

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ORMAN GÜLÜ BALI VE BİTKİSİNDEKİ GRAYANOTOKSİN-III (GTX-III)**  
**İZOFORMUNUN LC-MS/MS İLE ANALİZİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Hüseyin ŞAHİN**

**ŞUBAT 2014**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ORMAN GÜLÜ BALI VE BİTKİSİNDEKİ GRAYANOTOKSİN-III (GTX-III)  
İZOFORMUNUN LC-MS/MS İLE ANALİZİ**

**Hüseyin ŞAHİN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“DOKTOR (KİMYA)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Enstitüye Verildiği Tarih : 03.02.2014**

**Tezin Savunma Tarihi : 28.02.2014**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Trabzon 2014**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Ana Bilim Dalında**

**Hüseyin ŞAHİN Tarafından Hazırlanan**

**ORMAN GÜLÜ BALI VE BİTKİSİNDEKİ GRAYANOTOKSİN-III (GTX-III)  
İZOFORMUNUN LC-MS/MS İLE ANALİZİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 11 / 02 / 2014 gün ve 1540 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
DOKTORA TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU**

**Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK**

**Üye : Doç. Dr. Ahmet ALVER**

**Üye : Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Yorucu ama bir o kadar da keyifli uzun bir maratonun özeti olan şahsıma ait bu tezde, birçok yaşanmış anın ortak paydaları mevcuttur. Kimi zaman umutsuzluğa kapılarak bitirmeyeceğime inanmışlıklarım, kimi zaman da taze bir soluk ve amatör bir ruhla her daim ileriye dönük adımlarım... Yaşadığım bu anların tecrübe haneme bir basamak olarak yansıdığına bilicinde olarak siz değerli bilim insanlarına ve dostlarıma çalışmamı sunmaktan onur duyduğumu bildirmek isterim.

Saydığım her bir merhale ile bütünü oluşturan bu çalışmada birçok saygıdeğer bilim adamı şahsıma öncülük etmiş ve yol göstermiştir. Ancak hocalarımda arasında kendisine ayrı bir yer ayırdığım, bilgisiyle, hoşgörüsüyle her daim yanında olan ve şahsımı ailesinin bir ferdi olarak gören danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yine tezimin ilerleyişinde emeklerini esirgemeyen tez jüri üyeleri, Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK'e ve Sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER'e ve doktora döneminde ve mesleki yaşantımda şahsıma engin faydaları olan Biyokimya Kürsüsü'ndeki saygıdeğer hocalarıma canı gönülden teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında varlığını hissettiğim ve asla hakkını ödemeyeceğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY'a; laboratuvar çalışmalarım bir kısmında mesai arkadaşlığı yaparak beni onurlandıran Sayın Uzm. Adem DEMİR'e; her adımında beni yüreklendiren Sayın Yrd. Doç. Dr. Oktay YILDIZ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma KARAHALİL YAYLACI ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem SARAL'a; can dostluklarıyla ve yardımlarıyla yanımda olan Sayın Zehra CAN ve Sayın Zeynep İSKEFİYELİ'ye; laboratuvarımızın yeni üyesi Sayın Hilal Ebru HOTAMAN'a teşekkürlerin en yücesini sunarım.

Ayrıca doktora öğrenimim sırasında burs desteğiyle şahsımı destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak dostluğun kendisinde tam anlamını bulduğu, aynı ana-babadan olmasak da kardeşlik kelamıyla hayatımda önemli yeri olan biricik dostum Sayın Cem ÇOLAK'a, canım anneme, babama ve kardeşlerim Perihan ve Kübra'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Hüseyin ŞAHİN

Trabzon 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Orman Gülü Balı ve Bitkisindeki Grayanotoksin-III (GTX-III) İzoforumunun LC-MS/MS ile Analizi” 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.  
03/02/2014

Hüseyin ŞAHİN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Toksinler .....	1
1.2. Grayanotoksin (GTX) Nedir?.....	1
1.3. Türkiye’de Sık Görülen Toksik Rhododendronlar-Orman Gülü .....	3
1.4. Bal ve Bileşimi .....	4
1.5. Orman Gülü Balı (Deli Bal) .....	5
1.6. Orman Gülü Balı (Deli Bal) Tarihçesi.....	6
1.7. Orman Gülü Balı İçeriğindeki Toksinin Vücuda Etkisi .....	7
1.8. Alternatif Tıpta Balın Önemi-Apiterapi .....	7
1.9. Antioksidan Bileşenler .....	8
1.10. Fenolik Bileşikler .....	9
1.10.1. Fenolik Asitler .....	9
1.10.2. Flavonoidler.....	11
1.10.2.1. Antosiyanidinler .....	12
1.10.2.2. Flavonlar ve Flavonollar.....	12
1.10.2.3. Flavanonlar .....	13
1.10.2.4. Kateşinler ve Löykoantosiyanidinler.....	14
1.10.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler) .....	14
1.11. Antioksidan Tayin Yöntemleri .....	15
1.11.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	15
1.11.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP .....	16
1.11.3. Serbest Radikal Temizleme Antioksidan Tayinleri.....	16
1.11.3.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi .....	16

1.11.3.2.	ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi .....	17
1.12.	Kromatografi .....	17
1.12.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	18
1.12.1.1.	Ultraviyole (UV) Dedektör.....	20
1.12.1.2.	Kütle Spektrometrik (MS) Dedektör .....	20
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Çalışmada Kullanılan Materyaller.....	24
2.1.1.	Cihazlar.....	24
2.1.2.	Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	24
2.1.3.	Çözeltiler .....	25
2.2.	Numunelerin Temini, Saklama Yöntemi.....	27
2.3.	Balların Palinolojik Testi.....	30
2.4.	Örneklemelerin Ekstraksiyon Şartları .....	30
2.5.	LC-MS/MS Analizi .....	31
2.5.1.	Cihaz Parametreleri .....	31
2.6.	HPLC-UV ile Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	32
2.6.1.	RP-HPLC-UV Koşulları.....	32
2.6.2.	Standartlar ve Kalibrasyon .....	33
2.7.	Antioksidan Analizler .....	34
2.7.1.	Toplam Fenolik Madde Tayini .....	34
2.7.2.	Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP Tayini .....	34
2.7.3.	DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini .....	35
2.7.4.	ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini .....	36
2.7.5.	DPPH• ve ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi SC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması .....	36
2.8.	DeneySEL Hayvan Çalışmaları .....	37
2.8.1.	Deney Hayvanları .....	37
2.8.2.	Deney Grupları ve Uygulamalar.....	37
2.8.3.	Vücut Ağırlığı Takibi .....	38
2.8.4.	Dekapitasyon, Materyallerin Alınması ve Ön İşlemler .....	38
3.	BULGULAR .....	39
3.1.	LC-MS/MS ile GTX-III Analizi.....	39
3.1.1.	MS-MS Tarama Parametreleri.....	39
3.1.2.	Metod Validasyon Parametreleri .....	39
3.1.2.1.	Lineer Ölçüm Aralığı.....	39

3.1.2.2.	Tayin Limiti (LOD)/Ölçüm Limiti (LOQ) .....	40
3.1.2.3.	Kesinlik.....	41
3.1.2.3.1.	Tekrarlanabilirlik .....	41
3.1.2.3.2.	Geri Kazanım.....	41
3.2.	Örneklemlerin GTX-III Miktarları .....	42
3.3.	RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşen Analizi Validasyon Parametreleri ve Kromatogramları .....	46
3.4.	Bazı Örneklerimlerin Fenolik Bileşen Sonuçları.....	49
3.4.1.	Bazı Bal Örneklerinin Fenolik Bileşen Sonuçları .....	49
3.4.2.	Bazı Bitki Örneklerinin Fenolik Bileşen Sonuçları .....	50
3.4.2.1.	Bazı Mor Çiçekli Orman Gülü Bitkilerinin Fenolik Bileşen Sonuçları .....	50
3.4.2.2.	Bazı Sarı Çiçekli Orman Gülü Bitkilerinin Fenolik Bileşen Sonuçları.....	51
3.5.	Örneklemlerin Antioksidan Sonuçları .....	52
3.5.1.	Bal Örneklerinin Toplam Polifenol ve FRAP Testi Sonuçları .....	52
3.5.2.	Bal Örneklerinin DPPH ve ABTS Testi SC <sub>50</sub> Testi Sonuçları .....	53
3.5.3.	Orman Gülü Bitkileri Toplam Polifenol ve FRAP Testi Sonuçları.....	55
3.5.4.	Orman Gülü Bitkileri DPPH ve ABTS Testi SC <sub>50</sub> Sonuçları.....	56
3.6.	Deney Hayvanlarıyla Yapılan Biyokimyasal Denemeler.....	57
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ .....	60
5.	ÖNERİLER .....	73
6.	KAYNAKLAR.....	76
7.	EKLER .....	88

ÖZGEÇMİŞ



Doktora Tezi

ÖZET

ORMAN GÜLÜ BALI VE BİTKİSİNDEKİ GRAYANOTOKSİN-III (GTX-III)  
İZOFORMUNUN LC-MS/MS İLE ANALİZİ

Hüseyin ŞAHİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2014, 87 Sayfa, 48 Sayfa Ek

Deli bal, Rhododendron çiçeklerinin kaynaklık ettiği, içeriğinde grayanotoksinler (GTX) denilen oldukça aktif toksinleri barındırır ve tüketimi birçok toksikolojik semptomu sebep olabilir. Orman gülü bal ve bitkilerinin (*R. ponticum* ve *R. luteum*) karakterize amacıyla planlanan çalışma üç basamaktan oluşmaktadır; i) GTX türlerinin bir izomeri olan GTX-III izomerinin LC-MS/MS ile tayin edilmesi için metod geliştirmesi, ii) fenolik bileşenlerinin ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi, iii) deli bal ile beslenen sıçan kan serumlarındaki biyokimyasal parametrelerinin değişimlerinin incelenmesi. Sonuçlara göre; GTX-III miktarı, bal örneklerinde 0,193-68,754 µg GTX/g numune, bitki örneklerinde ise tespit edilemeyen (TE) düzeyden-760.435 µg GTX/g numune aralığında tespit edildi. Fenolik bileşen açısından *p*-OH benzoik asit ve kateşin major bileşen olarak bulundu. Aynı zamanda ballar ve bitki örneklerinin tümünde, toplam fenolik madde (TP): 0,095-44,109 mg GAE/g numune, demir (III) indirgeme/antioksidan güç (FRAP): 0.491-558.403 µmol Troloks/g numune, % 50 oranda DPPH radikalini temizleyen etkin konsantrasyon: 0.036-131.002 mg/mL ve % 50 oranda ABTS radikalini temizleyen etkin konsantrasyon: 1.182- 1146.011 mg/mL olarak bulundu. Sıçan kan serumlarında analizi yapılan biyokimyasal parametreler (AST, ALT, LDH, ALP, CK, CK-MB), kullanılan balın konsantrasyonundaki artış ile gruplar arasında anlamlı değişiklik gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Deli bal, Grayanotoksin-III, LC-MS/MS, *R. ponticum*, *R. luteum*

PhD. Thesis

SUMMARY

ANALYSIS OF GRAYANOTOXIN-III (GTX-III) ISOFORM IN RHODODENDRON  
HONEYES AND ITS PLANTS BY LC-MS/MS

Hüseyin ŞAHİN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2014, 87 Pages, 48 Pages Appendix

Mad honey, which is produced from the Rhododendron flowers, contains highly active toxins, called grayanotoxins (GTXs) and it can cause a wide spectrum of toxication symptoms. With the aim of characterizing of Rhododendron honey and its plants (*R. ponticum* and *R. Luteum*), this study consists of three steps: i) improving a method for analyzing of GTX-III by LC-MS/MS, ii) determining of phenolic compounds and antioxidant activity, iii) examination of dynamic changes of certain biochemical parameters in blood serum of rats consumed with mad honey. According results, different quantity of GTX-III was determined ranging from 0.193 to 68.754 µg GTX/g sample for honey, from not detected (ND) to 760.435 µg GTX/g sample for plants. In terms of phenolic compounds, *p*-OH benzoic acid and catechin were also detected as major phenolics. Furthermore, in honeys and plant samples, the antioxidant activities were found as follows: total phenolic content (TPC) ranging from 0.095 to 44.109 mg GAE/g sample, ferric reducing antioxidant power (FRAP) ranging from 0.491 to 558.403 µmol Trolox/g sample, the scavenging DPPH radical by 50% ranging from 0.036 to 131.002 mg/mL, and the scavenging ABTS radical by 50% ranging from 1.182 to 1146.011 mg/mL. In rat serum, biochemical analysis of tested parameters (AST, ALT, LDH, ALP, CK, CK-MB) were showed a significant elevation between increasing the concentration of honey and groups.

**Key Words:** Mad Honey, Grayanotoxin-III, LC-MS/MS, *R. ponticum*, *R. luteum*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Grayanotoksin formları.....	2
Şekil 2. <i>Rhododendron luteum</i> .....	3
Şekil 3. <i>Rhododendron ponticum</i> .....	3
Şekil 4. <i>R. luteum</i> Türkiye'deki dağılımı.....	3
Şekil 5. <i>R. ponticum</i> Türkiye'deki dağılımı.....	4
Şekil 6. Flavonoidlerin genel yapısı .....	11
Şekil 7. Antosiyanidinlerin genel yapısı .....	12
Şekil 8. Flavonollar ve flavonların genel yapısı .....	13
Şekil 9. Flavanonların genel yapısı.....	13
Şekil 10. Kateşinlerin genel yapıları.....	14
Şekil 11. Proantosiyanidinlerin kimyasal yapısı; R=H: Prosiyanidin, R=OH: Prodelfinidin .....	15
Şekil 12. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu .....	16
Şekil 13. DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) geometrik gösterimi .....	17
Şekil 14. ABTS•'nin persülfatla oksidasyonu .....	17
Şekil 15. Kapilerden ekstraktöre numune geçişi (www.waters.com).....	21
Şekil 16. Elektrosprey iyon kaynağı (ESI) şematik gösterimi.....	22
Şekil 17. Kuadrupol tipi kütle analizörü şematik gösterimi .....	23
Şekil 18. Grayanotoksin-III izoformunun LC-MS/MS ile identifikasyonu.....	31
Şekil 19. GTX-III analizi LC/MS-MS standart kalibrasyon grafiği .....	40
Şekil 20. Bal örneklemlerinin GTX-III miktarının grafiksel gösterimi.....	43
Şekil 21. Bitki örneklemlerinin GTX-III miktarının grafiksel gösterimi .....	46
Şekil 22. Fenolik bileşenler 280 nm'deki kromatogramı .....	48
Şekil 23. Fenolik bileşenler 315 nm'deki kromatogramı .....	48
Şekil 24. Bal örneklemlerinin Toplam Polifenol ve FRAP testi sonuçları korelasyonu.....	66
Şekil 25. Bal örneklemlerinin DPPH ve ABTS testi sonuçları korelasyonu .....	67
Şekil 26. Bitki örneklemlerinin Toplam Polifenol ve FRAP testi sonuçları korelasyonu.....	68
Şekil 27. Bitki örneklemlerinin DPPH ve ABTS testi sonuçları korelasyonu.....	69

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Ericaceae familyasındaki türlerin grayanotoksin bulundurma oranı .....	1
Tablo 2. Grayanotoksin izofromlarının R grupları .....	2
Tablo 3. Bazı fenolik asitlerin yapısal gösterimleri .....	10
Tablo 4. Flavonoid grupları .....	11
Tablo 5. Bazı antosiyanidinlerin fonksiyonel grupları ve barındırdığı renklilikleri .....	12
Tablo 6. Bazı flavonol ve flavon fonksiyonel grupları .....	13
Tablo 7. Bazı flavanonların fonksiyonel grupları .....	14
Tablo 8. Bazı kateşinlerin fonksiyonel grupları.....	14
Tablo 9. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri.....	24
Tablo 10. Kullanılan kimyasallar ve satın alınan firma bilgileri .....	25
Tablo 11. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları .....	26
Tablo 12. Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler .....	28
Tablo 13. RP-HPLC-UV gradient programı .....	33
Tablo 14. Toplam Polifenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri.....	34
Tablo 15. FRAP tayinindeki deney şartları.....	35
Tablo 16. DPPH yöntemi için deney şartları .....	36
Tablo 17. ABTS yöntemi için deney şartları .....	36
Tablo 18. GTX-III MS-MS tarama parametreleri.....	39
Tablo 19. Lineer ölçüm aralıkları ve $R^2$ değerleri .....	40
Tablo 20. GTX-III'e ait tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri .....	41
Tablo 21. Tekrar edilebilirlik çalışmasında elde edilen ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı (CV) değerleri.....	41
Tablo 22. Geri kazanım çalışmasında 3 farklı konsantrasyon da elde edilen % geri kazanım değerleri .....	42
Tablo 23. Bal örneklemelerin GTX-III miktarı .....	43
Tablo 24. Bitki örneklemelerin GTX-III miktarı.....	45
Tablo 25. RP-HPLC-UV validasyon parametreleri .....	47
Tablo 26. RP-HPLC-UV ile bal örneklemeleri fenolik bileşen sonuçları .....	49
Tablo 27. RP-HPLC-UV ile mor çiçekli orman gülü bitkileri fenolik bileşen sonuçları.....	50

Tablo 28.	RP-HPLC-UV ile sarı çiçekli orman gülü bitkileri fenolik bileşen sonuçları.....	51
Tablo 29.	Bal örneklemi toplam Polifenol ve FRAP testleri sonuçları .....	52
Tablo 30.	Bal örneklemi DPPH ve ABTS testleri SC <sub>50</sub> sonuçları .....	54
Tablo 31.	Orman gülü bitkileri Toplam Polifenol ve FRAP testleri sonuçları .....	55
Tablo 32.	Orman gülü bitkileri DPPH ve ABTS testleri SC <sub>50</sub> sonuçları .....	56
Tablo 33.	Sıçan serumları biyokimya sonuçları .....	59
Tablo 34.	Bal örneklemi antioksidan korelasyon tablosu.....	67
Tablo 35.	Orman gülü bitkileri antioksidan korelasyon tablosu.....	69
Tablo 36.	Paired samples testi korelasyonu .....	71
Tablo 37.	Paired samples test analizi .....	72

## SEMBOLLER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ALP	: Alkalen fosfataz enzim
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
<i>c</i>	: Eğim çizgisi kesim noktası
CAT	: Katalaz
CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O	: Sodyum asetat trihidrat
Cl	: Kimyasal iyonlaştırma
CK	: Kreatin kinaz
CK-MB	: Kreatin kinaz-miyokardial band
Cl	: Klor
cm	: Santimetre
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeme antioksidan kapasitesi
CV	: Varyasyon katsayısı
DAD	: Diyot serili spektrofotometreler
DC	: Doğru akım
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
EB	: Elektron bombardmanı
ESI	: Elektro sprey iyonlaştırma
eV	: Elektro volt
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi
g	: Gram
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GC	: Gaz kromatografisi
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon

GST	: Glutasyon-S-transferazlar
GTX	: Grayanotoksin
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	: İç standart
IT	: İyon tuzaklı
K	: Potasyum
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	: Potasyum persülfat
kV	: Kilovolt
L	: Litre
LC	: Likit kromatografisi
LC-MS/MS	: Likit Kromatografisi/Kütle/Kütle Spektrometresi
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LDL	: Düşük yoğunluktaki lipoprotein
LOD	: Dedeksiyon limiti
LOQ	: Tayin limiti
m	: Metre
<i>m</i>	: Kalibrasyon eğrisinin eğimi
<i>m-</i>	: Meta pozisyon
mM	: Milimolar
M	: Molar
m/z	: kütle/yük
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
M.Ö.	: Milattan önce
MS	: Kütle spektroskopisi
N	: Normalite
Na	: Sodyum
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum karbonat
NaHPO <sub>4</sub>	: Sodyum hidrojen fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit

nm	: Nanometre
NPC	: Normal faz kromatografisi
<i>o</i> -	: Orto pozisyon
ORAC	: Oksijen radikal absorbanans kapasite
<i>p</i> -	: Para pozisyon
pH	: Hidrojenin gücü
ppm	: Milyonda bir birim
R <sup>2</sup>	: Korelasyon katsayısının
RF	: Radyo frekans
RNS	: Reaktif nitrojen
ROS	: Reaktif oksijen
RP-HPLC-UV	: Ters faz- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- Ultra viyole
RPC	: Ters faz kromatografisi
RPM	: Dakikadaki devir sayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
RT	: Alıkonma zamanı
SC <sub>50</sub>	: % 50 İnhibisyon konsantrasyonu
SD	: Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma
SFC	: Süper akışkan kromatografisi
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
SRM	: Seçilmiş reaksiyon izleme
TEAC	: Troloks <sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan kapasite
TEAP	: Troloks <sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç
TOF	: Uçuş zamanlı
TP	: Toplam polifenolik madde
TPTZ	: Tripridilriazin
Troloks <sup>®</sup>	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TRAP	: Toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Bölge



V	: Volt
v/v	: Hacim/hacim
vd.	: Ve diğeri
-H	: Hidrojen iyonu
-OCH <sub>3</sub>	: Metoksi
-OH	: Hidroksil iyonu
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
Q	: Kuadropol
$\mu$	: Mikro
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
%	: Yüzde
•	: Radikal

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Toksinler

Toksin, insanlarda hastalığa neden olan, biyolojik olmayan maddeler grubudur. Bu maddeler belirli bir dozda ağız, solunum veya deri yoluyla alındığında biyolojik sistemlere zarar verebilen özelliktedirler. Birçok toksin gıda kaynaklı ve doğal kökenlidir. Gıdalarda bulunan toksik maddeler; doğal besin kaynaklı toksinler, mikrobiyal toksinler ve kimyasal kirleticiler olmak üzere üç başlıkta toplanmaktadır.

Doğal besin kaynaklı toksinler, bitki, hayvan ve mantar kaynaklı; mikrobiyal toksinler bakteriyal ve mikotoksinler; kimyasal kirleticiler ise pestisit, metaller, ilaç, deterjan ve dezenfektan kalıntıları, radyoaktif madde kalıntıları vb. şeklinde değerlendirilmektedir.

### 1.2. Grayanotoksin (GTX) Nedir?

Grayanotoksin bir diterpen olup, azotsuz polihidroksile siklikhidrokarbonlardan oluşur (Lampe, 2009). *Rhododendron* L. (Ericaceae familyası) gibi bazı bitkilerin nektar, polen ve yaprak kısımlarında bu toksin grubu görülmektedir (Stevens, 1978).

Türkiye’de sık görülen toksik *Rhododendron*lar; *R. luteum* ve *R. ponticum*’dur (Gunduz vd., 2008). Amerika’nın batısındaki toksik rhododendronlar batı açelyası (*R. occidentale*), Kaliforniya gülü (*R. macrophyllum*) ve *R. albiflorum*’dur. Kuzey Amerika’nın doğusunda dağ defnesi (*Kalmia latifolia*) ve koyun defnesi (*Kalmia angustifolia*) de grayanotoksin içerirler. Tallent vd. (1957) ve Adler (2000) Ericaceae familyasındaki türlerin grayanotoksini az veya çok bulundurma durumuna göre spektroskopik veriler nazarında özetlemiş ve bu özet Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Ericaceae familyasındaki türlerin grayanotoksin bulundurma oranı

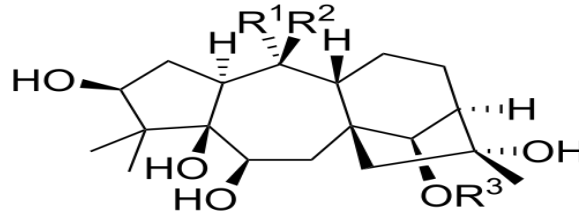
Tür	Grayanotoksin Bulunma Oranı <sup>a</sup>
<i>Agauria</i> spp. (DC.) Hooker	*
<i>Andromeda</i> ( <i>Pieris</i> ) L.	

Tablo 1'in devamı

<i>Pieris japonica</i> (Thunb.) D. Don	***
<i>Rhododendron</i> L.	
<i>R. luteum</i> Sweet	**
<i>R. ponticum</i> L.	**
<i>R. occidentale</i>	*
<i>R. macrophyllum</i>	*
<i>R. albiflorum</i>	*
<i>R. maximum</i> L.	**
<i>R. japonicum</i> (Gray) Suringar	*
<i>R. catawbiense</i> Michx.	***
<i>Kalmia</i> L.	
<i>Kalmia latifolia</i> L.	*
<i>K. angustifolia</i> L.	***
<i>Pernettya</i> Gaud.	
<i>P. coriacea</i> Klotzsch	**

<sup>a</sup> Bulunma oranı (spektroskopik veri); “\*”, “az”, “\*\*”, “orta” ve “\*\*\*”, “çok”

En son 60 farklı grayanotoksin çeşidi belirlenmiş olup bunlardan I, II, III ve IV izoformları sıklıkla karşılaşılan toksik ajanlardır (Gunduz vd., 2011). Grayanotoksin I, andromedotoksin; grayanotoksin II, desasetilanhidromedotoksin; grayanotoksin III ise desasetilandromedotoksin olarak tarif edilir (Kurtoğlu, 1992).



Şekil 1. Grayanotoksin formları

Tablo 2. Grayanotoksin izoformlarının R grupları

Grayanotoksin	-R <sup>1</sup>	-R <sup>2</sup>	-R <sup>3</sup>
Grayanotoksin I	-OH	-CH <sub>3</sub>	-H
Grayanotoksin II		-CH <sub>2</sub> -	-H
<b>Grayanotoksin III</b>	<b>-OH</b>	<b>-CH<sub>3</sub></b>	<b>-Ac</b>
Grayanotoksin IV		-CH <sub>2</sub> -	-Ac

Rhododendronda ana toksik izomer grayanotoksin III olmasına rağmen, grayanotoksin I ve grayanotoksin II az miktarlarda bulunmaktadır.

### 1.3. Türkiye’de Sık Görülen Toksik Rhododendronlar-Orman Gülü

Türkiye başta olmak üzere İspanya, Portekiz, Japonya, Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Nepal ve İngiliz Kolombiyası’nda *Rhododendron* familyasının 750’den fazla türü bulunur ama her türünde grayanotoksin yoktur (Viccellio, 1993; Milne ve Abbott, 2000). Toksin ihtiva eden türler arasında Türkiye’de özellikle Doğu Karadeniz’in dağlık kesiminde mor çiçekli (*Rhododendron ponticum*) ve sarı çiçekli (*Rhododendron luteum*) fazlasıyla yayılım göstermiştir (Şekil 2-5) (Terzioğlu vd., 2001).



Şekil 2. *Rhododendron luteum*



Şekil 3. *Rhododendron ponticum*



Şekil 4. *R. luteum* Türkiye’deki dağılımı



Şekil 5. *R. ponticum* Türkiye’deki dağılımı

Bu türler, siyah zehir ve sarı zehir olarak bilinmektedir. Kuzey Karadeniz sahil kıyısı boyunca uzanan dağlarda bulunan bu iki *Rhododendron* türünün çiçekleri grayanotoksin içerdikleri için, bu çiçeklerden üretilen ballar toksik etki taşıyabilmektedirler.

Halk arasında “eğriçiçeği”, “zifin” ya da “sarı ağu” gibi isimlerle de bilinen, *R. luteum*, Türkiye’de yayılışı bilinen diğer orman gülü türlerinden farklı olarak, kışın yapraklarını döken bir çalı türüdür. Yaklaşık 4 metreye kadar boylanabilir ve sarı renkteki çiçeklerinin 5-15 tanesi sürgün ucunda bir arada bulunur.

*R. ponticum* her dem yeşil, mor çiçekli Karadeniz Bölgesi’nde invaziv olarak gelişen bitkilerdendir, yanı sıra pek çok Akdeniz ülkesinde ve Britanya adalarında orman yaşamını tehdit etmektedir. *R. ponticum*’ un toksin miktarı yüksektir. Fakat *R. ponticum* Kuzey Anadolu’da romatizmal ya da diş ağrısı, yaygın soğuk algınlığı ve ödem tedavisinde dâhili ve harici analjezik olarak kullanılır.

#### 1.4. Bal ve Bileşimi

Bal, eski çağlardan günümüze kadar şekerin konsantre hali olarak viskoz ve aromatik özellik taşıyan ve terapötik önemi giderek artan bir besin maddesidir. Bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından doğadan toplanır ve içeriğinde yaklaşık 200 bileşene yer verdiği bilinir (FAO, 1996; Weston, 2000). Türk Gıda Kodeksine göre ise bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının, salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi,

Bal Tebliği, 2012/58). Ayrıca gerek Türk Gıda Kodeksi ve gerekse Codex Alimentarius ile European Commission kriterlerine göre balın herhangi bir katkı maddesi kabul etmeyeceği vurgulanmaktadır (Codex STAN, 2001; European Commission, 2002).

Balın bileşimi bulunduğu floraya, çevre koşullarına, koloninin durumuna ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir (Anklam, 1998; White, 1979). Bal, ana bileşen olarak karbohidrat ve suyun yanında organik asitler, aminoasitler, proteinler, uçucu bileşenler, enzimler ve fenolik bileşenler de içermektedir. Balın bileşimi çeşitlilik göstermekle birlikte tipik bir bal ortalama % 76 şeker, % 20 su, % 0,18 kül, % 1 toplam polifenol, protein gibi bileşenlerin yanı sıra koruyucu olarak  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, flavonoidler ve diğer fenolikler, glukoz oksidaz, katalaz ve peroksidaz gibi enzimleri de içermektedir (White, 1979).

### **1.5. Orman Gülü Balı (Deli Bal)**

Orman gülü balı, yüksek oranda grayanotoksin içeren Sapindaceae familyası ve Ericaceae familyasının *Rhododendron ponticum* ve *Rhododendron luteum* türlerinin nektarının bal arıları tarafından toplanması, dehidre edilip, olgunlaşması sonucu oluşturulan doğal bir üründür (Bölükbaşı 2010; Çeter ve Güney, 2011). Bu bal, amber renginde ve berrak görünümlü olup kendine has tadı kokusu olan ve kolay kristallenmeyen bir besindir. Kaynatılırsa ve uzun süre bekletilirse toksisitesi kaybolur. Bu nedenle zehirlenmeler taze balla ortaya çıkmaktadır. Halk arasında bu tür balların sütle kaynatılıp köpüğü alınmak suretiyle zehirsiz hale geleceği yaygın bir inanıştır (Çalangu, 1995). Bu bal ülkemizde, halk arasında deli bal, tutar bal veya acı bal olarak bilinir (Pamir, 1969; Kurtoğlu 1992). Yapılan bilimsel çalışmalarda orman gülü balının nem, kül, şeker, mineral madde yönünden diğer ballardan farklı olmadığı bildirilmektedir (Silici vd., 2010). Yapılan bilimsel çalışmalarda bu balın yüksek fenolik madde içeriğine sahip olduğu ve bundan dolayı yüksek antioksidan, antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Silici vd., 2010). Dolayısıyla bu bal her ne kadar toksik etkiye sahip ajanlar barındırırsa da öte yandan azımsanmayacak derecede biyoaktif özelliğe de sahip olduğu vurgulanmaktadır (Silici vd., 2010).

## 1.6. Orman Gülü Balı (Deli Bal) Tarihçesi

Bal zehirlenmesi *Rhododendron* türü bitkilerin çiçeklerinden beslenen arılar tarafından oluşturulan balın yenmesiyle meydana gelir. *Rhododendron* zehirlenmesi, deli bal zehirlenmesi veya grayanotoksin zehirlenmesi gibi isimler alır.

Tarihsel süreçte ilk defa deli bal, M.Ö. 67'de Kuzeydoğu Anadolu'da Kral Mithradates IV. tarafından Pompeyin ordularına karşı taktiksel manada kullanılmıştır. Kralın başdanışmanı ve tabibi olan Kateus'un taktiği doğrultusunda kendi topraklarına ilerleyen Romalıların yolu üzerine içi orman gülü balı ile dolu petekler konulmuştur. Bu baldan tüketen Romalı askerler kısa sürede zehirlenerek etkisiz hale getirilmiştir (Eraydın, 2011).

M.Ö. 401 yılında gerçekleşen bir olayı betimleyen ve literatüre kazandıran Yunan tarihçi ve komutan Xenophon, deli bal zehirlenmesi olayına "Sirus'un Sevki" günlüğünde şu şekilde yer vermiştir: "Colchianların dağına çıkıp yerlilerini bozguna uğrattıktan sonra, Yunanlılar onların köylerinde kamp kurdular. Orada onlara garip gelen bir şey yoktu, ama arı kovanlarının çokluğu alışılmıştın dışındaydı ve bu bal peteklerinden yiyen askerlerin hepsi şuurlarını kaybettiler, kustular ve ishal oldular. Ayrıca hiç birisi ayakta duramıyordu; sadece biraz yiyenler aşırı sarhoş, fazla yiyenler çıldırma noktasında, bazıları ise ölüm derecesindeydi. Baldan yiyen askerlerin hepsi yere yığılıp kaldılar. Orada sanki büyük bir yenilgi olmuştu ve genel bir hüznün ve çöküntü hali vardı. Ertesi gün onlardan hiçbiri ölü bulunmadı ve şuurlarını aşağı yukarı bir önceki gün kaybettikleri zamanla eş değerli olarak geri kazandılar, üçüncü ve dördüncü günde ise sanki bir beden eğitimi yapmışçasına ayağa kalktılar." (Gökçel, 1984; Eraydın, 2011). Tarihte kendisini yer verilen bu iki olay anlaşıldığına göre orman gülü balı biyolojik silah olarak kullanılmıştır.

1794 yılında orman gülü balı zehirlenmesinin etkileri ABD'de ilk defa Amerikalı botanik uzmanı Barton tarafından Amerikan Filozoflar Topluluğunda sunmuş, 1802 yılında ise bu bulgular bir dergide yayınlamıştır (Tutkun, 1993).

Ondokuzuncu yüzyılda Avrupa ve Kuzey Amerika'da karşılaşılan deli bal zehirlenme olguları kayıt altına alınmış, bu doğrultuda Colema, 1853 yılındaki çalışmasında New Jersey'den 14 ve Branchville'den ise 23 orman gülü balından zehirlenen hastaya ait semptomları dünya literatürüne kazandırmıştır (Kebler, 1896).

1896'da Amerikan eczacılar birliğinin yıllık toplantısında konuşan Kebler, ABD'deki orman gülü balı zehirlenmesi vakalarını Princeton ve New Jersey'de görülen 8 adet zehirlenmeyle örneklendirmiştir (Kebler, 1896).

Geçmişe dayanan bu örneklemlerin yanı sıra halen günümüzde yılın belirli dönemlerinde orman gülü balı kaynaklı zehirlenme vakaları rapor edilir durumdadır (Durmus vd., 2007).

### **1.7. Orman Gülü Balı İçeriğindeki Toksinin Vücuda Etkisi**

Hücre membranlarındaki sodyum kanallarına bağlanarak toksik etki oluşturduğu bildirilen GTX, hücre membranlarda sodyum iyonlarının permeabilitesini artırmaktadır (Başgöl, 2003). Hücreler böylece depolarize durumda kalır. İskelet kasına, kalp kasına ve santral sinir sistemine etkileri buna bağlıdır. Çoğunlukla öldürücü olmayan GTX zehirlenmelerinde belirtiler; cilt ve boğazda yanma hissi, ağız ve burunda kaşınma, deride ve gözlerde kızarıklık, vertigo ve baş ağrısı, bulantı, kusma, salivasyon, kramp tarzı karın ağrısı, idrar ve gaita kaçırma, gastroenterit, halsizlik, görme bulanıklığı veya geçici körlük, ateş nöbetleri, derin bradikardi, hipotansiyon veya kollaps, hipereksitabilite, konvülzyon, delirium ve hatta koma ortaya çıkabilir (Başgöl, 2003; Gunduz vd., 2008; Dilber vd., 2002). Ayrıca her tür ritm bozukluğu bildirilmiştir (Onat vd., 2001; Gunduz vd., 2006). Toksik dozu bilinmemekte olup, zehirlenme doza bağlı olarak (5-30 g) birkaç dakikadan 2 veya daha fazla saatlik latent periyot sonrası ortaya çıkar (Sütlüpinar ve Mat, 1993). En sık görülen bulgular olan hipotansiyon, bradikardi ve diğer disritmiler, solunum sistemine olan etkilerinin yanında, pek sık görülmeyen bir etki olan konvülzyondur (Gunduz vd., 2008a).

### **1.8. Alternatif Tıpta Balın Önemi-Apiterapi**

Apiterapi arı ürünleri ile yapılan tedavi yöntemlerine verilen genel bir isimdir. Başta bal olmak üzere arı ürünleri geçmişten günümüze değin halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Geleneksel bu kullanım tarzı bilim dünyasının ilgisi çekmiş, arı ürünleri ve de özellikle bal, bilimsel araştırmalar için önemli bir parametre olmuştur.

Bünyesinde barındırdığı birçok yararlı tıbbi etkiden ötürü bal, çok yüksek potansiyelli bir besindir. Bu potansiyelin önemli bir merhalesini oluşturan antimikrobiyal özelliği onun doğal bir besin olduğunu ortaya koymuştur (Mundo vd., 2004). Bu özellik



balın doğasında bulunan glukoz oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksitle ve fenolik bileşiklerle ilişkilidir (Ulusoy, 2012; Silici vd., 2010; Alvarez-Suarez vd., 2010; Al-Waili vd., 2011).

Ayrıca bal, yara ve yanıkların tedavisinde, cilt rahatsızlıklarında ve mide rahatsızlıklarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Ulusoy, 2012). Tıbbi destekli yapılan çalışmalara göre balın, mide ve bağırsakla ilgili bozukluklarda (Haffeejee vd., 1985; Ladas vd., 1995), yara ve yanıkların iyileşmesinde (Efem, 1988; Subrahmanyam, 1991; Syazana vd., 2011), akut ve kronik mide lezyonlarına karşı gastrik koruma sağlamasında önemli bir dayanak olduğu gösterilmiştir (Ali, 1991; Ali, 1995; Biglari vd., 2012).

Başka bir araştırmada da AIDS hastalarının oral kavitesinden izole edilen Candida türlerine karşı balın antifungal aktivite gösterdiği ve böylece oral lezyonları tedavi etmede kullanılabileceği öngörülmüştür (Mulu vd., 2010; Ulusoy, 2012).

Balın antioksidan özelliği yapısında bulunan fenolik bileşenler, askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferoller,  $\beta$ -karotenler gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu kimyevi içerik botanik orjinin farklılaşması nedeniyle balın türünden türüne değişmektedir (Frankel vd., 1998). Bünyesinde saklı tuttuğu bu özellik vücutta sürekli oluşum halinde olan radikalik maddelerin etkilerini azaltmak veya yok etmek için kullanılmaktadır (Küçük vd., 2007).

### **1.9. Antioksidan Bileşenler**

Oksijen hem aerobik yaşamın kaynağı hem de enerji metabolizması için gerekli bir elementtir. Ancak bu faydalı elementin yaşam boyunca birçok olumsuz etkiye de sebep olduğu bilinmektedir (Diplock, 1998). Çünkü biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen içeren serbest radikaller olup bunlara serbest oksijen radikalleri (SOR) adı verilmektedir. SOR'lar oksijenin suya indirgenmesi sırasında ve farklı oksidatif stres mekanizmalarıyla oluşmaktadırlar. Oksijenin eksik indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri en iyi bilinen radikallerdir (Saral, 2013; Akkuş, 1995). Ortaklanmamış elektron çiftine sahip olan bu radikallerin kimyasal reaktiviteleri oldukça yüksektir. Dolayısıyla protein, lipid ve DNA gibi birçok biyolojik materyale zarar vermektedirler.

Antioksidanlar, bu ve bunun gibi radikallerin etkisiyle meydana gelen oksidasyonu yavaşlatan veya durduran ya da oluşmasını engelleyen her türlü moleküle denilmektedir (Young ve Woodside, 2001). Endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen

(dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılırlar (Halliwell vd., 1992).

Endojen antioksidanlar; hem enzimatik yapıda hem de nonenzimatik yapıda olabilirler (Jerry vd., 2000). Enzimatik antioksidanlara; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimatik olmayan antioksidanlara redükte glutatyon (GSH), bilirubin, ferritin, albumin, seruloplazmin, melatonin, sistein, metiyonin, laktoferrin, transferrin, haptoglobülin ve ürik asit verilebilir (Saral, 2013; Young ve Woodside, 2001; Fang vd., 2002; Mantle ve Preedy, 1999).

Eksojen antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Saral, 2013; Kolaylı ve Keha, 1999).

### **1.10. Fenolik Bileşikler**

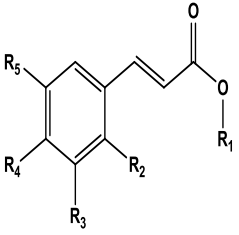
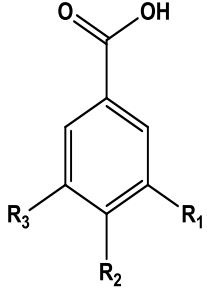
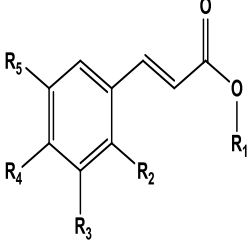
Sekonder metabolitler olarak da ifadelendirilen fenolik bileşikler, bitkiler aleminde oldukça önem arz eden temel bileşenlerdir (Burns vd., 2001). Besinsel ve organoleptik açıdan önemli olan bu bileşikler, altı üyeli aromatik halkaya (benzen) direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren aromatik bileşenlerdir (Fang vd., 2007). Genel olarak basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddelere ise polifenoller denir. Özetle bilinen tüm fenolik bileşikler, basit fenollerdeki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanması ile oluşmuşlardır (Hallaç Türk, 2009; Karaçalı, 2002). Başlık bazında fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere 2 grup altında toplanmaktadır (Khoddami vd., 2013).

#### **1.10.1. Fenolik Asitler**

Serbest halde bulunmayan, sinnamik ve benzoik asitten hidroksillenerek türevlenen ve böylece ayrımı yapılan fenolik asitler, bitkilerin major üyelerindendir. Fenolik asitlerin fonksiyonel gruplarından karboksil grupları, karbohidratlar, glikozidler, aminoasitler veya

proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikleriyle de amidleri oluştururlar. Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Harborne, 1998; Akyüz vd., 2013). Grubun üye başlıkları, hidroksisünamik asitler (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), hidroksibenzoik asitler (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) ve hidroksisünamik asit türevleridir. Tablo 3’de bu başlıklara örnekler sunulmuştur.

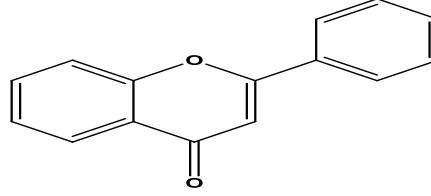
Tablo 3. Bazı fenolik asitlerin yapısal gösterimleri

Fenolik Asitler						
Hidroksisünamik Asitler (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> )						
	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>	-R <sub>4</sub>	-R <sub>5</sub>	
	Kafeik Asit	-H	-H	-H	-OH	-OH
	Ferulik Asit	-H	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>
	İzoferulik Asit	-H	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH
	<i>p</i> -Kumarik Asit	-H	-H	-H	-OH	-H
	<i>o</i> -Kumarik Asit	-H	-OH	-H	-H	-H
	Sinapik Asit	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>
Hidroksibenzoik Asitler (C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> )						
	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>			
	Gallik Asit	-OH	-OH	-OH		
	Protokatekuik Asit	-OH	-OH	-H		
	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	-H	-OH	-H		
	<i>m</i> -OH Benzoik Asit	-OH	-H	-H		
	Vanilik Asit	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H		
	Şiringik Asit	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>		
Hidroksisünamik Asit Türevleri						
	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>	-R <sub>4</sub>	-R <sub>5</sub>	
	Klorojenik Asit	Kuinik Asit	-H	-H	-OH	-OH
	İzoklorojenik Asit	Kuinik Asit	-H	-OH	-OH	-H
	Kaftarik Asit	Tartarik Asit	-H	-H	-OH	-OH
	Kutarik Asit	Tartarik Asit	-H	-H	-OH	-H
	Fertarik Asit	Tartarik Asit	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>

### 1.10.2. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Bu bileşikler bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluştururlar ve bitki pigmentleri olarak bilinmektedir. Bu etmenlerin yanında genel manada farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antifungal, antiinflamatuvar, antialerjik, antikanserojen özelliklerinin olduğu da bilinmektedir (Havsteen, 2002; Hallaç Türk, 2009; Havsteen, 2002).

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ( $C_6-C_3-C_6$ ) yapısındadır (Şekil 6).



Şekil 6. Flavonoidlerin genel yapısı

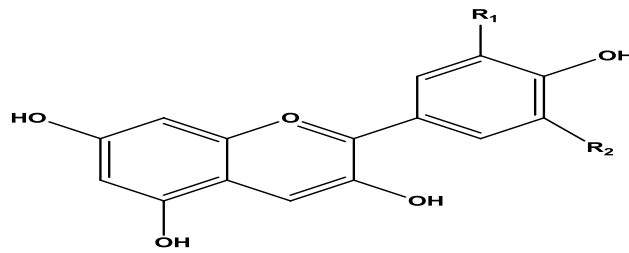
Yapılarındaki -OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Nizamlioğlu ve Nas, 2010). Bu bileşikler bitkide hastalık etmenlerine karşı savunma mekanizmasında ve gelişme faktörleri üzerinde büyük rol oynar. Bitkilerde çoğunlukla glikozit formunda ve hücre öz suyunda çözünen pigmentler olarak vakuollerde ve idioplastlarda bulunurlar (Sefer, 2000). Yaklaşık 6500 farklı flavonoid türü yapısal olarak 5 farklı başlıkta toplanmaktadır ve Tablo 4'te verilmiştir (Saldamlı, 2007). Bu gruplar flavonoidlerin yapısında bulundurduğu heterosiklik halkanın oksidasyon derecesine göre farklılık arz etmektedir (Halaç Türk, 2009).

Tablo 4. Flavonoid grupları

Grup İsmi	
1	Antosiyanidinler
2	Flavonlar ve Flavonollar
3	Flavanonlar
4	Kateşinler ve Löykoantosiyanidinler
5	Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

### 1.10.2.1. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlere glikozit olarak bağlanmış halde bulunurlar ve şekerlere bağlanma pozisyonlarına göre gruplandırılırlar (Shahidi ve Nacz, 1995). Antosiyaninler, bitkilerde pembe, kırmızı, mavi, turuncu ve mor tondaki çeşitli renklerini veren ve suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir (Hulme, 1971). Şekil 7’de antosiyanidinlerin genel yapıları ve Tablo 5’de bazı üyelerinin fonksiyonel gruplarına yer verilmiştir (Belitz ve Grosch, 1999).



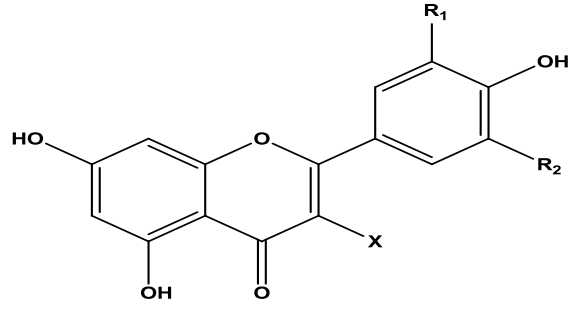
Şekil 7. Antosiyanidinlerin genel yapısı

Tablo 5. Bazı antosiyanidinlerin fonksiyonel grupları ve barındırdığı renklilikleri

Antosiyanidinler	Kısaltması	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	Renkliliği
Delfinidin	Dp	-OH	-OH	Koyu Mavi
Malvinidin	Mv	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	Mor
Pelargonidin	Pg	-H	-H	Turuncu
Peonidin	Pn	-OCH <sub>3</sub>	-H	Açık Kırmızı
Petunidin	Pt	-OCH <sub>3</sub>	-OH	Mavi-Mor
Siyanidin	Cy	-OH	-H	Kırmızı

### 1.10.2.2. Flavonlar ve Flavonollar

Flavon ve flavonolların kimyasal yapı farklılıkları, orta halkanın 3. pozisyonundaki karbon atomuna bağlı grubun -H veya -OH grubu olmasından kaynaklanmaktadır (Cemeroglu vd., 2001). Yapısal olarak antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar (Saldamlı, 2007). Şekil 8’de flavonlar ve flavonolların genel yapıları ve Tablo 6’da bazı üyelerinin fonksiyonel gruplarına yer verilmiştir (Cemeroglu, 2004).



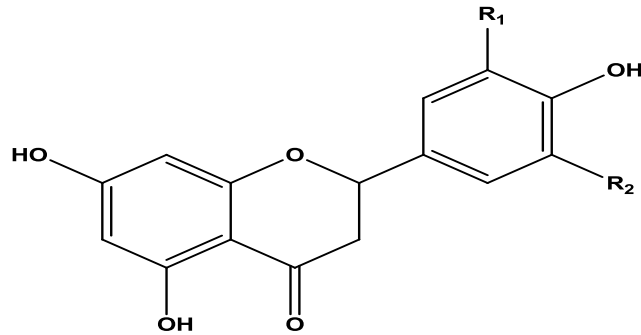
Şekil 8. Flavonoller ve flavonların genel yapısı

Tablo 6. Bazı flavonol ve flavon fonksiyonel grupları

Flavonoller			Flavonlar		
X= -OH			X=-H		
	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>		-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>
İsoramnetin	-OCH <sub>3</sub>	-H	Apigenin	-H	-H
Kamferol	-H	-H	Krisoeriol	-OCH <sub>3</sub>	-H
Kuersetin	-OH	-H	Luteolin	-OH	-H
Mirisetin	-OH	OH	Trisin	- OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>

### 1.10.2.3. Flavanonlar

Flavanonlar da doğada genellikle glikozid formda bulunurlar. Yapısal olarak flavonlardan farkı C<sub>3</sub> halkasında çift bağ bulundurmaz. Şekil 9'da flavanonların genel yapıları ve Tablo 7'de bazı üyelerinin fonksiyonel gruplarına yer verilmiştir (Nibbs ve Scheidt, 2012).



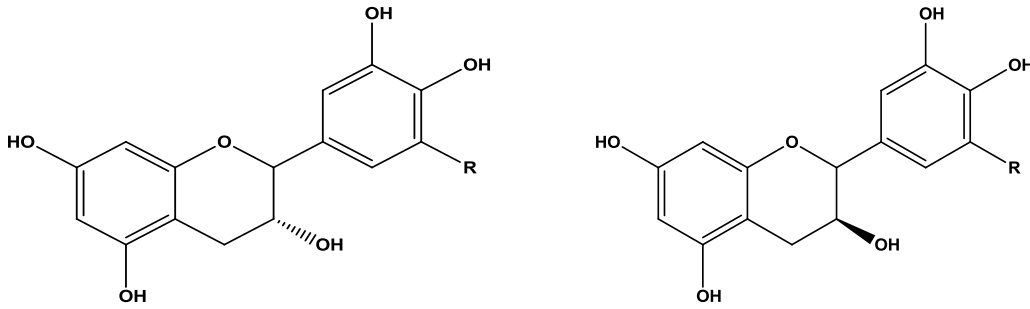
Şekil 9. Flavanonların genel yapısı

Tablo 7. Bazı flavanonların fonksiyonel grupları

	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>
Naringenin	-H	-OH
Eriodictyol	-OH	-OH
Hesperetin	-OH	-OCH <sub>3</sub>

#### 1.10.2.4. Kateşinler ve Löykoantosiyanidinler

Hidroksil grubu ve üçüncü karbon atomunda doymuş bağ içeren flavonoidler, flavonoller olarak bilinirler ve renksiz bileşiklerdir. Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Şekil 10'da kateşinlerin genel yapıları ve Tablo 8'de bazı üyelerinin fonksiyonel gruplarına yer verilmiştir (Shahidi ve Nacz, 1995).



