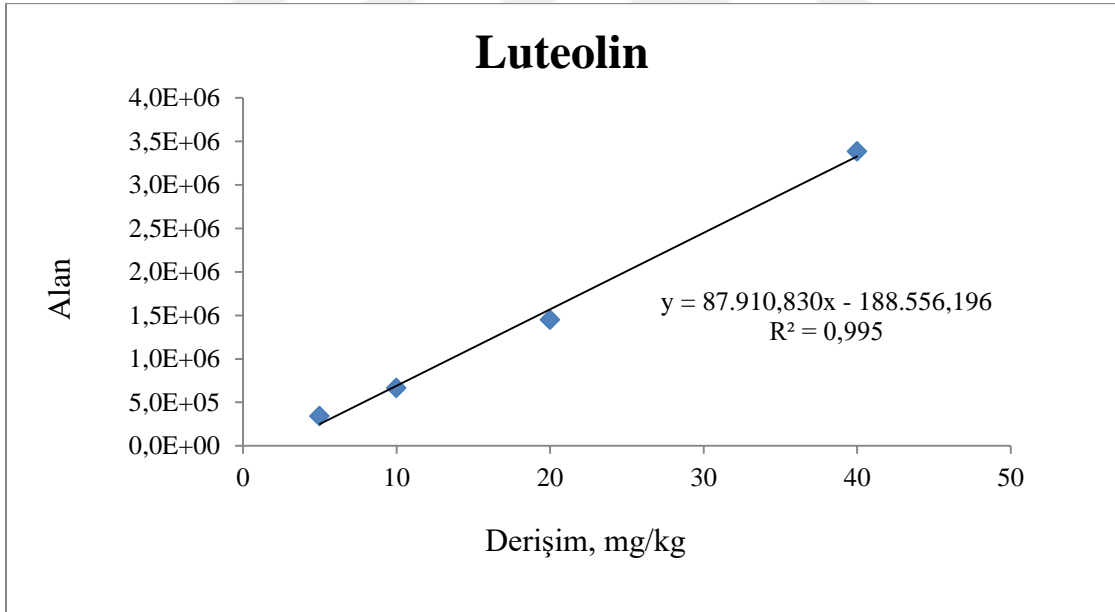
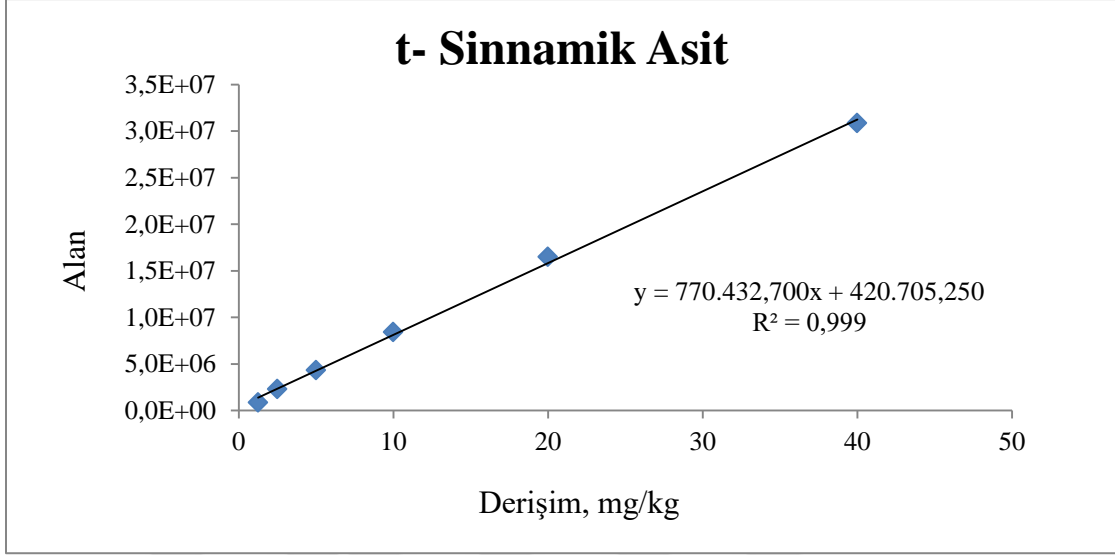
EK- 4' ün devamı



EK- 4' ün devamı



EK- 4' ün devamı



ÖZGEÇMİŞ

21.08.1988 yılında İstanbul' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul' da tamamladıktan sonra 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü' nü kazandı ve 2009 yılında lisans eğitimini tamamladı.

2009 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Petrol Analiz Laboratuvarı' na Uzman olarak atandı ve doktora eğitimine başladı. 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı' na yatay geçiş yaptı. Yabancı dili İngilizce' dir. Evli ve bir çocuk annesidir.