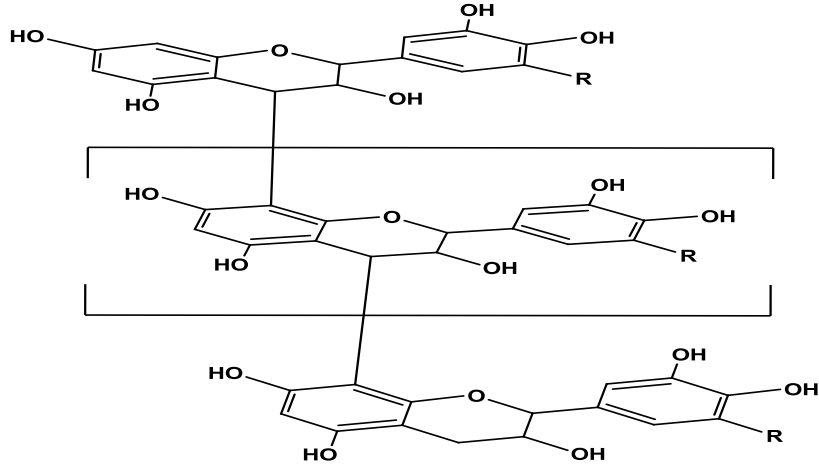
Şekil 10. Kateşinlerin genel yapıları

Tablo 8. Bazı kateşinlerin fonksiyonel grupları

Form A		Form B	
	-R		-R
(-)-Epikateşin	-H	(-)-Epigallokateşin	-H
(-)-Epigallokateşin	-OH	(+)-Gallokateşin	-OH

#### 1.10.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

Proantosiyanidinler, kateşinlerden veya löykoantosiyanidinlerden oluşan polimerik yapılardır. Şekil 11'deki gibi şayet epikateşin ve kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin ve gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin denir (Nizamlioglu ve Nas, 2010).



Şekil 11. Proantosiyandinlerin kimyasal yapısı; R=H: Prosiyanidin, R=OH: Prodelfinidin

### 1.11. Antioksidan Tayin Yöntemleri

*In vitro* ve *in vivo* olarak geliştirilmiş pek çok antioksidan aktivite ölçme yöntemi literatürde mevcuttur. Bu yöntemlerin dayandığı prensipler genel olarak oksidasyon oluşumunu önlemek, oluşan oksidan ajanların temizlenmesini veya indirgenmesini sağlamak, oksidasyon ürünlerinin etkilerinden koruyan ve oluşan radikalik zincir reaksiyonlarını durdurmaktır.

*In vitro* olarak toplam antioksidan aktivitenin ölçülmesinde ise iki temel prensibe dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; hidrojen atomunun transferine dayanan yöntemler (ORAC, TRAP, LDL-oksidasyonu vb.) ve elektron transferine dayanan yöntemlerdir (Toplan fenolik madde miktarının ölçüldüğü folin yöntemi, FRAP, TEAC, CUPRAC, DPPH,  $\beta$ -Karoten vb.) (Büyüktuncel E., 2013; Albayrak vd., 2010).

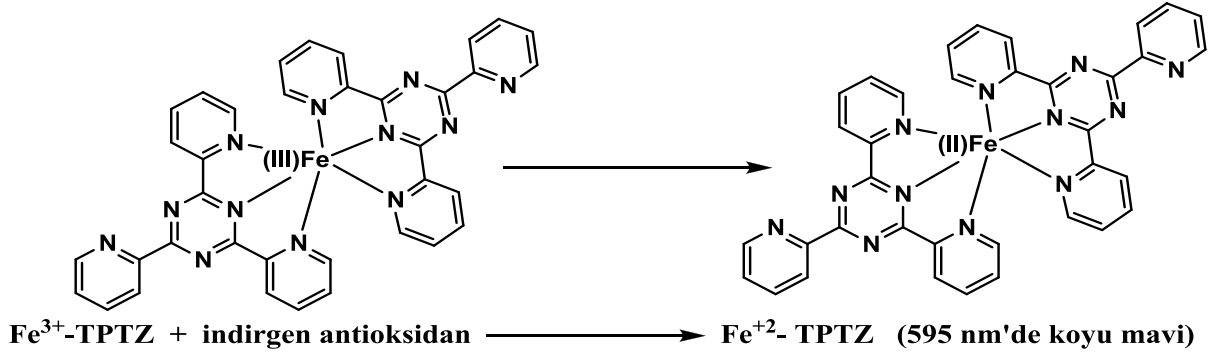
#### 1.11.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Yöntem doğal ürünlerde ve ballarda bulunan fenolik maddelerin Folin Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanan Folin (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999) metodu ile renk doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için en çok kullanılmaktadır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbans oluşturur.



### 1.11.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP

FRAP yöntemi, doğal ürünlerin antioksidan kapasitelerinin tayininde en sık kullanılan yöntem olup antioksidan maddelerin Fe (III)- TPTZ kompleksinde bulunan demir (III) iyonunun indirgenmesi esasına dayanan ve hidrojen transferi ne dayanan bir yöntemdir (Şekil 12). Metodu ilk olarak Oyaizu (1986) tarafından geliştirilmiş ve sonra Benzie ve Strain (1999) tarafından modifiye edilmiştir. Çözeltide bulunan antioksidan maddeler tarafından indirgenen demir (III) 760 nm'de absorbas verir, absorbans ne kadar yüksek olursa antioksidan aktivite o kadar yüksektir. Sonuçlar Troloks değeri cinsinden ifade edilir.

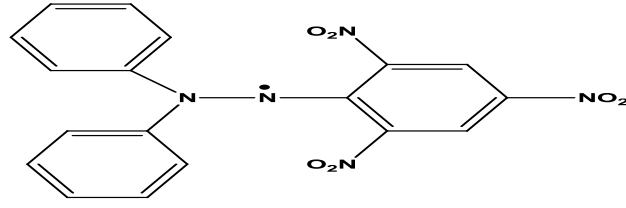


Şekil 12. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

### 1.11.3. Serbest Radikal Temizleme Antioksidan Tayinleri

#### 1.11.3.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

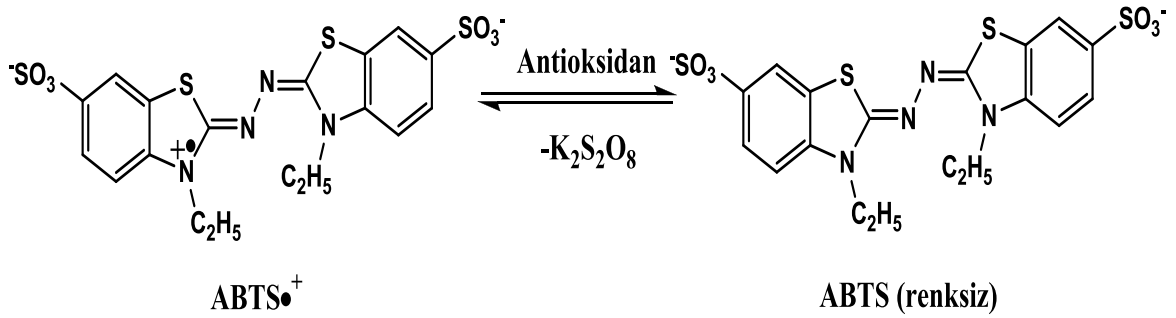
DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik olarak üretilen bir radikal olup 517 nm'de maksimum absorbans oluşturur (Cuendet vd., 1997) (Şekil 13). Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde DPPH•'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olmaktadır. Gerek standartlarla gerekse numunelerle reaksiyona giren DPPH• reaktifinin oluşturduğu absorbans değişimi 517 nm'de ölçülüp absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilir.



Şekil 13. DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) geometrik gösterimi

### 1.11.3.2. ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi

Hem biyolojik sıvılara hem de gıdalara uygulanabilen (Villano vd., 2004) ABTS yöntemi, çok kullanılan basit ve güvenilir bir antioksidan aktivite ölçüm metotlarından birisidir. Yöntem, ABTS'nin (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) oksidasyonu sonucu oluşan ABTS•<sup>+</sup> radikalinin etkisinin antioksidan maddece giderilmesi ve oluşan renkliliğin 600–750 nm dalga boyunda belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır (Şekil 14). Reaksiyon sonucunda ekstraktlar (numuneler)'in etkin konstrasyonları SC<sub>50</sub> cinsinden hesaplanmakta ve troloks standardı karşılığınca ifade edilmektedir (Garcia-Alonso vd., 2004).



Şekil 14. ABTS•'nin persülfatla oksidasyonu

### 1.12. Kromatografi

İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından bitki pigmentlerinin ayrımını yaparak geliştirilen, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen

hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun sabit faz boyunca geçirilir. Numune içerisindeki farklı bileşenler sabit faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleriyle elüsyon sağlanmış olur. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak bileşenler kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998; Akyüz, 2011). Hareketli fazın özelliğinin değişimi ile birlikte kromatografik özellik de değişmektedir. Bunlar, gaz (GC), sıvı (LC) ve süper akışkan (SFC) kromatografisi olmak üzere üç başlık altında toplanabilir. Sıvı ve gaz kromatografisi başlığı dört farklı prensip esas alınarak uygulanan bir tekniktir (Akyüz, 2011).

Bunlar:

- Adsorpsiyon kromatografisi (LC ve GC’de kullanılır.)
- Partisyon kromatografisi (LC ve GC’de kullanılır.)
- İyon değişimi kromatografisi (LC’de kullanılır.)
- Jel filtrasyon kromatografisi (LC’de kullanılır.)

### **1.12.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, gıda, çevre ve endüstriyel örneklerdeki organik ve inorganik bileşenlerin ayrımını sağlayan analitiksel bir tekniktir (Erdik vd., 2000). Bileşen karışımlardan her biri mobil (hareketli) fazın değişik akış oranlarında kolon denilen sabit bir faz üzerinde farklı sürelerde alınılarak ayrımı sağlanır. Basit bir HPLC cihazı; mobil faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, duruma göre öncü kolon, kolon fırını, dedektör ve kayıt tutucudan (bilgisayar) oluşmaktadır (Akyüz, 2011).

HPLC uygulamaları genelde tek bir çözücü veya gradient denilen birden fazla çözücü sisteminin karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Karışımdaki polarite ayarlaması ayrımı yapılacak olan maddenin polarite değerine göre farklılık arz etmektedir. Burada hareketli fazın akış hızı ayırma süresince aynı olmalı ve çözücü sisteminde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir. İleri hassasiyet için mobil faz içeriğindeki olası hava kabarcıklarının veya çözünmüş gazların giderilmesi adına HPLC cihazlarında pompa ünitesinden önce degaz üniteleri de mevcuttur (Skoog vd., 1998). Yüksek basınçlı mobil faz akış hızını sağlayan pompalar kromatografik ayrımın gerçekleştiği analitiksel kolonların öncesinde kendisine yer bulur. Düzenli akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır;

kolonda küçük iç çapı büyük akış hızı gerektirir ve günümüzde HPLC cihazları için 0,5-5 mL/dk akış hızı ve 400 bar 'a kadar çıkabilen pompalar üretilmiştir (Akyüz, 2011).

Analitiksel bir HPLC'de numune enjeksiyon sistemi otomatik veya manuel olmak üzere iki farklı şekilde olabilmektedir. Manuel olan bir sistemde örnek enjeksiyonu işleminin kolaylıkla yapılabilmesi ve çözücü akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir valfe gönderilir. Bu valf yardımıyla örneğin bulunduğu hareketli fazın kolana doğru taşınması sağlanır (Dursun, 2011).

HPLC'de bileşen ayrımı farklı kromatografik teknikler üzerine kurgulanmış ve bu kurgu analitlerin özelliklerine göre farklılık gösterir (Lindsay, 1987). Çoğu HPLC ayrımları dağılma tipinde; hareketli ve sabit fazların bağıl polarlığına dayalı olarak iki temel prensip esasında çalışır (Akyüz, 2011). Normal faz kromatografisinde (NPC), sabit faz hareketli fazdan daha polardır. Dolayısıyla apolar karakteri yüksek olan bileşen/bileşenler kolondan önce ayrılır. Ters faz kromatografisi (RPC) en kullanışlı sıvı kromatografisidir. Burada sabit faz apolar, hareketli faz polardır. Analitler yüzeye modifiye edilmiş apolar fonksiyon gruplarıyla bağlanırlar. Bu bağlamda en fazla kullanılan ters faz kolonları oktil (C<sub>8</sub>) ve oktadesil (C<sub>18</sub>) modifiye kolonlarıdır. Bu ayırım tekniğinde en polar bileşen/bileşenler kolondan ilk önce çıkar ve böylece ayırım farklılaşır.

HPLC'nin kendini oluşturan parça ünitelerin her biri ayrı bir özenle korunması gerekmektedir. Nitel ve nicel bazda hassas ayırım sağlayan analitiksel kolonların korunması da bu bağlamda oldukça önemlidir. Kolonla enjeksiyon aletinin arasına opsiyonel olarak kurulan koruyucu kolonlar bu görevi yeterince sağlamaktadır.

Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan ünitelerdir ve kolon sonrasına monte edilir. HPLC sistemlerinin kuruluşunda bu yana çok farklı ölçüm ilkelerine dayanan dedektörler geliştirilmiş veya geliştirilmektedir. Yaklaşık on iki tane dedektör LC sistemlerinde kullanılmasına rağmen bunların sadece dördü yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu dört dedektör; UV dedektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresidir (Skoog vd., 2007). Ancak çalışma kapsamında sadece UV ve MS dedektörler kullanılmasından ötürü bu iki dedektörden söz edilecektir.

### 1.12.1.1. Ultraviyole (UV) Dedektör

HPLC için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığına, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, istenen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik ayırma kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Böyle bir dedektör sıcaklık ve basınçtaki değişmelere de duyarsız olmalıdır ve analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır (Hışıl, 1999; Var vd., 2004). Bu sayılan özellikleri bir bütün halinde bünyesinde barındıran dedektör türlerinden biri de ultraviyole dedektörlerdir.

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190-800 nm aralığında ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Kullanılan sistemlerde sürekli çözücü ile muamele altında olan bileşenlerin moleküllerindeki bağ elektronlarının uyarılmasıyla absorpsiyon denilen bileşene spesifik etki meydana gelir. Böylece aranan bileşenin kalitatif ve kantitatif tayini gerçekleşmiş olur (Harvey, 2000).

LC sistemlere duyarlı UV dedektörlerin, hem organik hem de inorganik sistemlere uygun,  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M aralığında tipik duyarlılık değerine sahip ve bilimsel çalışmalarda oldukça tercih edilen dedektör tipi olduğu bilinmektedir. Ancak bu geleneksel LC sistemler üzerinde yapılan geliştirme çalışmaları neticesinde, döteryum veya tungsten lambalı ışık kaynaklı diyot serili spektrofotometreler (DAD) kullanılmaya başlanmıştır.

Bu sistemin UV/Vis dedektörden farkı, 512 diyottan oluşan bir yüzeyde, her diyodun ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Ölçüm verileri istenilen dalga boyu aralığında alınır ve üç boyutlu kromatogramlarla desteklenebilir. Eş zamanlı alınabilen spektrumlar sayesinde elüe edilen ve sinyal veren bileşenlerin doğru tanınması mümkün hale gelir (Akyüz, 2011).

### 1.12.1.2. Kütle Spektrometrik (MS) Dedektör

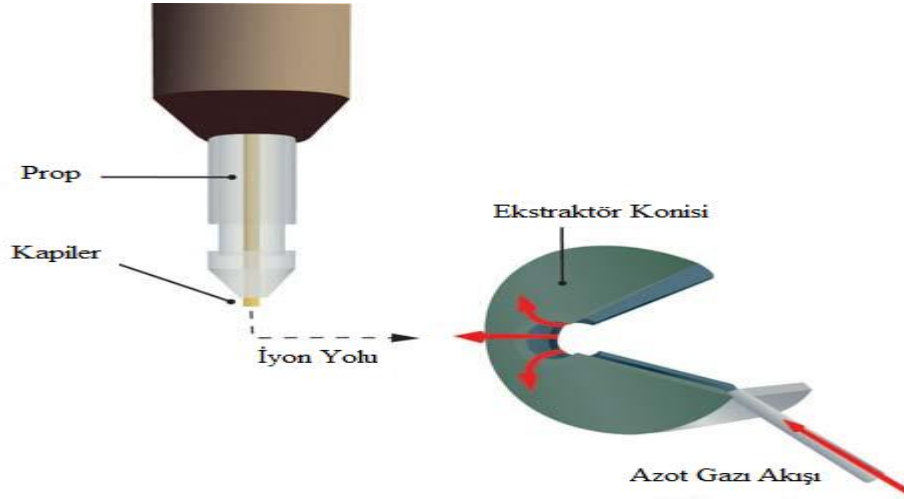
Kütle spektrometrik dedektörleri kalitatif ve kantitatif ayırmda sıklıkla kullanılan dedektörlerdir. Burada, gerek sıvı halde gerekse uçucu olmayan karışımları önce LC sistemden geçirip bileşenlerine ayrıldıktan ve ayrılan bileşenin iyon haline getirdikten sonra kütle/yük (m/z) oranları öncülüğünde ayırım sonucuna erişilebilir. Bu birleşke sistemlerde öncelikli ayırımın gerçekleştiği LC kısmından gelen hareketli faz alternatif yöntemlerle uzaklaştırılmalıdır. Burada mobil faz, sürekli dairesel şekilde dönen ve ısıtılan yüzeye püskürtülerek vakumla uzaklaştırılabileceği gibi elektrosprey ve termosprey

yöntemlerini kullanarak da uzaklaştırılabilir. Ancak püskürtme veya spreyleme işleminden sonra mevcut bileşenin iyonlarına ayrışması için bilindik bazı iyon kaynağına girmeleri gerekmektedir. Elektron bombardımanı (EB), kimyasal iyonlaştırma (CI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) üniteleri LC sistemlerde kullanılan iyonlaştırma kaynaklarıdır (Ersöz, 2010).

Elektron bombardımanında buharlaşan analit üzerine 50-80 eV'luk bir enerjiye sahip elektron demeti hızlı bir şekilde gönderilir ve çarpıştırılır. Çarpışma neticesinde moleküler iyonlar elde edilir.

Kimyasal iyonlaştırmada ise; reaktif bir gazın kullanıldığı ikili iyonlaştırma olgusu mevcuttur. Öncelikle reaktif gaz elektron bombardımanı ile iyonlaştırılır akabinde elde edilen reaktif iyonları uçucu formdaki analit üzerine gönderilir ve bir kimyasal tepkime meydana gelir. Tepkime neticesinde moleküler iyonlar elde edilir (Ersöz, 2010).

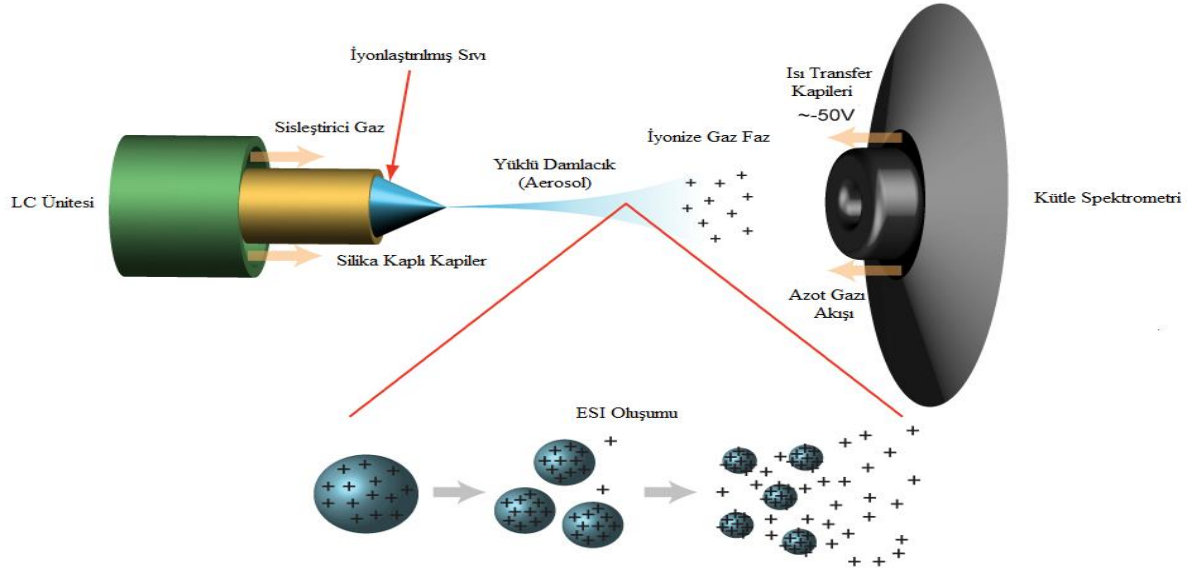
Uçucu ve polar özellikteki bir çözücüde çözülen numune, oldukça dar ve non-reaktif materyalden yapılmış kapilerden yaklaşık 20-500  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında kaynağa gönderilir (Şekil 15).



Şekil 15. Kapilerden ekstraktöre numune geçişi (www.waters.com).

Kapiler ucunda çıkan eluat, 2,5-4 kV'luk alanda zıt elektroda karşı yüksek bir potansiyel farkına sahip elektrosprey iğneden geçer. Kapilerden eluat çıkışının tamamlandığı yerde buharlaştırma ya da sisleştirici (nebulizer) olarak bilinen genellikle azot gazı geçirilir. Gazın yanında kuvvetli elektrik alanı ve yüksek sıcaklıkla birlikte kapilerden çıkan eluatlardan yüklü damlacıklar (aerosol) oluşturulur. Bu yüklü damlacıklar

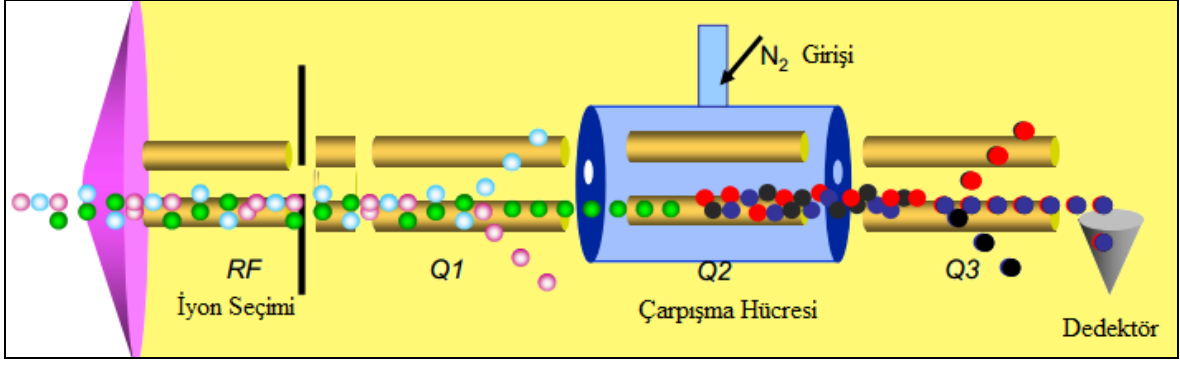
koniye benzer kaynak kısmına püskürtülür. Damlaların eluatın çıktığı yer ile huni arasındaki mesafede çapraz geçirilmesi sağlanır. Böylelikle geçiş yolu kısmi uzatılır ve çözücünün buharlaşması sağlanır. Bu olay sırasında damlaların yüzey gerilimi yüke dayanamayacak kadar küçülür ve damlaların parçalanmasını sağlayan, protonlaşmış moleküller oluşturan Kulomb patlaması denilen olgu ile karşılaşılır (Şekil 16) (Akyüz, 2011; Ersöz, 2010).



Şekil 16. Elektrosprey iyon kaynağı (ESI) şematik gösterimi (www.lamondlab.com).

LC-MS’de yaygın olarak kullanılan kütle analizörleri kuadrupol, iyon tuzaklı (Ion Trap; IT) ve uçuş zamanlı (Time of Flight, TOF) kütle analizörleridir. Çalışma muhteviyatında kuadrupol kütle analizörü kullanılması hasebiyle sadece bu başlıktan söz edilecektir.

Kuadrupol tipi analizörlerde, iyon demeti yolunda birbirine paralel 0,1-0,3 m uzunluğundaki dört silindirik çubuktan oluşan sistem kullanılır. Karşılıklı çubuklar aynı polariteye sahipken komşu çubuklar zıt polaritededirler. Örnek kapiler kolonundan çıktıktan sonra, kütle spektrometrenin girişinde bulunan transfer hattına ardından iyonlaştırma ünitesine geçerek iyonlaşarak parçalanır. Çubuklara hem doğru akım (DC) hem de radyofrekans (RF) gerilimi uygulanır. Kütle analizöründe uygulanan gerilim altında sadece belirli  $m/z$  oranına sahip olan iyonlar çubukların arasından geçerek dedektöre ulaşır (Ersöz 2010) (Şekil 17).



Şekil 17. Kuadrupol tipi kütle analizörü şematik gösterimi ([www.turkbiyokimya.org.tr](http://www.turkbiyokimya.org.tr)).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Mevcut çalışmada kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 9’da verildi.

Tablo 9. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
LC-MS/MS	TSQ Quantum Discovery MAX, San Jose, CA, USA
LC-UV	Thermo Scientific Surveyor™, San Jose, CA, USA
UV-vis 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
Santrifüj	Hettich, 1406 Type, Universal 320R, Tuttlingen, Germany
Dondurucu	Joun sa Deep Freezer VXE490, Jouan, Czech Republic
Otoanalizör	Roche Cobas Integra 800, Roche, Switzerland
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
SPE Vakum Manifold	CHROMABOND® SPE Vacuum Manifold, Macherey-Nagel, Düren, Germany
Sıçan terazisi	Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1, Balingen, Germany
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Germany

#### 2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Mevcut çalışmada kullanılan temel kimyasal madde ve malzemeler Tablo 10’da verildi.

Tablo 10. Kullanılan kimyasallar ve satın alınan firma bilgileri

<b>Kullanılan Kimyasal</b>	<b>Satın Alındığı Firma</b>
Grayanotoxin III Hemi (etil asetat)	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Gallik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Klorogenik asit	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
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>o</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Myrisetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Fisetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kuersetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Apigenin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
NaOH	Merck, Darmstadt, Germany
NaHPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na.3H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Germany
TPTZ	Merck, Darmstadt, Germany
FeCl <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
DPPH	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
ABTS	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> <sup>®</sup>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trolox	Applichem, Darmstadt, Germany
Asetonitril-LC saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC saflıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Metanol-LC/MS saflıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik asit	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

### 2.1.3. Çözeltiler

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 11'de ayrıntılarıyla verildi.

Tablo 11. Çalışmalarda kullanılan bazı çözeltiler ve hazırlanışları

<b>Çözelti</b>	<b>Hazırlanışı</b>
<b>LC/MS-MS ile GTX-III İzofromunun Belirlenmesi İçin</b>	
GTX-III (1000 ppm)	1 mg Grayanotoksin-III hemî etil asetat 1 mL MS saflıktaki metanol çözülür.
Asetik Asit (%1 v/v)	1 mL asetik asit 10 mL saf su içerisine ilave edilir. Son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Metanol (%1 v/v)	1 mL metanol 10 mL saf su içerisine ilave edilir. Son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
<b>HPLC-UV İle Fenolik Bileşen Analizleri İçin</b>	
Gallik asit	
Protokatekuik asit	
<i>p</i> -OH benzoik asit	
Klorojenik 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.
Vanilik asit	
Kaffeik asit	
Şiringik asit	
<i>p</i> -Kumarik asit	
Ferulik asit	
<i>o</i> -Kumarik asit	
Kateşin	
Epikateşin	%100 metanolla hazırlanan 1000 ppm'lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir.
Rutin	
Myrisetin	
Fisetin	
Kuersetin	
Apigenin	
Propilparaben	% 100 metanolla 1000 ppm'lik stok çözelti hazırlanır.
% 2'lik Asetik Asit	20 mL glasiyel asetik asit balon jodede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
%70-30 Asetonitril-Saf Su	700 mL asetonitril balon jodede saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.
<b>Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin</b>	
0,2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanılır.
% 10'luk Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 90 mL suda çözülür, 100 mL'ye tamamlanır.
Gallik Asit (1 mg/mL)	Metanolla hazırlanan stok çözeltiden, 0,5- 0,25- 0,125- 0,0625- 0,03125 mg/mL olacak şekilde metanolla seyreltilerek hazırlanır.
<b>Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP İçin</b>	
HCl (40 mM)	Yaklaşık 20 mL saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 340 µL ilave edilir ve saf suyla 100 mL'ye tamamlanır.

Tablo 11'in devamı

TPTZ (10 mM)	234,249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 mL 40 mM'lık HCl içinde çözüldü.
FeCl <sub>3</sub> (20 mM)	324,4 mg FeCl <sub>3</sub> destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2,325 g NaCH <sub>3</sub> COO.3H <sub>2</sub> O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi.750 mL'ye saf suyla tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl <sub>3</sub> (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlanır.
Troloks <sup>®</sup> (1000 µM)	25,31 mg troloks metanolle 100 mL tamamlanır. 500- 250- 125- 62,25- 31,125- 15,5625 µM'lık konstrasyonları metanolle seyreltilerek kullanılır.
<b>DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi İçin</b>	
DPPH Reaktifi (0,1 mM)	100 mL'si için; 3,94 mg DPPH tartılır, 90 mL metanolle çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.
Troloks <sup>®</sup> (0,02 mg/mL)	10 mg troloks 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlanır. 0,02 mg/mL'lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.
<b>ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi İçin</b>	
ABTS Reaktifi (7 mM)	10 mL'si için; 38,41 mg ABTS tartılır, 10 mL saf suda çözülür.
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (2,45 mM)	10 mL'si için; 6,62 mg potasyum persülfat tartılır, 10 mL saf suda çözülür.
Fosfat Tamponu (5 mM, pH 7,4)	500 mL'si için; 0,215 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ve 0,152 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O tartılarak aynı reaktif kabında yaklaşık 400 mL saf suda çözülür. Seyreltik kuvvetli asit ya da baz ile pH ayarlaması yaptıktan sonra yine saf suyla hacmi 500 mL'ye tamamlanır.

## 2.2. Numunelerin Temini, Saklama Yöntemi

Orman gülü balları ve bu balların kaynağı olan gerek sarı çiçekli gerekse mor çiçekli orman gülü bitkileri Karadeniz Bölgesinin farklı lokalitelerinden temin edildi. Temin edilen numunelerin etiket bilgileri; numune kodu, toplandığı lokalite, toplanma yılı ve çalışma boyunca hangi numunelerin hangi analizlere tabii tutulduğu (LC-MS/MS ile GTX-III, RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen ve spektrofotometrik yolla *in vitro* antioksidan analizleri) Tablo 12'de verildi. Kodlama prosedüründe bal örneklerinde baş harf kısaltması (**Deli Bal-DB**), bitki örneklerinde ise lokalite ve bitki türü kaynaklı kısaltmalara (**Yomra Mor Çiçek-YoMÇ**) yer verildi.

Tablo 12. Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler

Kod	Lokalitesi	Yıl	Yapılan Analizler		
			GTX-III	Fenolik Bileşen	Antioksidan
<b>Orman Gülü Balı Örneklemeleri</b>					
DB1	Düzce	2011	•		•
DB2	Trabzon/Vakfikebir	2010	•		•
DB3	Rize	2010	•		•
DB4	Rize	2009	•		•
DB5	Trabzon/Şalpazarı	2010	•		•
DB6	Kastamonu	2012	•		•
DB7	Bartın	2011	•	•	•
DB8	Trabzon/Şalpazarı	2011	•	•	•
DB9	Giresun/Sis Dağı-Görece	2011	•	•	•
DB10	Kastamonu	2011	•	•	•
DB11	Artvin	2012	•	•	•
DB12	Rize	2011	•	•	•
DB13	Zonguldak	2011	•		•
DB14	Zonguldak	2010	•		•
DB15	Zonguldak	2009	•		•
DB16	Trabzon/Ağasar	2010	•		•
<b>2013 Taze Sağım Orman Gülü Balları</b>					
DB17	Artvin	2013	•		•
DB18	Artvin	2013	•		•
DB19	Artvin	2013	•		•
DB20	Artvin	2013	•		•
DB21	Artvin	2013	•		•
DB22	Artvin	2013	•		•
DB23	Artvin	2013	•		•
DB24	Artvin	2013	•		•
<b>Vaka Balları</b>					
DB25	Artvin/Hopa	2007	•		•
DB26	Trabzon	-	•		•
DB27	Trabzon	-	•		•
DB28	Trabzon	-	•		•
DB29	Trabzon	-	•		•
DB30	Trabzon	-	•		•
<b>Kestane Balı</b>					
KB1	Zonguldak	2012	•		
<b>Orman Gülü Bitkileri</b>					
<b>Mor Çiçekli Bitkiler</b>					
YoMÇ	Yomra Mor Çiçek	2013	•		•
YoMY	Yomra Mor Yaprak	2013	•		•
AkMÇ	Akçaabat Mor Çiçek	2013	•		•
AkMY	Akçaabat Mor Yaprak	2013	•		•
MaMÇ	Maçka Mor Çiçek	2013	•		•

Tablo 12'nin devamı

MaMY	Maçka Mor Yaprak	2013	•	•
KöMÇ	Köprübaşı Mor Çiçek	2013	•	•
KöMY	Köprübaşı Mor Yaprak	2013	•	•
VaMÇ	Vakfikebir Mor Çiçek	2013	•	•
VaMY	Vakfikebir Mor Yaprak	2013	•	•
ŞaMÇ	Şalpazarı Mor Çiçek	2013	•	•
ŞaMY	Şalpazarı Mor Yaprak	2013	•	•
ÇaMÇ	Çaykara Mor Çiçek	2013	•	•
ÇaMY	Çaykara Mor Yaprak	2013	•	•
ToMÇ	Tonya Mor Çiçek	2013	•	•
ToMY	Tonya Mor Yaprak	2013	•	•
KeMÇ	Keşap Mor Çiçek	2013	•	•
KeMY	Keşap Mor Yaprak	2013	•	•
OMÇ	Ordu Mor Çiçek	2013	•	•
OMY	Ordu Mor Yaprak	2013	•	•
HeMÇ	Hemşin Mor Çiçek	2013	•	•
HeMY	Hemşin Mor Yaprak	2013	•	•
AMÇ	Artvin Mor Çiçek	2013	•	•
AMY	Artvin Mor Yaprak	2013	•	•
<b>Sarı Çiçekli Bitkiler</b>				
AkSÇ	Akçaabat Sarı Çiçek	2013	•	•
AkSY	Akçaabat Sarı Yaprak	2013	•	•
MaSÇ	Maçka Sarı Çiçek	2013	•	•
MaSY	Maçka Sarı Yaprak	2013	•	•
KöSÇ	Köprübaşı Sarı Çiçek	2013	•	•
KöSY	Köprübaşı Sarı Yaprak	2013	•	•
VaSÇ	Vakfikebir Sarı Çiçek	2013	•	•
ŞaSÇ	Şalpazarı Sarı Çiçek	2013	•	•
ÇaSÇ	Çaykara Sarı Çiçek	2013	•	•
ÇaSY	Çaykara Sarı Yaprak	2013	•	•
ToSÇ	Tonya Sarı Çiçek	2013	•	•
ToSY	Tonya Sarı Yaprak	2013	•	•
OSÇ	Ordu Sarı Çiçek	2013	•	•
OSY	Ordu Sarı Yaprak	2013	•	•

Bitkilerin yaprak ve çiçek kısımları birbirinden ayrılarak güneşe maruz bırakılmadan hava sirkülasyonu mevcut olan ortamda kendiliğinden kuruması sağlandı. Kuruma takibi günlük hassas ölçümlerle  $\sim \pm 0,001$  g duyarlılık olacak şekilde gerçekleştirildi. Gerekli analizler bu kuru numunelerden yapıldı.

Çalışmada kullanılan bal örneklemi ise analiz öncesinde  $+4$  °C'de ve karanlıkta muhafaza altına alındı. Analizler için gerekli olan miktarlar bu muhafaza ortamından gerektiği kadar alınarak tekrar mevcut saklama koşullarına tabi tutuldu.

### 2.3. Balların Palinolojik Testi

Balların polen analizleri Doç. Dr. Elsevar Asadov tarafından Nakhchivan State University Medical Faculty, Nakhchivan/Azerbaijan (Nahçıvan Devlet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nahçıvan/Azərbaycan)'da yapıldı. Bal polenleri mikroskopik olarak tespit edildi. Sayım sonucuna göre bala kaynak oluşturan bitkilerin polen oranları % 45 ve üzerinde olanlar orman gülü balı olarak kabul edildi. Çalışmada kullanılan bal örneklemi bu oran dikkate alınarak seçildi.

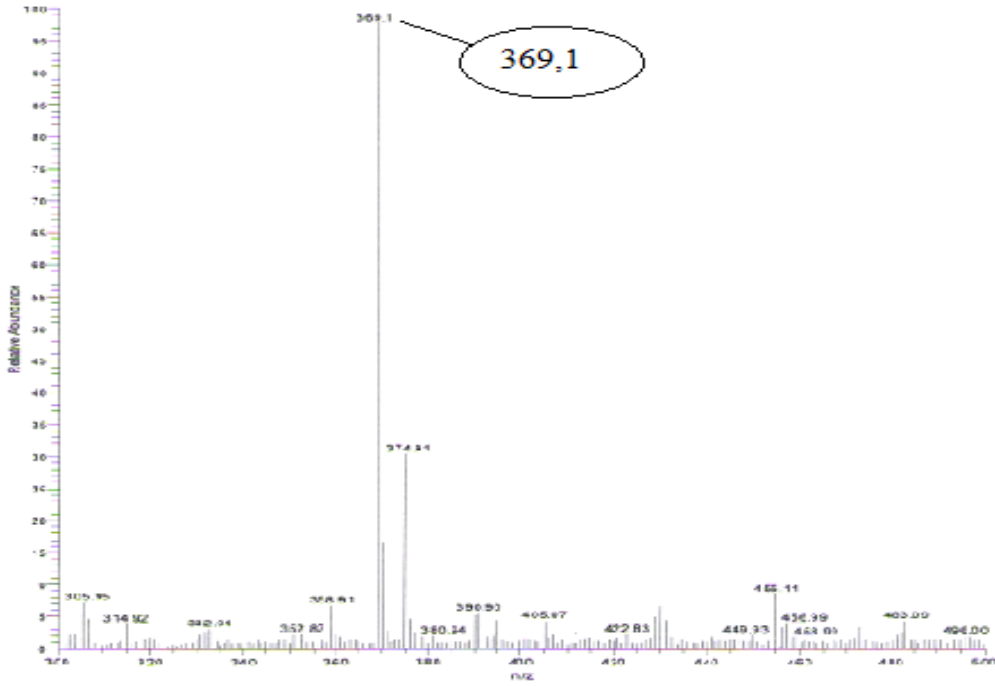
Bu bağlamda palinolojik test için her bir numuneden 10 g bal örneği alındı. Alınan bu örnekler üzerine 20 mL saf su ilave edilerek tamamen homojen hale getirildi ve 3000–4000 RPM'de 30-40 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen pellet bir kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilip tüpteki suyun iyice süzülmesi sağlandı. Bir diseksiyon iğnesi ile gliserin jelâtinden bir parça alınarak tüpün dibine çöken kısma değdirilip çökelti ile bulaşık gliserin jelâtin lam üzerine konulacak ve üzerine lamel kapatıldı. Mikroskop altında polen incelemesi yapıldı.

### 2.4. Örneklerin Ekstraksiyon Şartları

Gerek bitki gerekse ballardaki analizler için 24 saat süreyle oda sıcaklığında metanolik ekstraktlar magnetik karıştırıcı kullanarak hazırlandı, mevcut olası katı partiküllerden, safsızlıklardan kurtulma ve ileri homojenlik sağlama adına çözeltiler mavi bant süzgeç kâğıdı yardımıyla süzüldü. Elde edilen ekstraktların nihai konsantrasyonunu belirledikten sonra 10 mL'lik kısım antioksidan analizlerine ayrıldı. Geri kalan ekstrakt çözücüsü 60 °C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalıntı 10 mL saf suda çözüldü. Tamamıyla suda çözünen bu kalıntılar, SPE kartuştan vakum altında geçirilerek zenginleştirilme işlemine gidildi. Bu bağlamda kartuşlar öncelikle ikişer tekrarlı olmak üzere 3 mL'lik metanolla şartlandırıldı ardından yine ikişer tekrarlı 3 mL saf suyla yıkandı. GTX-III izoformunca ve fenolik bileşence zengin olan SPE kartuşları üç tekrarlı olmak üzere 3 mL metanolla elüe edildi. Elüsyon işlemi sonunda elde edilen ekstraktlar evaporatör balonları alındı ve çözücülerini 60 °C'deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Balon içeriği 2 mL MS saflıktaki metanolla çözümlenerek LC-MS/MS analizine gidildi. Son aşamada 2 mL metanolla çözümlenen ekstraktların bazılarında RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizleri yapıldı.

## 2.5. LC-MS/MS Analizi

1 mg'lık hemi etil asetat formuyla satın alınan Grayanotoksin-III izoformu 1 mL MS saflıktaki metanolla kendi kabında çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti +4 °C'de muhafaza altına alındı. Kullanım sırasında gerekli seyreltik konsantrasyonlar bu stok çözülden yararlanılarak hazırlandı. LC-MS optimizasyonu için 5 ppm'lik ara stok çözelti hazırlandı. Öncelikle LC-C<sub>18</sub> kolonundan ayırım yapılmaksızın 5 ppm'lik ara stok çözelti MS cihazına doğrudan enjekte edildi. "Full scan" tarama moduyla negatif moddaki GTX-III izoformu fragmentasyona uğramadan, en ideal sinyal seviyesiyle tespit edildi (Şekil 18). Kalitatif analiz doğrultusunda idealleştirilen analiz şartları doğrultusunda LC'deki kolon ayırımıyla kantitatif analize geçildi.



Şekil 18. Grayanotoksin-III izoformunun LC-MS/MS ile identifikasyonu

### 2.5.1. Cihaz Parametreleri

- Cihaz: TSQ Quantum Discover
- Mod: Negatif ESI
- İyon Spray Voltaj: 2700 V



- Buharlaştırma Sıcaklığı: 250 °C
- Sheath/Auxiliary Gaz: Nitrojen
- Sheath gaz basıncı: 35 (arbitrary units)
- Auxiliary gaz basıncı: 10 (arbitrary units)
- İyon transfer kapılar sıcaklığı: 300 °C
- Tarama Tipi: SRM
- Tarama Süresi: 0,2 sn
- Kolon Basıncı: 112 bar
- Kolon Özelliği: C<sub>18</sub> (15 cm × 3 mm x 5µm)
- Mobil Faz: A: %1 Asetik asit (Suda), B: %1 Asetik asit (Metanolde)
- Mobil Fazın Sistemdeki Uygulaması: İzokratik
- Mobil Faz Akış Hızı: 0,3 mL/dk
- Analiz Süresi: 8 dk
- Numune ve Standart Enjeksiyon Hacmi: 10 µL

Maddeler halinde verilen optimizasyon değerleri öncülüğünde ana molekülün (GTX-III) fragmentasyon ürünleri ve validasyon (lineer ölçüm aralığı, tayin limiti /ölçüm limiti, kesinlik ve geri kazanım kriterleri) parametreleri belirlendi.

## **2.6. HPLC-UV ile Fenolik Bileşiklerin Tayini**

### **2.6.1. RP-HPLC-UV Koşulları**

RP-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 C<sub>18</sub> kolonu (150 mm x4.6 mm, 5µ; Fortis) kullanarak ve asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (De Villers vd., 2004). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70-30 asetonitril-saf su bulunan gradient program Tablo 13'de verildi. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL'ye, mobil faz akış hızı 1,2 mL/dk'ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C'ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı (Öztürk vd., 2007).

Tablo 13. RP-HPLC-UV gradient programı

Zaman (dk)	A	B
	% 2 asetik asit (saf suda)	% 70-30 asetonitril-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

### 2.6.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Benzoik asit türevlerinden; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringik asit, flavanollardan; kateşin, epikateşin ve hidroksinamik asit üyesi olan *o*-kumarik asit 280 nm’de, sinamik asit türevlerinden; klorojenik asit, kaffeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve flavonollardan; rutin, myrisetin, fisetin, kuersetin, apigenin 315 nm’de analiz edildi. Ayrıca 280 nm’de normal kalibrasyon metodu öncülüğünde propil paraben iç standart (“Internal Standard”-IS) olarak kullanıldı.

Kullanılan 17 standartın 10 tanesi; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kaffeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve *o*-kumarik asitin %50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltisinden 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm’lik, diğer kalan 7 tanesi; kateşin, epikateşin, rutin, myrisetin, fisetin, kuersetin ve apigenin %100 metanolla hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm’lik ara stok çözeltileri kalibrasyon eğrileri için kullanıldı.

Propil parabenin stok çözeltisinden her bir kalibrasyon çözeltisine son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde eklendi.

Çalışılan her bir standardın konsantrasyonuna karşı, oluşan pik alanları iç standardın pik alanına bölünüp hesaplanan oran üzerinden kalibrasyon eğrileri elde edildi.

## 2.7. Antioksidan Analizler

### 2.7.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Analiz Slinkard vd. (1977) göre yapılmıştır. Toplam fenolik madde tayininin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu ayracı burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mavi rengin fotometrik olarak ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olup, 760 nm'de absorbans verir.

Çalışmada, standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit standardı kullanıldı (Slinkard vd., 1977; Singleton ve Rossi 1965). Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0,500, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031 ve 0,015 mg/mL) hazırlanıp, absorbansları okundu. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre numunelerin toplam fenolik madde miktarı bulunarak, mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/g numune olarak fenolik madde miktarı verildi. Çalışma pipetleme prosedürü Tablo 14'de toplu olarak verildi.

Tablo 14. Toplam Polifenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
Saf su	700 µL	680 µL	680 µL
Standart (Gallik Asit)	-	20 µL	-
Numune	-	-	20 µL
0,2 N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
% 10 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	400 µL	400 µL	400 µL
760 nm'de köre karşı absorbans okunur			

### 2.7.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP Tayini

FRAP metodu (Fe(III)-TPTZ- 2,4,6-tris (2-pyridilyl)-S-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşması ve bu kompleksin 593 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie and

Strain, 1999). FRAP yöntemi nispeten basit bir yöntem olup, kolaylıkla standardize edilebilmektedir. Bitkisel ekstraktlardaki antioksidan kapasitenin ölçülmesinde FRAP metodu geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Benzie and Strain, 1996).

Kalibrasyon için Troloks<sup>®</sup>'un değişen konsantrasyonları (31,250 - 62,500 – 125 – 250 – 500 - 1000  $\mu$ M) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Devamında 3 mL FRAP reaktifi ile 100  $\mu$ L numune karıştırıldı. 4 dakika sonrasında 593 nm'de absorbanslar okundu. Çalışma eğrisi için de numune yerine Troloks<sup>®</sup>'un değişen konsantrasyonları kullanılarak absorbanslar okundu. Sonuçlar  $\mu$ M Troloks<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (TEAP). Çalışma pipetleme prosedürü Tablo 15'de toplu olarak verildi.

Tablo 15. FRAP tayinindeki deney şartları

	<b>Kör<sub>MeOH</sub></b>	<b>Test (Numune)</b>	<b>Renk Körü<sub>(MeOH)</sub></b>	<b>Troloks</b>
FRAP Reaktifi	3 mL	3 mL	-	3 mL
Numune	-	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	-
Troloks (Değişen kons.)	-	-	-	100 $\mu$ L
Saf Su	-	-	-	-
Metanol	100 $\mu$ L	-	3 mL	-

4. dakikada 593 nm'de absorbans okunur.

Renk Körü<sub>test(met)</sub> : Metanolde çözünen numune için renk körü

Renk Körü<sub>test(su)</sub> : Suda çözünen numune için renk körü

### 2.7.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerde satın alınan bu radikalin 100  $\mu$ M'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Numunelerin metanolik ekstraktları kendi çözüleri ile seyreltilerek değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750  $\mu$ L) DPPH• çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi. Süre sonunda DPPH•'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Tanık olarak DPPH• çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Çalışma pipetleme prosedürü Tablo 16'da toplu olarak verildi.

Tablo 16. DPPH yöntemi için deney şartları

	Numune Tanık Tüpü	Reaktif Tanık Tüpü	Numune Tüpü
Numune (Değişik konsantrasyon)	750 µL	-	750 µL
Metanol	750 µL	750 µL	-
DPPH• (100 µM)	-	750 µL	750 µL

50 dk. sonra 517 nm'de absorbans okunur.

#### 2.7.4. ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

ABTS• radikali (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)), DPPH• radikali gibi ticari olarak satın alınabilen bir kimyasaldır. Bu reaktifin 7 mM konsantrasyonu 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi içerisinde (2:1) çözülerek deney öncesi 12-16 saat karanlıkta, oda sıcaklığında tutuldu. Hazırlanan bu reaktifin optik yoğunluğu 734 nm'de 0,7 absorbans olacak şekilde 5 mM pH 7,4 fosfat tamponunda seyreltildi. Seyreltilen reaktifin 2 mL'si ile 20 µL numune ekstraktı karıştırılır, 5 dk sonrasında 734 nm'de saf suya karşı okundu. Çalışma pipetleme prosedürü Tablo 17'de toplu olarak verildi.

Tablo 17. ABTS yöntemi için deney şartları

	Numune Tanık Tüpü	Reaktif Tanık Tüpü	Numune Tüpü
Numune (Değişik konsantrasyon)	20 µL	-	20 µL
Metanol	2 mL	20 µL	-
ABTS•	-	2 mL	2 mL

5 dk. sonra 474 nm'de absorbans okunur.

#### 2.7.5. DPPH• ve ABTS• Radikal Temizleme Aktivitesi SC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

SC<sub>50</sub> radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC<sub>50</sub> değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe

geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı  $SC_{50}$  değerini vermektedir. Sonuçlar mg/mL ya da g/mL cinsinden hesaplandı.

## **2.8. Deneysel Hayvan Çalışmaları**

### **2.8.1. Deney Hayvanları**

Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun 29.01.2013 toplantı tarihli, 2013/02 toplantı ve 2012/46 dosya nolu etik kurul kararı doğrultusunda izin verilen “Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda Orman Gülü ve Kestane Balının Diyabetik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının bir bölümü olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla yukarıda ismi belirtilen çalışma için talep edilen 77 adet 200-250 g ağırlıklı Spraque Dawley tipi dişi sıçanlardan 20 tanesinin biyokimyasal verileri kullanıldı. Diğer çalışmalar devam etmektedir.

Sıçanlar, tel kapaklı plastik standart kafeslerde,  $22\pm 2$  °C’da, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ve çeşme suyuyla beslenmiş olup yem ve su alımı serbest bırakıldı.

### **2.8.2. Deney Grupları ve Uygulamalar**

Deneyleerde kullanılacak sıçanlar toplamda 5 gruba ayrıldı. Her bir grubun belirlenen süre dâhilinde bal ile beslenme şartları farklılaştırıldı. Buna göre;

Grup I (4 sıçan) : (Serum fizyolojik kontrol grubu) Sıçanlara gavaj yolla, yedi gün boyunca 0,8 mL serum fizyolojik (SF) verildi.

Grup II (4 sıçan) : (Orman gülü bal örneği-75 mg/mL) 0,8 mL gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

Grup III (4 sıçan) : (Orman gülü bal örneği-150 mg/mL) 0,8 mL gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

Grup IV (4 sıçan) : (Orman gülü bal örneği-300 mg/mL) 0,8 mL gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

Grup V (4 sıçan) : (Orman gülü bal örneği-600 mg/mL) 0,8 mL gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

### 2.8.3. Vücut Ağırlığı Takibi

Sıçanlar sekiz gün boyunca tek hali elektronik tartı ile her gün aynı saatlerde günlük olarak tartıldı. Sıçanlardaki % ağırlık değişimleri oranları, çalışmanın ilk günü tespit edilen başlangıç değerlerine göre, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{Ağırlık değişim oranı} = 100 \times (\text{Ağırlık}_8 - \text{Ağırlık}_1) / (\text{Ağırlık}_1)$$

Ağırlık<sub>8</sub>: 8. gündeki ağırlık ölçümü (g)

Ağırlık<sub>1</sub>: 1. gündeki ölçülen ağırlık (g)

### 2.8.4. Dekapitasyon, Materyallerin Alınması ve Ön İşlemler

Sekiz günlük deney süresi sonunda bütün sıçanların dekapitasyon yöntemi ile yaşamları sonlandırıldı ve kanları hızlıca santrifüj tüplerine alındı.

Kanlar 2500 RPM'de 15 dakika santrifüj edilip serumları pastör pipeti ile ependorf tüplere alındı. Elde edilen serunlar aligotlar halinde -80°C'daki dondurucuda saklandı. Biyokimyasal analizler (AST, ALT, LDH, ALP, CK, CK-MB, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) kan serum sıvısında gerçekleştirildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. LC-MS/MS ile GTX-III Analizi

##### 3.1.1. MS-MS Tarama Parametreleri

Optimizasyon verileri öncülüğü doğrultusunda molekül ağırlığı 370,48 g/mol olan GTX-III izoformunun negatif modtaki MS/MS analizinin fragmentasyon iyon verileri Tablo 18’de özetlenerek verildi.

Tablo 18. GTX-III MS-MS tarama parametreleri

MS/MS Tarama Parametreleri						
Kapiler Sıcaklık (°C)	MS (m/z)	MS/MS <sub>1</sub> (m/z)	MS/MS <sub>2</sub> (m/z)	MS/MS <sub>3</sub> (m/z)	Parçalama Enerjisi (eV)	İyon Tarama Süresi (s)
300	369,48	279	297	315	38	0,2

##### 3.1.2. Metod Validasyon Parametreleri

Ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlarla uygunluğu validasyon denilen işlemler bütünü ile sağlanır ve böylelikle seçilen metodun rutin analizlerce tekrarı mümkün kılınır. Bu metodun validasyon yapılırken lineer ölçüm aralığı, tayin limiti /ölçüm limiti, kesinlik ve geri kazanım kriterleri incelendi.

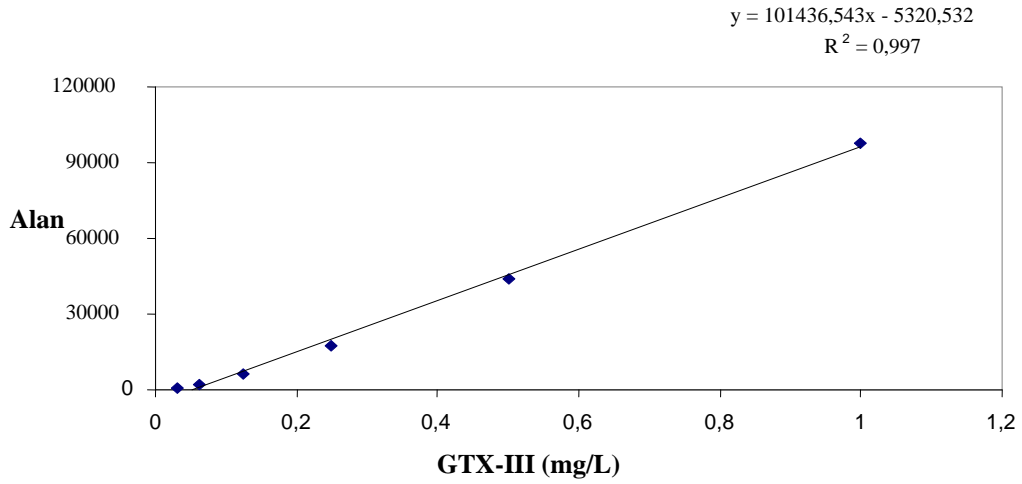
###### 3.1.2.1. Lineer Ölçüm Aralığı

Lineer ölçüm aralığını test etmek için 5 farklı konsantrasyonda 6’şar tekrarlı standart hazırlanarak enjeksiyon yapıldı. Ölçüm aralığının belirlenmesinde kullanılan sonuçlar Tablo 19’da ve bu verilere dayanarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 19’da verildi.



Tablo 19. Lineer ölçüm aralıkları ve  $R^2$  değerleri

Lineer Ölçüm Aralığı Değerleri							$R^2$
mg/L	0,031	0,062	0,125	0,250	0,500	1,000	0,997



Şekil 19. GTX-III analizi LC/MS-MS standart kalibrasyon grafiği

### 3.1.2.2. Tayin Limiti (LOD)/Ölçüm Limiti (LOQ)

LOD; analitin istatistiksel olarak tayin edilen en düşük konsantrasyon düzeyi, LOQ; kesinlik ve gerçeklik validasyon parametrelerinin desteklediği ölçülen en düşük analit konsantrasyonudur.

Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinin denklem verisinden ve aşağıdaki formülden yararlanarak LOD ve LOQ hesaplandı. Hesaplanan bu verilere Tablo 20'de verildi.

$$\text{Tayin Limiti (LOD)} = 3,3 \times \left( \frac{SD}{m} \right) \quad (1)$$

$$\text{Ölçüm Limiti (LOQ)} = 10 \times \left( \frac{SD}{m} \right) \quad (2)$$

SD = Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma

m = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tablo 20. GTX-III'e ait tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri

<b>Tayin/Ölçüm Limiti Değerleri</b>	
<b>LOD</b> (mg/L)	<b>LOQ</b> (mg/L)
0,013	0,039

### 3.1.2.3. Kesinlik

Kesinlik, analizin kendine has koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki ilişkinin bir göstergesidir. Bu parametre analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı verileriyle desteklenmektedir.

#### 3.1.2.3.1. Tekrarlanabilirlik

Ölçüm sonuçları arasındaki uyumun bir göstergesi olan tekrarlanabilirlik çalışması, üç farklı seviyede enjekte edilmiş örnekle, her seviye için 6 tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 21'de verildi.

Tablo 21. Tekrar edilebilirlik çalışmasında elde edilen ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı (CV) değerleri

<b>Tekrarlanabilirlik Değerleri</b>									
<b>GTX-III</b>									
<b>Standart Konsantrasyon (mg/L)</b>	0,250	0,500	1,000	0,250	0,500	1,000	0,250	0,500	1,000
	<b>Ortalama</b>			<b>Standart Sapma</b>			<b>Varyasyon Katsayısı</b>		
<b>Hesaplanan Konsantrasyon (mg/L)</b>	0,251	0,509	1,080	0,004	0,007	0,018	1,667	1,375	1,594

#### 3.1.2.3.2. Geri Kazanım

Geri kazanım, numune içerisindeki analitin tayini ile elde edilen miktarın, saf analitin çözültüsüne göre ne kadar geri kazanıldığının yüzde (%) sonucudur.

Geri kazanım çalışması üç farklı seviyede enjekte edilmiş örneklerle, her seviye için 6 tekrar yapıldı. Geri kazanım sonuçları Tablo 22’de verildi. Geri kazanım her seviye için hazırlanan matriks standart kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

Tablo 22. Geri kazanım çalışmasında 3 farklı konsantrasyon da elde edilen % geri kazanım değerleri

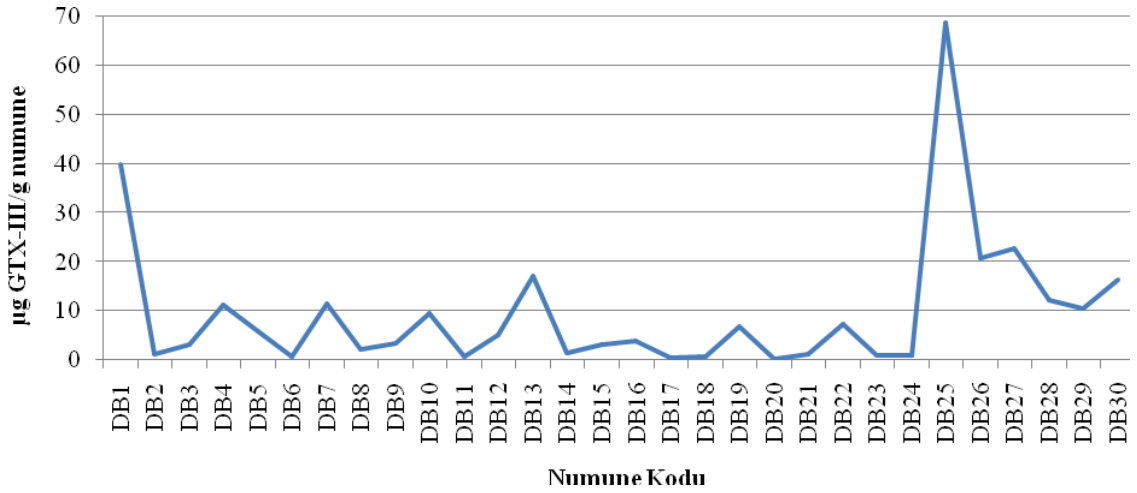
<b>Geri Kazanım Değerleri</b>			
<b>GTX-III</b>			
<b>Konsantrasyon mg/L</b>	0,250	0,500	1,00
<b>% Geri Kazanım</b>	86,814	92,500	103,450

### 3.2. Örneklerin GTX-III Miktarları

LC-MS/MS ile GTX-III analizi yapılan örneklem türleri öncelikle bal ve bitki grubu adı altında derlenerek kategorize edildi. Bal örneğine dair ana başlık; orman gülü balları, 2013 taze sağım orman gülü balları, vaka balları ve ölçümün kontrolü açısından kestane balı olmak üzere alt başlıklara ayrıldı. Aynı ayırım prosedürü bitki örneklerinde de; mor çiçekli ve sarı çiçekli orman gülü bitkileri olarak gerçekleştirildi. Üç tekrarlı olmak üzere yapılan kromatografik analiz sonucunda numunelerdeki GTX-III miktarı  $\mu\text{g GTX-III/ g}$  numune olarak tayin edildi.

Tablo 23’de ki ölçüm sonuçlarına göre DB1 kodu ile analiz edilen Düzce menşeli bal örneği  $39,949 \pm 0,020 \mu\text{g GTX-III/ g}$  numune ölçüm değeri ile kendi grubundaki 16 örneklem arasında en yüksek GTX-III oranına sahip olduğu görüldü. Artvin yöresinden edinilen 2013 yılı taze sağım bal örneklerindeki GTX-III miktarı  $0,377-7,729 \mu\text{g GTX-III/ g}$  numune aralığında tespit edilmiş olup diğer kategori gruplarıyla mukayese edildiğinde orta seviye toksik etken barındırdığı yorumu yapıldı.

Vaka balları başlığı altında toplanan ve daha önce tüketimi ile zehirlenme etkisi göstermiş 6 adet bal örneğinden DB25 kodlu Artvin-Hopa kaynaklı numune,  $68,754 \pm 0,032 \mu\text{g GTX-III/ g}$  numune sonucu ile en yüksek toksik etkiye sahip olan bal örneği olarak kendisine yer bulduğu görüldü. Edinilen bu sonuç ışığında DB25 nolu numune, gerek kendi kategorisinde gerekse tüm bal örneği kategorisinde en yüksek toksik bileşene sahip olduğu yorumlandı (Tablo 23, Şekil 20).



Şekil 20. Bal örneklerinin GTX-III miktarının grafiksel gösterimi

Ölçüm sonuçlarının güvenilirliği açısından farklı floral kaynaklı bir adet bal örneği analize tabii tutulmuş ancak içeriğinde kalitatif ve kantitatif olarak GTX-III izoformunun varlığına rastlanılmadı (Tablo 23).

Tablo 23. Bal örneklerinin GTX-III miktarı

Kod	Lokalitesi	µg GTX-III/ g numune <sup>a</sup>
<b>Orman Gülü Balı Örnekleri</b>		
DB1	Düzce	39,949±0,020
DB2	Trabzon/Vakfikebir	1,167±0,009
DB3	Rize	3,119±0,012
DB4	Rize	11,230±0,011
DB5	Trabzon/Şalpazarı	5,905±0,013
DB6	Kastamonu	0,632±0,001
DB7	Bartın	11,371±0,008
DB8	Trabzon/Şalpazarı	2,114±0,010
DB9	Giresun/Sis Dağı-Görece	3,416±0,011
DB10	Kastamonu	9,534±0,014
DB11	Artvin	0,701±0,001
DB12	Rize	5,192±0,012
DB13	Zonguldak	17,048±0,016
DB14	Zonguldak	1,570±0,009
DB15	Zonguldak	3,273±0,008
DB16	Trabzon/Ağasar	3,921±0,012

Tablo 23'ün devamı

<b>2013 Taze Sağım Orman Gülü Balları</b>		
DB17	Artvin	0,377±0,001
DB18	Artvin	0,813±0,002
DB19	Artvin	6,892±0,014
DB20	Artvin	0,193±0,000
DB21	Artvin	1,295±0,009
<b>DB22</b>	<b>Artvin</b>	<b>7,279±0,014</b>
DB23	Artvin	1,065±0,009
DB24	Artvin	1,000±0,008
<b>Vaka Balları</b>		
<b>DB25</b>	<b>Artvin/Hopa</b>	<b>68,754±0,032</b>
DB26	Trabzon	20,869±0,016
DB27	Trabzon	22,705±0,018
DB28	Trabzon	12,200±0,012
DB29	Trabzon	10,583±0,014
DB30	Trabzon	16,325±0,016
<b>Kestane Balı</b>		
KB1	Zonguldak	T.E. <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>b</sup>: Tespit edilemedi.

Balların floral kaynağı olan bitki analizlerindeki ayırım sarı ve mor çiçekli olmanın ötesinde çiçek ve yaprak olarakta ileri safhaya taşındı. Bu ayırım neticesinde mor çiçekli bitkilerin yaprak kısımlarında, sarı çiçekli bitkilerin de salt çiçek kısmında yüksek oranda GTX-III tespit edildi. Aynı zamanda özellikle mor çiçekli bitkilerin bazılarında (MaMÇ-MaMY-VaMY-OMÇ-OMY-HeMÇ-HeMY) toksik izomer tespit edilemedi.

Bulgulara göre bir karşılaştırma yapıldığında; sarı çiçekli orman gülü bitkilerinin mor çiçekli orman gülü bitkilerine nazaran daha fazla toksik izomer barındırdığı görülürken, özellikle ToSÇ kodlu Tonya menşeli sarı orman gülü çiçeği 760,435±0,104 µg GTX-III/ g numune değeri ile tayin edildi. Bu analiz neticesiyle mevcut bulunan ve analizi yapılan bal örneklerinin en yüksek değerinden yaklaşık 11 kat daha fazla olduğu sonucuna varıldı (Tablo 24).

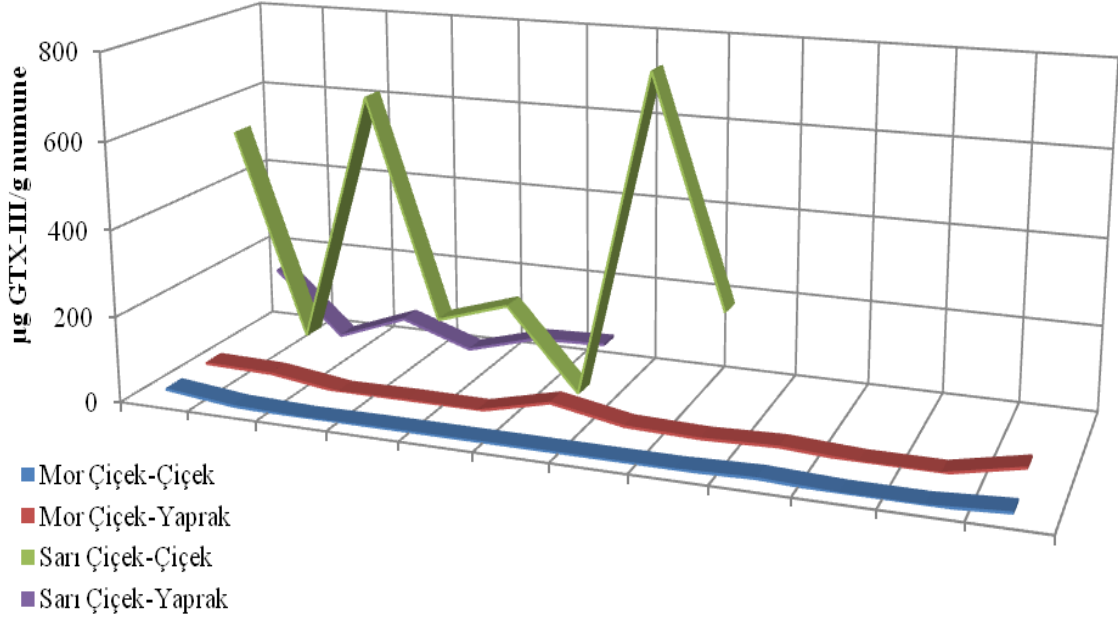
Tablo 24. Bitki örneklerinin GTX-III miktarı

Kod	Lokalitesi	$\mu\text{g GTX-III/ g numune}^a$
<b>Orman Güllü Bitkileri</b>		
<b>Mor Çiçekli Bitkiler</b>		
YoMÇ	Yomra Mor Çiçek	22,891±0,018
YoMY	Yomra Mor Yaprak	26,431±0,019
AkMÇ	Akçaabat Mor Çiçek	5,029±0,009
AkMY	Akçaabat Mor Yaprak	22,707±0,017
MaMÇ	Maçka Mor Çiçek	T.E. <sup>b</sup>
MaMY	Maçka Mor Yaprak	T.E. <sup>b</sup>
KöMÇ	Köprübaşı Mor Çiçek	1,753±0,008
KöMY	Köprübaşı Mor Yaprak	1,799±0,004
VaMÇ	Vakfikebir Mor Çiçek	1,917±0,004
VaMY	Vakfikebir Mor Yaprak	T.E. <sup>b</sup>
ŞaMÇ	Şalpazarı Mor Çiçek	2,084±0,009
<b>ŞaMY</b>	<b>Şalpazarı Mor Yaprak</b>	<b>40,476±0,020</b>
ÇaMÇ	Çaykara Mor Çiçek	1,740±0,005
ÇaMY	Çaykara Mor Yaprak	9,207±0,015
ToMÇ	Tonya Mor Çiçek	1,825±0,006
ToMY	Tonya Mor Yaprak	4,344±0,012
KeMÇ	Keşap Mor Çiçek	7,288±0,018
KeMY	Keşap Mor Yaprak	9,860±0,016
OMÇ	Ordu Mor Çiçek	T.E. <sup>b</sup>
OMY	Ordu Mor Yaprak	T.E. <sup>b</sup>
HeMÇ	Hemşin Mor Çiçek	T.E. <sup>b</sup>
HeMY	Hemşin Mor Yaprak	T.E. <sup>b</sup>
AMÇ	Artvin Mor Çiçek	10,604±0,016
AMY	Artvin Mor Yaprak	36,306±0,028
<b>Sarı Çiçekli Bitkiler</b>		
AkSÇ	Akçaabat Sarı Çiçek	543,079±0,099
AkSY	Akçaabat Sarı Yaprak	154,220±0,087
MaSÇ	Maçka Sarı Çiçek	60,490±0,032
MaSY	Maçka Sarı Yaprak	3,350±0,007
KöSÇ	Köprübaşı Sarı Çiçek	651,448±0,101
KöSY	Köprübaşı Sarı Yaprak	65,635±0,034
VaSÇ	Vakfikebir Sarı Çiçek	137,956±0,041
ŞaSÇ	Şalpazarı Sarı Çiçek	190,444±0,091
ÇaSÇ	Çaykara Sarı Çiçek	1,740±0,004
ÇaSY	Çaykara Sarı Yaprak	9,207±0,012
<b>ToSÇ</b>	<b>Tonya Sarı Çiçek</b>	<b>760,435±0,104</b>
ToSY	Tonya Sarı Yaprak	55,842±0,027
OSÇ	Ordu Sarı Çiçek	233,348±0,062
OSY	Ordu Sarı Yaprak	61,850±0,031

<sup>a</sup>: Numuneler üç tekrarlı olacak şekilde yürütüldü.

<sup>b</sup>: Tespit edilemedi.

Gerek lokalitenin farklılaşması gerekse bitkideki analiz edilen kısmının (yaprak ve çiçek) farklılaşması analiz sonuçlarında değişen geniş aralıklar meydana getirmiş olup grafiksel bazda ölçüm aralığındaki bu değişim özetlenerek Şekil 21’de sunuldu. Madde miktarı açısından kabaca kendi içerisindeki GTX-III izomerince toksik sıralama: Sarı Çiçek-Çiçek> Sarı Çiçek-Yaprak> Mor Çiçek-Yaprak> Mor Çiçek-Çiçek şeklindedir.



Şekil 21. Bitki örneklerinin GTX-III miktarının grafiksel gösterimi

### 3.3. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşen Analizi Validasyon Parametreleri ve Kromatogramları

RP-HPLC-UV ile tespit edilen 17 standart bileşenin (gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kaffeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, *o*-kumarik asit, myrisetin, fisetin, kuersetin ve apigenin) ve iç standart olarak kullanılan propilparabenin validasyon parametreleri Tablo 25’de verildi. Böylelikle ölçüm sonuçlarındaki gerek kalitatif gerekse kantitatif sonuçlar doğrulandı.

Tablo 25. RP-HPLC-UV validasyon parametreleri

No	RT <sub>Ort</sub> <sup>a</sup>	Bileşen	<i>m</i> <sup>b</sup>	<i>c</i> <sup>c</sup>	R <sup>2</sup>	%RSD (Alınma Zamanı)	%RSD (Alan)	LOD <sup>d</sup>	LOQ <sup>d</sup>
1	2.78	Gallik Asit	0,137	0,011	0,998	0,241	4,479	0,135	0,449
2	5.16	Protokatekuik Asit	0,098	0,341	0,998	0,239	2,506	0,086	0,285
3	8.56	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	0,092	0,047	0,995	0,657	3,164	0,124	0,414
4	9.64	Kateşin	0,023	0,008	0,998	0,580	3,966	0,325	1,083
5	10.29	Klorojenik Asit	61,187	1,323	0,998	0,087	1,516	0,089	0,267
6	10.69	Vanilik Asit	0,109	0,050	0,997	0,354	1,808	0,483	1,609
7	11.16	Kaffeik Asit	120,93	7,158	0,999	0,079	2,312	0,211	0,632
8	11.83	Şiringik Asit	0,184	0,080	0,997	0,361	1,693	0,065	0,217
9	12.46	Epikateşin	0,027	0,021	0,997	0,385	1,675	0,091	0,302
10	14.17	<i>p</i> -Kumarik Asit	172,550	21,797	0,999	0,077	1,342	0,299	0,896
11	15.42	Ferulik Asit	115,110	11,597	0,999	0,081	1,628	0,331	0,994
12	15.85	Rutin	39,478	3,9151	0,999	0,085	2,152	0,282	0,847
13	17.36	<i>o</i> -Kumarik Asit	180,560	8,1254	0,999	0,055	1,425	0,301	0,899
14	18.90	Myrisetin	56,886	-16,300	0,999	0,060	2,801	0,237	0,711
15	19.36	Fisetin	99,511	-79,95	0,997	0,104	3,147	0,193	0,579
16	22.53	Kuersetin	77,745	-22,523	0,999	0,137	2,607	0,315	0,946
17	25.52	Apigenin	61,404	-14,844	0,999	0,086	0,858	0,190	0,570
IS	26.48	Propilparaben				0,069	4,107	0,179	0,596

<sup>a</sup>: Zaman birimi dakika cinsindedir.

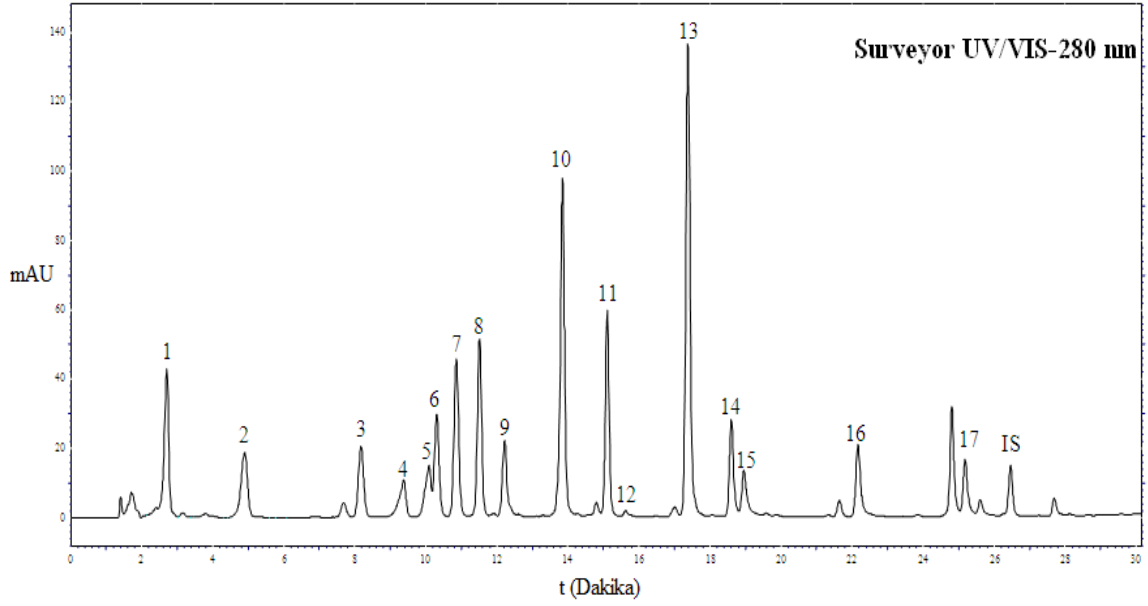
<sup>b</sup>: Eğim

<sup>c</sup>: Eğim Çizgisi Kesim Noktası

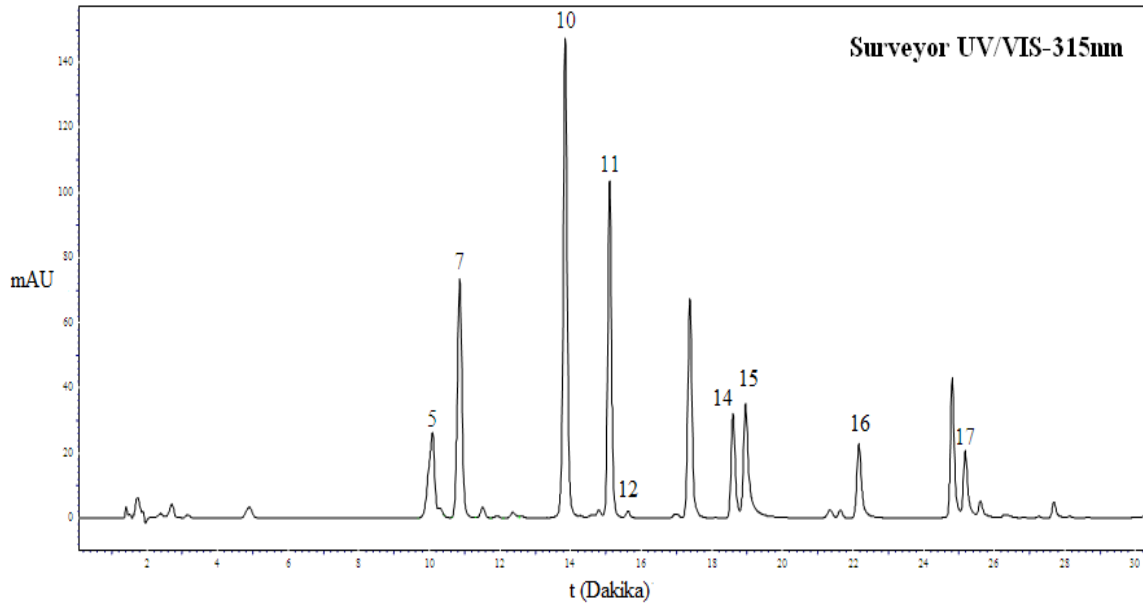
<sup>d</sup>: Değerler mg/L cinsinden verilmiştir.

İki farklı dalga boyu ile yapılan standart pik ayrımları Şekil 22 ve 23'teki kromatogramlarda verildi.





Şekil 22. Fenolik bileşenler 280 nm'deki kromatogramı. (1) Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (4) Kateşin, (5) Klorojenik asit, (6) Vanilik asit, (7) Kaffeik asit, (8) Şiringik asit, (9) Epikateşin, (10) *p*-Kumarik asit, (11) Ferulik asit, (12) Rutin, (13) *o*-Kumarik asit, (14) Myrisetin, (15) Fisetin, (16) Kuersetin, (17) Apigenin, (IS) İç standart-Propilparaben.



Şekil 23. Fenolik bileşenler 315 nm'deki kromatogramı. (5) Klorojenik asit, (7) Kaffeik asit, (10) *p*-Kumarik asit, (11) Ferulik asit, (12) Rutin, (14) Myrisetin, (15) Fisetin, (16) Kuersetin ve (17) Apigenin.

### 3.4. Bazı Örneklerin Fenolik Bileşen Sonuçları

LC-MS/MS ile GTX-III analizi yapılan bazı örneklerde RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizi yapıldı. Bu bağlamda bal örneklerinden 6 (DB7, DB8, DB9, DB10, DB11, DB12); mor çiçekli orman gülü bitkilerinden 6 (KeMÇ, KeMY, ToMÇ, ToMY, HeMÇ, HeMY); sarı çiçekli orman gülü bitkilerinden ise 5 adet (KöSÇ, KöSY, ŞaSÇ, ToSÇ, ToSY) analiz numunesi seçildi. Seçimler rastgele olmak üzere gerçekleştirildi.

#### 3.4.1. Bazı Bal Örneklerinin Fenolik Bileşen Sonuçları

17 fenolik bileşenle gerçekleştirilen bazı bal örneklerinin analizlerinde genel manasıyla farklı oranlarda 9 adet fenolik bileşene rastlanıldı. Geriye kalan 8 fenolik bileşen ise ya tayin sınırının altında olması ya da herhangi bir dedeksiyon sinyali alınamamasından ötürü gözlemlenemedi (Tablo 26).

Tablo 26. RP-HPLC-UV ile bal örnekleri fenolik bileşen sonuçları

Standartlar	Numune Kodları					
	$\mu\text{g}$ (Fenolik Bileşen)/ g numune					
	DB7	DB8	DB9	DB10	DB11	DB12
Gallik Asit	0,032	0,123	0,007	0,071	0,102	0,233
Protokatekuik Asit	T.E. <sup>a</sup>	1,500	4,201	T.E. <sup>a</sup>	1,841	0,242
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	<b>9,062</b>	<b>11,731</b>	<b>18,992</b>	<b>10,751</b>	<b>12,690</b>	<b>2,351</b>
Kateşin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Klorojenik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Vanilik Asit	0,304	T.E. <sup>a</sup>	1,230	1,411	2,641	T.E. <sup>a</sup>
Kaffeik Asit	4,341	5,971	3,904	4,190	1,874	0,304
Şiringik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Epikateşin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>p</i> -kumarik Asit	3,991	5,482	3,903	4,843	6,422	3,081
Ferulik Asit	0,895	2,614	0,272	0,454	2,413	0,880
Rutin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>o</i> -kumarik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Myrisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Fisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Kuersetin	T.E. <sup>a</sup>	3,482	T.E. <sup>a</sup>	3,253	4,294	3,510
Apigenin	T.E. <sup>a</sup>	0,613	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	0,443	T.E. <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Tespit edilemedi.

Örneklem grubunda ortak gözlemlenen ve major bileşen olarak tanımlanan *p*-OH benzoik asit 2,351-18,992 µg/g numune değer aralığı ile tayin edildi. Bu bileşenin yanında gallik asit 0,032-0,233 µg/g numune; kaffeik asit 0,304-5,971 µg/g numune; *p*-kumarik asit 3,081-6,422 µg/g numune ve ferulik asit 0,272-2,614 µg/g numune aralığında tayin edildi. Bileşen zenginliği açısından numuneler irdelendiğinde; DB11 etiket koduyla isimlendirilen bal numunesi içeriğinde barındırdığı 9 fenolik bileşen öne çıktığı görüldü. Aynı zamanda DB11 nolu bal, tespit edilen fenolik bileşenlerin toplam madde miktarı (32,720 µg/g numune) açısından öncü olduğu sonucuna varıldı (Tablo 26).

### 3.4.2. Bazı Bitki Örneklerinin Fenolik Bileşen Sonuçları

#### 3.4.2.1. Bazı Mor Çiçekli Orman Gülü Bitkilerinin Fenolik Bileşen Sonuçları

Bazı mor çiçekli orman gülü bitkilerinin fenolik bileşen sonuçları Tablo 27’de verildi.

Tablo 27. RP-HPLC-UV ile mor çiçekli orman gülü bitkileri fenolik bileşen sonuçları

Standartlar	Numune Kodları µg (Fenolik Bileşen)/g numune					
	KeMÇ	KeMY	ToMÇ	ToMY	HeMÇ	HeMY
Gallik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	0,246	0,240
Protokatekuik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	3,393	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<b>Kateşin</b>	<b>13,989</b>	<b>74,871</b>	<b>16,460</b>	<b>7,217</b>	<b>21,735</b>	<b>52,069</b>
Klorojenik Asit	0,526	T.E. <sup>a</sup>	5,353	2,363	1,241	T.E. <sup>b</sup>
Vanilik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Kaffeik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Şiringik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Epikateşin	4,408	70,069	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>p</i> -kumarik Asit	0,152	136,835	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	0,147	T.E. <sup>a</sup>
Ferulik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	188,094
Rutin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>o</i> -kumarik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Myrisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Fisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Kuersetin	T.E. <sup>a</sup>	13,710	1,726	4,170	0,544	T.E. <sup>a</sup>
Apigenin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Tespit edilemedi.

Bitkinin çiçek ve yaprak kısmı fenolik bileşen analizlerinde kateşin bileşiği en yüksek oranda ve ortak olarak tespit edildi. KeMY kodlu Keşap menşeiili mor çiçekli yaprakta bu değer 74,871 µg/g numune ile ilk sıradadır (Tablo 27).

Genel manasıyla madde miktarı açısından yaprak kısımlarının barındırdığı fenolik bileşenler çiçek kısımlarından bir hayli fazla olarak tespit edildiği gözlemlendi (Tablo 27). Tablo 27 verilerine göre değişen oranlarda olmakla birlikte numunelerde kateşinin yanında; gallik asit, klorojenik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kuersetinin varlığıda tespit edildi. Özellikle KeMY kodlu Keşap mor çiçekli orman gülü yaprağında *p*-kumarik asit, 136,835 µg/g numune; HeMY kodlu Hemşin mor çiçekli orman gülü yaprağında ferulik asit, 188,094 µg/g numune ile madde miktarı açısından en fazla gözlemlenen bileşenler olduğu sonucuna varıldı (Tablo 27).

#### 3.4.2.2. Bazı Sarı Çiçekli Orman Gülü Bitkilerinin Fenolik Bileşen Sonuçları

Tablo 28 verileri ışığında analizleri gerçekleştirilen sarı çiçekli orman gülü bitki numunelerindeki fenolik bileşen çeşitliliği mor çiçekli orman gülü bitkisiyle korelasyon gösterecek kadar yakın olduğu ve bu ifadenin 0,571-10,548 µg/g numune değer aralığıyla kateşin ile güçlendiği tespit edildi. Ancak korelasyonu bozan örneğin varlığı da mevcuttur. Bu örneğe üç numunede gözlemlenen *o*-kumarik asit (0,155-6,230 µg/g numune) varlığı verilere gösterildi (Tablo 28).

Tablo 28. RP-HPLC-UV ile sarı çiçekli orman gülü bitkileri fenolik bileşen sonuçları

Standartlar	Numune Kodları				
	µg (Fenolik Bileşen)/ g numune				
	KöSÇ	KöSY	ŞaSÇ	ToSÇ	ToSY
Gallik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Protokatekuik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	0,596	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
<b>Kateşin</b>	<b>8,542</b>	<b>10,548</b>	<b>3,932</b>	<b>0,571</b>	<b>4,296</b>
Klorojenik Asit	T.E. <sup>a</sup>	2,448	4,259	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Vanilik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Kaffeik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Şiringik Asit	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Epikateşin	4,501	T.E. <sup>a</sup>	1,282	T.E. <sup>a</sup>	3,431
<i>p</i> -kumarik Asit	0,196	0,246	1,583	0,306	T.E. <sup>a</sup>
Ferulik Asit	11,825	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Rutin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>

Tablo 28'in devamı

<i>o</i> -kumarik Asit	T.E. <sup>a</sup>	1,799	3,201	0,155	6,230
Myrisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Fisetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>
Kuersetin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	10,339	0,946	2,717
Apigenin	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>	T.E. <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Tespit edilemedi.

### 3.5. Örneklerin Antioksidan Sonuçları

Tablo 12 (Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler)'de özetlendiği gibi çalışma kapsamında toplanan tüm numunelere *in vitro* spektrofotometrik antioksidan testler yapılmış olup kısmi alt başlıklarda derlenerek yorumlandı.

#### 3.5.1. Bal Örneklerinin Toplam Polifenol ve FRAP Testi Sonuçları

Bal örneklerinde gerçekleştirilen gallik asidin referans standart olarak alındığı "Toplam Polifenol" ve troloksun referans standart olarak alındığı "FRAP" ölçüm sonuçlarına göre, DB9, DB17 ve DB28 kodlu örnekler kendi gruplarında en yüksek değerlere sahip olan numuneler olarak yorumlandı (Tablo 29). Genel manasıyla toplam polifenol ölçüm sonuçları; 0,095-0,513 mg GAE/g numune ve FRAP ölçüm sonuçları; 0,491-1,859 µmol Troloks/g numune olarak tespit edildi.

Tablo 29. Bal örnekleri toplam Polifenol ve FRAP testleri sonuçları

Kod	Lokalitesi	TP <sup>a</sup>	FRAP <sup>a</sup>
		(mgGAE/g numune)	(µmol Troloks/g numune)
<b>Orman Gülü Balı Örnekleri</b>			
DB1	Düzce	0,450±0,004	1,506±0,027
DB2	Trabzon/Vakfikebir	0,134±0,005	0,842±0,005
DB3	Rize	0,311±0,003	0,773±0,009
DB4	Rize	0,100±0,008	0,592±0,005
DB5	Trabzon/Şalpazarı	0,175±0,004	1,361±0,002
DB6	Kastamonu	0,336±0,019	1,620±0,007
DB7	Bartın	0,314±0,005	0,853±0,003
DB8	Trabzon/Şalpazarı	0,185±0,001	0,619±0,002
<b>DB9</b>	<b>Giresun/Sis Dağı-Görece</b>	<b>0,457±0,007</b>	<b>1,728±0,035</b>

Tablo 29'un devamı

DB10	Kastamonu	0,310±0,006	0,845±0,005
DB11	Artvin	0,220±0,000	0,879±0,013
DB12	Rize	0,209±0,001	0,674±0,007
DB13	Zonguldak	0,160±0,009	0,491±0,011
DB14	Zonguldak	0,300±0,002	1,616±0,003
DB15	Zonguldak	0,346±0,005	1,692±0,009
DB16	Trabzon/Ağasar	0,095±0,000	0,494±0,000
<b>2013 Taze Sağım Orman Gülü Balları</b>			
<b>DB17</b>	<b>Artvin</b>	<b>0,346±0,006</b>	<b>0,912±0,020</b>
DB18	Artvin	0,276±0,004	0,563±0,019
DB19	Artvin	0,133±0,012	0,640±0,017
DB20	Artvin	0,325±0,325	1,077±0,039
DB21	Artvin	0,300±0,008	0,898±0,008
DB22	Artvin	0,131±0,007	0,723±0,039
DB23	Artvin	0,174±0,006	0,780±0,005
DB24	Artvin	0,184±0,011	0,812±0,004
<b>Vaka Balları</b>			
DB25	Artvin/Hopa	0,390±0,006	0,987±0,008
DB26	Trabzon	0,108±0,004	0,747±0,014
DB27	Trabzon	0,137±0,006	0,939±0,015
<b>DB28</b>	<b>Trabzon</b>	<b>0,513±0,002</b>	<b>1,859±0,070</b>
DB29	Trabzon	0,292±0,006	0,931±0,039
DB30	Trabzon	0,175±0,011	0,747±0,004

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

### 3.5.2. Bal Örneklerinin DPPH ve ABTS Testi SC<sub>50</sub> Testi Sonuçları

Numunelerin barındırdığı toplam antioksidan bileşenlerin ortamdaki herhangi bir radikalik türle savaşması ve bu radikalik etkiyi yok etmesi esasına dayanan DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesi tayinleri öncülüğünde edinilen sonuçların bal örneklerine dair kısmı Tablo 30'da derlenerek verildi. Bu ölçüm sonuçları radikalik etkinin % 50'sini temizleme konsantrasyonu tanımıyla ve g/mL birimiyle hesaplandı. Ayrıca ölçüm sonuçlarını standart bir referansla karşılaştırma adına troloks kullanıldı.

Numunelerin Toplam Polifenol ile FRAP arasındaki uyumlu korelasyona nazaran bu iki testin sonuçlarındaki tepe değerlerinde küçük sapmalar görüldü. Kendi örneklem grubu içerisinde, DB15 kodlu bal örneği DPPH testinde 0,024±0,001 g/mL SC<sub>50</sub> değeriyle en yüksek sonuca ulaşırken, ABTS testinde aynı örneklem grubundaki DB9 kodlu bal örneği 0,303±0,003 g/mL değeriyle en yüksek değere sahip olduğu sonucuna varıldı (Tablo 29).

Toplam Polifenol ve FRAP sonuçlarında (Tablo 29) olduğu gibi 2013 taze sağım orman gülü ballardaki DB17 (DPPH-SC<sub>50</sub> 0,044±0,001 g/mL; ABTS-SC<sub>50</sub> 0,504±0,022

g/mL) ve vaka ballarındaki DB28 (DPPH-SC<sub>50</sub> 0,024±0,000 g/mL; ABTS-SC<sub>50</sub> 0,333±0,009 g/mL) kodlu numunelerinin aktivitesinin kendi grupları içerisinde en yüksek değerde olduğu bu iki testle de teyit edildi (Tablo 30).

Tablo 30. Bal örneklemi DPPH ve ABTS testleri SC<sub>50</sub> sonuçları

Kod	Lokalitesi	DPPH <sup>a</sup> SC <sub>50</sub> -g/mL	ABTS <sup>a</sup> SC <sub>50</sub> -g/mL
<b>Orman Gülü Balı Örneklemi</b>			
DB1	Düzce	0,044±0,000	0,544±0,025
DB2	Trabzon/Vakfikebir	0,078±0,001	0,709±0,000
DB3	Rize	0,073±0,000	0,825±0,015
DB4	Rize	0,077±0,000	1,146±0,000
DB5	Trabzon/Şalpazarı	0,031±0,001	0,629±0,057
DB6	Kastamonu	0,050±0,000	0,328±0,016
DB7	Bartın	0,053±0,000	0,599±0,023
DB8	Trabzon/Şalpazarı	0,079±0,000	0,931±0,042
<b>DB9</b>	<b>Giresun/Sis Dağı-Görece</b>	<b>0,030±0,000</b>	<b>0,303±0,003</b>
DB10	Kastamonu	0,069±0,000	0,618±0,012
DB11	Artvin	0,054±0,000	0,614±0,016
DB12	Rize	0,055±0,000	0,874±0,006
DB13	Zonguldak	0,096±0,002	0,704±0,004
DB14	Zonguldak	0,035±0,003	0,504±0,022
<b>DB15</b>	<b>Zonguldak</b>	<b>0,024±0,001</b>	<b>0,313±0,014</b>
DB16	Trabzon/Ağasar	0,119±0,002	1,719±0,000
<b>2013 Taze Sağım Orman Gülü Balları</b>			
<b>DB17</b>	<b>Artvin</b>	<b>0,044±0,001</b>	<b>0,504±0,022</b>
DB18	Artvin	0,102±0,002	0,713±0,044
DB19	Artvin	0,079±0,004	0,860±0,000
DB20	Artvin	0,044±0,001	0,469±0,019
DB21	Artvin	0,068±0,001	0,590±0,030
DB22	Artvin	0,068±0,001	0,764±0,000
DB23	Artvin	0,093±0,007	0,739±0,044
DB24	Artvin	0,131±0,001	0,667±0,036
<b>Vaka Balları</b>			
DB25	Artvin/Hopa	0,055±0,000	0,588±0,005
DB26	Trabzon	0,065±0,002	0,982±0,000
DB27	Trabzon	0,059±0,003	0,796±0,055
<b>DB28</b>	<b>Trabzon</b>	<b>0,024±0,000</b>	<b>0,333±0,009</b>
DB29	Trabzon	0,049±0,001	0,625±0,000
DB30	Trabzon	0,066±0,000	0,982±0,000
Std.	Troloks <sup>b</sup>	0,001±0,000	0,199±0,005

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>b</sup>: mg/mL

### 3.5.3. Orman Gülü Bitkileri Toplam Polifenol ve FRAP Testi Sonuçları

Toplanan bitkilerin metanolik ekstraktlarıyla yapılan “Toplam Polifenol” ve “FRAP” testleri neticesinde elde edilen verilere göre değer aralıkları bal örneklemelerinin sahip olduğu değerlerden ~70-190 kat fazla olduğu görüldü (Tablo 31). Test sonuçları özetlenerek “Orman gülü bitkileri Toplam Polifenol ve FRAP testleri sonuçları” başlığı altında Tablo 31’de verildi.

Tablo 31. Orman gülü bitkileri Toplam Polifenol ve FRAP testleri sonuçları

Kod	Lokalitesi	TP <sup>a</sup>	FRAP <sup>a</sup>
		(mg GAE/g numune)	( $\mu$ mol Troloks/g numune)
<b>Orman Gülü Bitkileri</b>			
<b>Mor Çiçekli Bitkiler</b>			
YoMÇ	Yomra Mor Çiçek	16,529±0,112	245,540±1,142
YoMY	Yomra Mor Yaprak	17,502±0,043	203,742±1,671
AkMÇ	Akçaabat Mor Çiçek	24,532±0,144	364,929±1,147
AkMY	Akçaabat Mor Yaprak	31,671±0,157	414,631±0,879
MaMÇ	Maçka Mor Çiçek	17,497±0,177	299,694±1,399
MaMY	Maçka Mor Yaprak	23,034±0,074	313,669±1,001
KöMÇ	Köprübaşı Mor Çiçek	24,798±0,031	403,431±0,346
KöMY	Köprübaşı Mor Yaprak	34,208±0,063	440,142±1,130
VaMÇ	Vakfikebir Mor Çiçek	28,315±0,150	394,827±1,864
VaMY	Vakfikebir Mor Yaprak	40,284±0,132	476,555±1,715
ŞaMÇ	Şalpazarı Mor Çiçek	15,396±0,019	215,314±0,858
ŞaMY	Şalpazarı Mor Yaprak	18,997±0,062	249,863±0,650
ÇaMÇ	Çaykara Mor Çiçek	17,076±0,009	249,549±0,408
ÇaMY	Çaykara Mor Yaprak	19,244±0,085	273,490±0,634
ToMÇ	Tonya Mor Çiçek	20,659±0,099	266,741±1,107
ToMY	Tonya Mor Yaprak	40,262±0,134	404,051±1,601
KeMÇ	Keşap Mor Çiçek	21,524±0,038	357,858±1,408
KeMY	Keşap Mor Yaprak	26,636±0,274	345,091±1,635
OMÇ	Ordu Mor Çiçek	26,807±0,099	410,955±1,514
<b>OMY</b>	<b>Ordu Mor Yaprak</b>	<b>44,109±0,121</b>	<b>558,403±1,929</b>
HeMÇ	Hemşin Mor Çiçek	26,574±0,230	338,752±1,625
HeMY	Hemşin Mor Yaprak	26,519±0,124	383,412±0,886
AMÇ	Artvin Mor Çiçek	14,538±0,016	262,432±1,522
AMY	Artvin Mor Yaprak	25,781±0,159	339,539±0,708
<b>Sarı Çiçekli Bitkiler</b>			
AkSÇ	Akçaabat Sarı Çiçek	17,844±0,017	172,481±1,951
AkSY	Akçaabat Sarı Yaprak	14,891±0,070	176,941±0,314
MaSÇ	Maçka Sarı Çiçek	8,769±0,064	93,711±0,289
MaSY	Maçka Sarı Yaprak	29,045±0,095	402,882±1,423
KöSÇ	Köprübaşı Sarı Çiçek	6,643±0,021	68,203±0,829



Tablo 31'in devamı

KöSY	Köprübaşı Sarı Yaprak	20,142±0,094	269,190±0,699
VaŞÇ	Vakfikebir Sarı Çiçek	9,753±0,007	89,177±1,004
ŞaŞÇ	Şalpazarı Sarı Çiçek	13,378±0,211	123,863±1,578
ÇaŞÇ	Çaykara Sarı Çiçek	12,103±0,140	104,694±1,884
ÇaSY	Çaykara Sarı Yaprak	22,977±0,083	203,845±0,335
ToŞÇ	Tonya Sarı Çiçek	4,551±0,072	51,512±0,432
<b>ToSY</b>	<b>Tonya Sarı Yaprak</b>	<b>35,526±0,118</b>	<b>500,704±1,648</b>
OSÇ	Ordu Sarı Çiçek	17,185±0,009	188,492±0,402
OSY	Ordu Sarı Yaprak	29,677±0,088	400,944±1,601

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

### 3.5.4. Orman Gülü Bitkileri DPPH ve ABTS Testi SC<sub>50</sub> Sonuçları

Toplanan bitkilerin metanolik ekstratlarıyla yapılan DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesi sonuçları bal örneklem sonuçlarında farklı verildi. Hesaplamalar neticesinde edinilen SC<sub>50</sub> değerleri g/mL'den mg/mL mertebesine kadar düşerken sonuçların bal örneklemelerine göre ~ 1000 kat daha etkin olduğu kanaatine varıldı. Bu bağlamda Tablo 32 "Orman gülü bitkileri DPPH ve ABTS testleri SC<sub>50</sub> sonuçları"derlemesi göz önünde bulundurularak DPPH SC<sub>50</sub>, 0,036-0,439 mg/mL; ABTS SC<sub>50</sub>, 1,185-18,826 mg/mL değer aralıklarıyla kendisine yer bulduğu gözlemlendi.

Tablo 32. Orman gülü bitkileri DPPH ve ABTS testleri SC<sub>50</sub> sonuçları

Kod	Lokalitesi	DPPH <sup>a</sup>	ABTS <sup>a</sup>
		SC <sub>50</sub> -mg/mL	SC <sub>50</sub> -mg/mL
<b>Orman Gülü Bitkileri</b>			
<b>Mor Çiçekli Bitkiler</b>			
YoMÇ	Yomra Mor Çiçek	0,159±0,001	4,452±0,146
YoMY	Yomra Mor Yaprak	0,142±0,000	3,990±0,098
AkMÇ	Akçaabat Mor Çiçek	0,097±0,000	3,609±0,019
AkMY	Akçaabat Mor Yaprak	0,056±0,001	1,957±0,036
MaMÇ	Maçka Mor Çiçek	0,110±0,000	3,032±0,009
MaMY	Maçka Mor Yaprak	0,093±0,000	2,468±0,481
KöMÇ	Köprübaşı Mor Çiçek	0,109±0,000	2,134±0,110
KöMY	Köprübaşı Mor Yaprak	0,052±0,000	1,417±0,022
VaMÇ	Vakfikebir Mor Çiçek	0,077±0,000	1,981±0,054
<b>VaMY</b>	<b>Vakfikebir Mor Yaprak</b>	<b>0,036±0,000</b>	<b>1,338±0,019</b>
ŞaMÇ	Şalpazarı Mor Çiçek	0,181±0,000	5,277±0,192
ŞaMY	Şalpazarı Mor Yaprak	0,082±0,000	2,884±0,190
ÇaMÇ	Çaykara Mor Çiçek	0,130±0,000	4,166±0,466

Tablo 32'in devamı

ÇaMY	Çaykara Mor Yaprak	0,085±0,000	3,234±0,123
ToMÇ	Tonya Mor Çiçek	0,115±0,002	3,637±0,017
ToMY	Tonya Mor Yaprak	0,050±0,000	1,750±0,005
KeMÇ	Keşap Mor Çiçek	0,090±0,001	2,532±0,043
KeMY	Keşap Mor Yaprak	0,071±0,002	2,362±0,017
OMÇ	Ordu Mor Çiçek	0,073±0,000	2,079±0,041
<b>OMY</b>	<b>Ordu Mor Yaprak</b>	<b>0,042±0,000</b>	<b>1,185±0,014</b>
HeMÇ	Hemşin Mor Çiçek	0,062±0,000	2,009±0,025
HeMY	Hemşin Mor Yaprak	0,057±0,001	1,919±0,051
AMÇ	Artvin Mor Çiçek	0,107±0,000	4,926±0,242
AMY	Artvin Mor Yaprak	0,078±0,000	3,254±0,077
<b>Sarı Çiçekli Bitkiler</b>			
AkSÇ	Akçaabat Sarı Çiçek	0,151±0,001	4,126±0,054
AkSY	Akçaabat Sarı Yaprak	0,145±0,002	5,294±0,391
MaSÇ	Maçka Sarı Çiçek	0,351±0,001	5,885±0,038
<b>MaSY</b>	<b>Maçka Sarı Yaprak</b>	<b>0,043±0,000</b>	<b>1,675±0,003</b>
KöSÇ	Köprübaşı Sarı Çiçek	0,439±0,012	10,116±0,699
KöSY	Köprübaşı Sarı Yaprak	0,099±0,000	3,295±0,037
VaSÇ	Vakfikebir Sarı Çiçek	0,367±0,002	7,003±0,057
ŞaSÇ	Şalpazarı Sarı Çiçek	0,208±0,003	5,145±0,115
ÇaSÇ	Çaykara Sarı Çiçek	0,263±0,004	6,490±0,153
ÇaSY	Çaykara Sarı Yaprak	0,084±0,000	2,792±0,011
ToSÇ	Tonya Sarı Çiçek	0,797±0,009	18,826±0,232
<b>ToSY</b>	<b>Tonya Sarı Yaprak</b>	<b>0,056±0,000</b>	<b>1,620±0,047</b>
OSÇ	Ordu Sarı Çiçek	0,135±0,001	3,326±0,079
OSY	Ordu Sarı Yaprak	0,092±0,001	2,027±0,035
Std.	Troloks	0,001±0,000	0,199±0,005

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

### 3.6. Deney Hayvanlarıyla Yapılan Biyokimyasal Denemeler

Kardiyovasküler sistem hücrelere ihtiyaçları olan oksijen ve besin maddelerini ileten ve hücrelerde oluşan metabolik artıkları da akciğerler ve böbrekler aracılığıyla vücuttan atılmak üzere götüren sistemdir. Bu sistem üzerindeki organ kasılmasını sağlayan elektriksel algı iyonlarının (sodyum, potasyum, kalsiyum ve klor) hücresel difüzyonu ile gerçekleşir.

Orman gülü ballarının doz aşımı ile tüketimi neticesinde bu sistem üzerinde fonksiyonel bozukluklar meydana gelmektedir. Bu bozukluğun ana sebebi Na-K kanallarının modifikasyonu olarak gösterilmektedir. Modifikasyon neticesinde

kardiyotoksisite denilen fonksiyonel bozukluk, AST, ALT, LDH, CK, CK-MB, troponin T, troponin I, ANP, BNP gibi biyomarkırların düzeylerdeki değişimle belirlenir.

Mevcut tez çalışmasında biri kontrol olmak üzere 5 farklı gruba farklı konstrasyonlardaki (75-600 mg/mL) orman gülü balı ekstraktları verildi. Sekiz günlük besleme sonucunda dekapte edilen sıçanların kan plazma sıvısında AST, ALT, LDH, ALP, CK, CK-MB, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> analizleri gerçekleştirildi. Tablo 33'de biyokimyasal analizi yapılan parametrelerin ölçüm sonucu verildi. İyon düzeyleri haricinde analizi yapılan tüm enzimlerin değerleri kontrol grubuna göre bal ekstrakt konstrasyonu ile lineer artış gösterdi.

Tablo 33. Sıçan serumları biyokimya sonuçları

Biyokimyasal Parametreler	Deney Hayvanları Grupları <sup>a</sup>				
	Kontrol	I.	II.	III.	IV.
AST(U/L)	172,750±2,217	199,250±4,646	205,250±4,573	225,000±3,651	266,750±3,096
ALT (U/L)	53,250±1,708	55,250±2,217	61,250±4,992	65,250±4,113	71,750±2,630
LDH (U/L)	1365,250±4,646	1410,250±11,442	1547,250±22,897	1581,000±7,746	2276,750±5,620
ALP (U/L)	120,750±5,737	155,750±4,787	181,000±8,406	194,250±1,708	215,250±5,852
CK (U/L)	2197,500±8,963	2794,250±55,066	2917,500±12,793	3322,750±10,468	3819,000±7,071
CK-MB (U/L)	1307,000±9,899	1772,750±9,215	1810,250±11,413	2193,250±9,639	2460,250±4,113
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	136,750±0,500	139,750±2,217	137,000±1,633	136,750±0,500	136,750±0,500
K <sup>+</sup> (mmol/L)	7,125±0,050	7,100±0,000	7,175±0,096	6,900±0,183	7,150±0,058
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	96,750±0,957	96,750±0,500	96,750±1,258	96,250±0,500	95,750±0,957

<sup>a</sup>: Ölçüm sonuçları üç tekrarlı ve ± standart sapma olarak verilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bal, eski çağlardan beri birçok medeniyette ve hala günümüzde alternatif tıp kaynağı olarak kullanılmaktadır (Allen vd., 1991). Gastirit, ülser, yaralar, yanık, yatak yaraları, diyabet ve iştahsızlık gibi birçok hastalığın tedavisinde ön plana çıkmaktadır (Jeddar vd., 1985; Kandil vd., 1987; Allen vd., 1991; Al-Waili, 2004; Larson-Meyer vd., 2010).

Bal arısı (*Apis mellifera* L.) tarafından üretilen bu yararlı besin maddesinin ve ona kaynaklık eden floranın kimyasal içeriği, üretim merkezindeki coğrafik alanının (toprak, iklim ve topolojik özellik) farklılaşmasıyla değişmektedir (Izhar-ul-Haq vd., 2010). Örneğin, bitkinin nektar olgusundaki farklılaşmada toprak tipi faktörü en önemli faktördür. Crafts ve Crisp'in (1971) çalışması bu ifadeyi desteklemektedir. Çalışma, "Kalkerli topraklarda nektar salgısı doğal topraklara nazaran bir hayli fazladır." yargısıyla sonuçlanmıştır (Crafts ve Crisp 1971). Yine bir başka örnekte, toprak değişimiyle birlikte balın mineral kompozisyonundaki farklılaşma Cimino vd. (1984) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada volkanik ve volkanik olmayan toprak lokasyonundaki balların mineral bileşimi çalışılmış ve volkanik topraklı bölgeden toplanan baldaki kül ve mineral miktarı fazla bulmuştur (Cimino vd., 1984).

Özetle, aynı türde olsa bile bitkideki ve bu bitkilerin kaynaklık ettiği balların içeriğindeki kompozisyon çeşitli etmenlerle değişmekte ve farklı tamamlayıcı tıp özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (Linder vd., 1996).

Tamamlayıcı tıp alanında sıklıkla karşılaşılan ve zengin dünya florasının bir üyesi olan *Rhododendron* türleri, astım ve bronşit rahatsızlığında, bağırsak gastritinde, soğuk algınlığı tedavisinde, deri hastalıklarının tedavisinde ve iltihap gideriminde vb. kullanılmaktadır (Duke ve Ayensu, 1985; Tang ve Eisenbrand, 1992; Keys, 1993; Kim vd., 1998; Iwata vd., 2004; Li vd., 2011; Wu ve Li, 2011; Zhou vd., 2011; Fu vd., 2012; Popescu ve Kopp, 2013). Çünkü, yapılarının sahip olduğu antibakteriyel, antioksidan, antiprotozoal, antiviral, antiinflamatuvar gibi biyoaktif etkileri bilinmektedir (Johnson, 1999; Erdemoglu vd., 2003; Orhan vd., 2003; Tasmir vd., 2005; Alan vd., 2010; İskefiyeli, 2010; Usta vd., 2012; Popescu ve Kopp, 2013). Bu türler her ne kadar böylesi zengin biyoaktif özelliklere sahip olsada, içeriğinde grayanotoksin özel ismiyle barındırdıkları oldukça etkili toksinlere de sahiptirler (Hikino, 1979).

Bu bitkilerin toksik etkisi bilinsede dünyanın muhtelif yerlerinde kullanımı hala devam etmektedir. Örneğin, Hindistan'ın Himalaya bölgesinde *R. arboreum* türünün geleneksel tıpta kullanımı fazlasıyla yaygındır. Ancak kullanım dozu belirli seviyenin üzerinde olması halinde oldukça ciddi toksin kaynaklı semptomlara neden olacağı da bildirilmiştir (Bhattacharyya, 2011; Paul vd., 2005). Yine aynı bölgede, *R. campanulatum* ve *R. cinnabarinum* türlerini tüketen hayvanların toksik etkiye maruz kaldıkları rapor edilmiştir (Popescu ve Kopp, 2013). Lama vd., (2001)'de, tıbbi tedavi için Nepal'de *Rhododendron campanulatum* türü kullanılmadan önce sulu ekstraktının yüksek sıcaklıklara değin kaynatılarak grayanotoksinlerce detoksifiye edildiğini vurgulamıştır. Ayrıca Hindistan'da *R. barbatum* ve *R. falconeri* türlerinin yaprakları balık zehiri ve *R. thomsonii* böcek zehiri olarak kullanılmaktadır (Bahuguna ve Jangwan, 1987; Bhattacharyya, 2011). Bunun yanında *R. aureum* Sibiryada, *R. caucasicum* Kafkasyada ve *R. dauricum* da Asya'nın muhtelif yerlerinde balık zehiri olarak kullanılmaktadır (Dragendorff, 1898).

*Rhododendron* türlerinin barındırdığı toksik bileşenler *R. luteum* ve *R. ponticum*da da fazlasıyla görülmektedir. Toksiditesi yüksek bu bitkilerin nektarları bal arıları tarafından işlenmekte ve ülkemizde orman gülü balı olarak üretilmektedir. Üretimi neticesiyle bölgedeki tüketimi fazla olan bu ballar, hücre üzerinde sodyum kanallarında olumsuz etkiler meydana getirmektedir (Gündüz vd., 2008b). Maejima vd. (2003) tarafından literatüre kazandırılan çalışmaya göre toksinin sodyum kanallarına etkisi kademeli olmaktadır. İlk aşamada grayanotoksin, voltaj bağımlı kanalların açılma fazında kanallara bağlanır. Modifikasyona uğrayan kanallar inaktivasyonunu engeller. Son aşamada modifiye olmuş sodyum kanallarının aktivasyon potansiyeli, sodyum kanalının hiperpolarizasyonuna (iyonlarının hücre içinden hücre dışına fazla çıkışı) neden olur. Dolaylı olarak hiperpolarizasyonun neden olduğu zehirlenme semptomları, halsizlik, bulantı, kusma, baş dönmesi, salivasyon, aşırı terleme ve özellikle ağız çevresi ve ekstremitelerde uyuşmadır (Akın vd., 2013; Yılmaz vd., 2006). Kısmen bu hafif semptomları hipotansiyon, bradikardi, intoksikasyonlarda koordinasyon bozukluğu ve bilinç kaybı gibi ciddi semptomlar takip edebilir (Akın vd., 2013; Yılmaz vd., 2006).

Orman gülü balının zehirlenmesi olgusu balın tüketim dozuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Dursunoglu vd., 2007). Akın vd. (2013) "Deli bal herkeste toksik etki meydana getirmeyebilir. İnsanlarda grayanotoksinin etkisi doza bağlıdır. Zehirlenmeler 5-30 mg kadar miktarlarla ortaya çıkar." ifadesiyle bilimsel camiaya katkı yapmıştır. Ancak

bu yargı letal dozun belirlendiği *in vivo* çalışmalarla desteklenmemiş ve sadece klinik vakaların ifadelerine dayandırılarak ortaya konmuştur.

Grayanotoksin letal dozunu belirleyebilmenin ilk adımını oluşturma adına gerek *Rhododendron* türlerindeki gerekse bu bitkinin kaynaklık ettiği orman gülü balındaki mevcut ana toksik izomerini (GTX-III) kalitatif ve kantitatif olarak tespit etmek gerekmektedir. Hassas, güvenilir ve geniş ölçüm aralığına sahip analitiksel metodolojinin uygun görüldüğü bir yöntem ile bu işlem gerçekleştirilmelidir.

Bu mevcut durumdan ve durumun ortaya koyduğu literatür eksikliğinden yola çıkılarak kurgulanan mevcut çalışmada yüksek hassasiyetli dedeksiyon sağlayan LC-MS/MS metodolojisi seçildi. Çünkü Kang'a (2012) göre sıvı kromatografisine kombine edilmiş kütle spektroskopisi, mevcut analitiksel yöntemler içerisinde gerek ilaç metabolizması, gerekse farmakinetik ve biyokimyasal toksikoloji çalışmalarında kullanılan en önemli ve avantajlı ölçüm cihazıdır. Aynı zamanda cihazın MS bölümündeki üçlü-kuadropol veya iyon tuzaklı kütle analizörleri bu çalışmalardaki duyarlılığı ve seçiciliği artırdığını da bildirmiştir. Clarke vd. (2001) ve Schwartz vd. (1990)'ne göre ise, birçok çalışmada üçlü-kuadropol (QQQ) ve onların MS/MS tarama tipleri metabolitlerin identifikasyonunu belirlemede avantajlı bir yol ortaya koymaktadır. Analizördeki duyarlılığın ve hassasiyetin en önemli parametresi fragment iyon olarak adlandırılan iyonların her birininin bağıl bolluğunun ayrı ayrı hesaplanmasından ileri gelmektedir. (Kang, 2012).

İfadelenen bu avantajlı metodolojiden faydalanarak, 370,48 g/mol molekül ağırlığına sahip GTX-III izoformu, MS/MS analizlerinde 38 eV parçalanma enerjisiyle bağıl bolluğu en fazla olan 279, 297 ve 315 g/mol molekül ağırlıklarına sahip üç ana parça fragmentte ayrıldı ve fragment iyonlar üzerinden toplam iyon dedeksiyon değerleri takip edildi (Tablo 18). Elde edilen bu bilgiler ışığında GTX-III izoformunun MS/MS'de validasyon parametrelerine geçildi. Her bir validasyon parametresi, "3.1.2. Metod Validasyon Parametreleri" ana başlığında ve bu başlığa bağlı alt başlıklarda özetlendi (Tablo 19-22). Optimizasyon koşulları netleştirildikten sonra numunelerdeki GTX-III izoformunun kromatografik ayırımına geçildi. Ancak LC-MS/MS'te biyolojik materyallerin direkt enjeksiyonla cihaz analizleri uygun değildir. Dolayısıyla materyal, enjeksiyon işlemi öncesinde protein çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ya da katı faz ekstraksiyonu (SPE) gibi bazı tekniklerle analize hazırlanmalıdır (Kang, 2012). Bilimsel bu verilerin ışığında analizi yapılacak olan gerek bitkilerin gerekse bal numunelerinin metanolik ekstraktlarında "2.4."

başlık numarasıyla verilen “Örneklerin Ekstraksiyon Şartları” bölümünde ifadelendirildiği üzere katı faz ekstraksiyonu yapıldı. Katı ekstraksiyonu ile GTX-III açısından zenginleştirme yapılarak tekrarlı analizlere geçildi. Çalışma kapsamında yapılan tüm analizler bal ve bitki numune grubu açısından irdelenerek sonuçlandırıldı.

30 adet orman gülü balındaki ve 1 adet kontrol grubu olarak değerlendirilen kestane balındaki GTX-III analizleri, 68,754-0,377 µg GTX-III/ g numune değer aralığı ile sonuçlandırıldı (Tablo 23). Ölçümün kontrolü ve yapılan analizlerin doğruluğunu teyit etme adına monofloral özellikli KB1 kodu ile verilen Zonguldak menşeli kestane balı referans numunesi olarak kullanıldı. Bu numunede GTX-III’ün tespit edilememesi çalışmadaki diğer bal numunelerinin ölçüm neticelerinin güvenilirliğini artırdı.

GTX-III açısından tepe noktasındaki değerler vaka balları başlığı altında değerlendirilen bal örneklerinde gözlemlendi (68,754-10,583 µg GTX-III/ g numune) (Tablo 23). Bu başlıktaki numunler, zehirlenme semptomu ile hastaneye başvuran kişilerin tükettiği ballardan temin edilerek oluşturuldu. Vaka balları gruplandırmasının tüketici ifadesine dayandırıldığı için analiz edilen diğer balların zehirlenme etkisi gösterip göstermediği bilinmemektedir. Örneğin, DB1 kodu ile ifadelendirilen Düzce menşeli ve DB13 koduyla ifadelendirilen Zonguldak menşeli ballar vaka balları başlığı altında değerlendirilmesede barındırdıkları yüksek GTX-III miktarlarıyla olası tüketimlerinde zehirlenme semptomlarıyla sonuçlanacak toksik etki gösterebileceği yorumu yapılabilir.

Aynı bölge etiketiyle analizi yapılan ve “2013 Taze Sağım Orman Gülü Balları” kategorisinde değerlendirilen 8 adet (DB17-24) Artvin ili teminli orman gülü balında GTX-III açısından genel manasıyla en düşük ölçüm seviyeleri gözlemlendi. Edinilen bu sonuçlara göre, “Bu ilden temin edilen balların barındırdıkları GTX-III izoformu oldukça düşüktür.” ifadesini ön plana çıksa da vaka balları başlığında değerlendirilen DB25 nolu balın da yine Artvin ili sınırlarından temin edildiği ve analiz edilen ballar arasında en yüksek değere eriştiği de görüldü. Dolayısıyla numune içerik değişikliğinin salt lokalite kaynaklı olmadığı yorumu yapıldı.

Bitki örneklem grubundaki GTX-III analizleri iki başlık altında değerlendirildi. Tablo 24’de özetlenen verilerde, 12’si çiçek ve 12’si yaprak kısmı olmak üzere toplam 24 adet mor çiçekli orman gülü numunesi analiz edildi. 40,476-1,740 µg GTX-III/ g numune değer aralığıyla ölçülen numunelerin bazılarında (MaMÇ-MaMY-VaMY-OMÇ-OMY-HeMÇ-HeMY) GTX-III toksik izomerine rastlanmadığı görüldü (Tablo 24).



8 adet çiçek ve 7 adet yaprak kısmının GTX-III izoformu açısından irdelendiği sarı çiçekli orman gülü bitkilerinde, 760,435-1,740 µg GTX-III/ g numune değer aralığı sonuçlar tespit edildi (Tablo 24). Analiz edilen sarı çiçekli bitki numunelerinin tümünde GTX-III izoformunun gözlemlendiği ve elde edilen sonuçların mor çiçekli bitki örneklemelerine nazaran bir hayli yüksek olduğu sonucuna varıldı. Gerek farklı bitki türlerinde (*R. luteum* ve *ponticum*) gerekse aynı türlerin kendi içerisinde edilen ölçüm değerlerinin farklı olmasının sebebi birçok nedene dayandırılabilir. Ancak en etkin olanı Linder vd. (1996) ifade ettiği gibi bitkinin yetiştiği lokalitenin, toprak tipinin ve iklimsel etkinin farklılaşması sonucunda bitkinin kimyevi içeriğinin de farklılaşması sonucudur.

LC-MS/MS’te kalitatif ve kantitatif GTX-III analiz için hazırlanan numunelerde aynı zamanda RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizler gerçekleştirildi. Fenolik bileşen analizi için seçilen numunelerin kategorizasyonu, Tablo 12’de “Numune etiket bilgisi ve numunelere yapılan analizler” başlığı ile verildi.

280 ve 315 nm dedeksiyonunda 17 standardın kalitatif ve kantitatif ayrımı gerçekleştirildi (Şekil 22-23). Özellikle tayin sınırı ve dedeksiyon sınırının yer aldığı validasyon parametreleri belirlenerek numune analizlerine geçildi (Tablo 25).

Fenolik bileşenleri en geniş manada iki alt grupta derlemek mümkündür. Bunlar; fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Silici vd., 2013). Metabolik faaliyette çok önemli yer tutan bu bileşikler, normal hücre metabolizmaları tarafından üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS ve RNS) kaynaklı serbest radikallere karşı savaşmaktadır (Miniati, 2007). Çoğunlukla bitki ve mikroorganizma kaynaklı bu yararlı bileşenlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu mümkündür (Santos-Buelga vd., 2012).

Bilimsel araştırmalara göre *Rhododendron* türlerinden aglikon veya glikozid formunda olan 65’den fazla flavanoid elde edilmiştir (Popescu ve Kopp, 2013). Hu ve Xiao’nun (1989) ve De Loose’un (1974) yaptığı çalışmalar bu ifadeye örnek olarak verilebilir. Hu ve Xiao (1989) 166 farklı *Rhododendron* yaprağından başta kaemferol olmak üzere kuersetin, kuersitrin, hiperozid, farrerol ve polistakozid sentezlerken; De Loose (1974) bitkilerin çiçeklerinden siyanidin, peonidin ve azaleatin gibi bazı antosiyanidin ve flavonollerini sentezlemiştir.

Yapılan çalışmanın bitki analizi kısmında 7 numunede (KeMY-ToMÇ-ToMY-HeMÇ-ŞaSÇ-ToSÇ-ToSY) 0,544-13,710 µg/ g numune değer aralığı ile kuersetinin tespiti, Hu ve Xiao (1989) çalışmasına kısmi paralellik gösterdiği görüldü (Tablo 27-28). Ancak *R. pontium* ve *luteum* örneklerindeki analizlerde major bileşen olarak flavanoidlerin bir

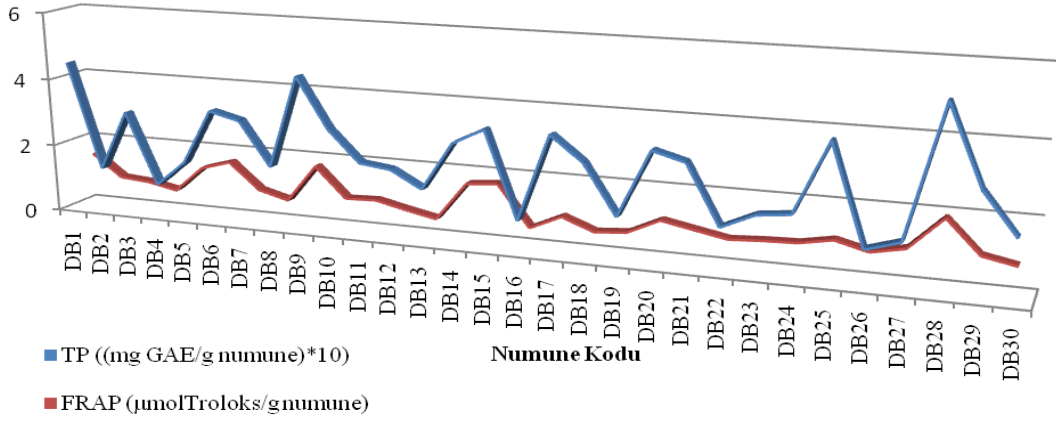
başka üyesi olarak kateşin görüldü (0,571-74,871 µg/ g numune) (Tablo 27-28). Bu bileşenin birçok *Rhododendron* türünde varlığı bilimsel çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Jaiswal vd. (2012) 16 *Rhododendron* üyesinde (*Rhododendron* 'Catawbiense Grandiflorum', *Rhododendron* 'Cunningham's White', *Rhododendron smirnowii* Trautv., *Rhododendron calophytum* Franch., *Rhododendron dichroanthum* ssp. *scyphocalyx* (Balf. f. & Forrest) Cowan, *Rhododendron micranthum* Turcz., *Rhododendron praeevernum* Hutch., *Rhododendron ungerii* Trautv., *Rhododendron kaempferi* Planch., *Rhododendron degronianum* ssp. *heptamerum* var. *hondoense* (Nakai) H. Hara, *Rhododendron fortunei* Lindl., *Rhododendron ponticum* L., *Rhododendron galactinum* Balf. f. ex Tagg., *Rhododendron oreotrepes* W. W. Sm., *Rhododendron brachycarpum* ssp. *brachycarpum* D. Don ex G. Don ve *Rhododendron insigne* Hemsl. & E. H. Wilson) LC-MS ile kateşin, epikateşin, gallokateşin ve epigallokateşin taramasını yapmış ve özellikle türlerdeki kateşinin varlığını ortaya koymuştur.

Gerek mor çiçekli gerekse sarı çiçekli orman gülü türünde, bu flavanoidlerin yanı sıra farklı oranlarda fenolik asitler de tespit edildi. Tespit edilen gallik asit (0,240-0,246 µg/ g numune) ve protakatekuik asit (0,596-3,393 µg/ g numune) (Tablo 27-28) sonucu Li vd. (2013)'nin yaptığı çalışma ile paralellik göstermiş ve bu çalışmada da *Rhododendron* türlerinde bu iki bileşenin varlığı ortaya konulmuştur. Mevcut tez çalışmasında bu iki asidin yanı sıra; klorojenik asit (0,526-5,353 µg/g numune), *p*-kumarik asit (0,147-136,835 µg/g numune), ferulik asit (11,825-188,094 µg/g numune) ve *o*-kumarik asidin (0,155-6,230 µg/g numune) varlığı da ortaya konularak komponentler açısından fenolik asit zenginliği vurgulandı (Tablo 27-28).

Bitkilerin analize hazırlanma prosedürü ile aynı eş olan bal ekstraktların RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizinde, değişen oranlarda 9 farklı bileşen tespit edildi. DB7-DB12 aralığındaki numunelerin analizlerinde *p*-OH benzoik asit ve *p*-kumarik asit major bileşen olarak görüldü (Tablo 26). Silici vd. (2013) *Rhododendron* ballarında fenolik bileşen analiz yapmış ve kumarik asitleri major bileşenler olarak tespit etmiştir. Yine aynı çalışmada gallik asidin ve ferulik asidin tüm numunelerde ortak gözlemlenen fenolik bileşen olarak belirtmiştir. Mevcut tez çalışmasında da major bileşenin yanı sıra gallik asit, kaffeik asit ve ferulik asit ortak fenolik bileşen olarak tespit edildi (Tablo 26).

Salt metanolik ekstraktların kullanıldığı spektrofotometrik *in vitro* antioksidan analizleri için Toplam Polifenol, FRAP, DPPH radikal temizleme ve ABTS radikal temizleme aktivite testleri uygulandı.

Bal numune ekstraktlarının, Toplam Polifenol ile FRAP testlerindeki uyumlu artış-azalışı Tablo 34'deki korelasyon tablosuyla ve Şekil 24'deki analizlerin korelasyonu görseli ile desteklenerek ortaya konuldu.



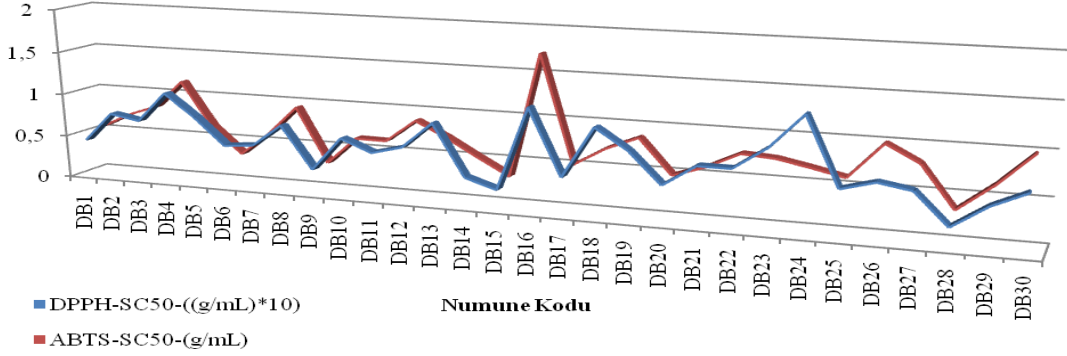
Şekil 24. Bal örneklerinin Toplam Polifenol ve FRAP testi sonuçları korelasyonu

Metanolik bal ekstraktlarındaki Toplam Polifenol ve FRAP arasındaki güçlü bir korelasyonu ( $R^2=0,8$ ) oluşturan sonuçlar literatürdeki çalışmalarla desteklendi.

Silici vd. (2010) 50 adet orman gülü balının biyoaktivite özelliklerini çalışmış ve numunelerin toplam polifenol değerlerini 0,24-141,83 mg GAE/100 g numune (0,002-1,41 mg GAE/ g numune) olarak ortaya koymuştur. Ayrıca, Küçük vd. (2007) Karadeniz bölgesinden ve Erzincan'dan topladıkları bal numunelerinin toplam polifenol özelliklerini çalışmış ve numune grubu arasında *Rhododendron* balının da bulunduğu çalışmadaki sonuç, 132 mg Kateşin/100 g numune olarak verilmiştir. Neticede örneği verilen çalışmadaki sonuçlar kateşin standardı cinsinden verilse de bu sonucun mevcut çalışmadaki var olan değer aralığına (0,095-0,513 mg GAE/g numune) referans olduğu görüldü.

Bal örneklerine dair antioksidan içerikli birçok bilimsel çalışmada FRAP metodu kullanılmıştır. Ancak orman gülü balları açısından FRAP'ın troloks eşdeğerince verildiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Chua vd. (2013) orman gülü balı gibi Malezya'nın otantik ballarından olan tuluang balının biyooaktif özelliğini çalışmış ve numunenin FRAP değerini 2,09 µmol Troloks/g numune olarak belirlemiştir. Yayınlamış olduğu bu bilimsel veri, mevcut tez çalışmasının FRAP değerlerine oldukça yakın olduğu görülmüştür.

Bal örneklerinin DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesinde ise küçük olası sapmaların dışında artışın artışıla, azalışında azalışla cevap bulduğu gözlemlendi. Her bir örneklem grubu nazarındaki uyum, gerek korelasyon tablosuyla Tablo 34’de gerekse görsel destekle Şekil 25’de verilerek sonuçlar desteklendi.



Şekil 25. Bal örneklerinin DPPH ve ABTS testi sonuçları korelasyonu

Tablo 34. Bal örnekleri antioksidan korelasyon tablosu

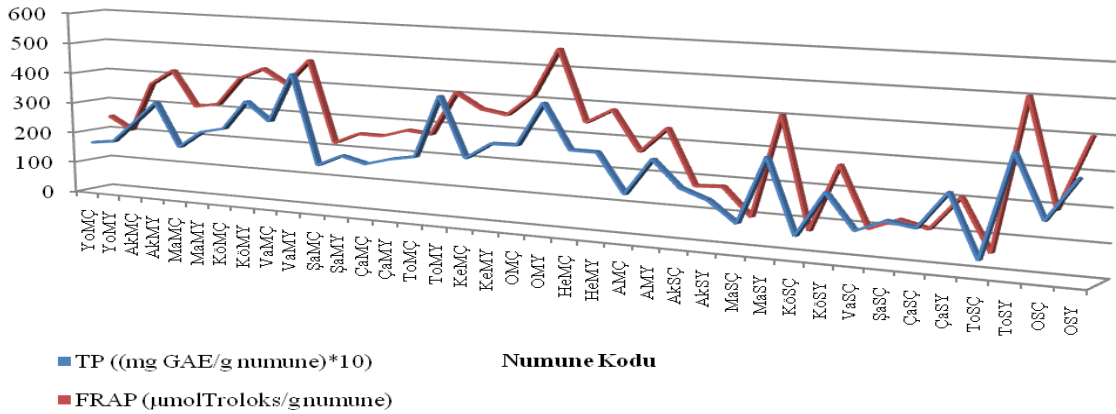
	TP	FRAP	DPPH	ABTS
TP	<b>1,0</b>	0,8	-0,7	-0,8
FRAP	0,8	<b>1,0</b>	-0,7	-0,7
DPPH	-0,7	-0,7	<b>1,0</b>	0,7
ABTS	-0,8	-0,7	0,7	<b>1,0</b>

DPPH ve ABTS radikal temizleme testlerinde numunelerin %50 oranında var olan radikallik etkiyi temizlediği konsantrasyon aralıkları sırasıyla; 0,024-0,102 ve 0,303-1,179 g/mL olarak tespit edildi. Sonuçlar standart bir kimyasal olan troluks ile desteklendi ve kıyaslandı. DPPH testinde bu standart 0,001 mg/mL, ABTS testinde ise 0,199 mg/mL sonuçla kendisine yer bulduğu görüldü.

Tezcan vd. (2011) bazı yöresel balların DPPH radikal temizleme aktivitesini çalışmış ve örneklem grubu içerisinde *Rhododendron* balına da yer vermiştir. Bu çalışmada SC<sub>50</sub> değerleri 224,86-770,5 mg/mL (0,224-0,770 g/mL) olarak bulunarak yayınlanmıştır. Bir başka bilimsel çalışmada her ne kadar *Rhododendron* balına yer verilirse de bazı bal örneklerinin ABTS radikal temizleme aktivitesiyle aktivitesi ölçülmüştür ve SC<sub>50</sub> değeri 43,25-202,26 mg/mL (0,043-0,202 g/mL) olarak bulunmuştur (Alzahrani vd., 2012).

Verilen bilimsel örneklerde edinilen sonuçlar ile mevcut çalışma sonuçları kıyaslandığında var olan küçük farklılığın, numunelerin toplandığı orijinin ve kimyevi içeriğinin farklı olmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı.

Bal örneklerinde çalışılan antioksidan test parametreleri orman gülü bitkilerinin (*R. luteum* ve *R. ponticum*) metanolik ekstraktlarında da çalışıldı. Bal ekstraktlarından elde edilen antioksidan sonuçlarında gözlemlenen güçlü korelasyonun bir diğer yansıması bitki ekstraktlarının “Toplam Polifenol ve FRAP” testlerinde de görüldü (Şekil 26, Tablo 35). OMY kısa ismiyle verilen numune, mor çiçekli bitkiler kategorisinde gerek toplam polifenolde ( $44,109 \pm 0,121$  mg GAE/g numune) gerekse FRAP testinde ( $558,403 \pm 1,929$   $\mu$ mol Troloks/g numune) en yüksek değere erişirken aynı durum Tonya meşei sarı yapraklı bitkide de gözlemlendi (TP:  $35,526 \pm 0,118$  mg GAE/g numune; FRAP  $500,704 \pm 1,648$   $\mu$ mol Troloks/g numune) (Tablo 31).

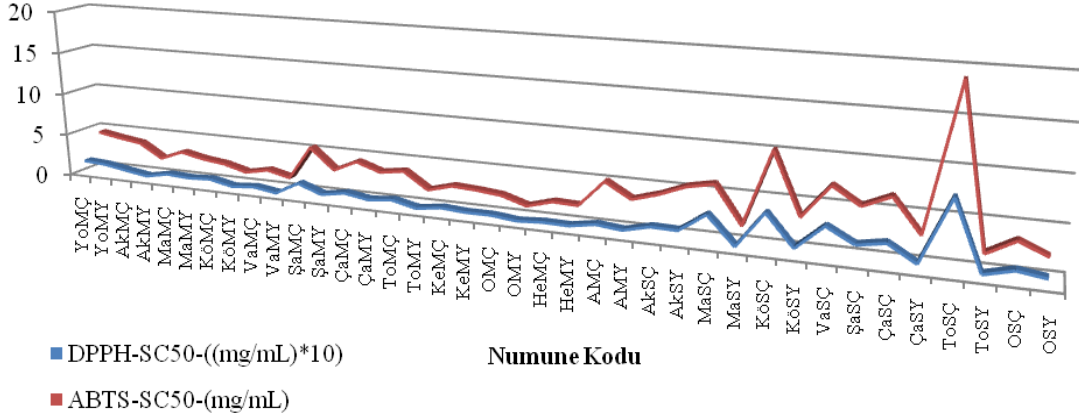


Şekil 26. Bitki örneklerinin Toplam Polifenol ve FRAP testi sonuçları korelasyonu

Rafiq vd., (2013) *Rhododendron schlippenbachii* maxim. bitkisinin kabuklarını kullanarak yaptığı çalışmada bitki ekstraktın toplam polifenol içeriğini  $76,39 \pm 2,04$  mg GAE/g numune olarak bulmuştur. Li vd. (2013) Çin’den topladıkları 51 adet yenilebilir ve yabani tür bitkinin biyoaktivite özellikleri karşılaştırarak çalışmıştır. Örneklem grubu açısından *Rhododendron* türüne de yer verilen çalışmada, FRAP değerleri  $\mu$ mol Fe(II)/g cinsince verilmiştir. Bu çalışmada FRAP yöntemini sonuçlandıran standartın mevcut tez çalışmasında kullanılan standartla farklılığı görülmektedir. Mevcut tez çalışmasında *Rhododendron* bitki türleri  $558,403$ - $51,512$   $\mu$ mol Troloks/g numune değer aralığıyla son derece yüksek antioksidan özellik göstermiştir (Tablo 31). Bu yüksek değer Li vd. (2013)

çalışmasında da ortaya konulmuş ve *Rhododendron* türü, çalışılan türler arasında  $64,87 \pm 3,04 \mu\text{mol Fe(II)/g}$  numune sonuç değeriyle yüksek biyoaktivite gösteren numuneler arasında girmiştir.

DPPH ve ABTS radikal temizleme aktivitesi testinin çalışılan bitki ekstraktları açısından değerlendirilmesinde yine test sonuçlarının birbirine göre uyumu dikkate alındı. Uygulanan bu iki testteki gözlemlenen üst düzey pozitif korelasyon,  $R^2=1$  değeri ile kendisine yer bulurken tepe nokta değerlerinde küçük sapmalar gözlemlendi. Bu ayrıntı, mor çiçekli bitkiler arasında “Vakfikebir Mor Yaprak” DPPH testinde en yüksek aktiviteye sahip iken “Ordu Mor Yaprak” ABTS testinde en yüksek aktiviteye sahip; sarı çiçekli bitkiler arasında “Maçka Sarı Yaprak” DPPH testinde en yüksek aktiviteye sahip iken “Tonya Sarı Yaprak” ABTS testinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu olgusuyla desteklendi (Tablo 32, 35). Genel manasıyla bahsedilen bu uyumsal takibat “Bitki örneklerinin DPPH ve ABTS testi sonuçları korelasyonu” başlığı altındaki görsel destekle Şekil 27’de verildi.



Şekil 27. Bitki örneklerinin DPPH ve ABTS testi sonuçları korelasyonu

Tablo 35. Orman gülü bitkileri antioksidan korelasyon tablosu

	TP	FRAP	DPPH	ABTS
TP	<b>1,0</b>	0,9	-0,7	-0,7
FRAP	0,9	<b>1,0</b>	-0,7	-0,7
DPPH	-0,7	-0,7	<b>1,0</b>	1,0
ABTS	-0,7	-0,7	-0,7	<b>1,0</b>

Farklı bir *Rhododendron* türü olan *R. arboreum* Sm'nin biyoaktivesinin değerlendirilip % 50 inhibisyon konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) birimiyle sonuçlandırılan bilimsel çalışmada sonuçlar; DPPH testinde  $19,91 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$  ve ABTS testinde  $9,50 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuştur (Mani vd., 2008). Aynı sonuç ifadesinin ( $IC_{50}$ ) yer aldığı bir diğer çalışmada, Prakash vd. (2007) 21 adet farklı Himalaya *Rhododendron*larını -*R. baileyii*, *R. camellie-florum*, *R. campanulatum*, *R. ciliatum*, *R. cinnabarinum*, *R. griffithianum*, *R. lepidotum*, *R. niveum*, *R. sallignum* ve *R. Virgatum*- çalışmış ve ekstraktlarının %50 inhibisyon konsantrasyonu  $0,07-0,19 \text{ mg/mL}$  olarak bulmuştur. Bu sonuç aralığının mevcut çalışmanın DPPH sonuçlarını desteklediği görüldü.

$Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Cl^-$  elektrolitlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim gözlenmezken, karaciğer enzimleri AST ( $172,750-266,750 \text{ U/L}$ ) ve ALT ( $53,250-71,750 \text{ U/L}$ ) de anlamlı derecede artış gözlemlendi. Bu artış bal konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak bulundu (Tablo 33). Nitekim istatistikî olarak korelasyon katsayısı AST için  $-R^2: 0,961$ ,  $p < 0,05$ - ALT için  $-R^2: 0,907$ ,  $p < 0,05$  olarak tespit edildi (Tablo 36-37). Çetin vd. (2009) "Deli Bal ile Hepatotoksisite" adlı çalışmasında yüksek dozda orman gülü balı zehirlenmesine maruz kalan vakanın AST ve ALT değerlerini kayıt altına almış. Normalde  $10-40 \text{ U/L}$  olması gereken AST değeri  $1175 \text{ U/L}$  olarak,  $10-35 \text{ U/L}$  olması gereken ALT değeri  $479 \text{ U/L}$  olarak ölçmüştür. Edinilen bu sonuç orman gülü balının bu iki enzim değerini artırdığını teyit etmiştir.

Alkalen fosfataz enzim (ALP) enzim aktiviteside bal konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir ( $120,750-215,250 \text{ U/L}$ ) ( $R^2:0,974$ ,  $p < 0,05$ ) (Tablo 33, 36-37). ALP enzimi bir fosfataz olup artan kas kasılmalarına paralel olarak kemik dokudan fosfat salınmasını tetiklemiş olabilir (Ersoy, 2012).

Kardiyak enzimlerden olan total CK ve CK-MB izoenzimi de orman gülü balı konsantrasyonun bağlı olarak değişim gösterdiği ve bal ekstresi konsantrasyonu arttıkça CK ( $2197,500-3819,00 \text{ U/L}$ ) ve CK-MB ( $1307,00-2460,250 \text{ U/L}$ ) aktivitesinin de arttığı görüldü (Tablo 33). Yapılan istatistikî değerlendirme ile bal konsantrasyonu ile CK aktivitesi arasındaki ilişki ( $R^2:0,984$ ,  $p < 0,05$ ) olarak tespit edildi (Tablo 36-37). Yaylacı vd. (2011) "Hipotansiyon ve bradikardi etiyolojisinde deli bal zehirlenmesi" adlı çalışmasında orman gülü balı zehirlenmesi öyküsüne sahip olan hastanın, hastaneye başvurusu sırasında ve tedavisi sonrası CK ve CK-MB değerleri ölçülerek yayınlanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre balın tüketimi neticesinde CK ve CK-MB değerleri, normal

değerlerden yaklaşık iki kat fazla çıktığı gözlemlenmiştir. Değerlerdeki bu misli artış mevcut tez çalışmasına da paralellik göstermiştir.

CK enzimine benzer şekilde bir kas ve kalp dokusuna spesifik olan LDH enzim aktivitesinde bal konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı gözlemlendi (1365,250-2276,750 U/L) ( $R^2:0,853$ ,  $p<0,05$ ) (Tablo 33, 36-37). CK ve LDH kas ve kalp dokularında var olan enzimler olup herhangi bir hipoksi durumunda artan anaerobik glikolize paralel olarak enzim aktivitelerinde artış olduğu bilinmektedir (Kaaja ve Are, 1996). Sonuç olarak, orman gülü balı konsantrasyonuna (veya GTX miktarına) bağlı olarak kardiyak enzimlerin artmasına neden olmuştur.

Tablo 36. Paired samples testi korelasyonu

<b>Korelasyon Grupları</b>	<b>N<sup>a</sup></b>	<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>Sig.<sup>b</sup></b>
Grup & AST	20	0,961	<b>0,000</b>
Grup & ALT	20	0,907	<b>0,000</b>
Grup & LDH	20	0,853	<b>0,000</b>
Grup & ALP	20	0,974	<b>0,000</b>
Grup & CK	20	0,984	<b>0,000</b>
Grup & CK-MB	20	0,979	<b>0,000</b>
Grup & Na <sup>+</sup>	20	-0,261	0,266
Grup & K <sup>+</sup>	20	-0,163	0,492
Grup & Cl <sup>-</sup>	20	-0,409	0,063

<sup>a</sup>: Örnek sayısı

<sup>b</sup>: İstatistiksel olarak 1. derecede anlamlılık ölçüsü



Tablo 37. Paired samples test analizi

Korelasyon Grupları	Paired samples Değişkenleri									
	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata Ortalama	% 95'lik Güven Aralığı Sınırları				t <sup>a</sup>	df <sup>b</sup>	Sig. (2-tailed) <sup>c</sup>
				En Düşük	En Yüksek	En Düşük	En Yüksek			
Grup – AST	-211,80000	30,89643	6,90865	-226,25998	-197,34002	-30,657	19	0,000		
Grup – ALT	-59,35000	6,23467	1,39411	-62,26791	-56,43209	-42,572	19	0,000		
Grup – LDH	-1634,10000	337,89735	75,55615	-1792,24083	-1475,95917	-21,628	19	0,000		
Grup – ALP	-171,40000	32,46115	7,25853	-186,59229	-156,20771	-23,614	19	0,000		
Grup – CK	-3008,20000	554,90119	124,07968	-3267,90175	-2748,49825	-24,244	19	0,000		
Grup – CK-MB	-1906,70000	402,69279	90,04485	-2095,16603	-1718,23397	-21,175	19	0,000		
Grup – Na <sup>+</sup>	-135,40000	2,47939	0,55441	-136,56039	-134,23961	-244,224	19	0,000		
Grup – K <sup>+</sup>	-5,09000	1,47858	0,33062	-5,78200	-4,39800	-15,395	19	0,000		
Grup – Cl <sup>-</sup>	-94,45000	1,98614	0,44411	-95,37954	-93,52046	-212,671	19	0,000		

<sup>a</sup>: İstatistiksel “t” değeri

<sup>b</sup>: Serbestlik derecesi

<sup>c</sup>: İstatistiksel olarak 2. derecede anlamlılık ölçüsü

## 5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, orman gülü balı ve bitkisindeki GTX-III izoformunun LC-MS/MS ile aydınlatılması araştırıldı. Ancak araştırmanın kapsamı salt GTX-III'ün ölçümü ile sınırlandırılmadı. LC-MS/MS için hazırlanan numune ekstraktlarının bazılarında RP-HPLC-UV ile fenolik bileşen analizi, metanolik ekstraktların tümünde ise *in vitro* spektrofotometrik antioksidan analizlerine yer verildi.

Orman gülü balı, orman gülü bitkisinin kaynaklık ettiği, ülkemizde Karadeniz Bölgesinde oldukça fazla üretilen ve üretimi derecesinde tüketimi gerçekleştirilen bir besin maddesidir. Ancak belirli bir miktar üzerinde tüketimi sonucunda metabolik faaliyetleri zora sokan; bulantı, kusma, halsizlik, tansiyon değişikliği, nefes alamama ve bilinç kaybı gibi semptomlara neden olmaktadır. Bu gerçeklikten yola çıkarak, mevcut tez çalışmasında toplanan orman gülü bitkilerinin ve kaynağı bu bitkiler olan orman gülü ballarının GTX-III analizi gerçekleştirilerek elde edilen bulgular ışığında numunelerin bu bileşence zengin olup olmadığı yorumlaması yapıldı.

Toksik etkisi bilinen bu bal, dünyanın muhtelif coğrafyalarında alternatif tıp ürünü olarak da kullanılmaktadır. Ancak “Bu besin maddesi ne sıklıkla tüketilmelidir?” ve “Metabolizma için letal doz nedir?” gibi klinik bazlı problemlerin çözümü rutin analizlerce tam olarak çözüme kavuşturulmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma, örneklemelerin durum tespitini ortaya koymanın yanı sıra rutin bir ölçüm yöntemi geliştirme adına da önem arz etmektedir. GTX-III analizinin ölçümü ile birinci basamağın tamamlandığı bu çalışma, multi-disipliner perspektif ile zengileştirilebilir ve letal doz belirlenmesi gibi eş çalışmalar yapılabilir.

LC-MS/MS dışında GTX formlarının tayin edilmesine imkân sağlayacak biyosensörler gibi yeni analitiksel metotların geliştirilmesi sağlanabilir.

Durum tespiti yapıldıktan sonra bal numunelerinde GTX-III izoformunun çeşitli yöntemler denenerek giderimine bakılabilir. Özellikle farmakolojik sahada, bu toksit maddeye savaş açan ajan biyomoleküllerin üretilmesi ve böylece *in vivo* ortamda vücuttan uzaklaştırılması sağlanabilir.

*In vitro* ortamda ise, numunenin ekstraksiyonu aşamasında sıcaklık, ultrasonik etki, UV ışık etkisi ve çeşitli absorbanlarla numunenin muamelesi denendikten sonra LC-MS/MS ile numune içeriğindeki GTX-III'ün varlık tespiti ve miktar analizi yapılabilir.

Sayılan bu parametre değişikliğinden herhangi biri ya da birileri yapılarak GTX-III miktarındaki azalma ya da kaybolma gibi olası müspet sonuçlar değerlendirilebilir ve MS dedektör yardımıyla GTX-III'ün hangi kimyasal forma dönüştüğü analiz edilebilir.

GTX'in diğer izoformlarının standartları tedarik edilerek LC-MS/MS'te aydınlatıp tüm örneklem gruplarında karşılaştırmalı yorumlar yapılabilir. Özellikle vaka durumlarında bu etkiyi asıl sebep olan ana toksik izomer daha net bir şekilde aydınlatılabilir.

GTX-III bileşenini aydınlatma işlemi kromatografik yöntemlerle çeşitlendirilebilir. Ancak bu yine MS dedektör gibi yüksek hassasiyetli dedektörler kullanılmalıdır. Bu özelliğe sahip kromatografi cihaz gaz kromatografisidir. Ancak GC-MS kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde numunenin uçucu hale getirilmesi gibi ekstra işlem basamakları analiz süresini uzatırken numune içeriğinde de madde kaybına neden olabilir. Her ne kadar dezavantaj gibi görünse de bu işlem prosedürü uygunarak kromatografik yöntemlerin mukayesesi yapılabilir.

Çalışmanın diğer bir kısmında GTX-III analizi yapılmış farklı konsantrasyonlardaki bal ekstraktları ile beslenen sıçanların serumlarında biyokimyasal analizler yapılmış ve birçok biyokimyasal parametrenin bal konsantrasyonu ile değiştiği gözlenmiştir. Letal doz belirlemede bu parametrelerin değişkenliğini kontrol etmek önemli bir unsurdur. Ancak bu önemli unsuru destekleyecek farklı metabolik parametreleri de takip ederek prelinik ve klinik çalışmalara gidilmelidir.

Orman gülü balları ve bitkilerinin LC-MS/MS ile GTX-III analizi için hazırlanan numunelerde fenolik bişenler için kısmi durum tespiti yapma adına RP-HPLC-UV ile analizleri de gerçekleştirildi. Ancak belirlenen bileşenlerden olası daha fazla bileşen gözlemek için cihaz analizi öncesinde numune hazırlama işi farklılaştırılabilir ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi gibi literatürce sık kullanılan işleme tabii tutulabilir. Özellikle bitkideki major bileşenleri kütle spektroskopisi ile aydınlatılabilir ve preparatif kromatografik yöntemlerle bu komponentler izole edilebilir.

HPLC kullanılarak bal veya bitki içeriğindeki antioksidan etkileri bilinen antosiyaninler de bakılabilir. Böylece farklı lokaliteden toplanmış bu numunelerin içerdikleri antosiyaninlerin genel perspektifleri çıkartılabilir ve özellikle yöresel teminli bu tıbbi balda antosiyaninlerce marker bir ajan tespit edilebilir.

Çalışmada kullanılan bitki örneklem gruplarının toplandığı yerlerden ve bu bitkilerin kaynaklık ettiği ballardan müteakip dönemlerde tekrarlı numune alınarak tez

alışmasında kullanılan analizler yapılarak dönemsel veriler toplanabilir. Böylelikle mevsimsel farklılıkların ve lokalite farklılığı daha aydınlatıcı şekilde ortaya çıkarılmış ve istatiski veriler elde edilmiş olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Adler L.S., 2000. The Ecologic Significance of Toxic Nectar, Oikos, 91, 409-420.
- Akın A., Çoruh A. E., Efesoy Ş. N., Bayram A. ve Avşaroğulları L., 2013. A Case of Sinusal Bradycardia Caused by Mad Honey Toxicity, Erciyes Medical Journal, 35, 4, 229-331.
- Akkuş İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Akyuz E., Sahin H., Islamoglu F., Kolayli S. ve Sandra, P., 2014. Evaluation of Phenolic Compounds in *Tilia rubra subsp. caucasica* by HPLC-UV and HPLC-UV-MS/MS. International Journal of Food Properties, 17, 2, 331-343.
- Akyüz E., 2011. *Digitalis ferruginea ssp. Schisckinii* ve Bazı Endemik Digitalis Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimlerinin Enstitüsü, Trabzon.
- Alan S., Kurkcuoglu M., Goger F. ve Baser K.H.C., 2010. Morphological, Chemical and Indumentum Characteristics of *Rhododendron luteum* Sweet (Ericaceae). Pakistan Journal of Botany, 42, 3729–3737.
- Albayrak S., Sağdıç O. ve Aksoy A., 2010. The Assays Used for Assessing Antioxidant Capacities of Herbal Products and Foods. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26, 4, 401-409.
- Allen K.L., Molan P.C. ve Reid G.M., 1991. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 43, 817–822.
- Ali A.T., Chowdhury M.N. ve Al-Humayyd M.S., 1991. Inhibitory Effect of Natural Honey on *Helicobacter pylori*, Tropical Gastroenterology, 12, 73-77.
- Ali A.T., 1995. Natural Honey Exerts Its Protective Effects Against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats by Preventing Depletion of Glandular Nonprotein Sulfhydryls, Tropical Gastroenterology, 16, 18-26.
- Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri, F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S. ve Battino M., 2010. Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Several Monofloral Cuban Honeys and Their Correlation with Color, Polyphenol Content and Other Chemical Compounds, Food and Chemical Toxicology, 48, 8-9, 2490–2499.
- Al-Waili N.S., 2004. Natural Honey Lowers Plasma Glucose, C-Reactive Protein, Homocysteine, and Blood Lipids in Healthy, Diabetic, and Hyperlipidemic Subjects: Comparison with Dextrose and Sucrose, Journal of Medicinal Food, 7, 100-107.

- Al-Waili N.S., Salom K. ve Al-Ghamdi A.A., 2011. Honey for Wound Healing, Ulcers, and Burns; Data Supporting Its Use in Clinical Practice, The Scientific World Journal, 11, 766–787.
- Alzahrani H.A., Boukraa L., Bellik Y., Abdellah F., Bakhotmah B.A., Kolayli S. ve Sahin H., 2012. Evaluation of the Antioxidant Activity of Three Varieties of Honey from Different Botanical and Geographical Origins, Global Journal of Health Science, 4, 6, 192-196.
- Anklam E., 1998. A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey, Food Chemistry, 63, 549-562.
- Bahuguna R.P. ve Jangwan, J.S., 1987. Constituents of *Rhododendron barbatum*, Journal of Natural Products, 50, 309–338.
- Başgöl A., 2003. Deli Bal Zehirlenmesi. Yoğun Bakım Dergisi, 3, 1, 33-36.
- Belitz H.D. ve Grosch W., 1999. Food Chemistry, Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, 764-781.
- Benzie I.F.F. ve Strain J.J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, In Methods in Enzymology, 299, 15–27.
- Bhattacharyya D., 2011. *Rhododendron* Species and Their uses with Special Reference to Himalayas-A Review, Assam University Journal of Science & Technology, 7, 161–167.
- Biglari B., Linden P.H., Simon A., Aytac S., Gerner H.J. ve Moghaddam A., 2012. Use of Medihoney as a Non-surgical Therapy for Chronic Pressure Ulcers in Patients with Spinal Cord Injury, Spinal Cord, 50, 165-169.
- Bilaloğlu G.V. ve Harmandar M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Burns J., Gardner P.T., Matthews D., Duthie G.G., Lean M.E.J. ve Crozier A., 2001. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 5797–5808.
- Büyüktünel E., 2013. Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17, 2, 93-103.
- Cemeroglu B., Yemenicioglu A. ve Özkan M. 2001. Fenolik Bilesikler. Meyve ve Sebzelelerin Bileşimi, Soğukta Depolanmaları, Gıda Teknolojileri Derneği Yayınları, Ankara, 24, 78.

- Cemeroğlu B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 35, 77-88.
- Chua L.S., Rahaman N.L.A., Adnan N.A. ve Tan T.T.E., 2013. Antioxidant Activity of Three Honey Samples in relation with Their Biochemical Components, Journal of Analytical Methods in Chemistry, 1-9, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/313798>.
- Cimino G., Ziino M. ve Panuccio, M.R., 1984. Heavy Metal Pollution. Part X: Impact of Volcanic Activity on Etnean Honey, Environmental Technology Letters, 5, 453-456.
- Clarke N.J., Rindgen D., Korfmacher W.A. ve Cox K.A., 2001. Systematic LC/MS Metabolite Identification in Drug Discovery, Analytical Chemistry, 73, 15, 430A-439A.
- Codex Alimentarius Commission, 2001. Revised Codex Standard for Honey, Codex STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001); FAO/WHO, 215.
- Crafts A.S. ve Crisp C.E., 1971. Phloem Transport in plants. W.H. Freezeman & Company, San Francisco, U.S.A., 481.
- Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O. ve Dyatmiko W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimi Acta, 80, 1144-1152.
- Curtis K.D., 2001. Toxicology the Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 969.
- Çalangu S., 1995. Acil Dahiliye. İstanbul: Güzel Sanatlar Matbaası, 613.
- Çeter T. ve Güney K., 2011. Ormangülü ve Deli Bal, Uludağ Arıcılık Dergisi, 11, 4, 124-129.
- Çetin N.G., Marçıl E., Kıldıran M. ve Öğüt S., 2009. Hepatotoxicity with Mad Honey, Turkish Journal of Emergency Medicine, 9, 2, 84-86.
- De Loose R., 1974. Flower Color Pigments (Anthocyanins, Flavonols) and Two-Dimensional Chromatographic Patterns within the Hybrids of *Rhododendron simsii*, Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, 39, 1369-1384.
- 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.
- Dilber E., Kalyoncu M., Yarış N. ve Ökten A., 2002. A Case of Mad Honey Poisoning Presenting With Convulsion: Intoxication Instead of Alternative Therapy, Turkish Journal Medicinal Science, 32, 361-362.

- Diplock A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity, Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, Belgium, 59.
- Dragendorff G., 1898. Die Heilpflanzen der Verschiedenen Volker und Zeiten. Verlag von Ferdinand Enke, Stuttgart, Germany.
- Duke J.A. ve Ayensu E.S., 1985. Medicinal Plants of China. Reference Publications, Inc., Michigan, U.S.A.
- Durmus I., Türedi S., Gündüz A. ve Öztürk S., 2007. Mad Honey Poisoning Related Asystole, Emergency Medicine, 24, 592–3.
- Dursun İ., 2011. *Butomus umbellatus* L. ve *Sparganium emersum* Rehmann Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit İçeriklerinin HPLC-UV ile Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Dursunoglu D., Gur S. ve Semiz E., 2007. A Case with Complete Atrioventricular Block Related to Mad Honey Intoxication, Annals of Emergency Medicine, 50, 484–485.
- Effem S.E. 1988. Clinical Observations on the Wound Healing Properties of Honey, British Journal of Surgery, 75, 679-681.
- Eraydin İ., 2011. Deli Balın (Grayanotoxin) Akut ve Kronik Ağrı Davranışı, Uzmanlık Tezi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Erdik E., Obalı M., Yüksekışık N., Öktemer A., Pekel T. ve İhsanoğlu E., 2000. Denel Organik Kimya, Ankara Üniversitesi, Ankara, 133-136.
- Erdemoglu N., Akkol E.K., Yesilada E. ve Calis I., 2008. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory and Antinociceptive Principles from a Folk Remedy, *Rhododendron ponticum* L. Leaves, Journal of Ethnopharmacology, 119, 172–178.
- Ersoy O., 2012. Evaluation of Elevated Liver Enzymes, Ankara Medical Journal, 12, 3, 129-135.
- Ersöz A. 2010. Aletli Analiz, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 197-225.
- European Commission, 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 concerning honey, Official J. Eur. Communities Jan. 12th 2002, L10, 47–52.
- Fang Y., Yang S. ve Wu G., 2002. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition, Nutrition, 18, 10, 872.
- Fang Z., Zhan M. ve Wang L., 2007. HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.), Food Chemistry, 100, 845-852.



- Frankel S., Robinson G.E. ve Berenbaum M.R., 1998. Antioxidant Capacity and Correlated Characteristics of 14 Unifloral Honeys, Apicultural Research, 37, 1, 27-31.
- Fu Y., Zhang L. ve Chen G., 2012. Far Infrared-Assisted Extraction Followed by MEKC for The Simultaneous Determination of flavones and Phenolic Acids in The Leaves of *Rhododendron mucronulatum* Turcz, Journal of Separation Science, 35, 468–475.
- Garcia-Alonso M., Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C. ve Rivas-Gonzalo J.C., 2004. Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits, Food Chemistry, 84, 13-18.
- Gökçel T., 1984. Xenophon: Anabasis, Onbinlerin Dönüşü Sosyal. Yayınlar ikinci baskı, Sena Ofset., 143-4.
- Gunduz A., Turedi S., Uzun H. ve Topbaş M., 2006. Mad Honey Poisoning, American Journal of Emergency Medicine, 24, 59, 595–598.
- Gunduz A., Bostan H., Turedi S., Nuhoglu I. ve Patan T., 2007. Wild Flowers and Mad Honey, Wilderness and Environmental Medicine, 18, 69-71.
- Gunduz A., Turedi S., Russell R.M. ve Ayaz F.A., 2008a. Clinical Review of Grayanotoxin/Mad Honey Poisoning Past and Present, Clinical Toxicology, 46, 437-442.
- Gunduz A., Turedi S. ve Ayaz A.F., 2011. Deli Balın İçindeki Zehir: Grayanotoxin, Journal of Applied and Environmental Microbiology, 95-96.
- Gündüz A., Tatlı Ö. ve Turedi S., 2008b. Mad Honey Poisoning from the Past to the Present, Turkish Journal of Emergency Medicine, 8, 1, 46-49.
- Haffeejee I.E. ve Moosa A., 1985. Honey in the Treatment of Infantile Gastroenteritis. British Medical Journal, 290, 1886-1887.
- Hallaç Türk F., 2009. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Dönemlerde Alınan Yapraklardaki Fenolik ve Mineral Madde Değişimlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Halliwell B., Cross C.E. ve Gutteridge J.M.C., 1992. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease. Where are We Now?, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119, 598-620.
- Harborne J.B., 1998. Phenolic Compounds. In: Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, London, UK, 40–106.
- Harvey D., 2000. Modern Analytical Chemistry, Mc Graw Hill International Edition, USA.
- Havsteen B.T., 2002. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, Pharmacology and Therapeutics, 96, 67–202.

- Hışıl Y. 1999. Enstrümental Gıda Analizleri (I), Ege Üniv. Basımevi, Bornova-İzmir, 218.
- Hikino H., Ohizumi Y., Konno C., Hashimoto K. ve Wakasa, H., 1979. Sunchronic Toxicity of Ericaceous Toxins and Rhododendron Leaves, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 27, 874–879.
- Hu M. ve Xiao, P.G., 1989. HPTLC Scanning Determination of 6 Flavonoids in 166 *Rhododendron* species, Yaoxue Xuebao, 24, 923–931.
- Hulme A.C., 1971. The Biochemistry of Fruits and Their Products, A.R.C. Food Research Institute, Norwich, England., 2, 172–205.
- Iwata N., Wang N., Yao X. ve Kitanaka S., 2004. Structures and histamine release inhibitory effects of prenylated orcinol derivatives from *Rhododendron dauricum*, Journal of Natural Products, 67, 1106–1109.
- Izhar-ul-Haq M., Ahmad K.J., Ahmed S. ve Razzaq A., 2010. Characterization of Some Properties in Different Floral Honeys Collected by *Apis Mellifera* L., Pakistan Entomologist, 32, 2, 77-81.
- İskefiyeli Z., 2010. Ormangülü (*Rhododendron*) Uçucu Yağ Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimleri ve Biyolojik Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaiswal R., Jayasinghe L. ve Kuhnert N., 2012. Identification and Characterization of Proanthocyanidins of 16 Members of the *Rhododendron* Genus (Ericaceae) by Tandem LC-MS, Journal of Mass Spectrometry, 47, 4, 502-515.
- Jeddar A., Kharsany A., Ramsaroop U.G., Bhamjee A., Haffejee I.E. ve Moosa A., 1985. The antibacterial action of honey: an *in vitro* study, South African Medical Journal, 67, 257-258.
- Jerry P., Liu L., Zeng M., ve Stamler J.S. 2000. An Apoptotic Model for Nitrosative Stress, Biochemistry, 39, 1040-1047.
- Johnson T., 1999. CRC Ethnobotany Desk Reference. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Kaaja R. ve Are K., 1996. ACTH and Growth Hormone in Myocardial LDH Adaptation to Hypoxia in Rats, Basic Research in Cardiology, 91, 4, 269-274.
- Kandil A., El-Banby M., Abdel-Wahed G. K., Abdel- Gawwad M. ve Fayez M. 1987. Curative properties of true floral and false non-floral honeys on induced gastric ulcers, Journal of Drug Research, 17, 103-106.
- Kang J.S., 2012. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, Dr Jeevan Prasain (Ed.), ISBN: 978-953-51-0141-3, InTech, China.

- Karaçalı İ., 2002. Bahçe Ürünlerinin Muhafazası ve Pazarlanması. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 494.
- Kebler L.F., 1896. Poisonous Honey, Journal of the American Pharmacists Association, 44, 167-174.
- Keys, J.D., 1993. Chinese Herbs. Their Botany, Chemistry, and Pharmacodynamics. Charles E. Tuttle Co. Inc., Tokyo, Japan.
- Khoddami A., Wilkes M.A. ve Roberts T.H., 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, Molecules, 18, 2328-2375
- Kim Y.J., Choi S.E., Lee M.W. ve Lee C.S., 2008. Taxifolin Glycoside Inhibits Dendritic Cell Responses Stimulated by Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60, 1465–1472.
- Kolaylı S. ve Keha E., 1999. A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities in Freshwater and Seawater Adapted Rainbow Trout, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13, 6, 334-337.
- Kurtoğlu S., 1992. Zehirlenmeler, Teşhis ve Tedavi, Kayseri: Erciyes Üniv. Yayınları, 30, 569-570.
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu Ş., Ulusoy E., Baltacı C. ve Candan F., 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, Food Chemistry, 100, 526-534.
- Ladas S.P., Haritos D.N. ve Raptis S.A., 1995. Honey May Have a Laxative Effect on Normal Subjects Because of Incomplete Fructose Absorption, American Journal of Clinical Nutrition, 62, 1212-1215.
- Lama Y.C., Ghimire S.K. ve Aumeeruddy-Thomas Y., 2001. Medicinal Plants of Dolpo. Amchis' Knowledge and Conservation. WWF Nepal Program, Kathmandu, Nepal.
- Lampe K.F., 2009. Rhododendrons, Mountain Laurel, and Mad Honey, Journal of the American Medical Association, 1988, 259.
- Larson-Meyer D.E., Willis K.S., Willis L.M., Austin K.J., Hart A.M., Breton A.B., ve Alexander B.M., 2010. Effect of honey versus sucrose on appetite, appetite-regulating hormones, and postmeal thermogenesis, Journal of the American College of Nutrition, 29, 5, 482-493.
- Li A.-N., Li S., Li H.-B., Xu D.-P., Xu X.-R ve Chen F., 2013. Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of 51 Edible and Wild Flowers, Journal of Functional Foods, 1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.022>.

- Li Q.Y., Chen L., Zhu Y.H., Zhang M., Wang Y.P. ve Wang M.W., 2011. Involvement of Estrogen Receptor- $\beta$  in Ferrerol Inhibition of Rat Thoracic Aorta Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Acta Pharmacologica Sinica, 32, 433–440.
- Linder P., Berman E. ve Gamarnik B., 1996. Characterization of Citrus Honeybee Deuterium NMR, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 139-140.
- Lindsay S., 1987. HPLC Analytical Chemistry by Open Learning, 4th ed., New York: John Wiley & Sons., 54-72.
- Maejima H., Kinoshita E., Seyama I. ve Yamaoka K., 2003. Distinct Sites Regulating Grayanotoxin Binding and Unbinding to D4S6 of Na(v)1.4 Sodium Channel as Revealed by Improved Estimation of Toxin Sensitivity, Journal of Biological Chemistry, 278, 9464-9471.
- Mani T.T., Badami S., Kumar A. ve Suresh B., 2008. Phytopharmacology and Therapeutic Values III, Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Rhododendron arboreum* Sm leaf, Ed. Singh, V.K., Govil, J.N., 395-409. ISBN: 1-9336991-1-6.
- Mantle D. ve Preedy V.R., 1999. Free Radicals as Mediators of Alcoholtoxicity, Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews, 18, 235-252.
- Milne R.I. ve Abbott R.J., 2000. Origin and Evolution of Invasive Naturalized Material of *Rhododendron ponticum* in The British Isles, Molecular Ecology, 9, 541-556.
- Miniati E., 2007. Assessment of Phenolic Compounds in Biological Samples, Phenolics in Biological Samples, 43, 4, 362-368.
- Mulu A., Diro E., Tekleselassie H., Belyhun Y., Anagaw B., Alemayehu M., Gelaw A., Biadlegne F., Desalegn K., Yifiru S., Tiruneh M., Kassu A., Nishikawa T. ve Isogai E., 2010. Effect of Ethiopian Multiflora Honey on Fluconazole-Resistant Candida Species Isolated from the Oral Cavity of AIDS Patients, International Journal of Std and AIDS, 21, 11, 741-745.
- Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I. ve Worobo R.W., 2004. Growht Inhibition of Foodborne Pathogens and Food Spoilage Organisms by Select Raw Honeys, International Journal of Food Microbiology, 97, 1-8.
- Nibbs A.E. ve Scheidt K.A., 2012. Asymmetric Methods for the Synthesis of Flavanones, Chromanones, and Azaflavanones, European Journal of Organic Chemistry, 3, 449–462.
- Nizamoğlu M.N. ve Nas S., 2010. The Phenolic Compounds in Vegetables and Fruit; Structures and Their Importance, Electronic Journal of Food Technologies, 5, 1, 20-35.
- Onat F.Y., Yegen B.C., Lawrence R., Oktay A. ve Oktay S., 2001. Site of Action of Granayotoxins in Mad Honey in Rats, Journal of Applied Toxicology, 11, 199-201.

- Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. ve Khalid A., 2003. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Turkish Medicinal Plants, Journal of Ethnopharmacology, 91, 57–60.
- Oyaizu M., 1986. Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activity of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine, Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- Öztürk, N., Tunçel, M. ve Tunçel, N.B., 2007. Determination of Phenolic Acids by A Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 30, 587-596.
- Pamir F., 1969. Klinik Toksikoloji. Ankara: Ankara Yarı Açık Cezaevi Matbaası, 457-458.
- Paul A., Khan M.L. ve Arunachalam, K., 2005. Biodiversity and Conservation of *Rhododendrons* in Arunachal Pradesh in the Indo-Burma Biodiversity Hotspot, Current Science, 89, 623–634.
- Popoescu R. ve Kopp B. 2013. The genus *Rhododendron*: An ethnopharmacological and toxicological review, Journal of Ethnopharmacology, 147, 42-62.
- Prakash D., Upadhyay G., Singh B.N, Dhakarey R., Kumar S., ve Singh K.K., 2007. Free-Radical Scavenging Activities of Himalayan *Rhododendrons*, Current Science, 92 (4), 526-532.
- Puschner B., Holstege D.M. ve Lamberski N., 2001. Grayanotoksin Poisoning in Three Goats, Journal of the American Veterinary Medical Association, 218, 573-575.
- Rafiq M., Sancheti S.S., Sancheti S.A., Kim H.R., You Y.H. ve Seo, S.Y., 2013. Antihyperglycemic and Antioxidant Activities of *Rhododendron schlippenbachii* maxim. Bark and Its Various Fractions, Journal of Medicinal Plants Research, 7, 12, 713-719.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsiteng P. ve Glover W., 1999. Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Processes in Fruits, Food Chemistry, 66, 401-436.
- Saldamlı İ., 2007. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492.
- Santos-Buelga C., Gonzalez-Manzano S., Dueñas M. ve Gonzalez-Paramas A.M., 2012. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds, Natural Products Isolation, Eds. Sarker S.D. ve Nahar L., 864, 427-464. ISBN: 978-1-61779-623-4.
- Saral Ö., 2013. Apiterapik Arı Ürünlerinin (Bal, Polen, Propolis ve Arı Sütü) Biyoaktif Özellikleri ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Schwartz J.C., Wade A.P., Enke C.G. ve Cooks, R.G., 1990. Systematic Delineation of Scan Modes in Multidimensional Mass Spectrometry, Analytical Chemistry, 62, 17, 1809-1818.
- Shahidi F. ve Naczki M., 1995. Food Phenolics, Technomic Publishing Company Book, Lancaster, USA, 199-225.
- Silici S., Sagdic O. ve Ekici L. 2010. Total Phenolic Content, Antiradical, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rhododendron* Honeys, Food Chemistry, 121, 1, 238-243.
- Silici S., Sarioglu K., Dogan M. ve Karaman K., 2013. HPLC-DAD Analysis to Identify Phenolic Profile of *Rhododendron* Honeys Collected from Different Regions in Turkey, International Journal of Food Properties, Accept Paper. DOI:10.1080/10942912.2012.698441.
- 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.
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Skoog D.A., Holler F.H. ve Crouch S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thompson Brooks, California, USA, 17-21.
- Subrahmanyam M. 1991. Topical Application of Honey in the Treatment of Burns, British Journal of Surgery, 78, 497-498.
- Sütlüpmar N. ve Mat A., 1993. Poisoning by Toxic Honey in Turkey, Archives of Toxicology, 67, 148-50.
- Stevens P.F., 1978. *Rhododendron* L. In: Davis PF, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh University Press, 90-94.
- Syazana M.S.N., Halim A.S., Gan S.H. ve Shamsuddin S. 2011. Antiproliferative Effect of Methanolic Extraction of Tualang Honey on Human Keloid Fibroblasts, BMC Complementary and Alternative Medicine, 11, 82.
- Tallent W.H., Riethof M.L. ve Horning E.C., 1957. Studies on the Occurrence and Acetylandromedol (Andromedotoxin), Journal of the American Chemical Society, 79, 4548-4554.

- Tang W. ve Eisenbrand G., 1992. Chinese Drug of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Tasdemir D., Brun R., Perozzo R. ve Donmez A.A., 2005. Evaluation of Antiprotozoal and Plasmodial Enoyl-ACP Reductase Inhibition Potential of Turkish Medicinal Plants, Phytotherapy Research, 19, 162–166.
- Terai T., Osakabe K., Katai M., Sakaguchi K., Narama I., Matsuura T, Katakawa J., ve Tetsumi T., 2003. Preparation of 9-Hydroxy Grayanotoxin Derivatives and Their Acute Toxicity in Mice, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 51, 351-353.
- Terzioğlu S., Merev N. ve Anşin R., 2001. A study on Turkish *Rhododendron* L. (Ericaceae), Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25, 311-317.
- Tezcan F., Kolayli S., Sahin H., Ulusoy E. ve Erim F.B., 2011. Evaluation of organic acid, carbohydrate composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys, Journal of Food and Nutrition Research, 50, 33–40.
- Tutkun E., 1993. “Deli bal nedir ve nasıl oluşmaktadır?”, Teknik Arıcılık, 42, 20-22.
- Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği, (Tebliđ No: 2012/58).
- Ulusoy E., 2012. Honey and Apiteraphy, Bee Science, 12, 3, 89-97.
- Usta A., Yayli B., Kahrinman N., Karaoglu S.A. ve Yayli N., 2012. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from the Fower of *Rhododendron luteum* Sweet, Asian Journal of Chemistry, 24, 1927–1930.
- Var I., Kabak B. ve Özkarslı M., 2004. Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2, 11, 1-11.
- Viccellio P., 1993. Systemic Poisonous Plant Intoxication, Handbook of Medical Toxicology, Washington: Library of Congress Cataloging, 718.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Troncoso A.M. ve Garcia-Parrilla M.C., 2004. The Antioxidant Activity of Wines Determined By the ABTS<sup>•+</sup> Method: Influence of Sample Dilution and Time, Talanta, 64, 501-509.
- Weston, R.J., Brocklebank, L.K. ve Lu, Y., 2000. Identification and Quantitative Levels of Antibacterial Components of Some New Zealand Honeys, Food Chemistry, 70, 427-435.
- White J.W., 1979. A Comprehensive Survey, Heinemann, London, 157–158.
- Wu Z.Y. ve Li R.T., 2011. Chemical Constituents of The Roots of *Rhododendron spiciferum*. Natural Product Research and Development, 23, 253–257

Yaylacı S., Ösken A., Olt S., Temiz T., Tamer A. ve Gündüz H., 2011. Mad Honey Poisoning Accompanied by Hypotension and Bradycardia, Sakarya Medical Journal, 2, 73-75.

Yılmaz O, Eser M, Sahiner A, Altıntop L. ve Yesildag O., 2006. Hypotension, Bradycardia and Syncope Caused by Honey Poisoning, Resuscitatio, 68, 3, 405-408.

Young I.S. ve Woodside J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical Pathology, 54, 3, 176-186.

[www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php](http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php).  
26 Eylül 2013.

[www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/huray-islekel.pdf](http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/huray-islekel.pdf). 26 Eylül 2013.

[www.waters.com/waters/en\\_TR/CommonIonization/nav.htm?cid=10073251&locale=en\\_TR](http://www.waters.com/waters/en_TR/CommonIonization/nav.htm?cid=10073251&locale=en_TR).  
26 Eylül 2013.

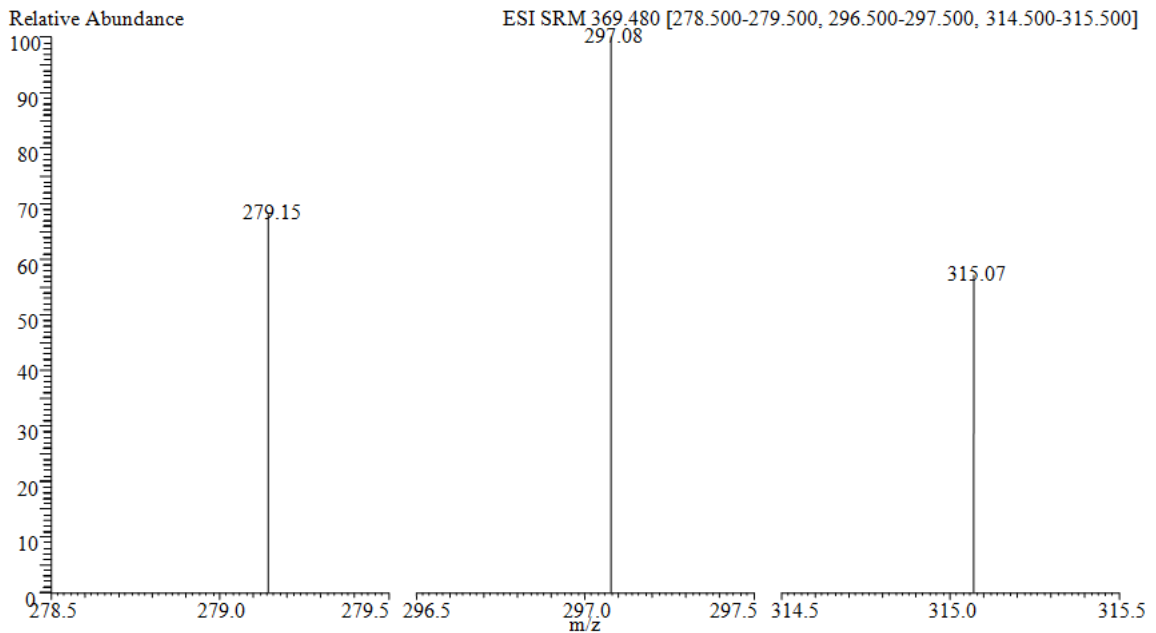
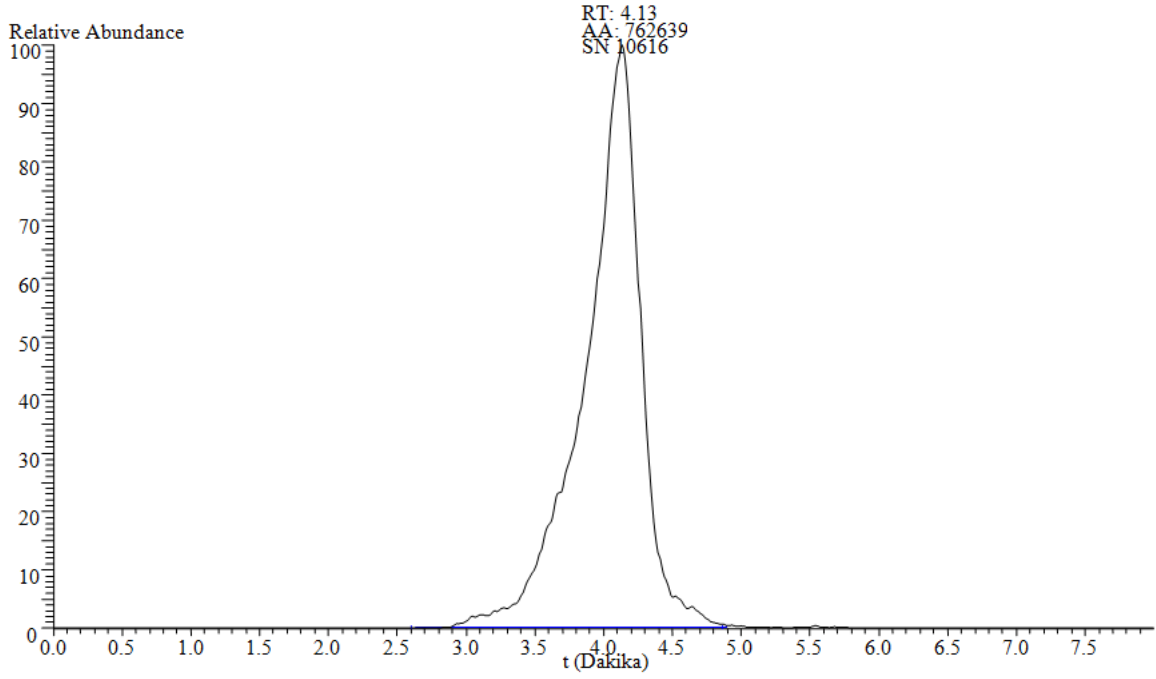
Zhou J., Xie G. ve Yan X., 2011. Encyclopedia of Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications Traditional Chinese Medicines, vols. 5, 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.



## 7. EKLER

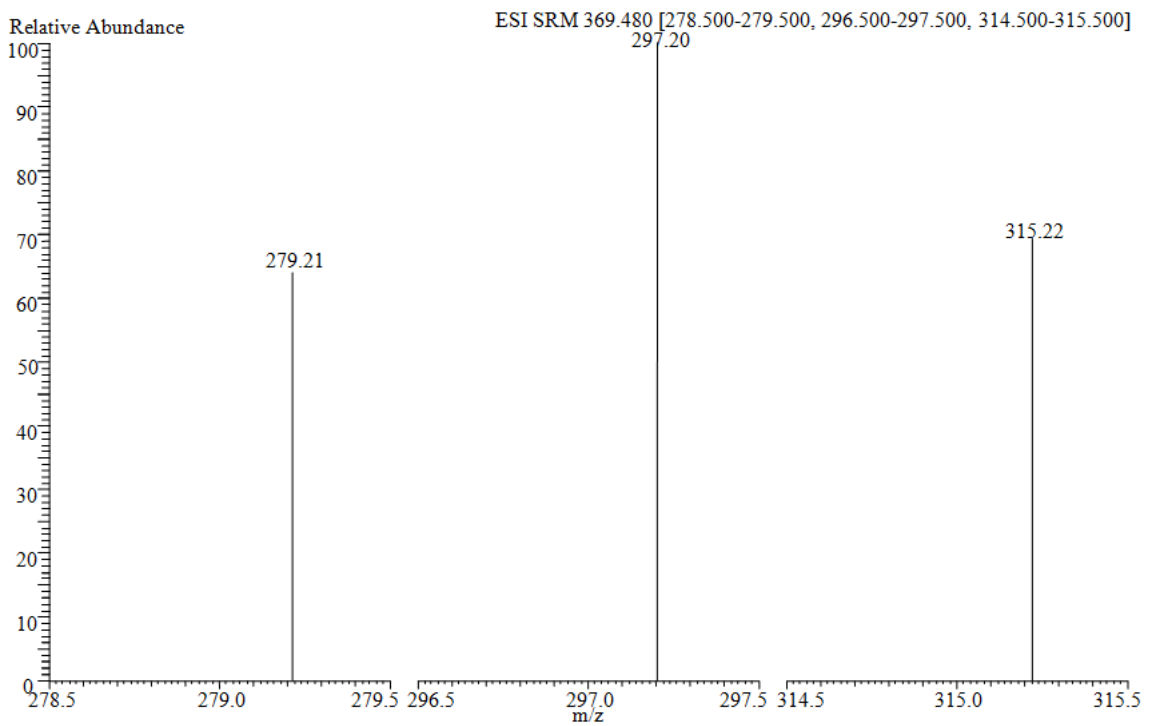
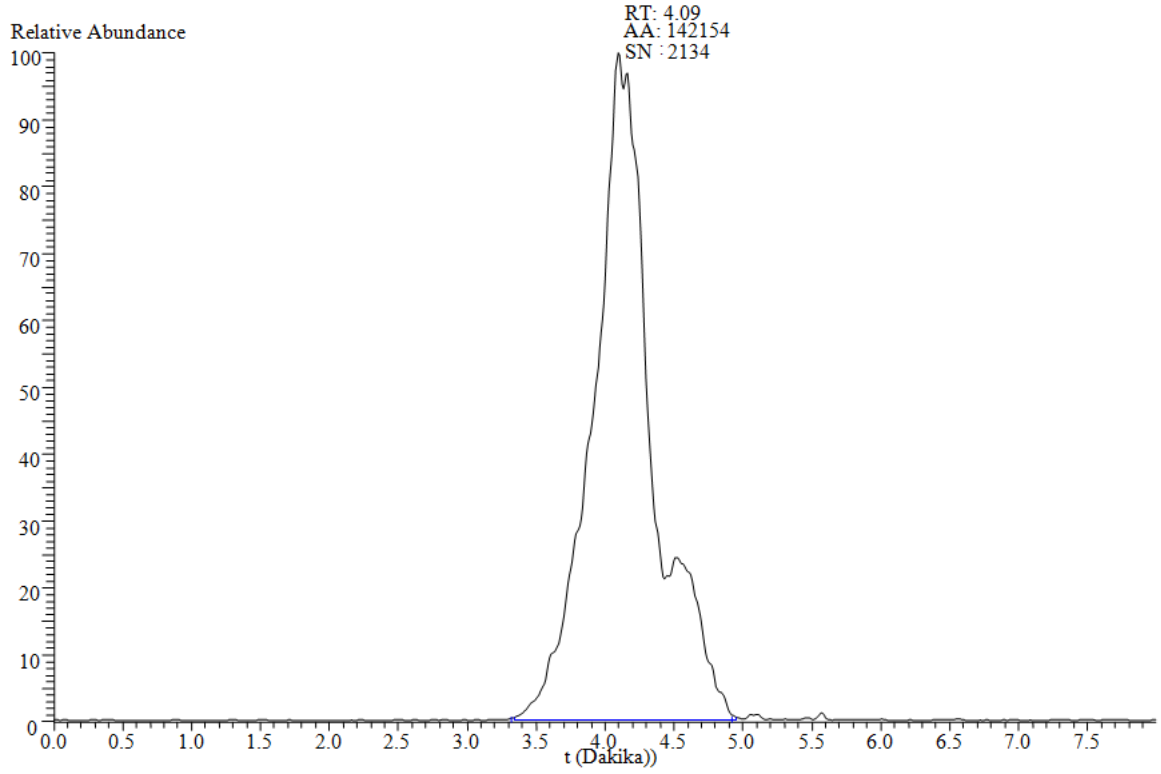
### Ek 1. Bal Örneklerinden Bazılarının GTX-III Kromatogramları

- **DB1**

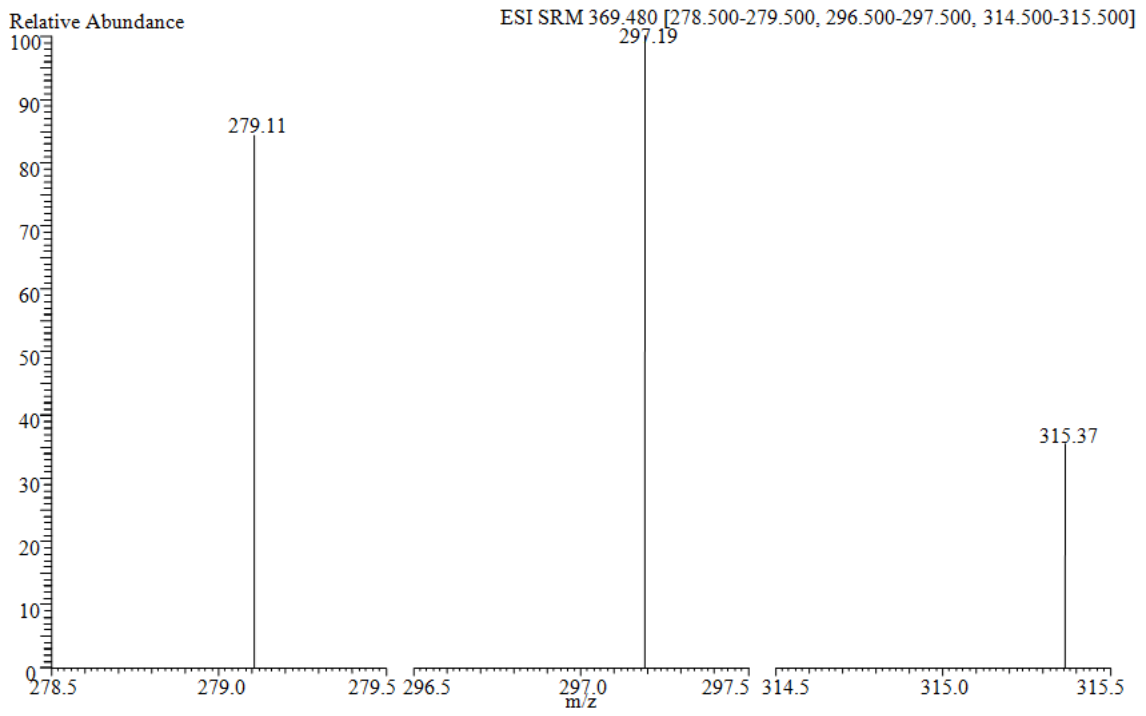
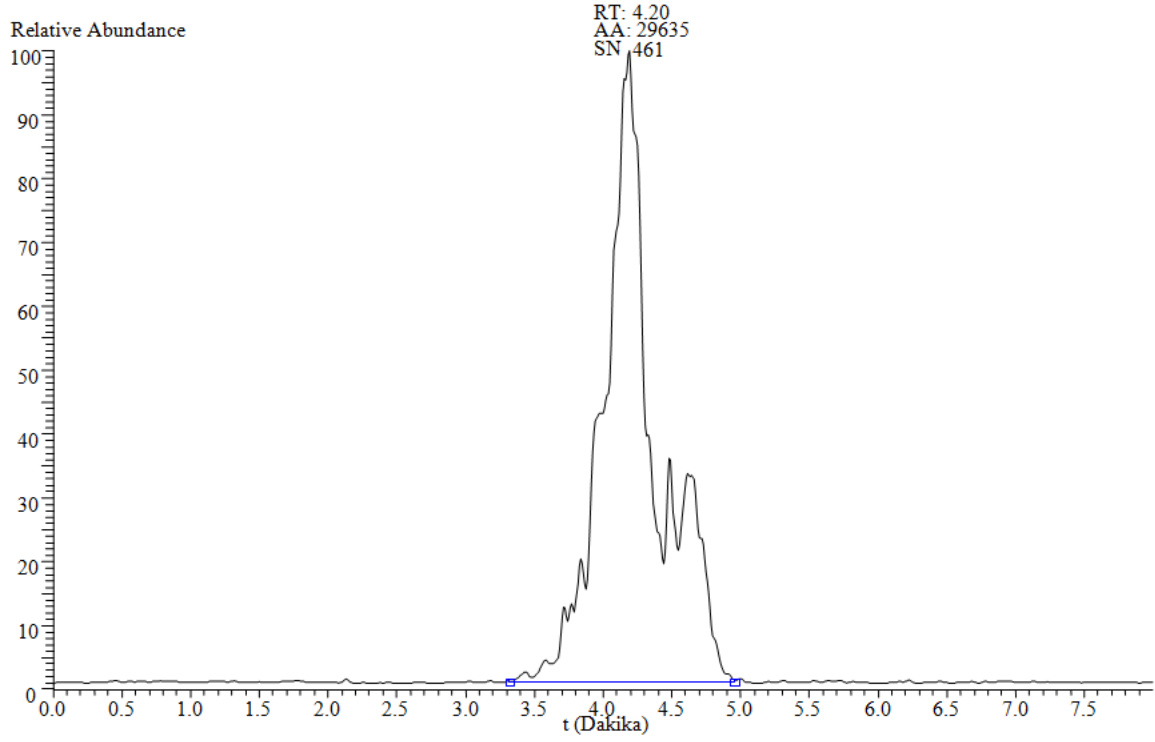


Ek 1'in devamı

- **DB4**

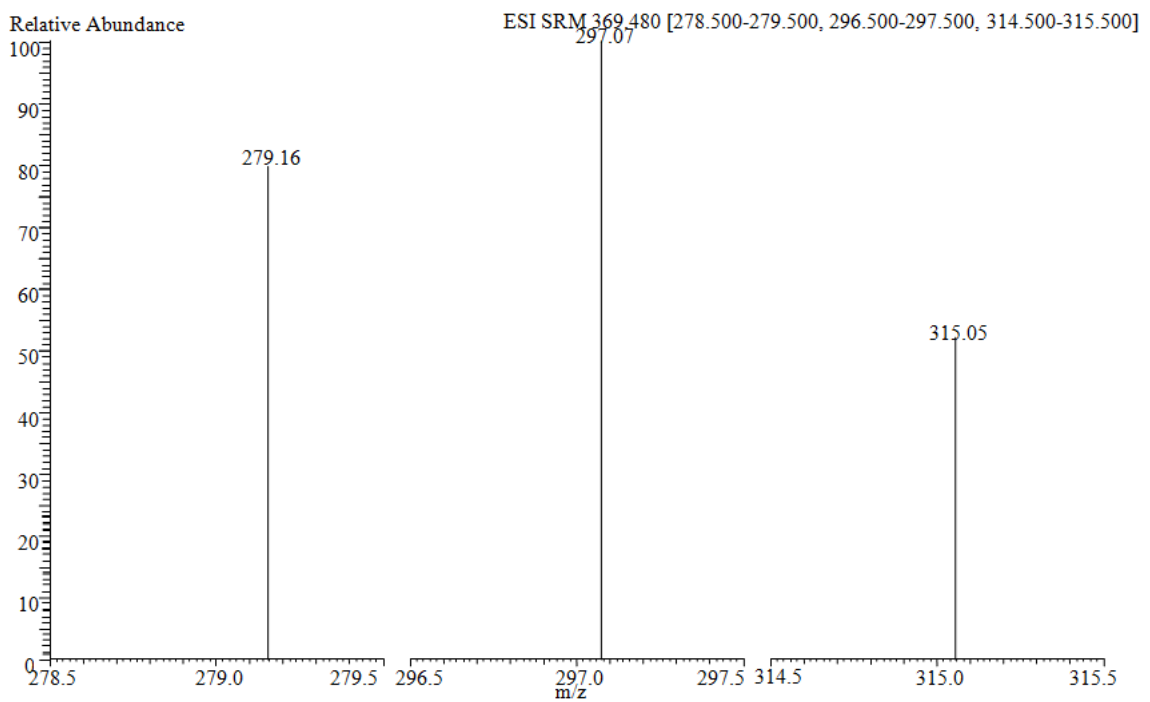
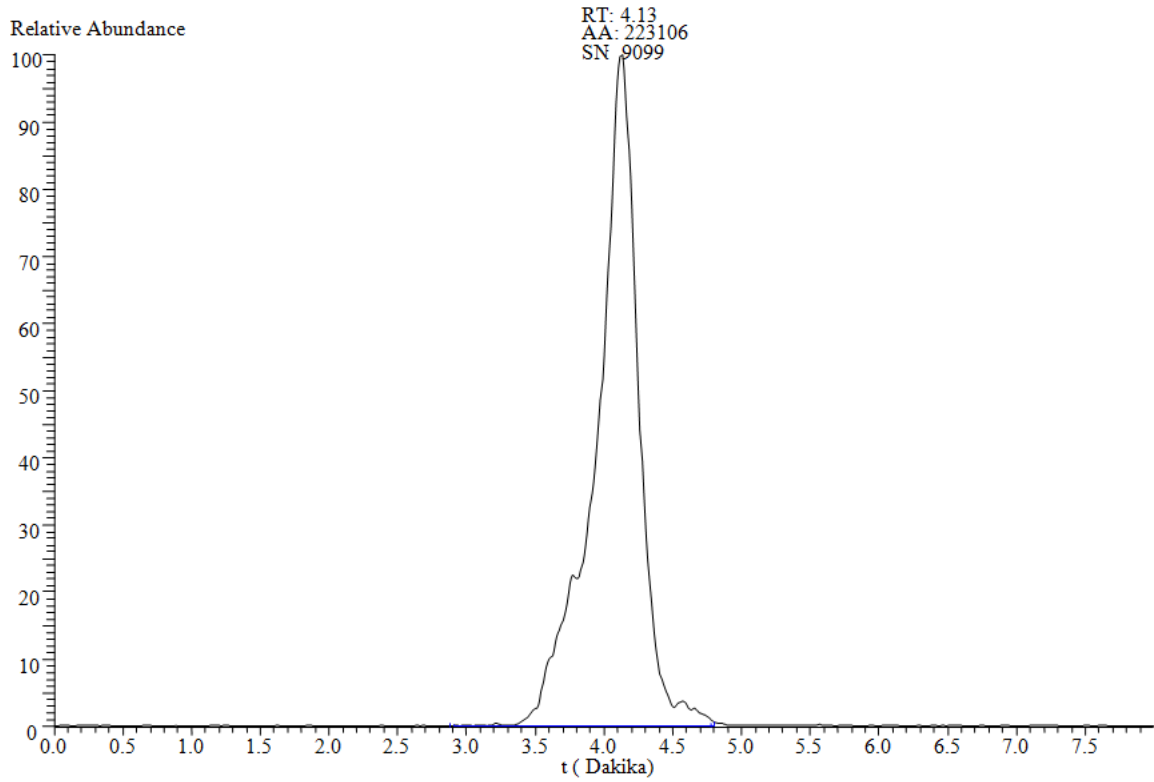


Ek 1'in devamı

• **DB13**

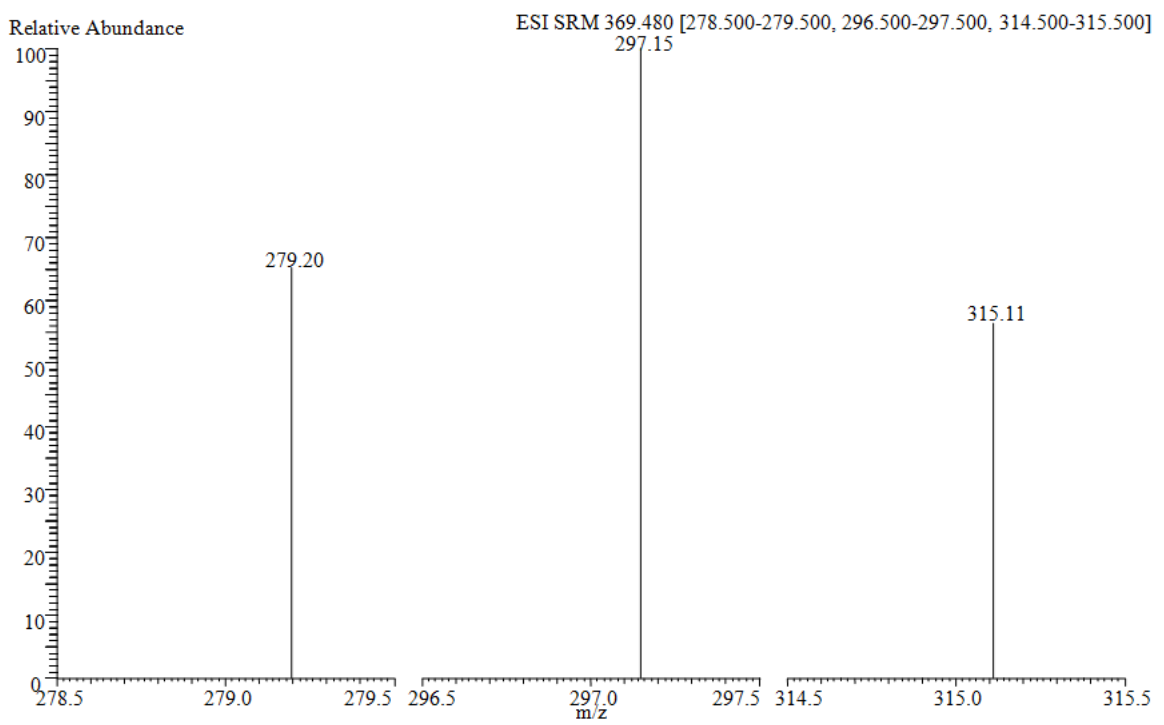
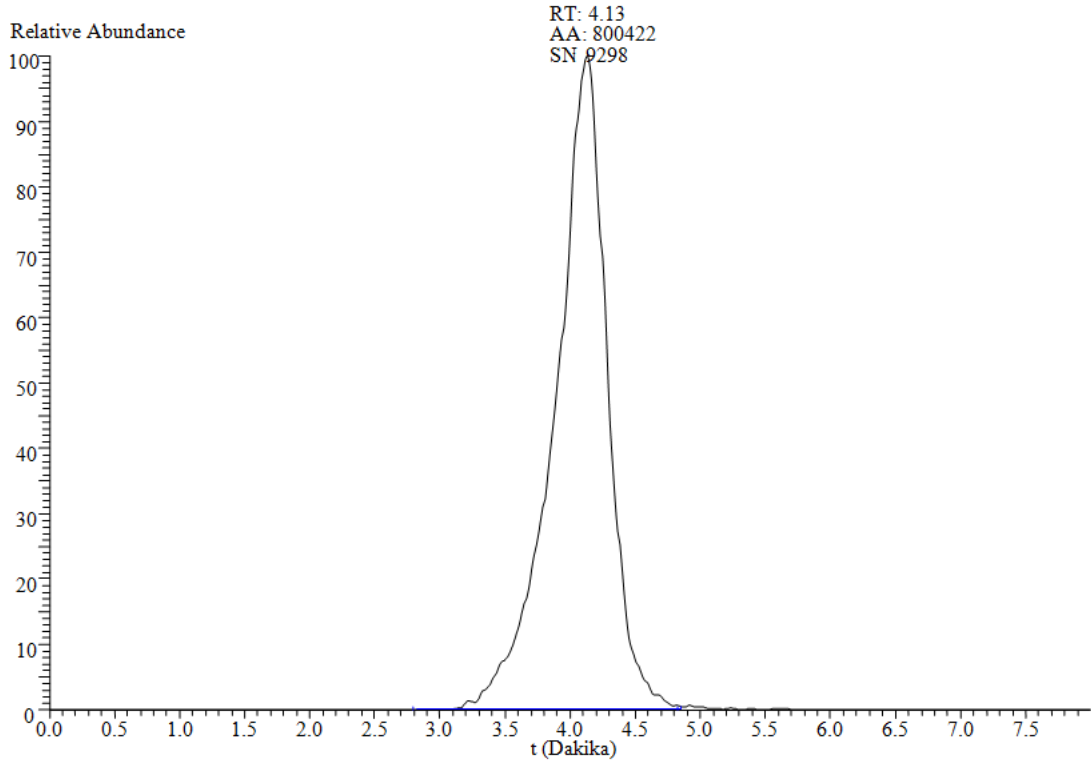
Ek 1'in devamı

- **DB22**



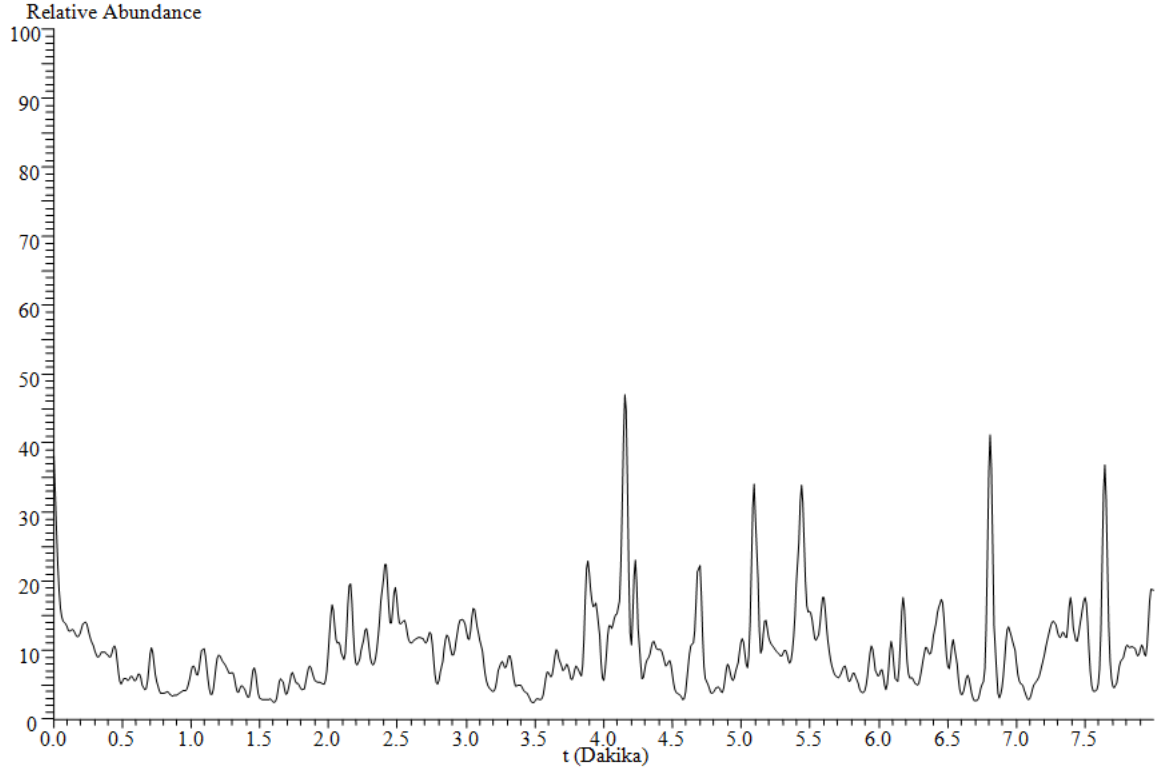
Ek 1'in devamı

- **DB25**



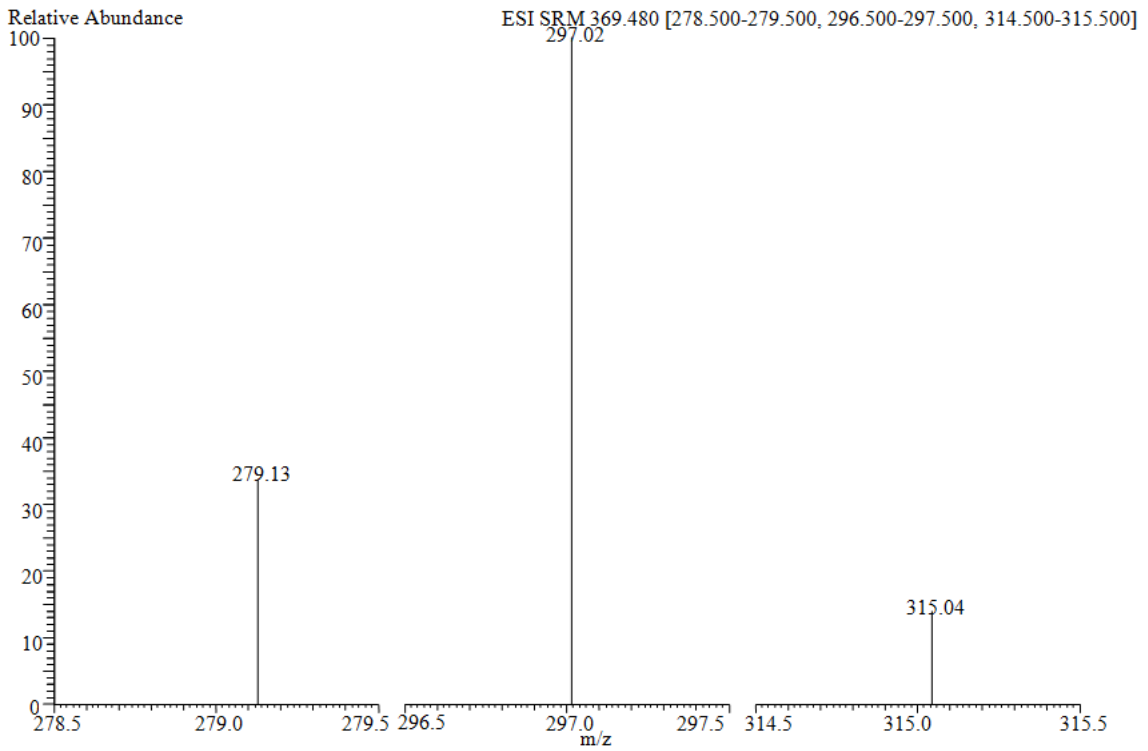
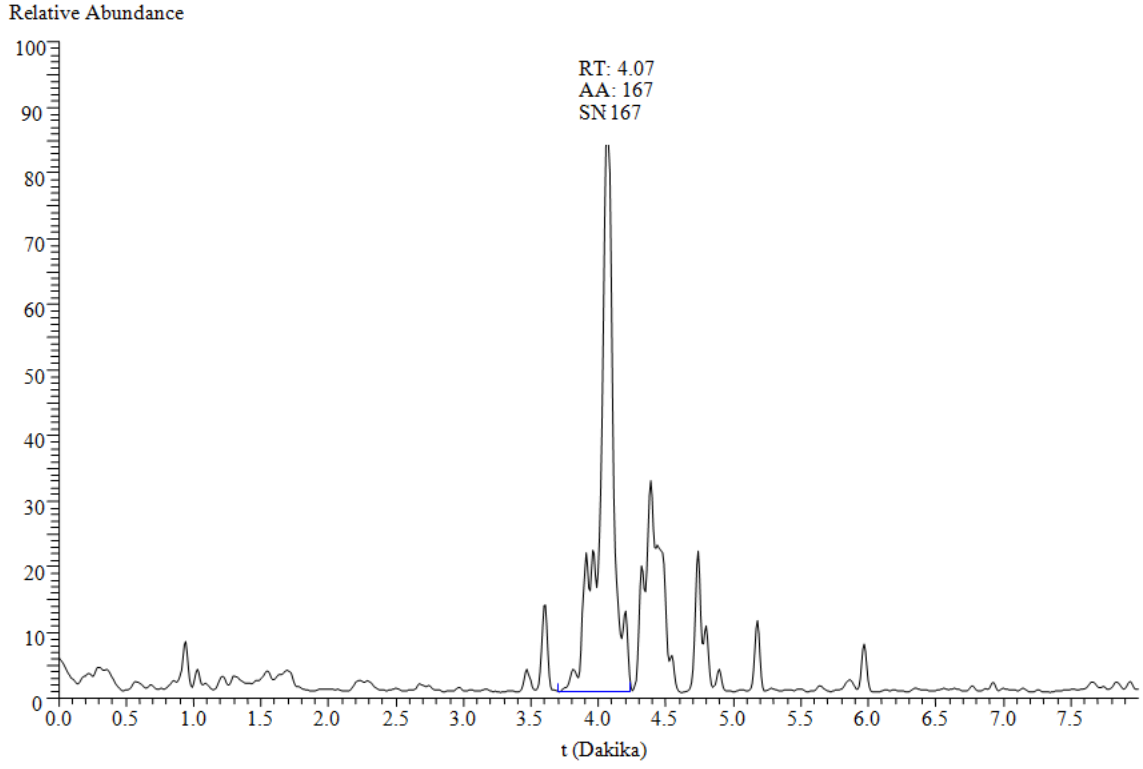
Ek 1'in devamı

- **KB1**



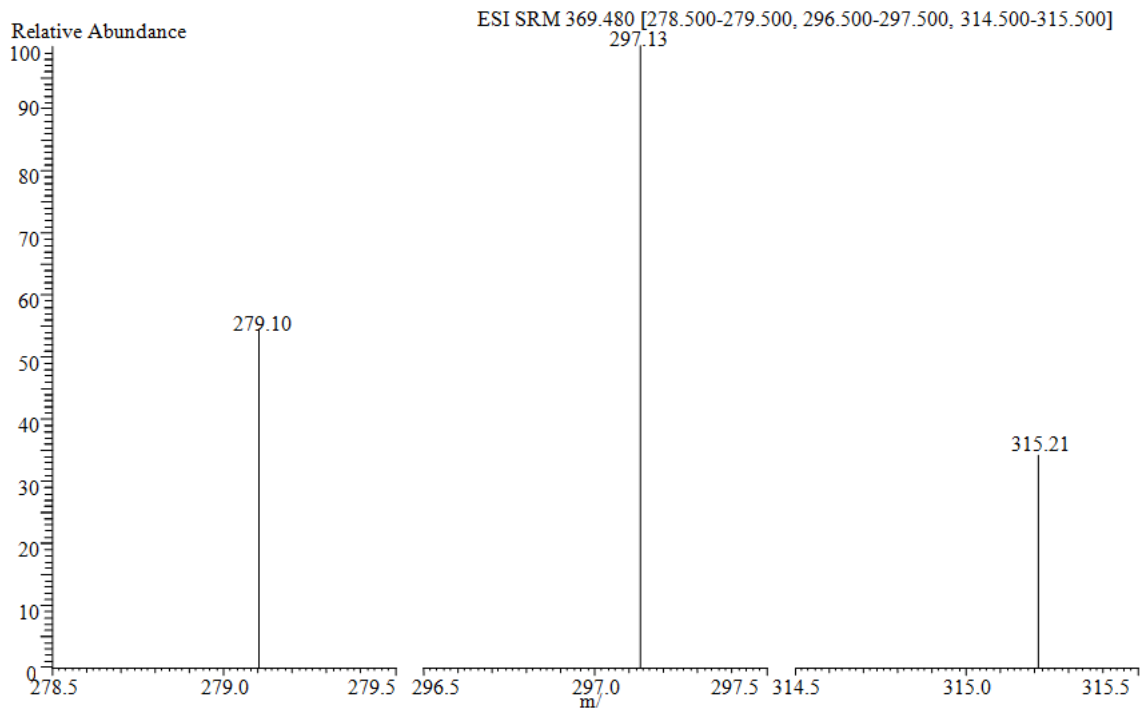
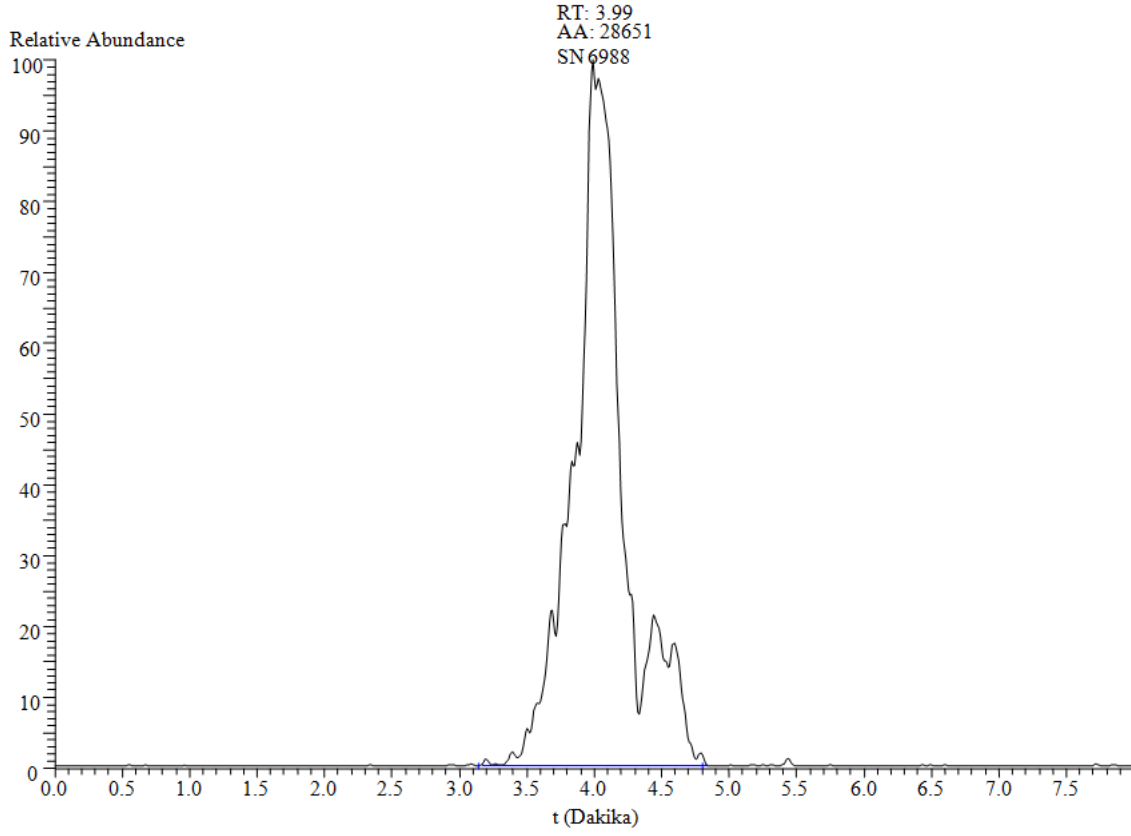
## Ek 2. Bitki Örneklerinden Bazılarının GTX-III Kromatogramları

- ŞaMÇ-Şalpazarı Mor Çiçek



Ek 2'in devamı

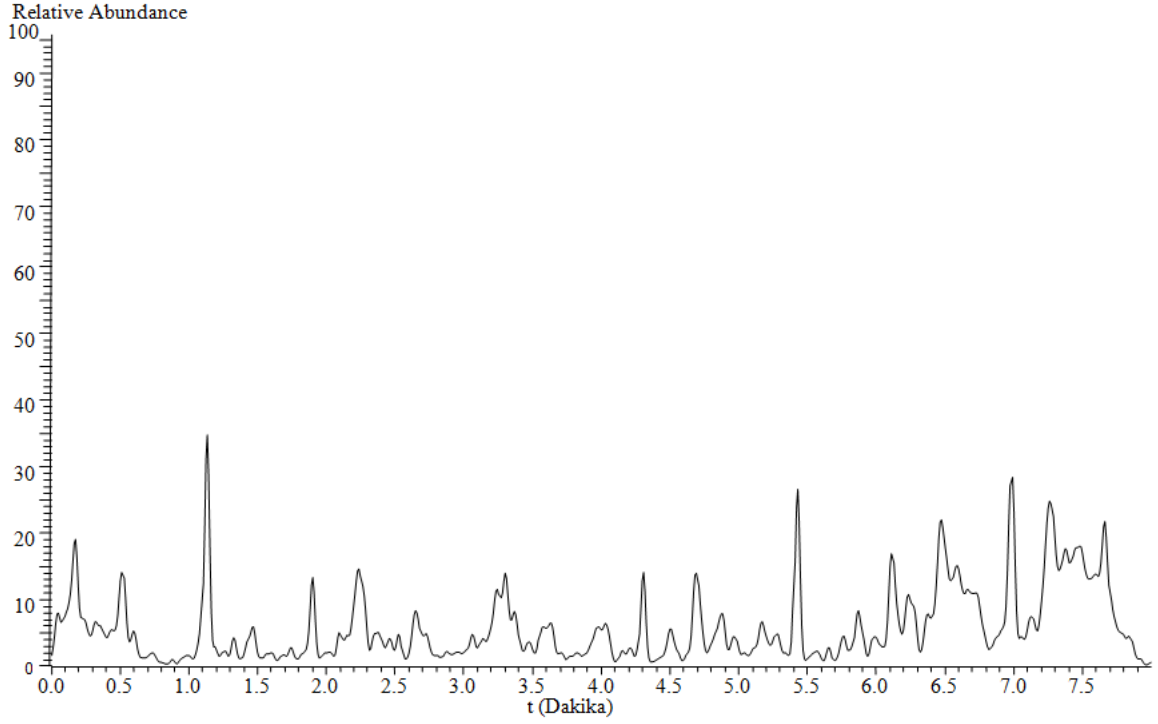
- **ŞaMY-Şalpazarı Mor Yaprak**



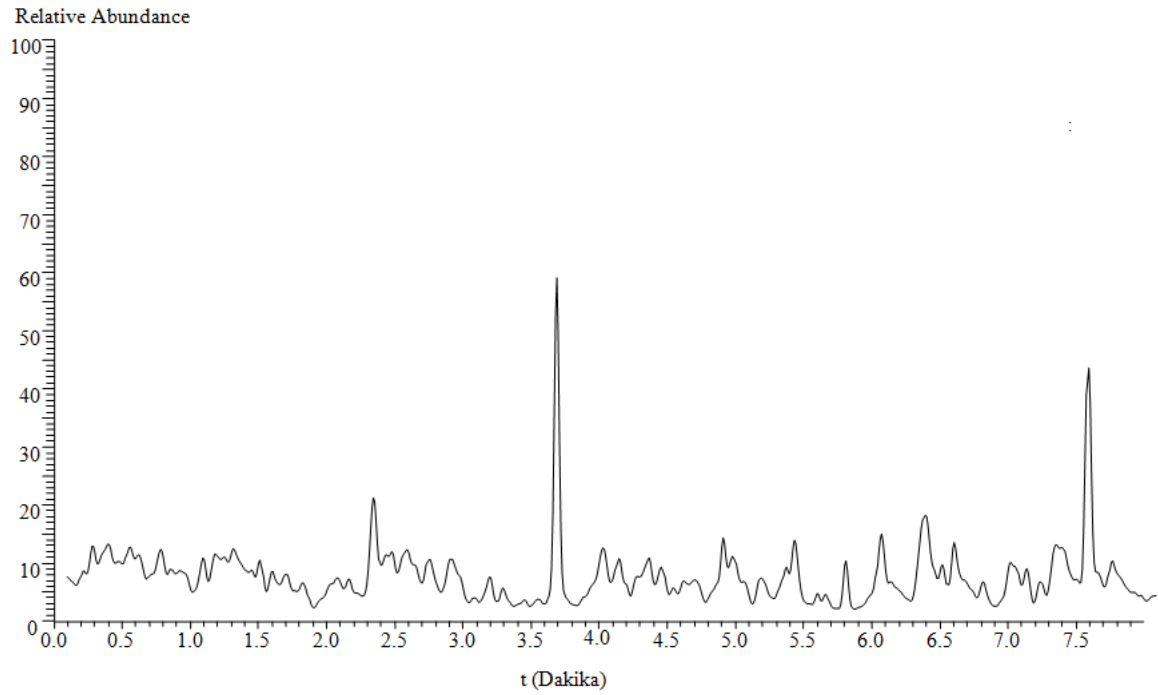


Ek 2'in devamı

- **OMÇ-Ordu Mor Çiçek**

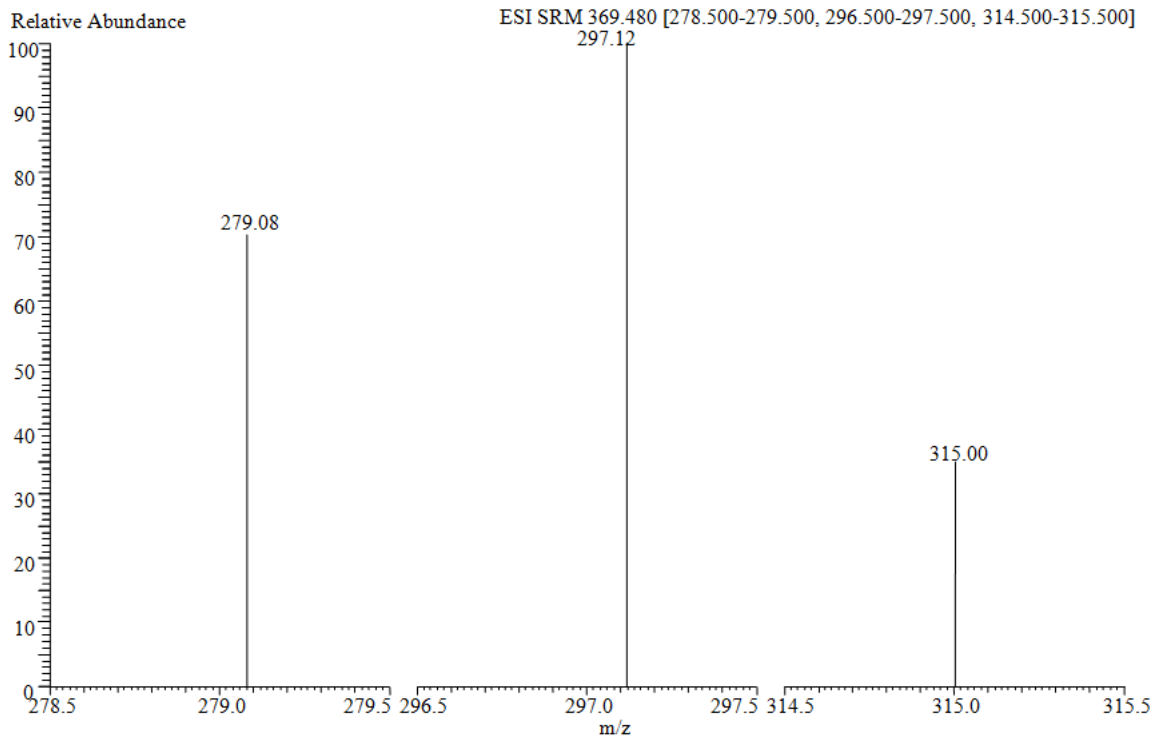
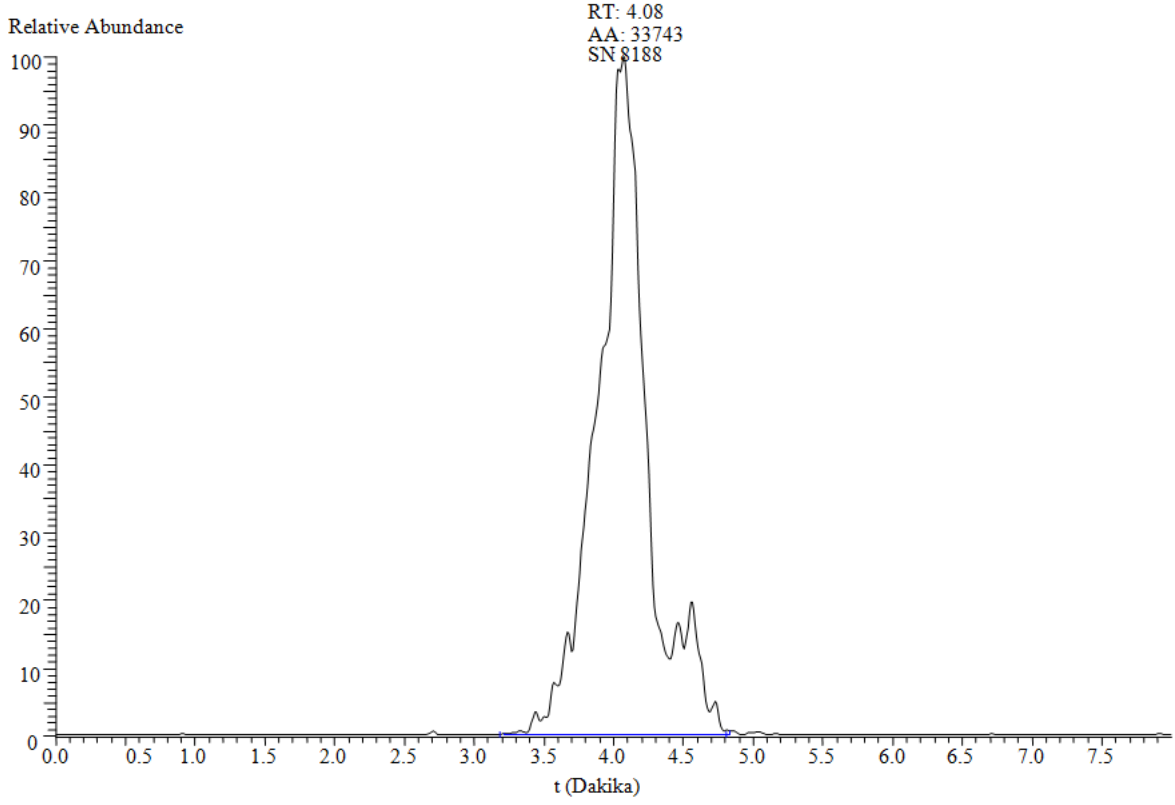


- **OMY-Ordu Mor Yaprak**



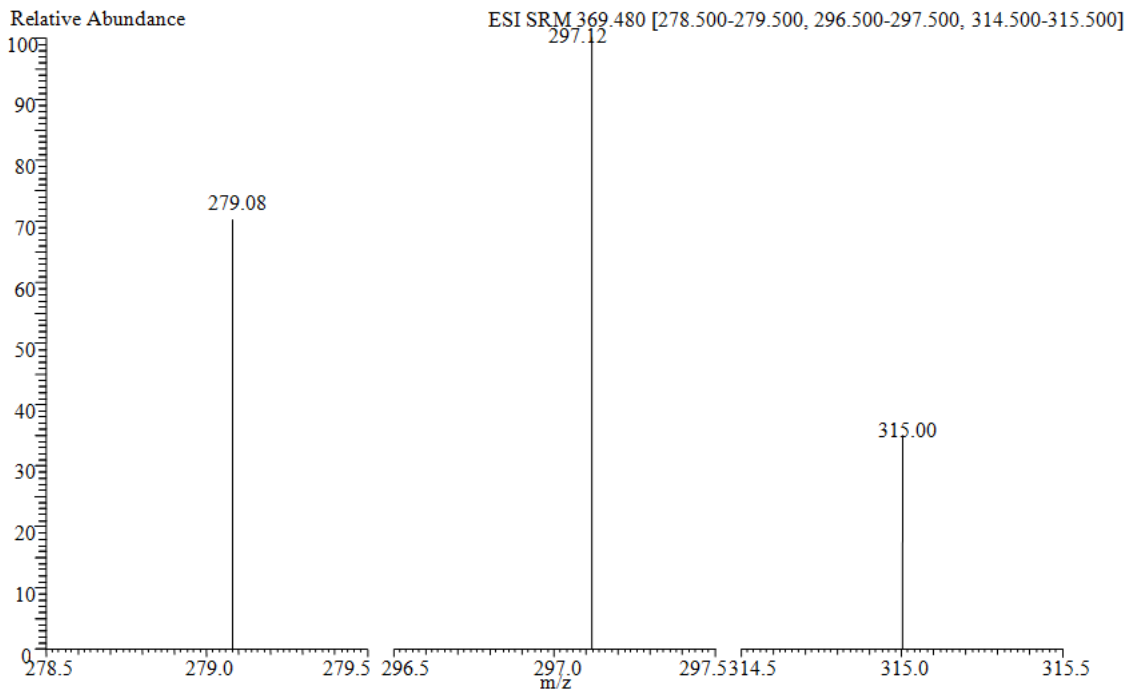
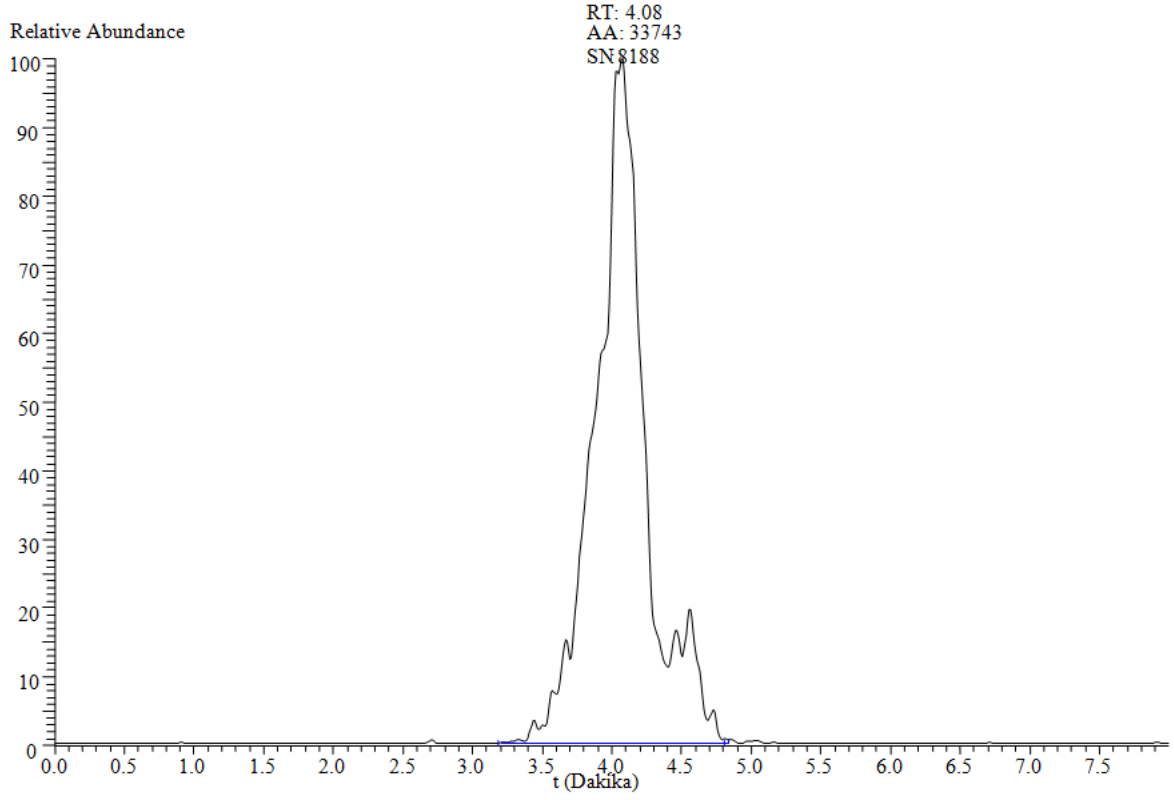
Ek 2'in devamı

- AMÇ-Artvin Mor Çiçek



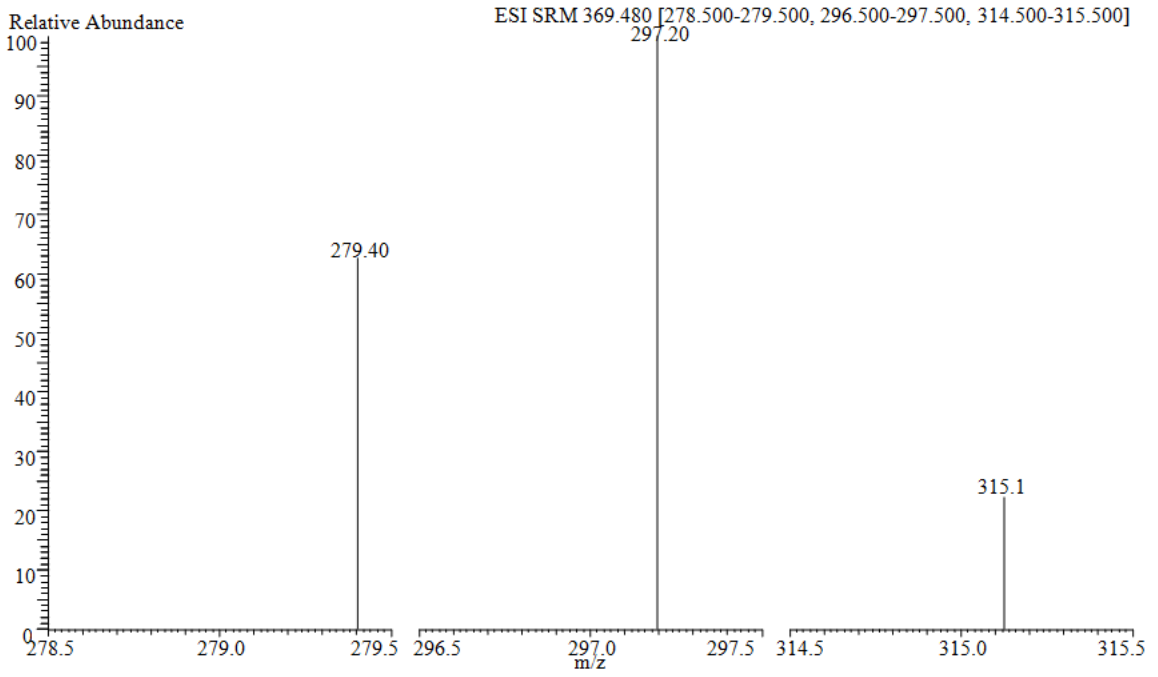
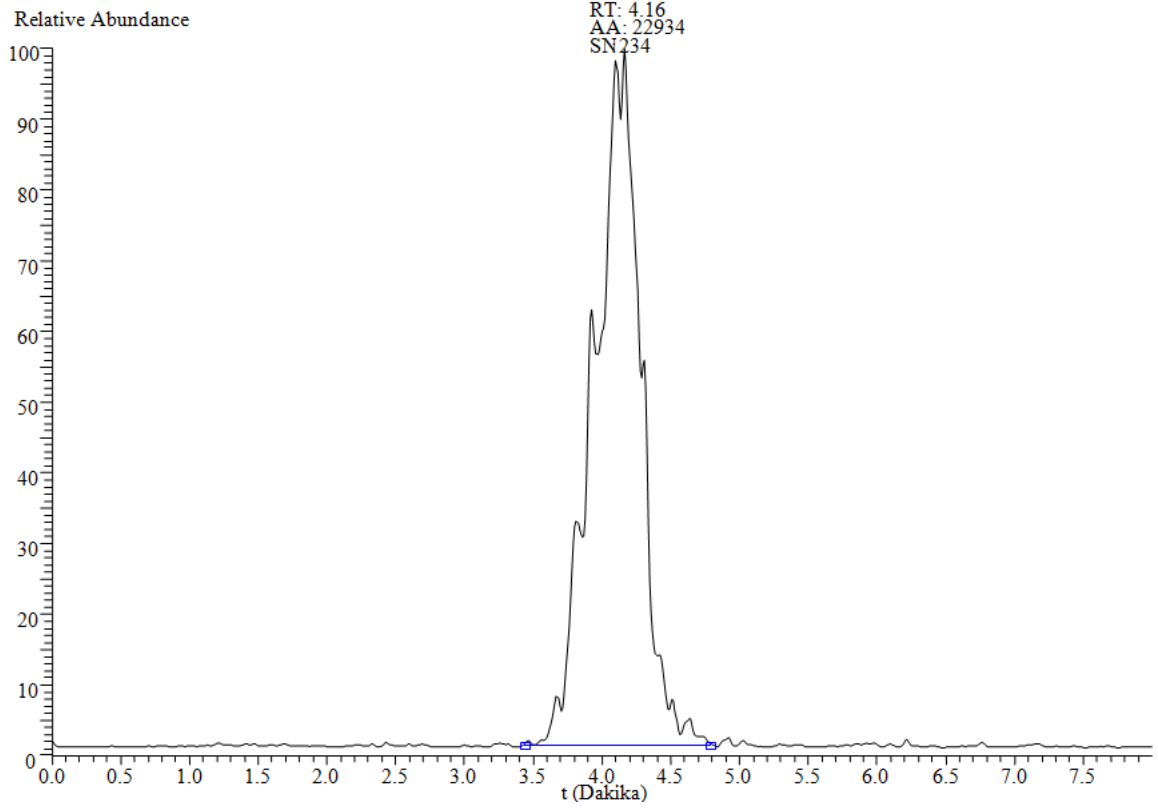
Ek 2'in devamı

- **AMY-Artvin Mor Yaprak**



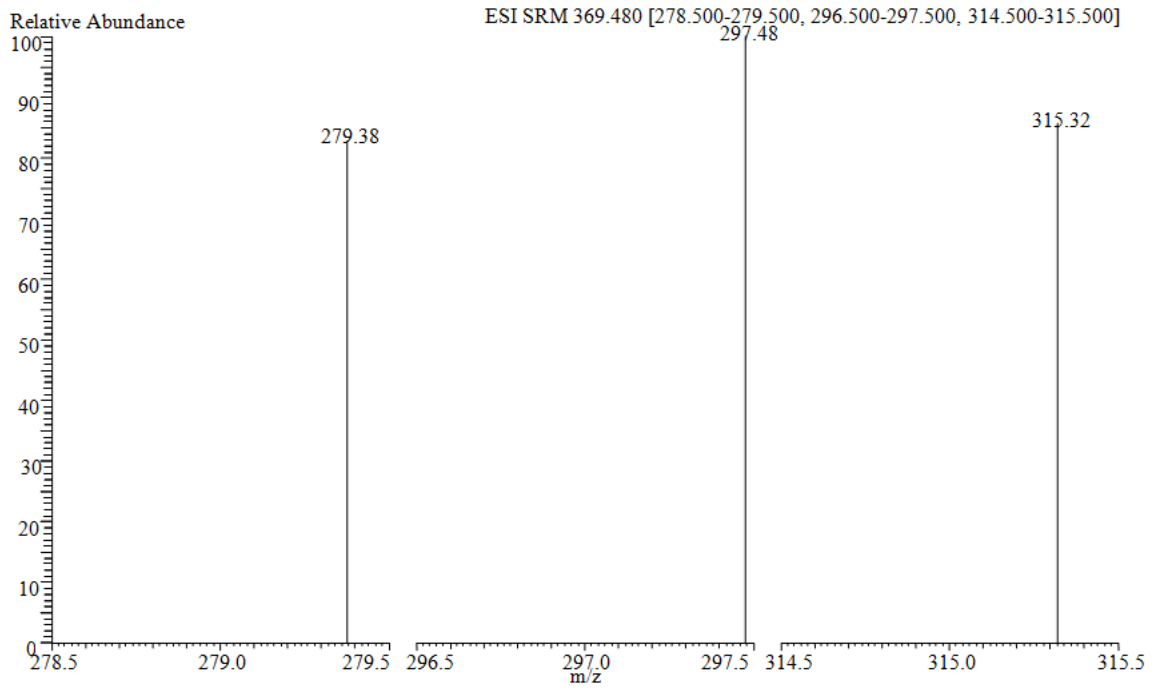
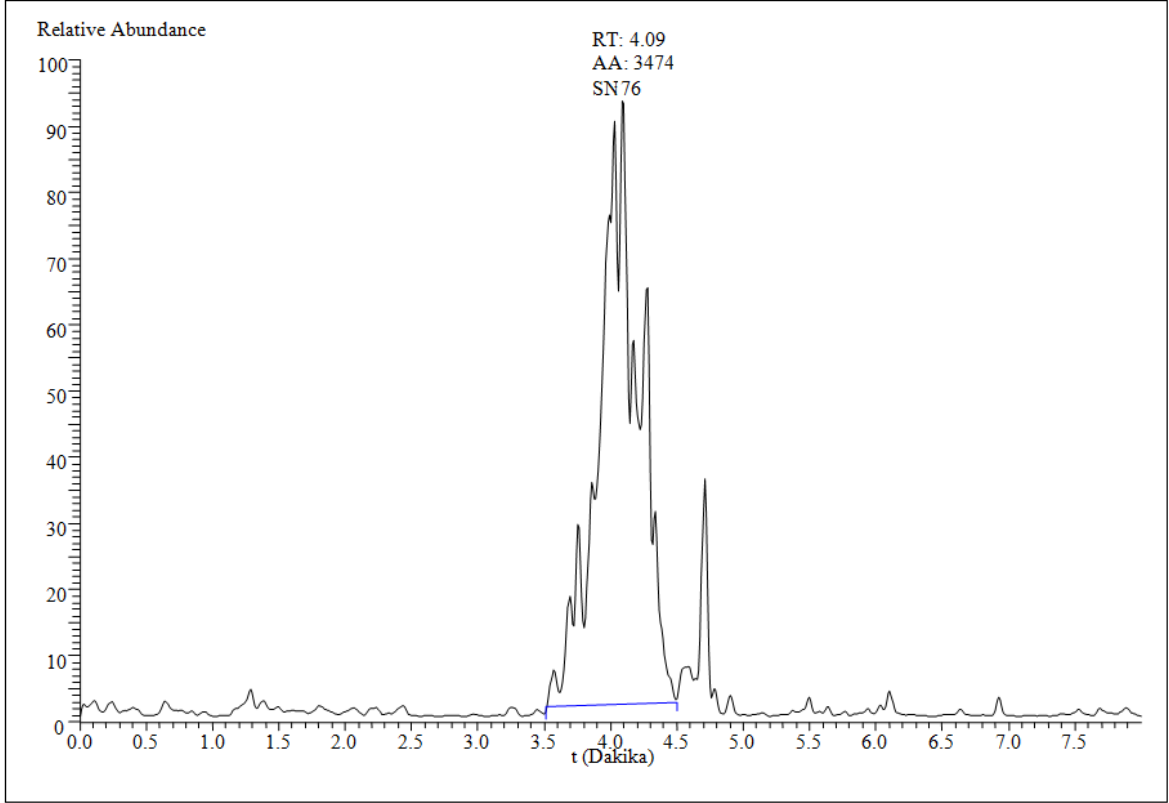
Ek 2'in devamı

- MaŞÇ-Maçka Sarı Çiçek



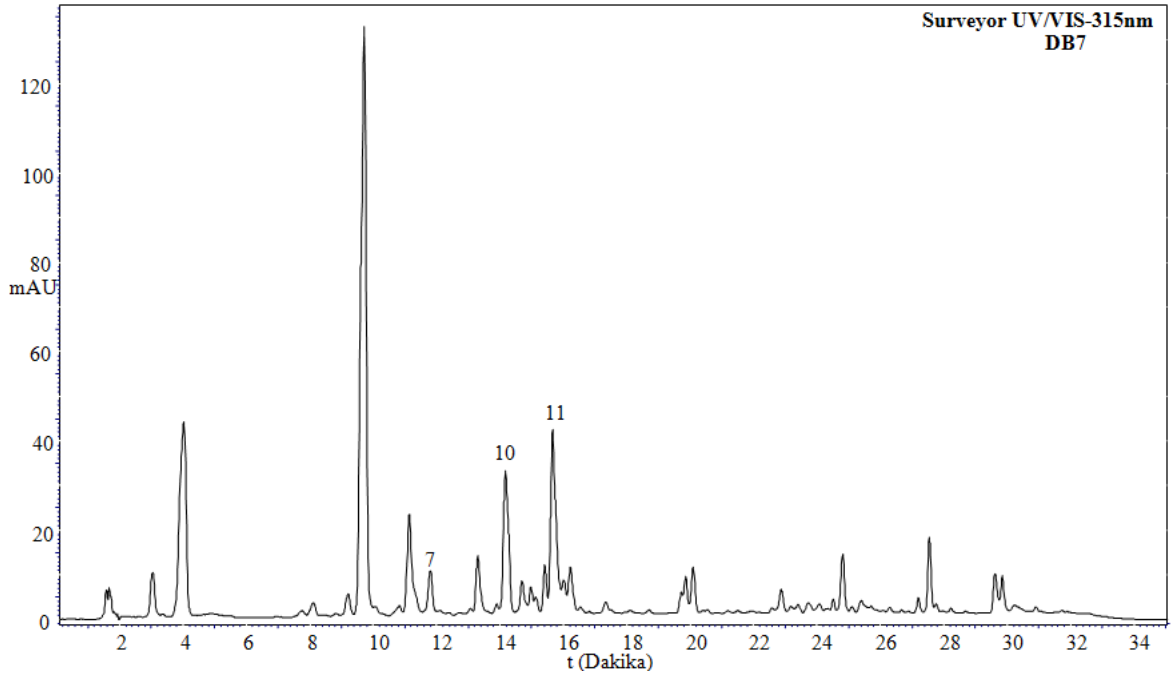
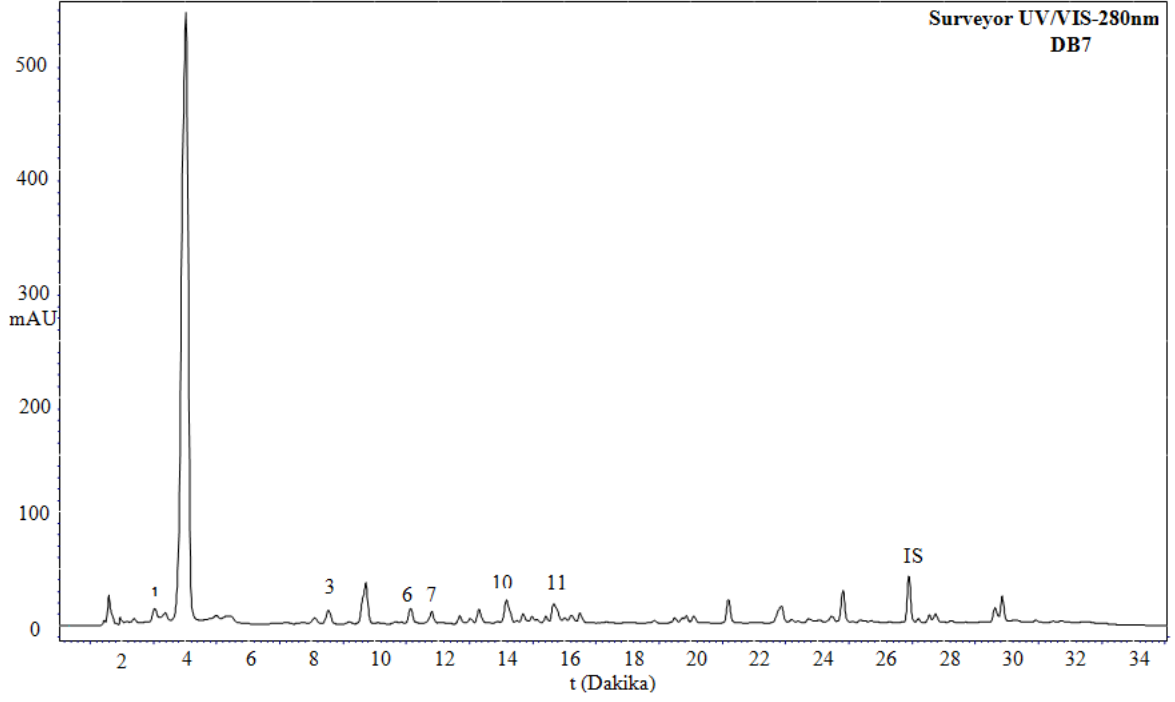
Ek 2'in devamı

- **MaSY-Maçka Sarı Yaprak**



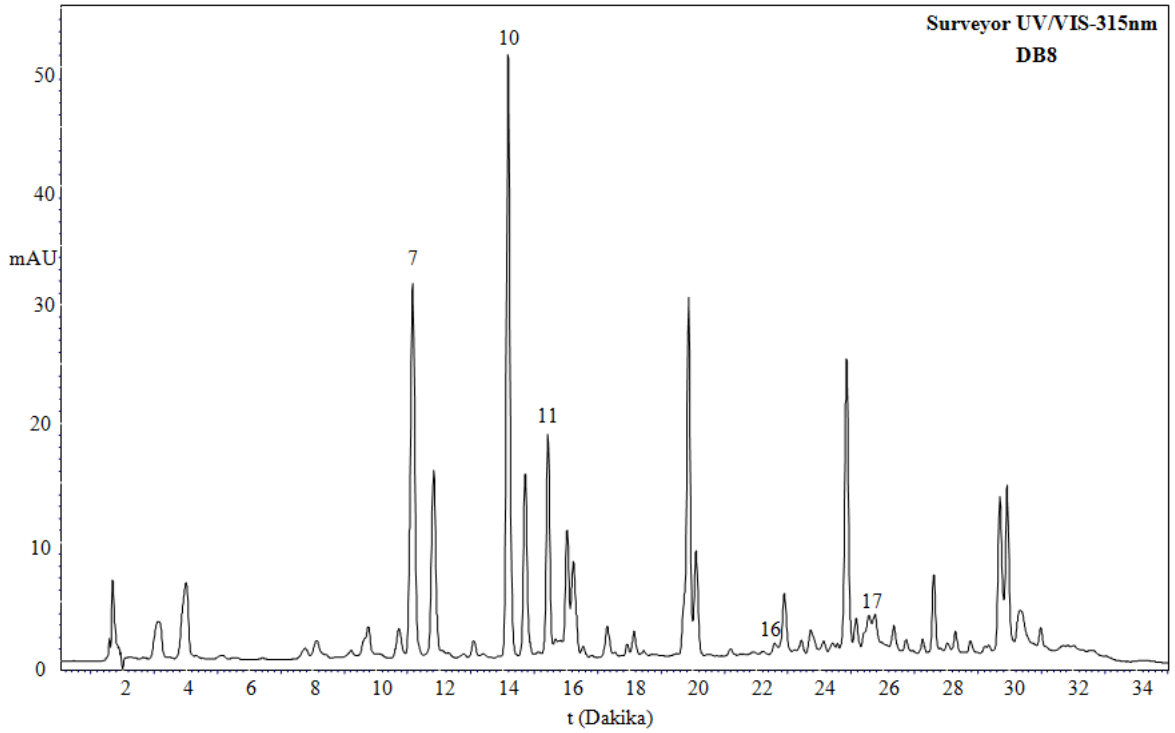
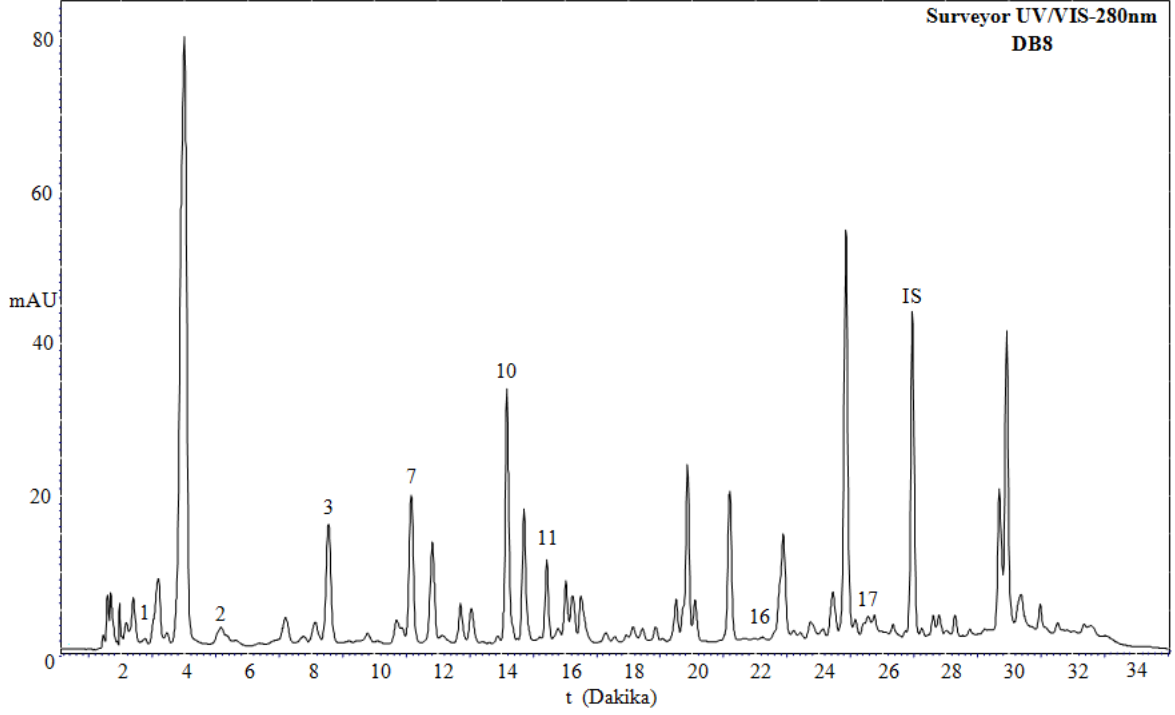
### Ek 3. Bazı Bal Örneklerinin HPLC-UV Kromatogramları

- **DB7**

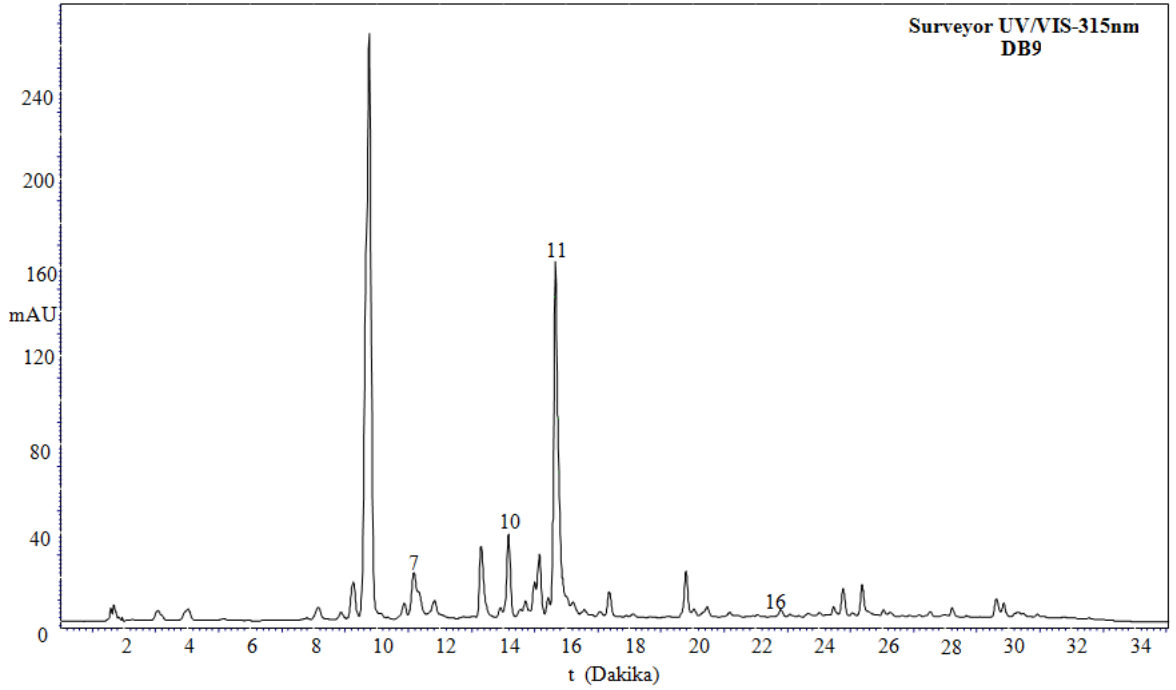
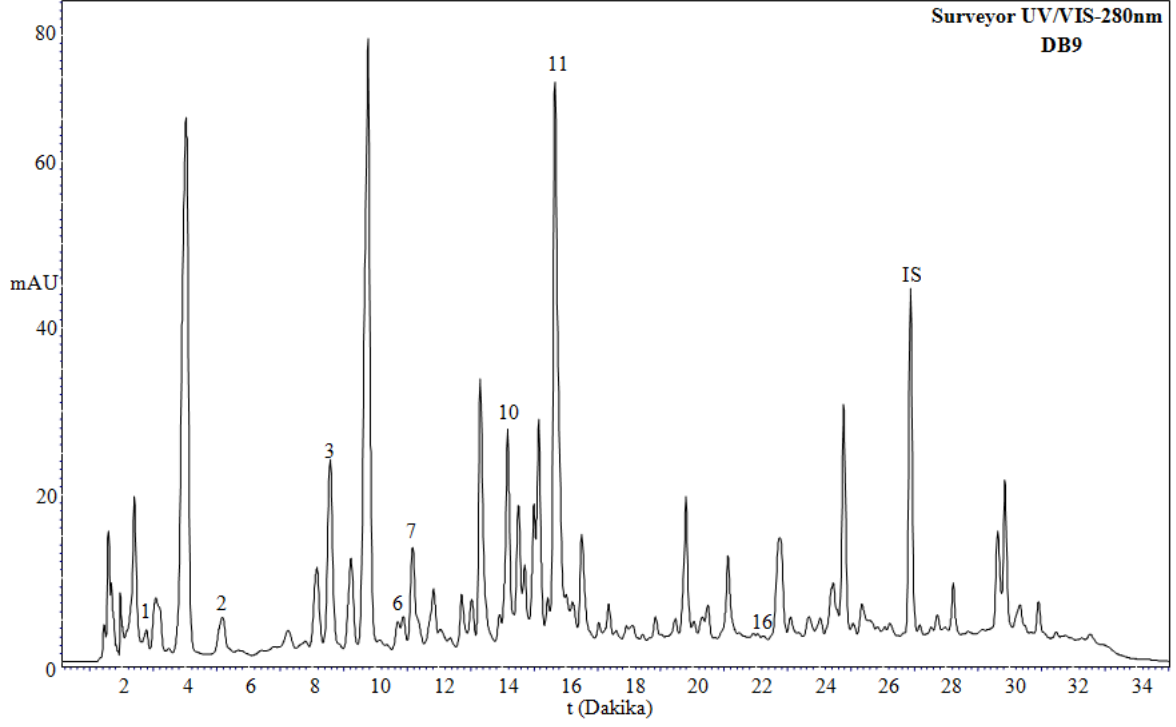


Ek 3'ün devamı

- **DB8**



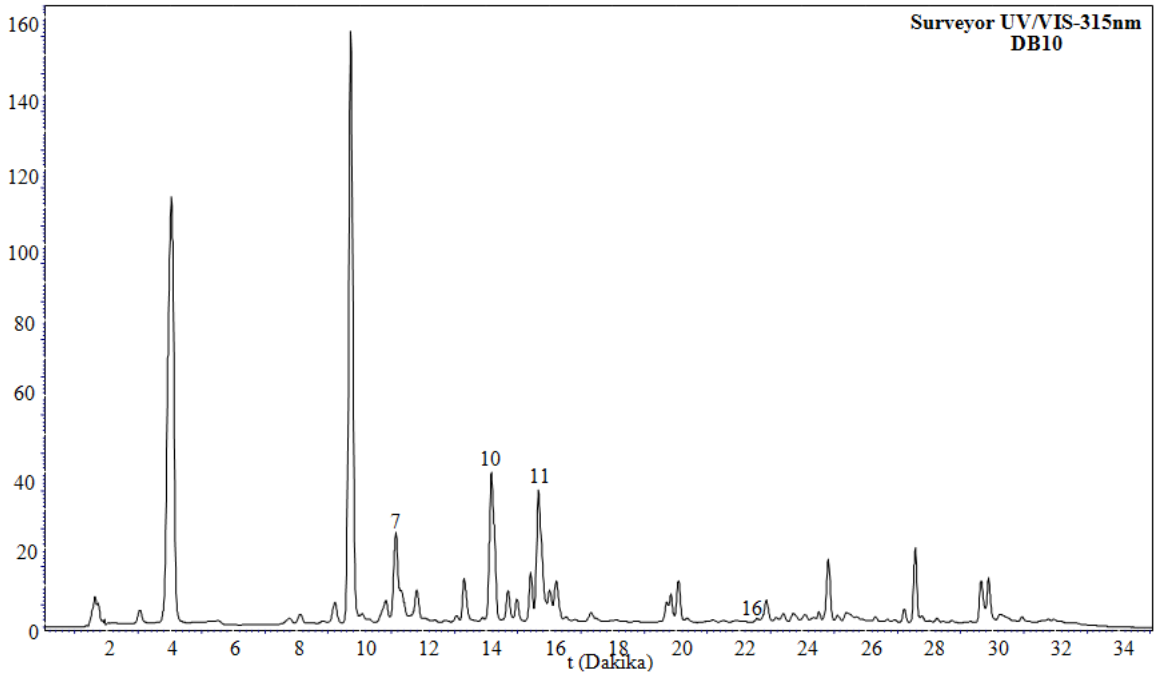
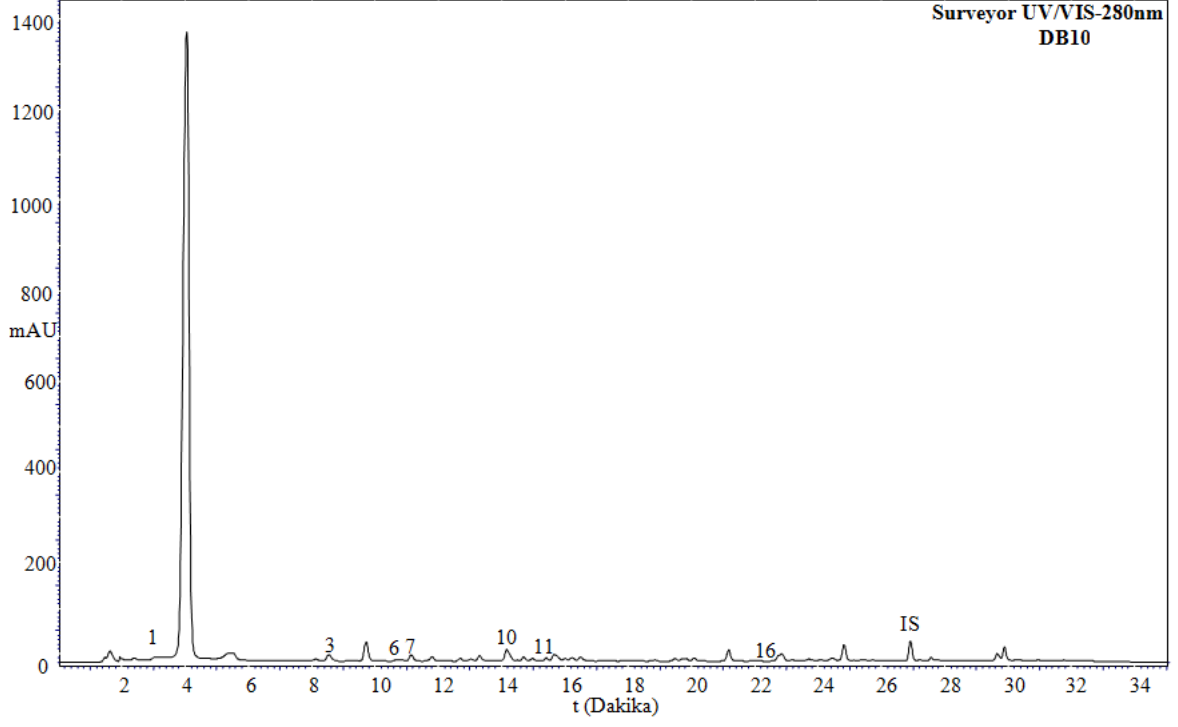
Ek 3'ün devamı

• **DB9**

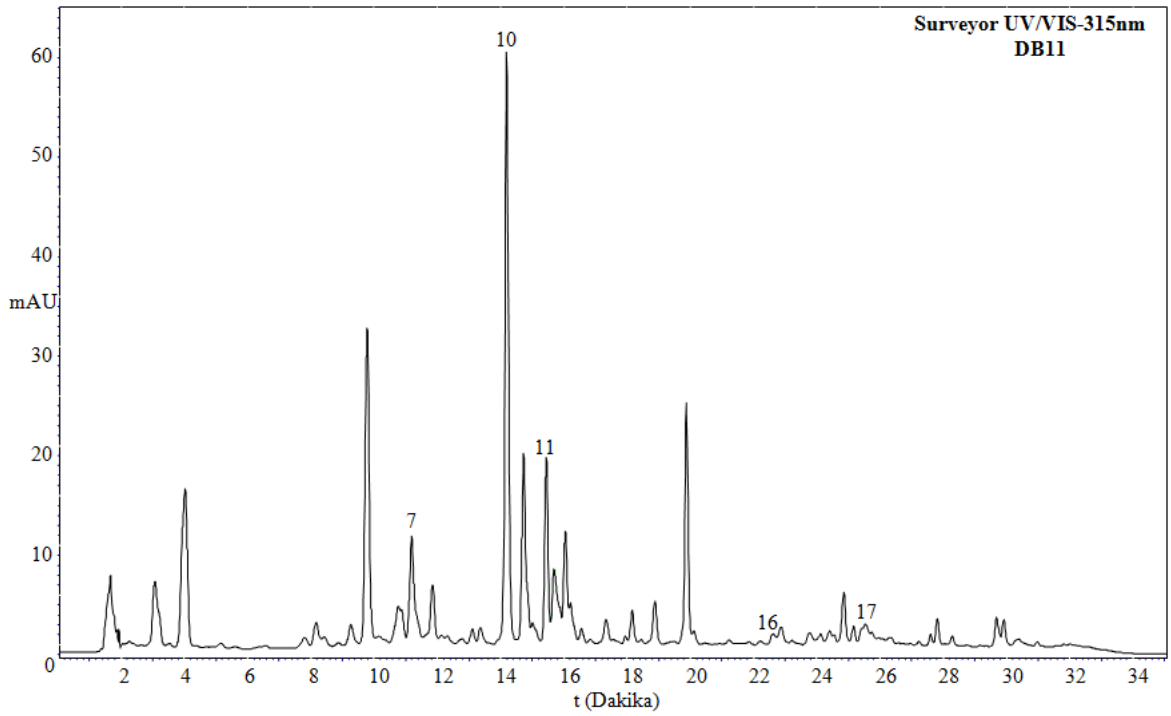
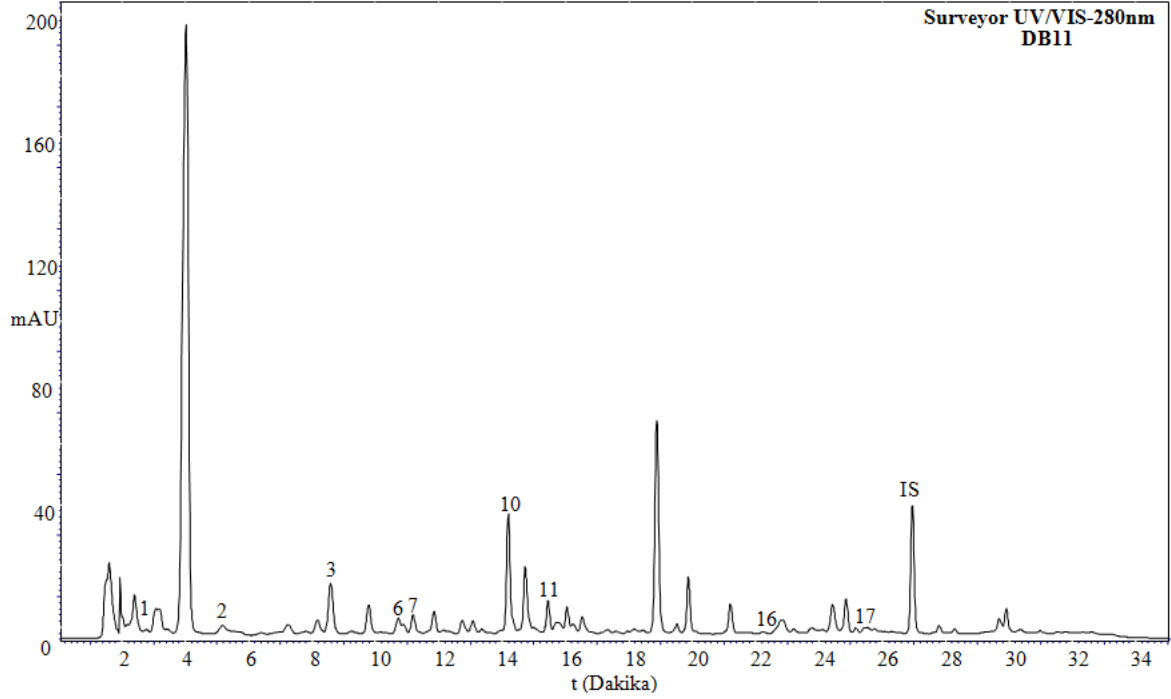


Ek 3'ün devamı

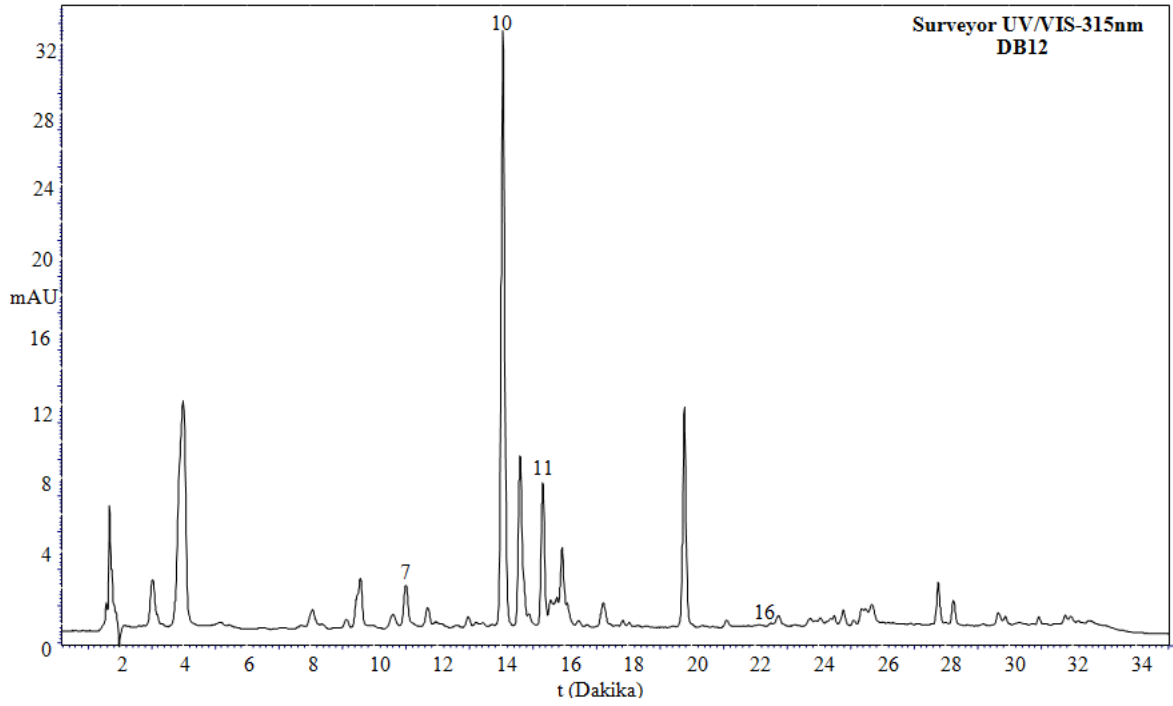
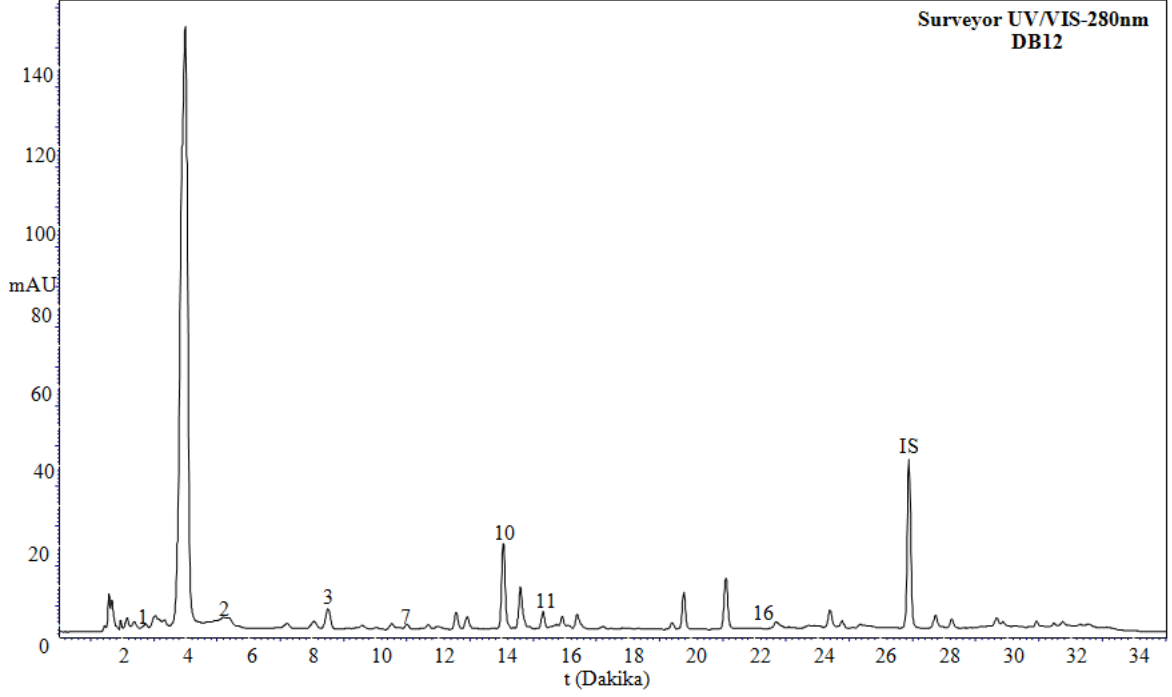
- **DB10**



Ek 3'ün devamı

• **DB11**

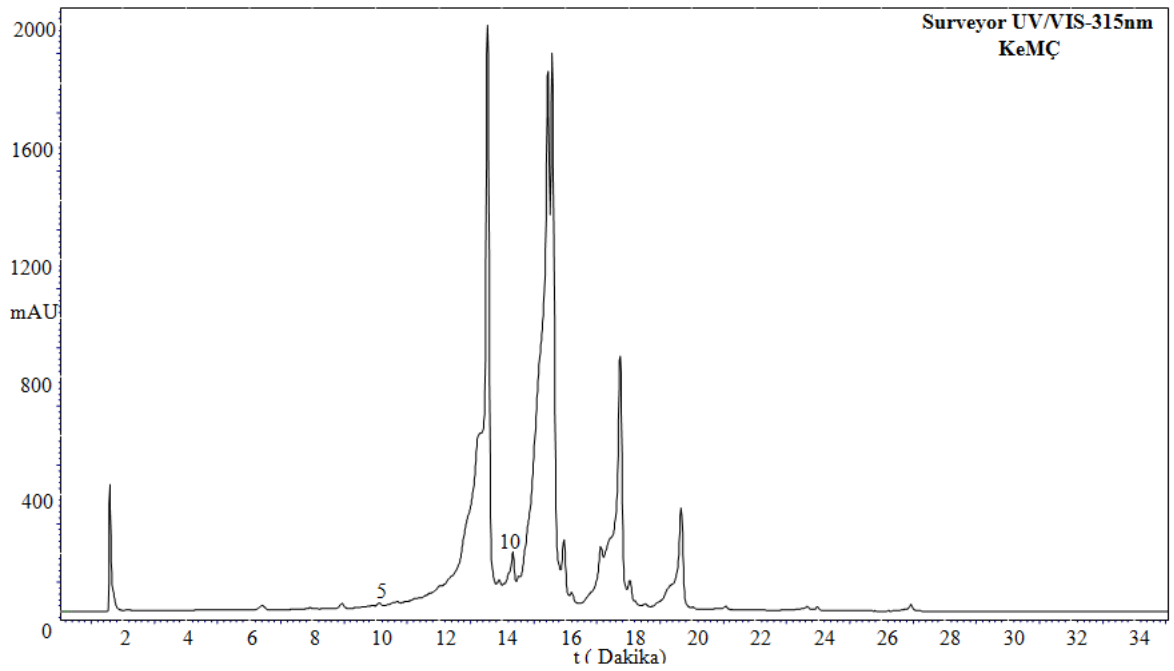
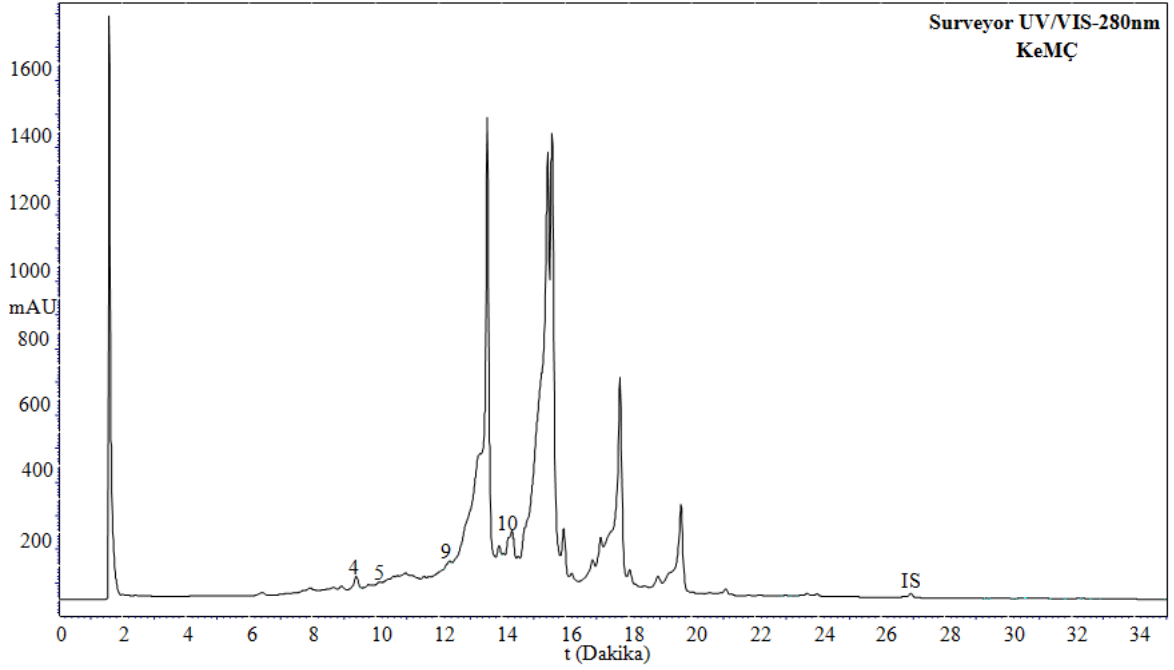
Ek 3'ün devamı

• **DB12**

#### Ek 4. Bazı Bitki Örneklerinin HPLC-UV Kromatogramları

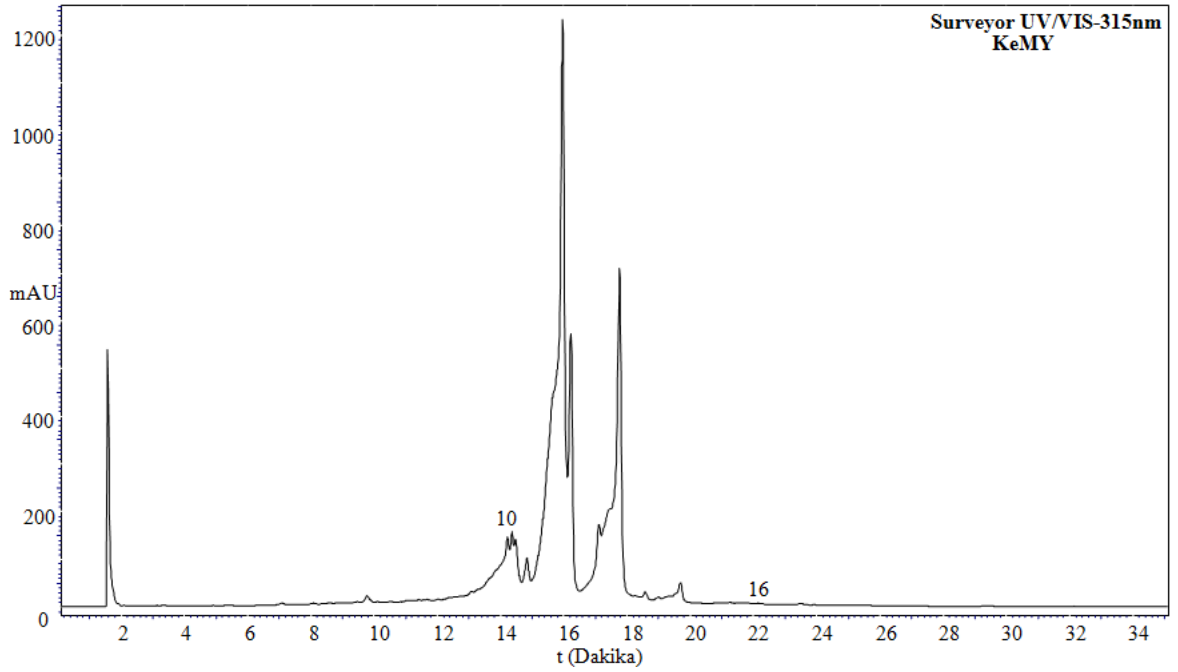
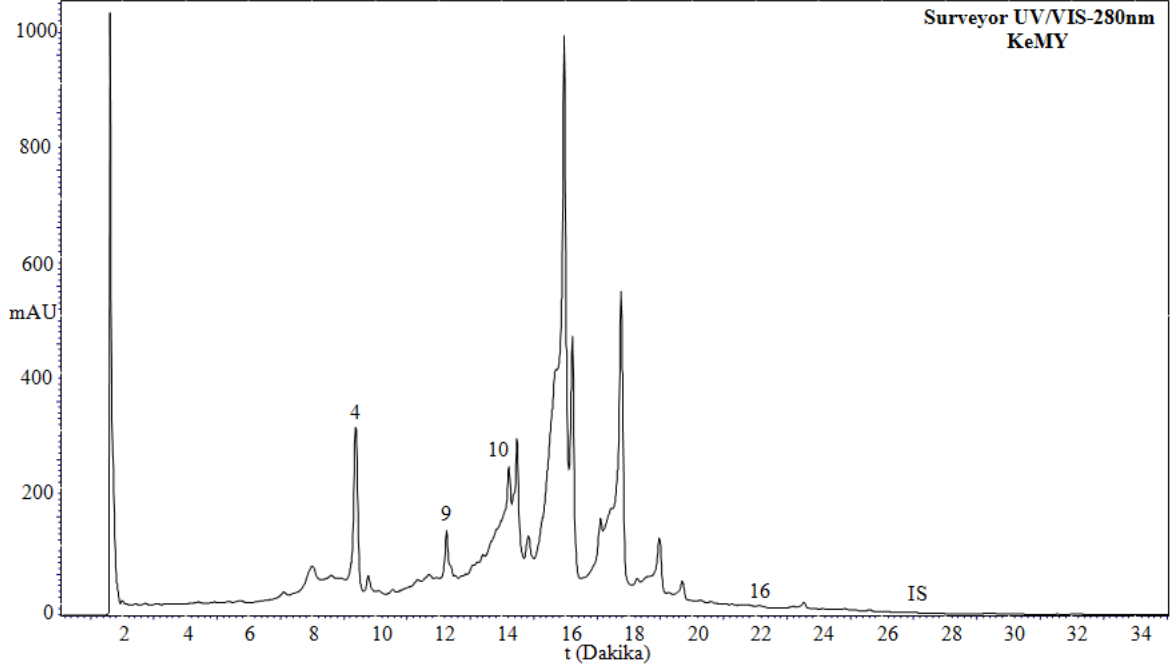
##### Mor Çiçekli Bitkiler

- KeMÇ-Keşap Mor Çiçek



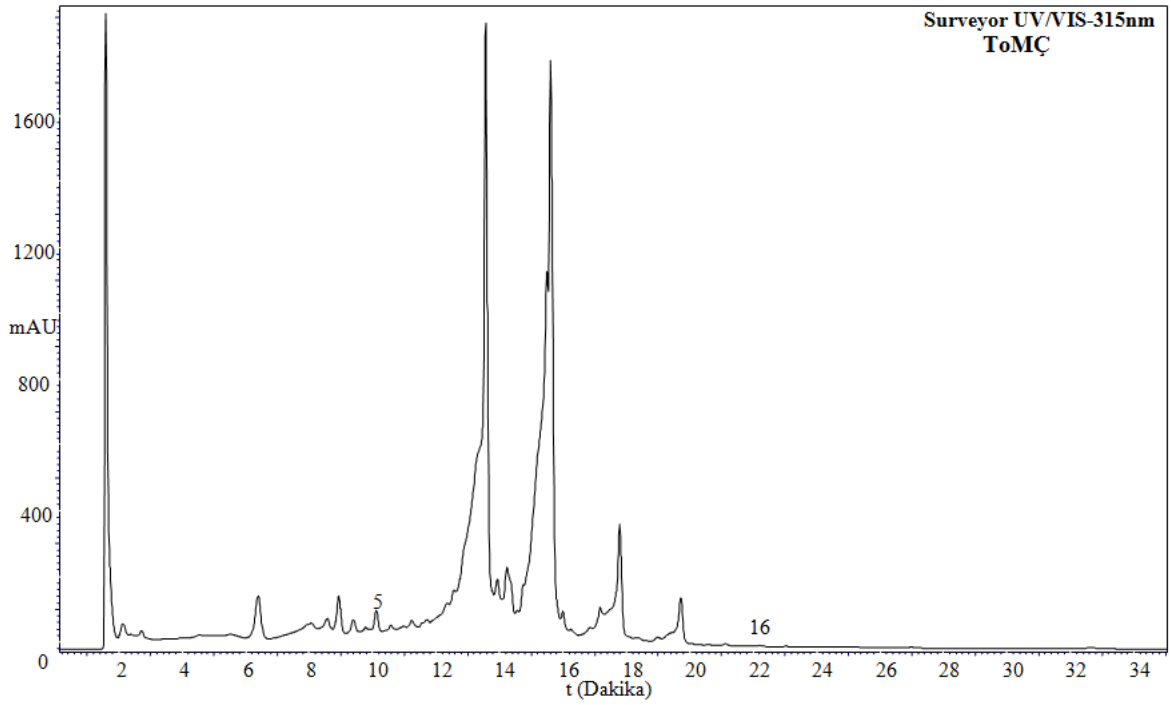
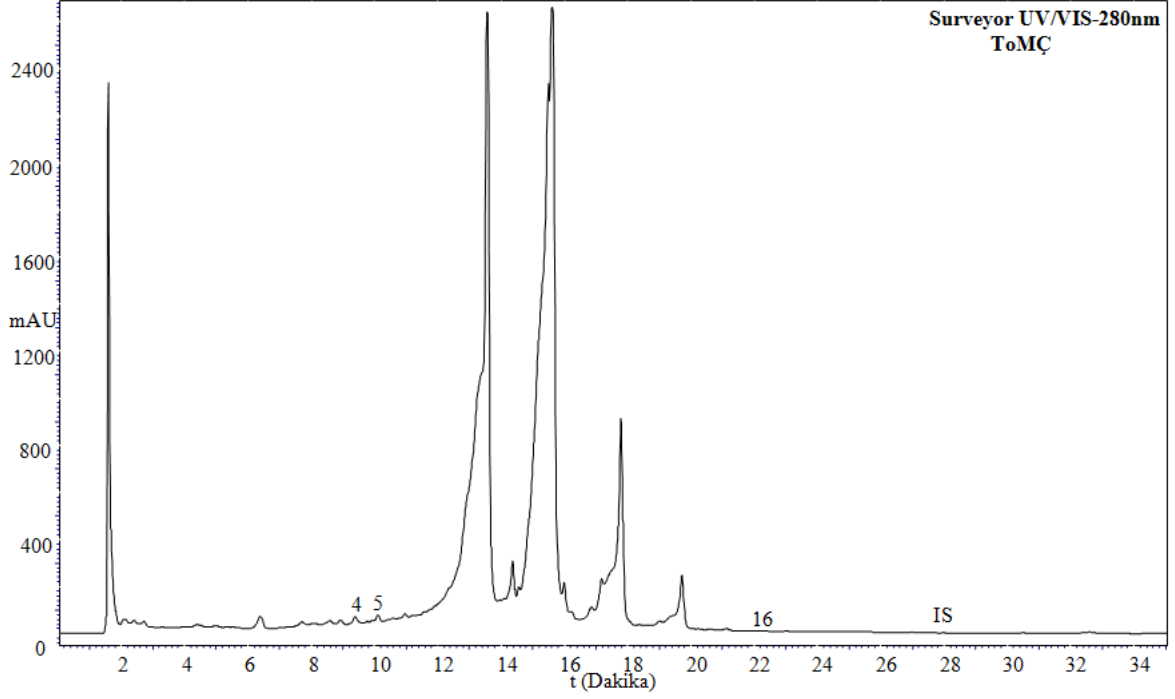
Ek 4'ün devamı

- **KeMY-Keşap Mor Yaprak**



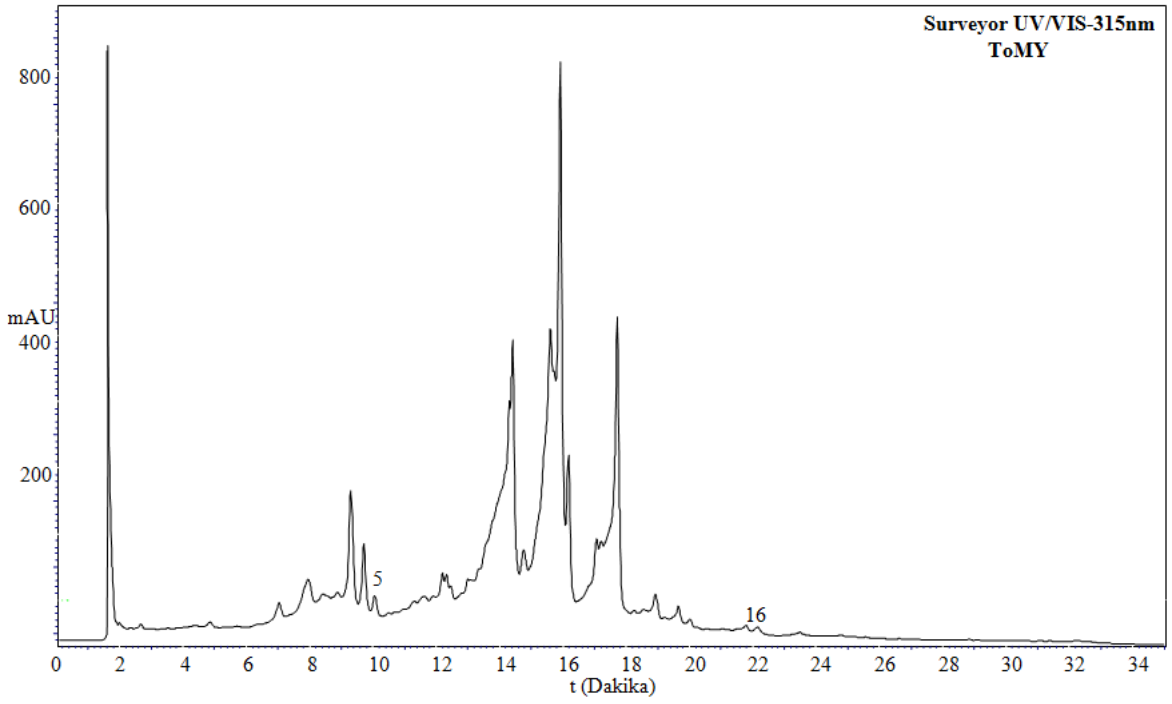
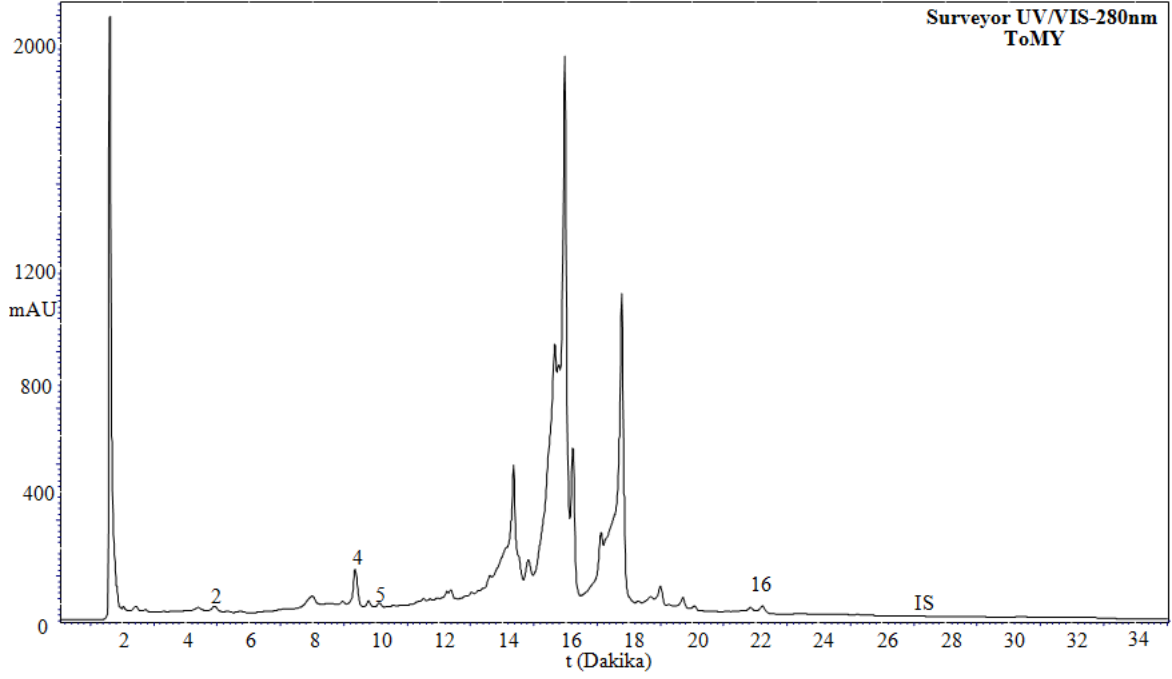
Ek 4'ün devamı

- **ToMÇ-Tonya Mor Çiçek**



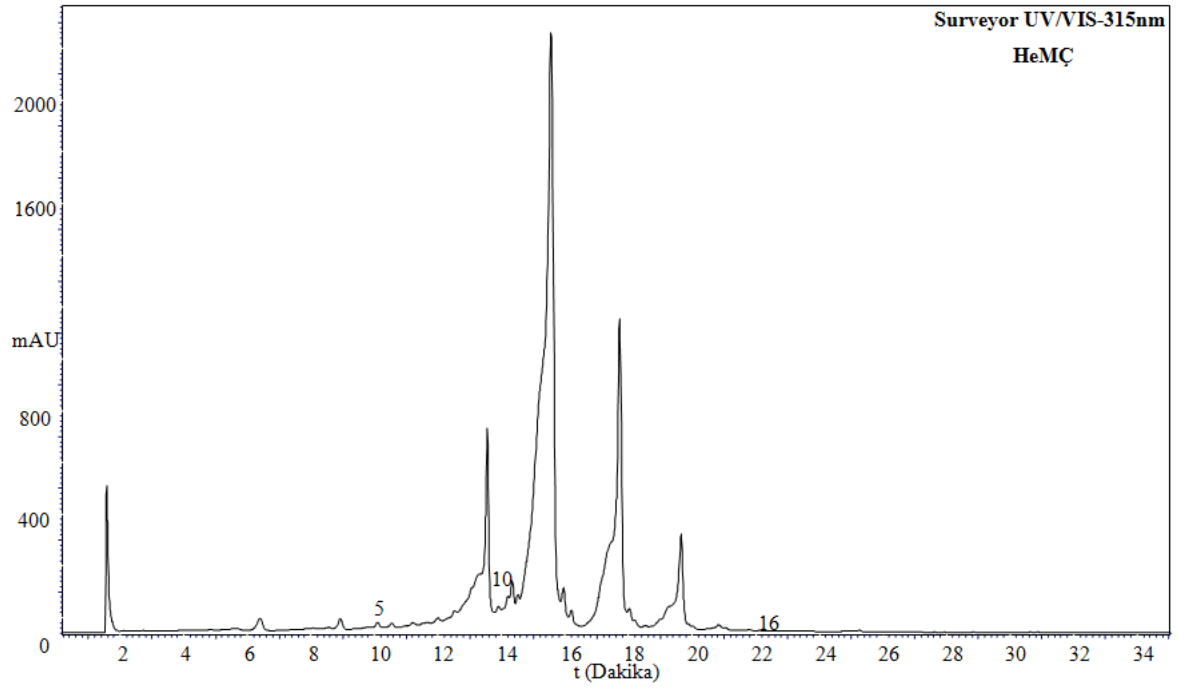
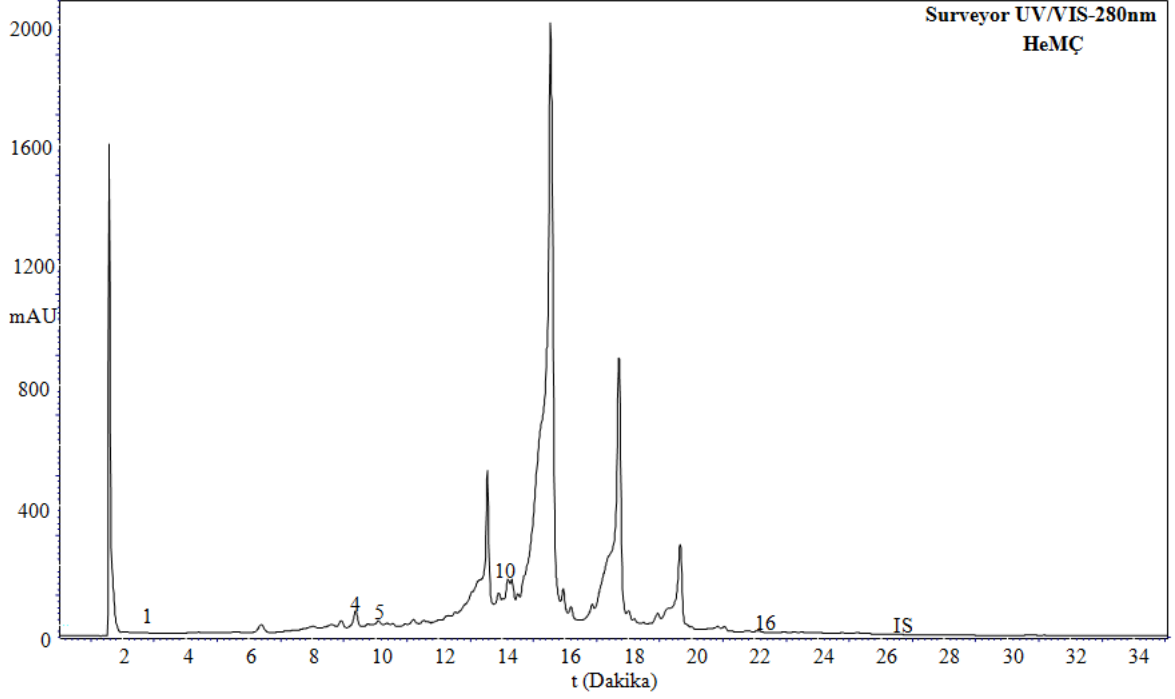
Ek 4'ün devamı

- **ToMY-Tonya Mor Yaprak**



Ek 4'ün devamı

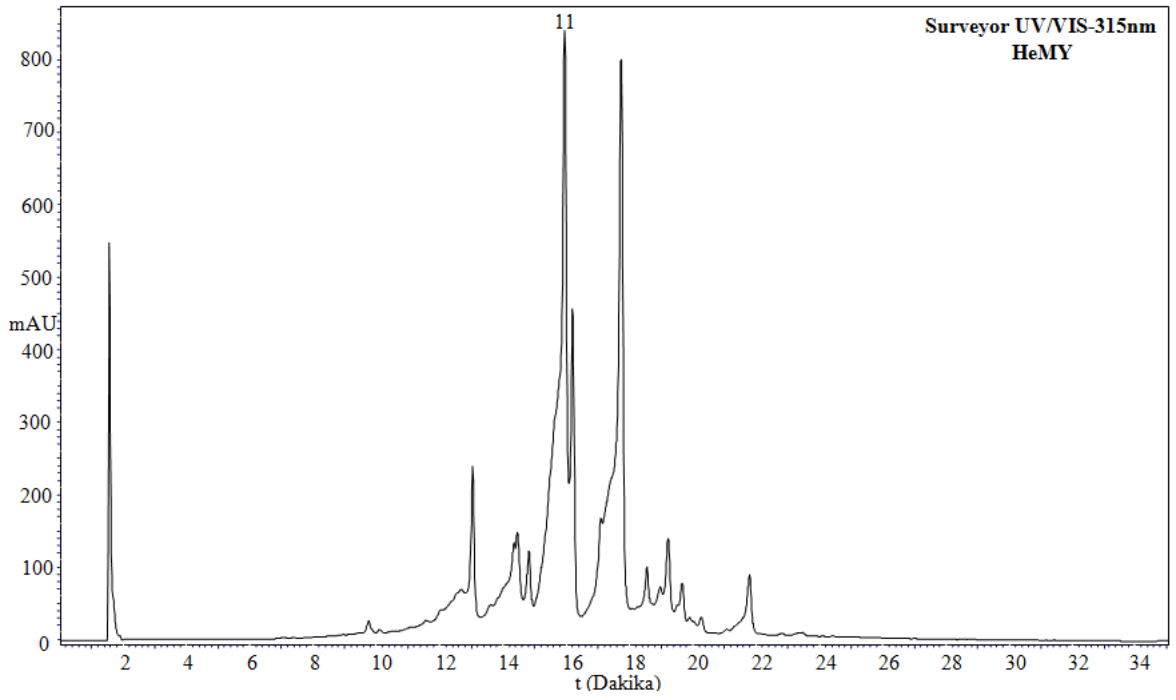
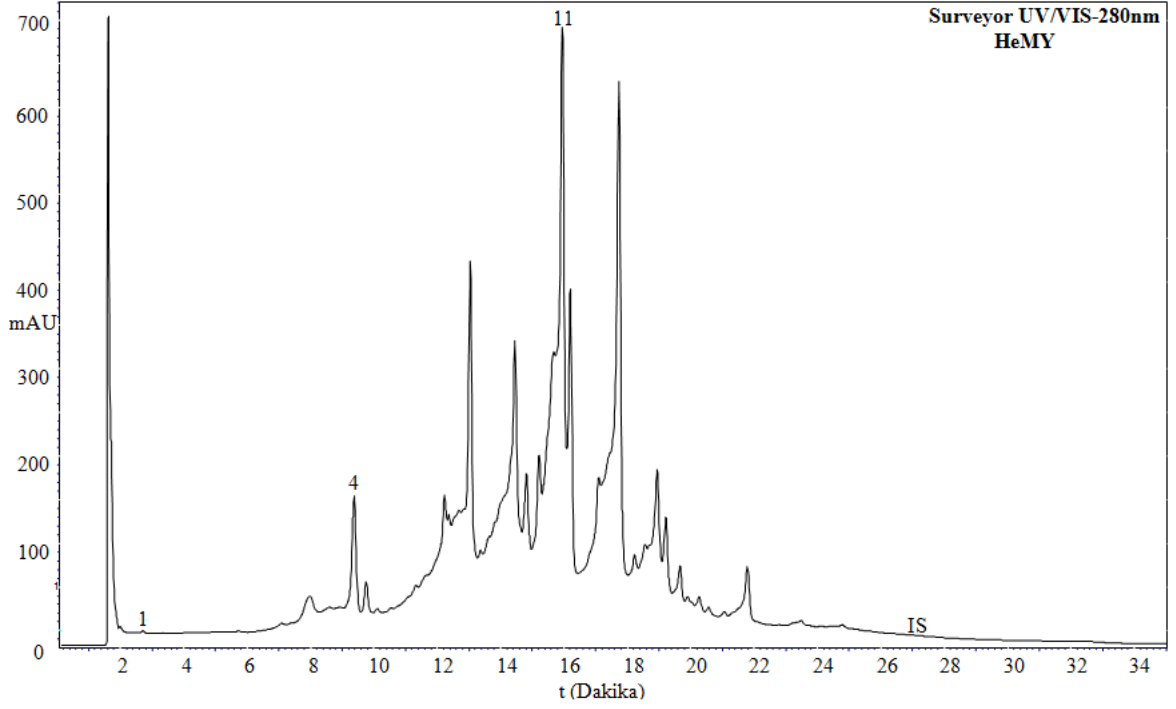
- **HeMÇ-Hemşin Mor Çiçek**





Ek 4'ün devamı

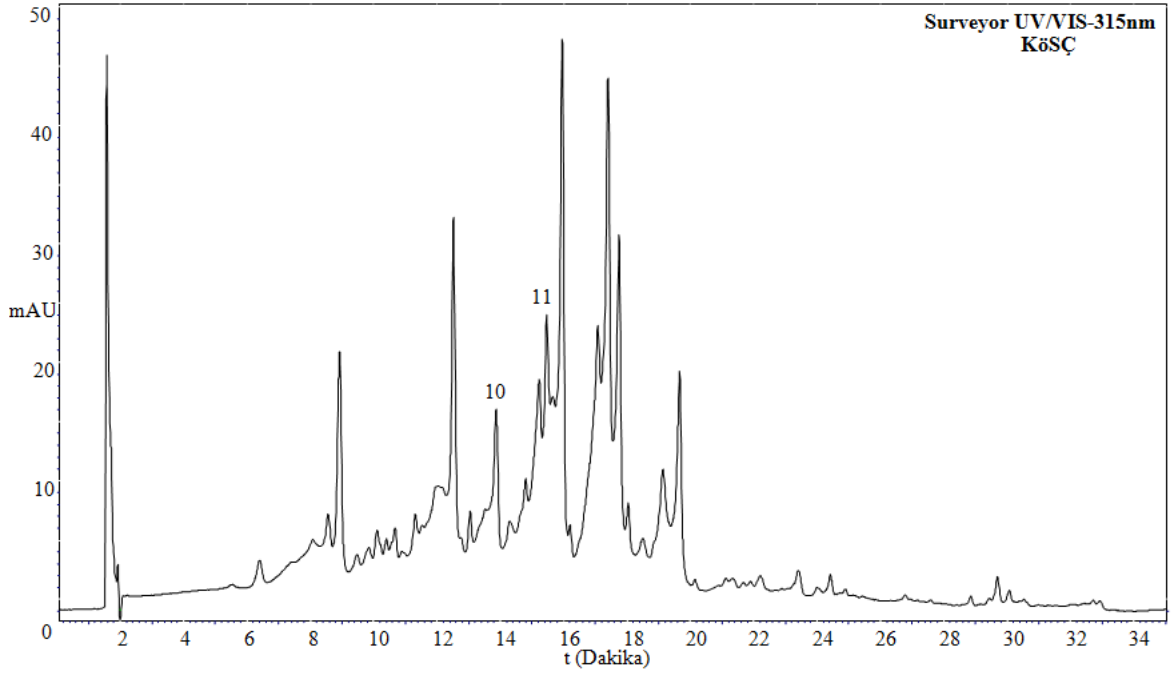
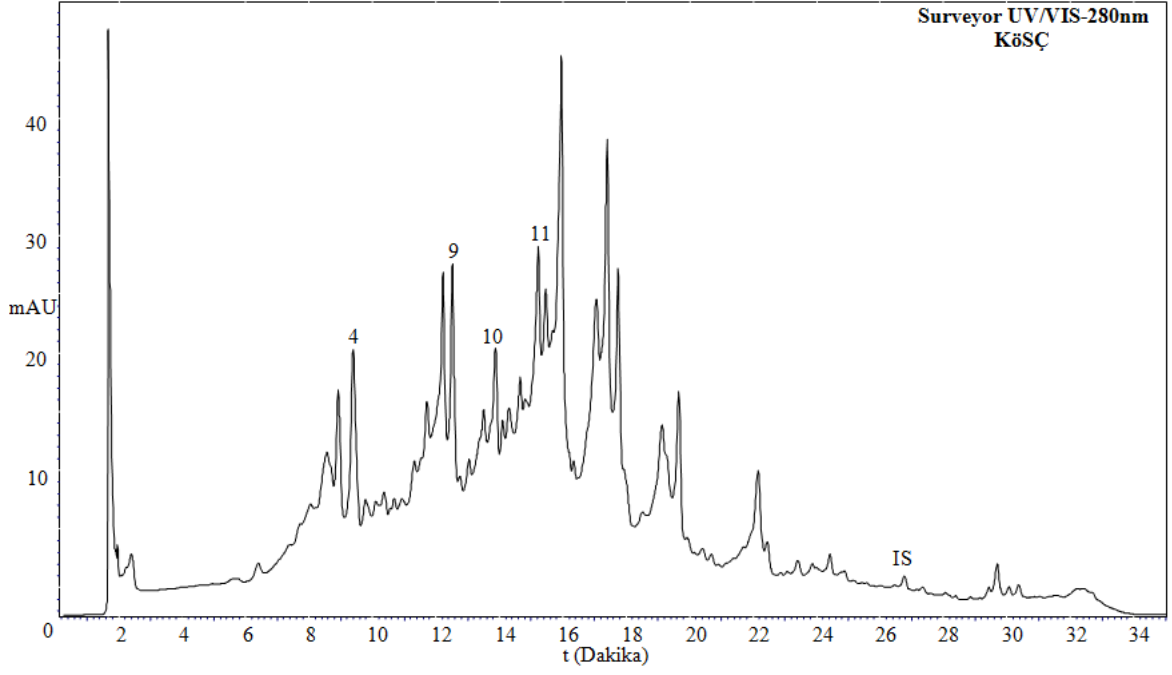
- **HeMY-Hemşin Mor Yaprak**



Ek 4'ün devamı

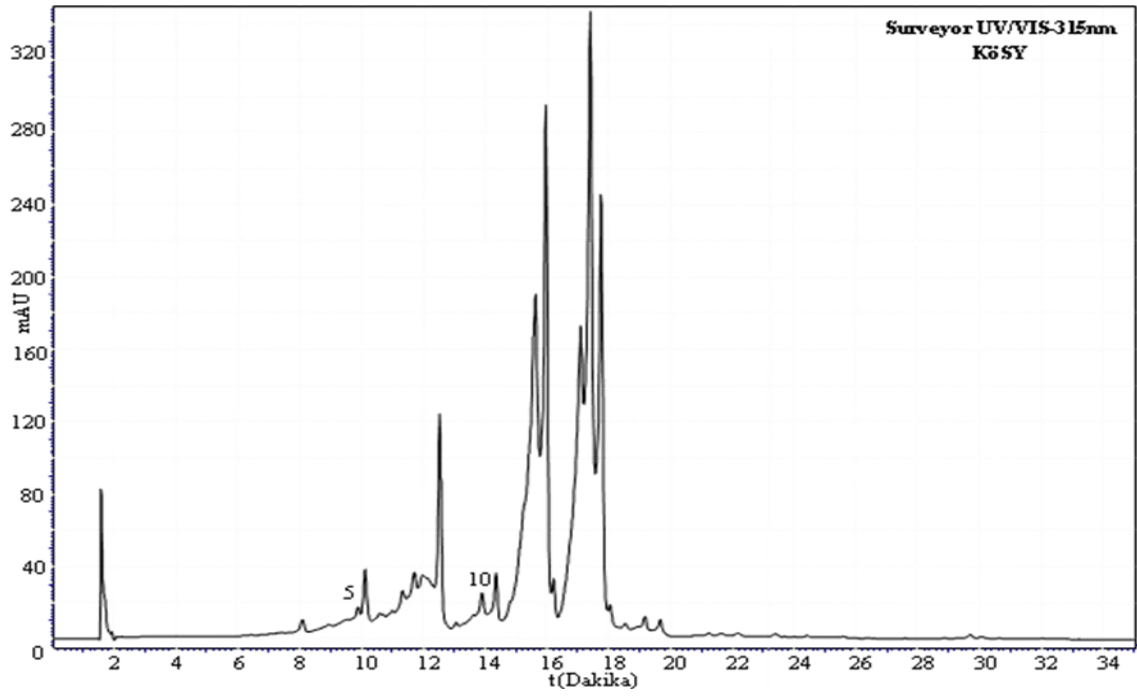
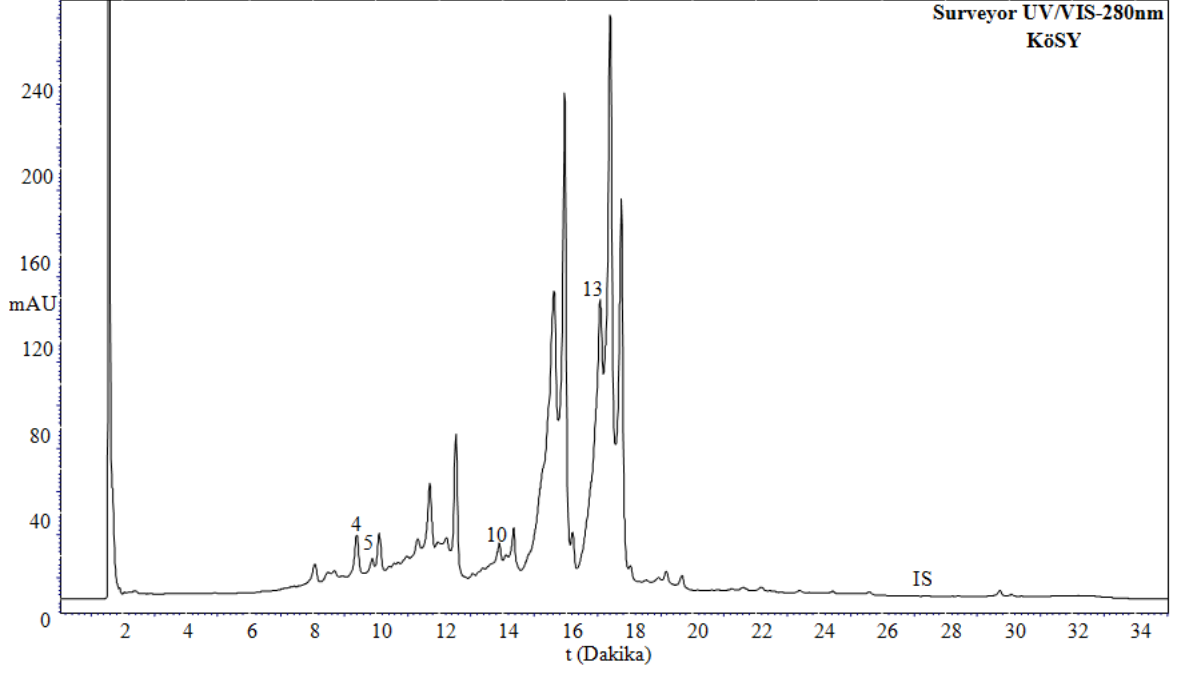
### Sarı Çiçekli Bitkiler

- **KösÇ-Köprübaşı Sarı Çiçek**



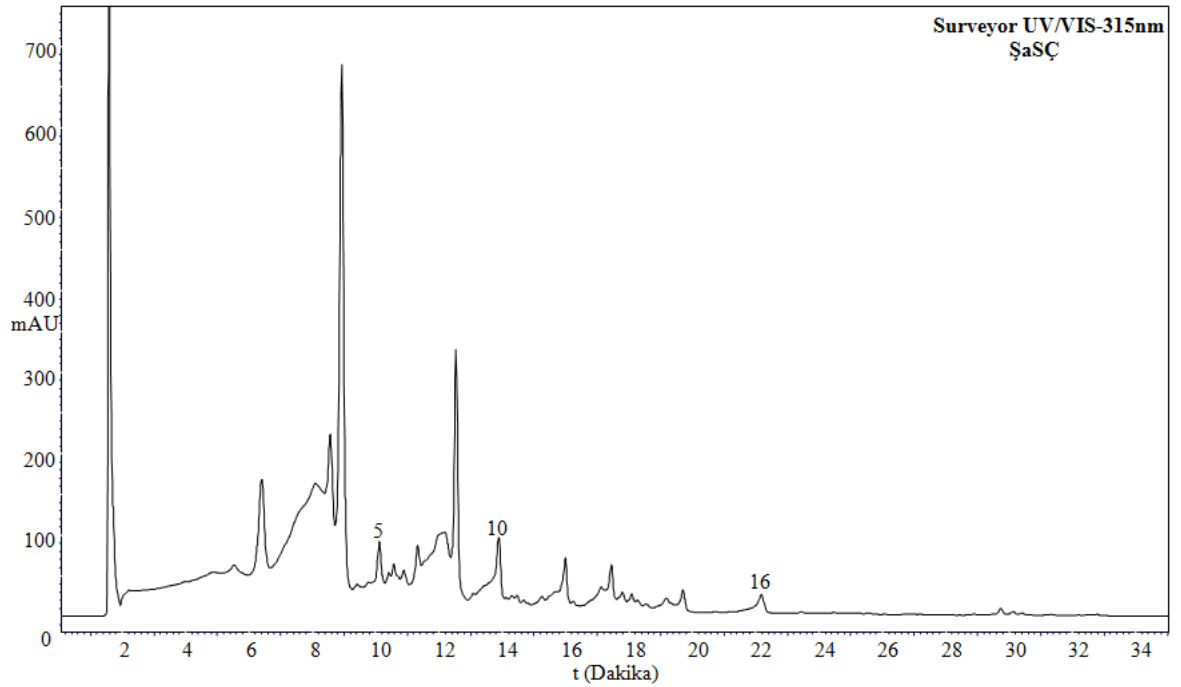
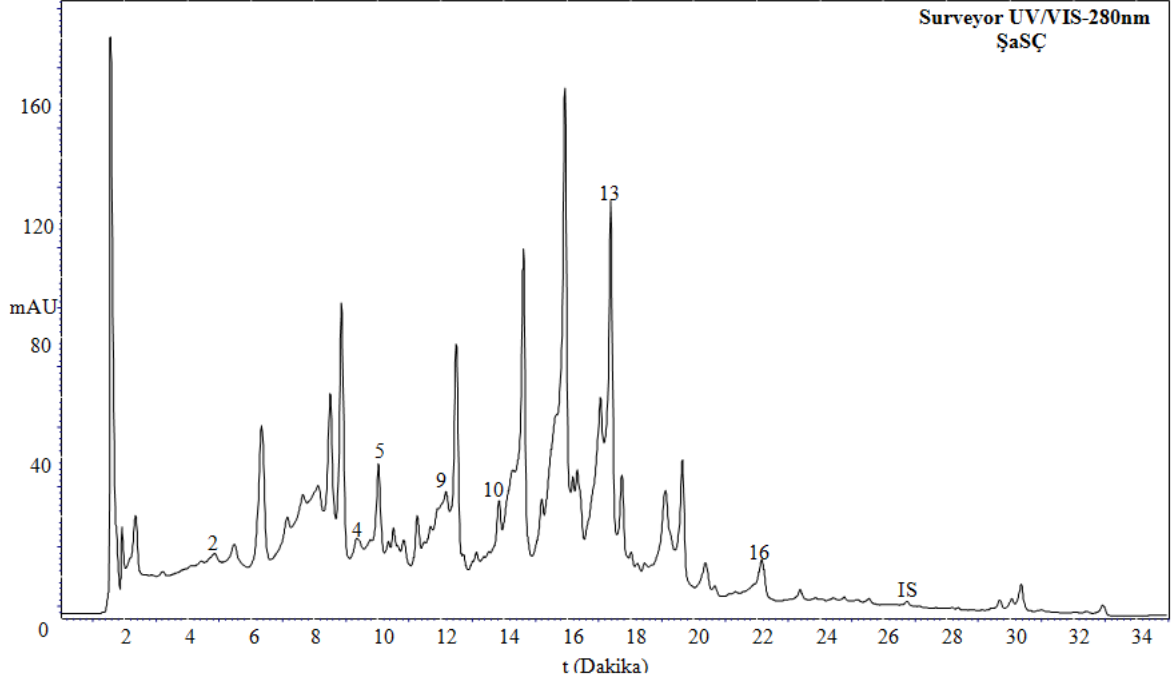
Ek 4'ün devamı

- **KöSY-Köprübaşı Sarı Yaprak**



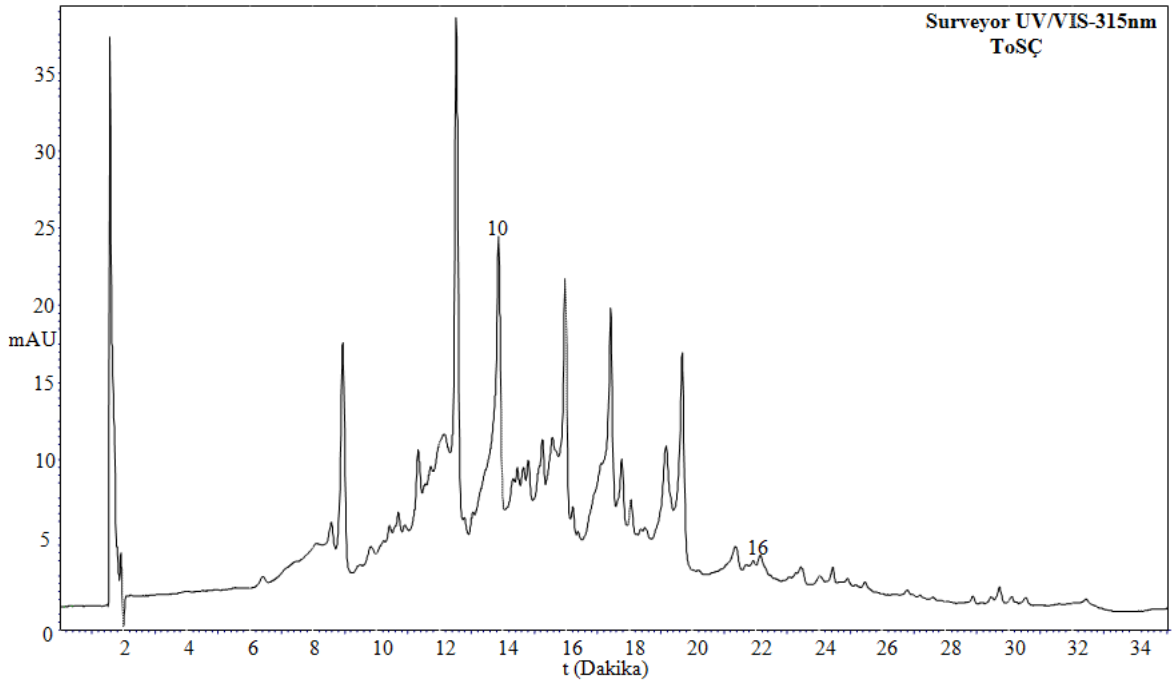
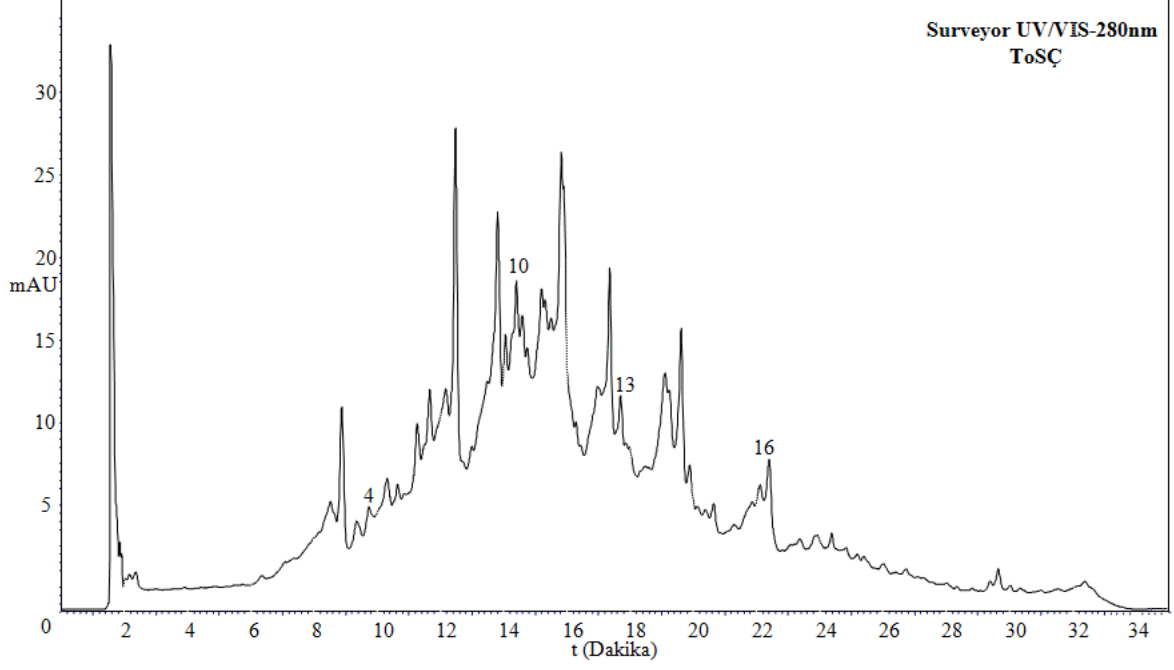
Ek 4'ün devamı

- **ŞaSÇ-Şalpazarı Sarı Çiçek**



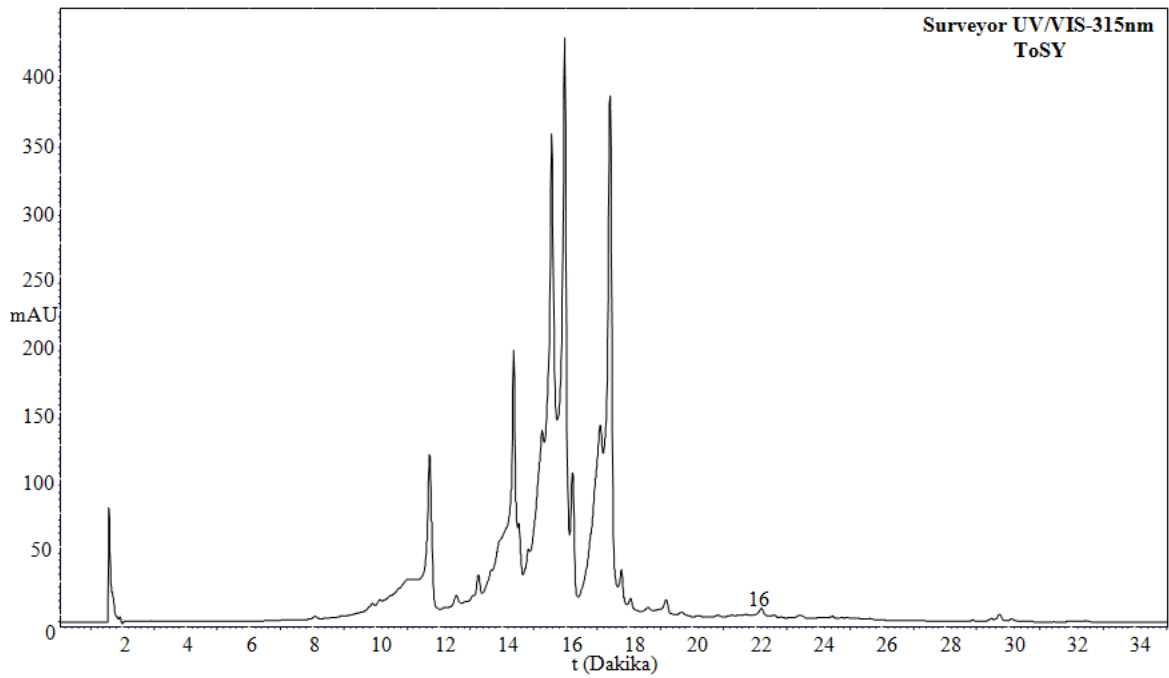
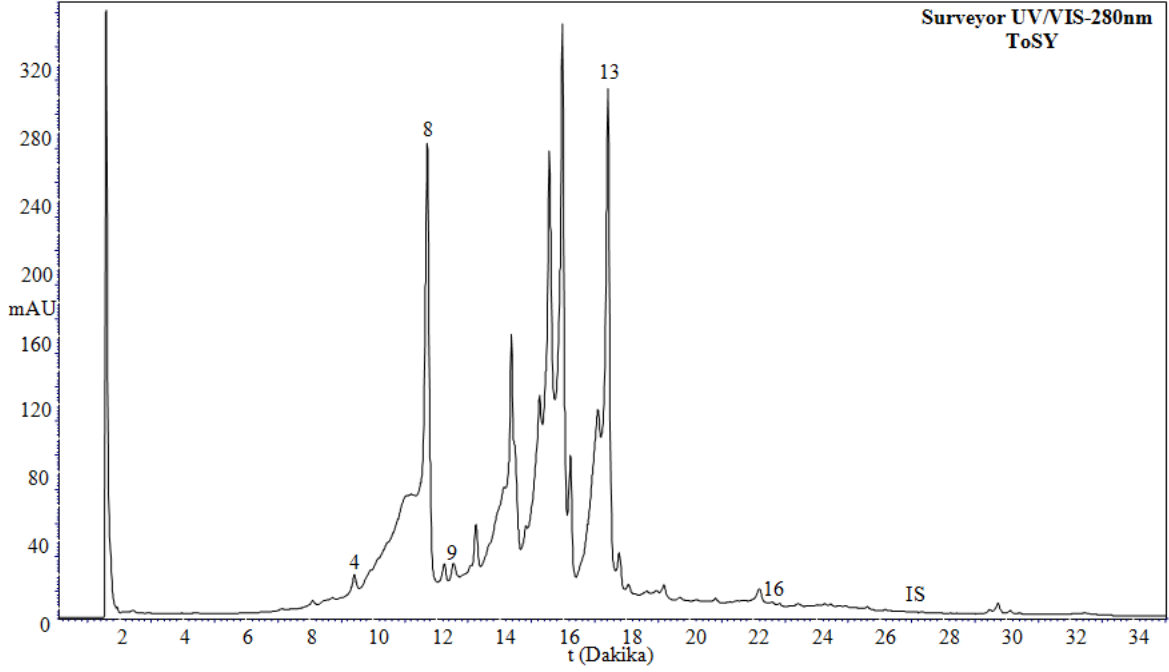
Ek 4'ün devamı

- **ToSÇ-Tonya Sarı Çiçek**

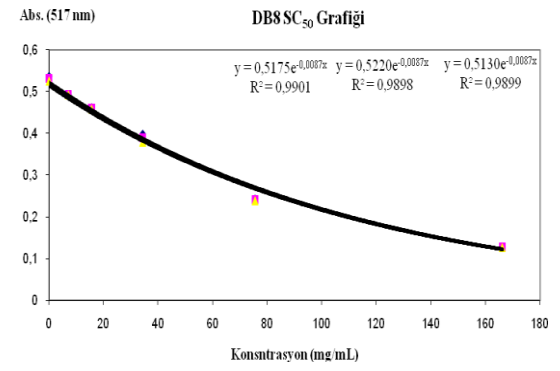
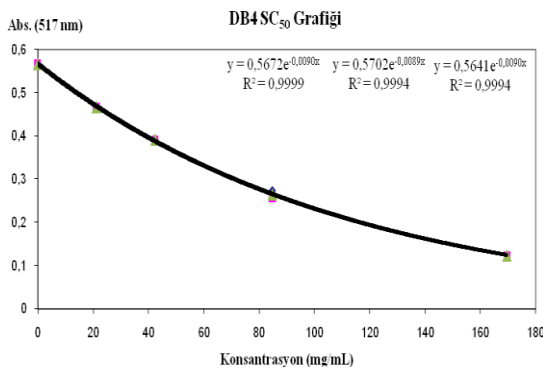
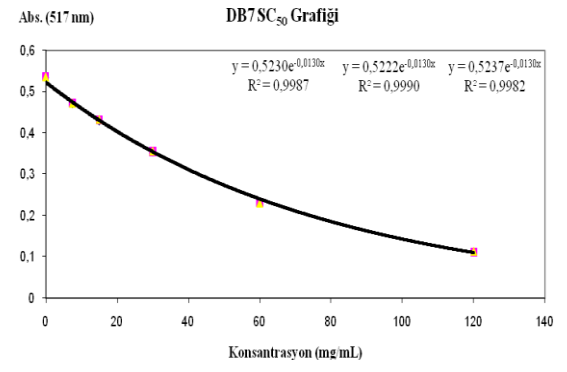
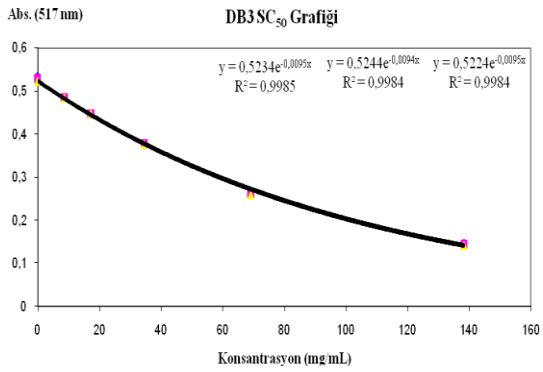
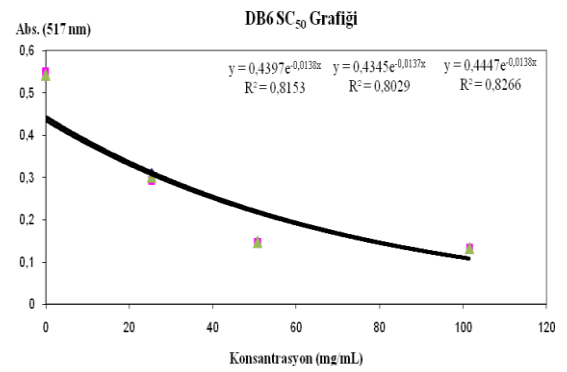
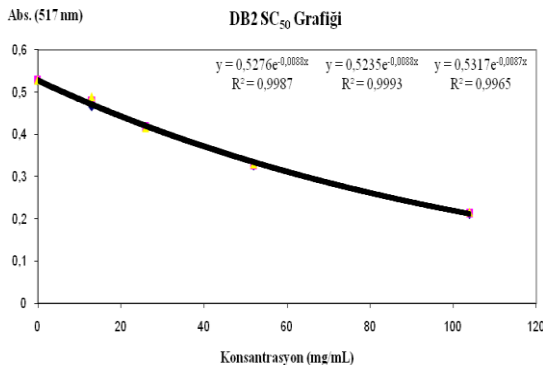
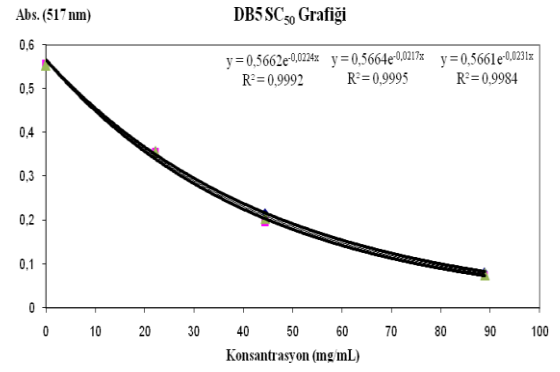
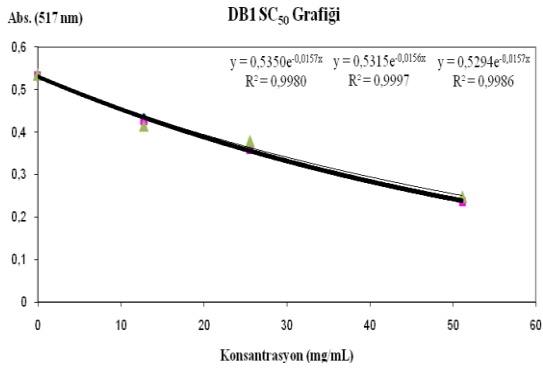


Ek 4'ün devamı

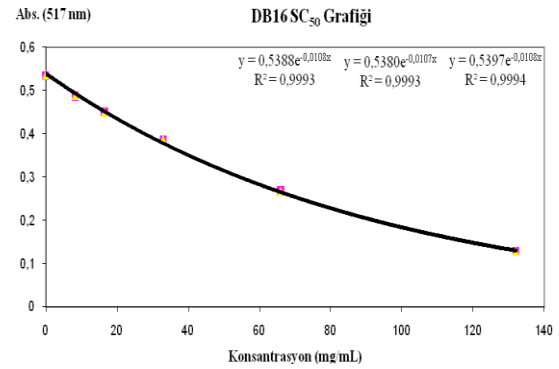
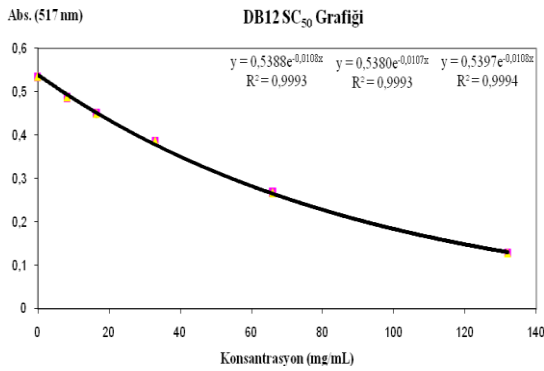
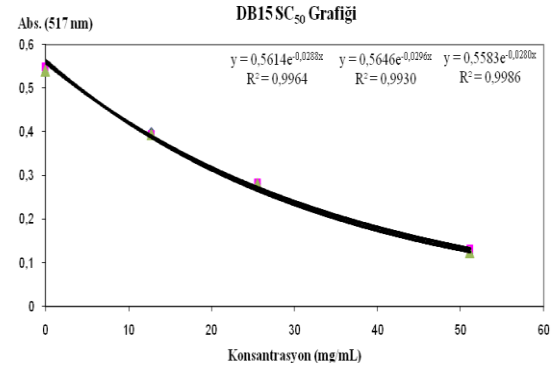
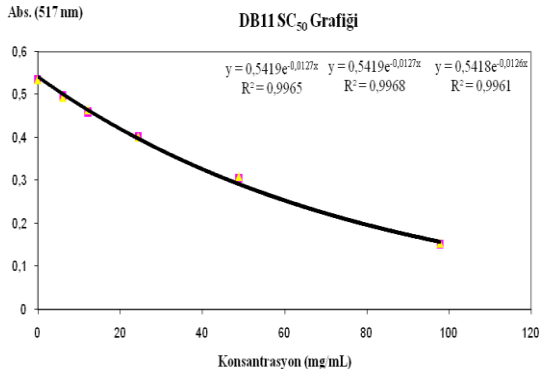
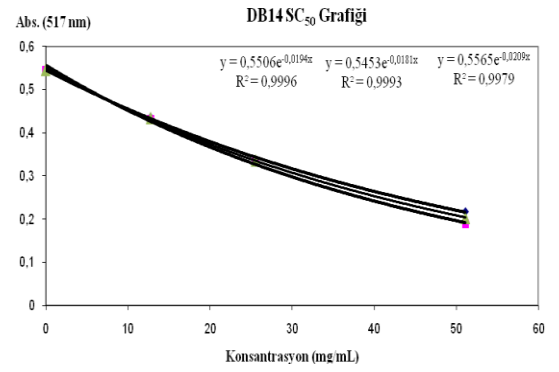
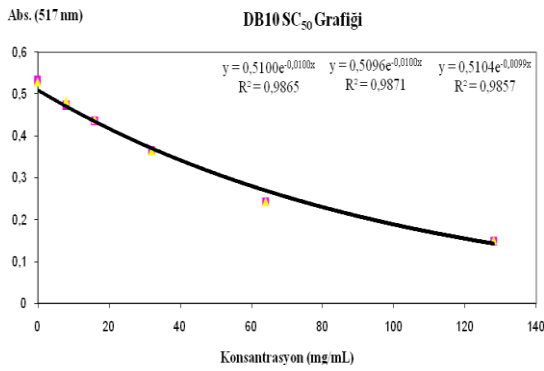
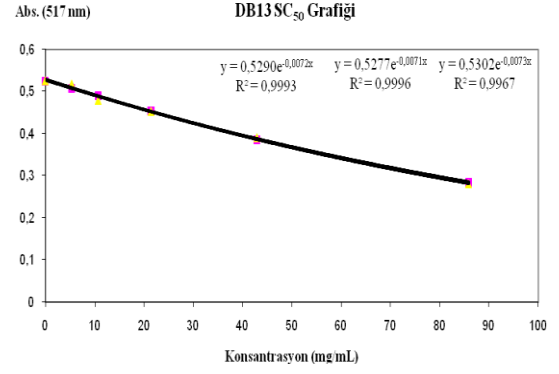
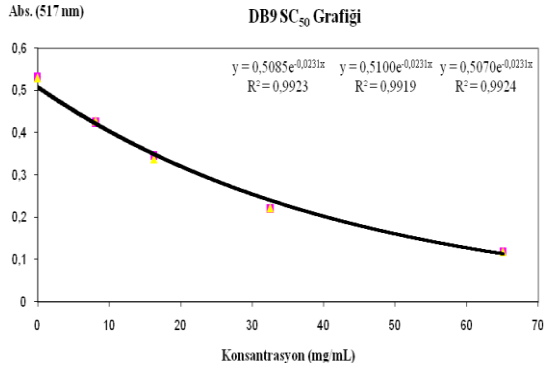
- **ToSY-Tonya Sarı Yaprak**



## Ek 5. Bal Örneklerinin DPPH-SC<sub>50</sub> Grafikleri

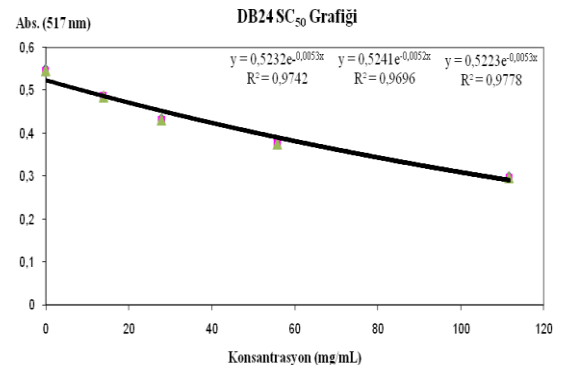
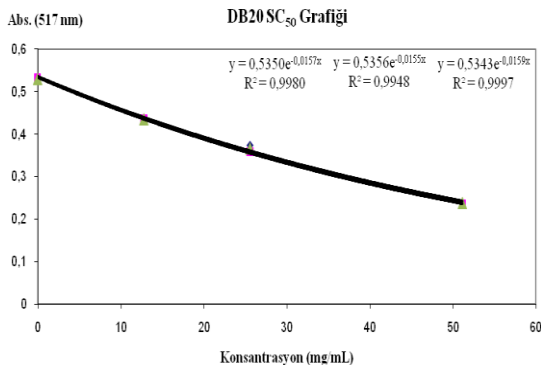
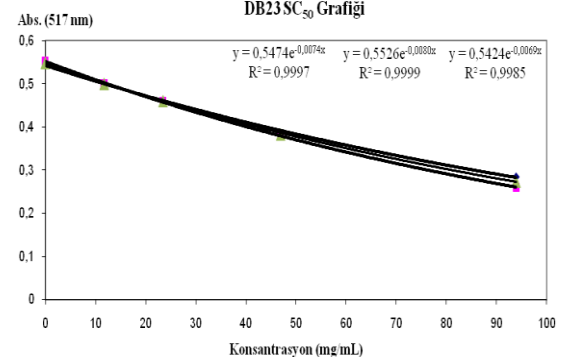
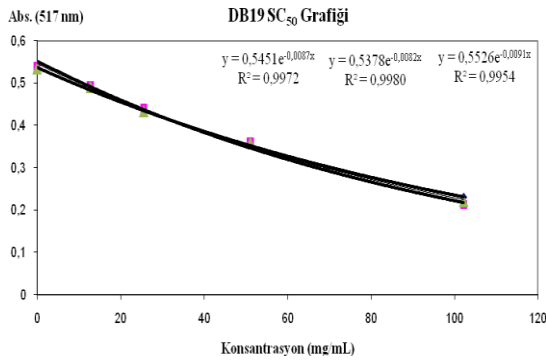
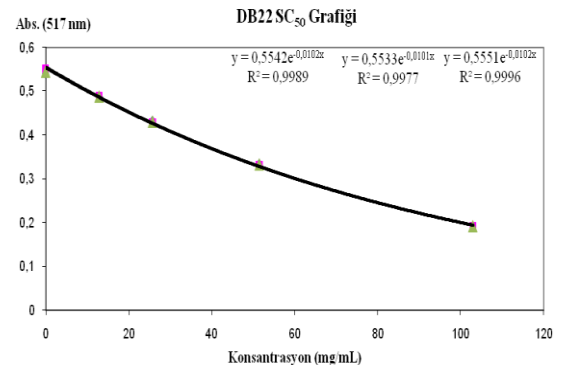
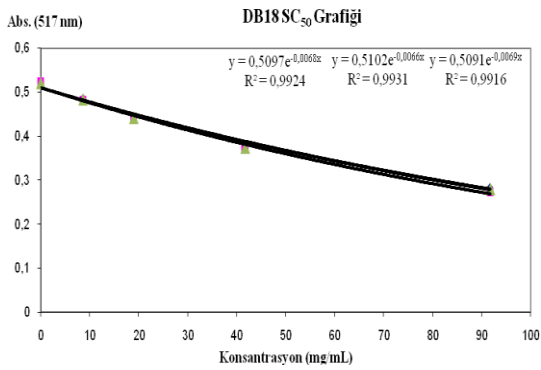
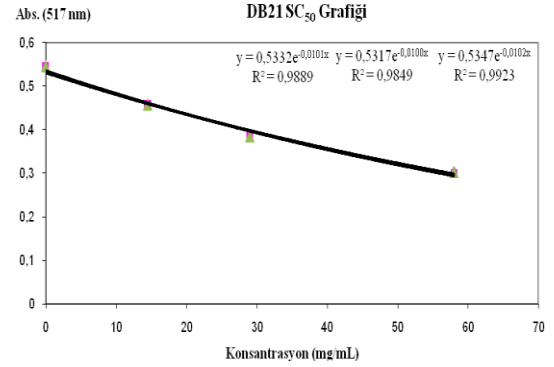
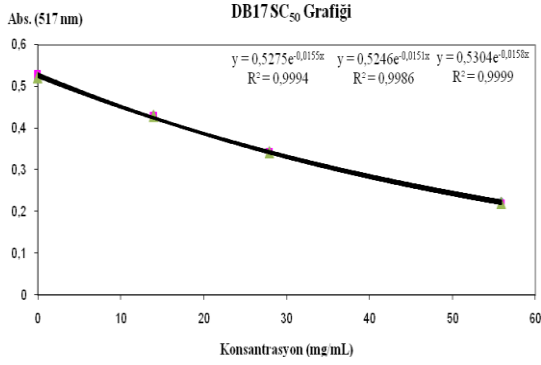


## Ek 5'in devamı

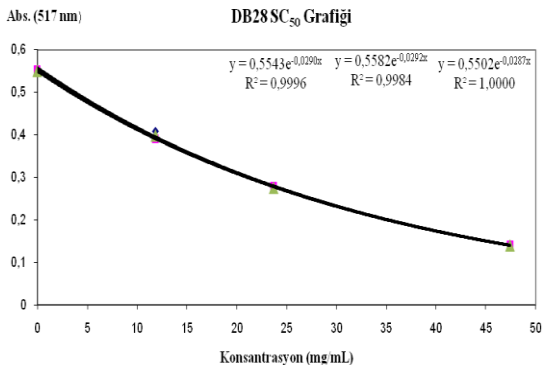
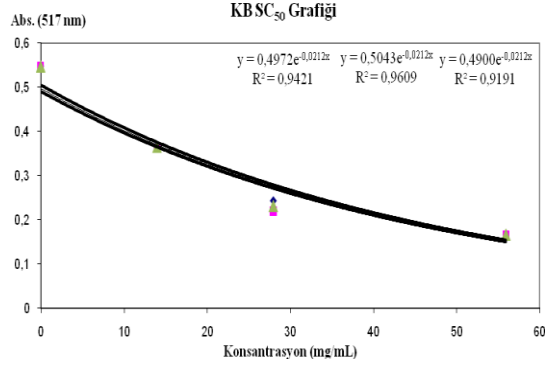
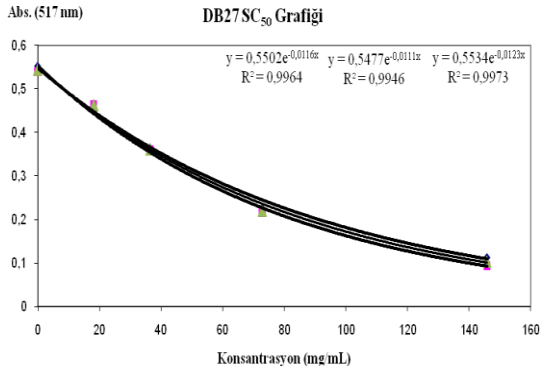
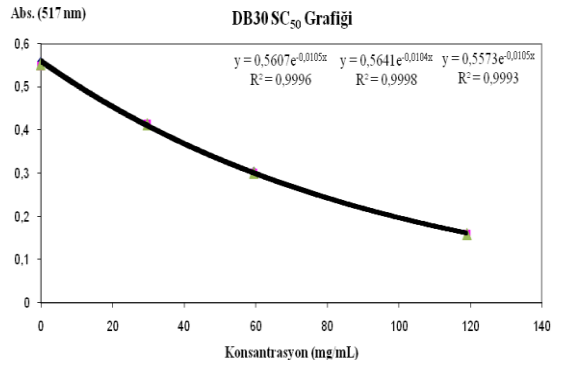
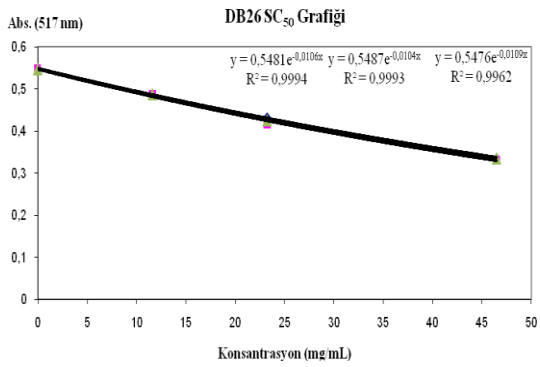
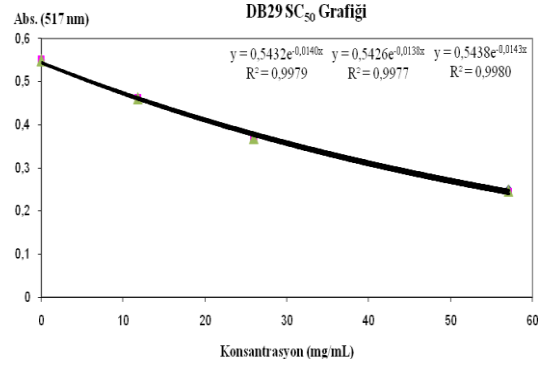
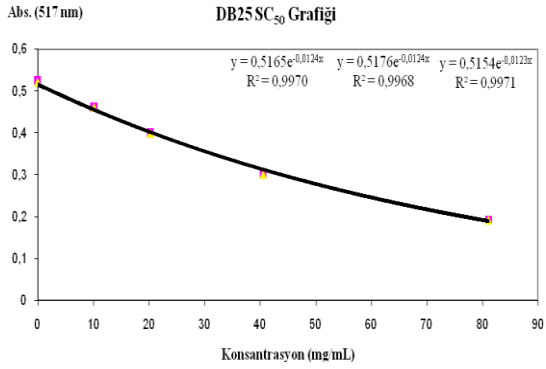




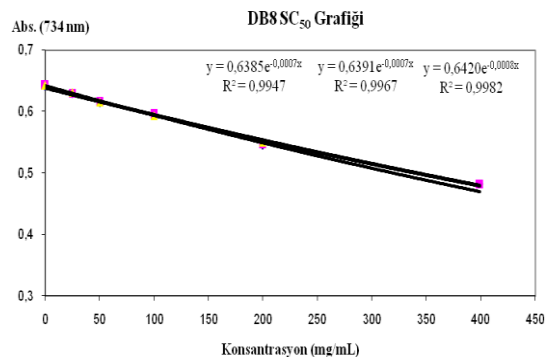
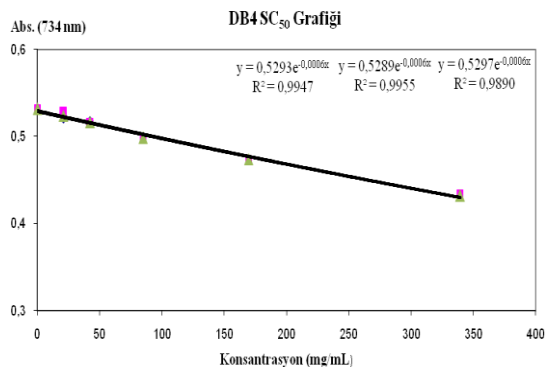
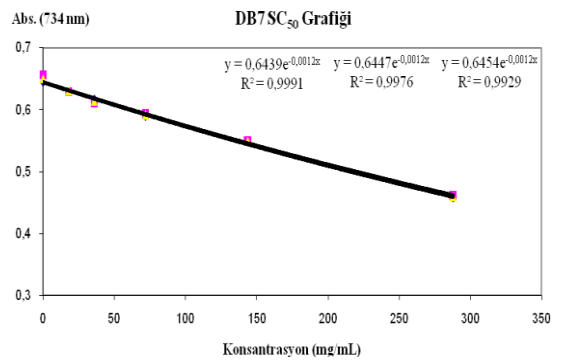
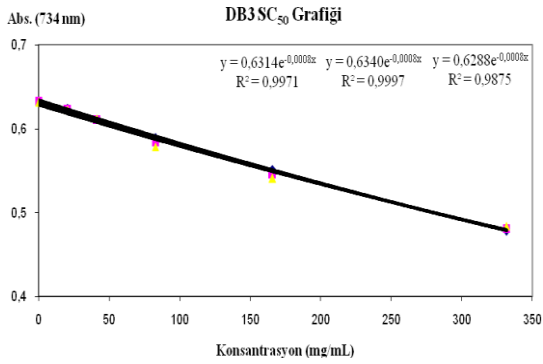
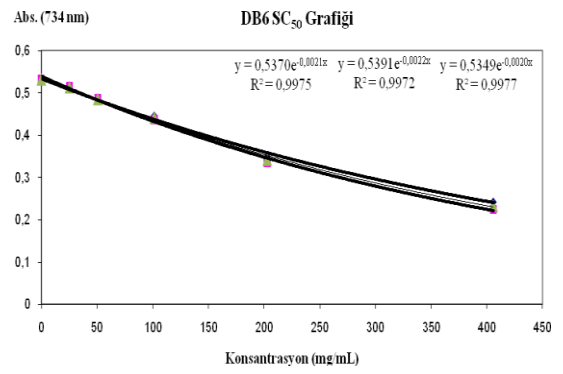
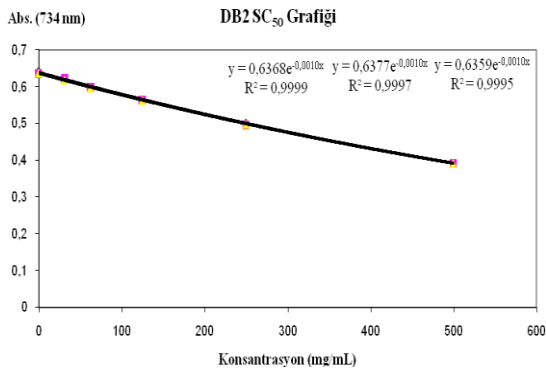
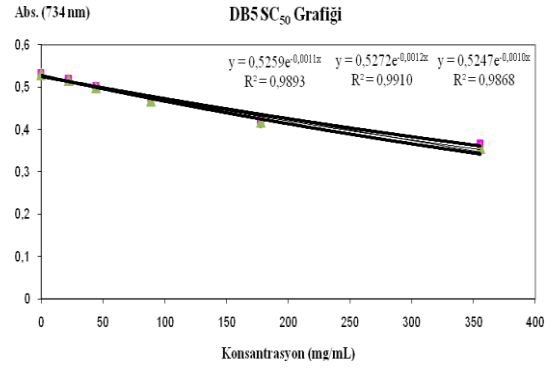
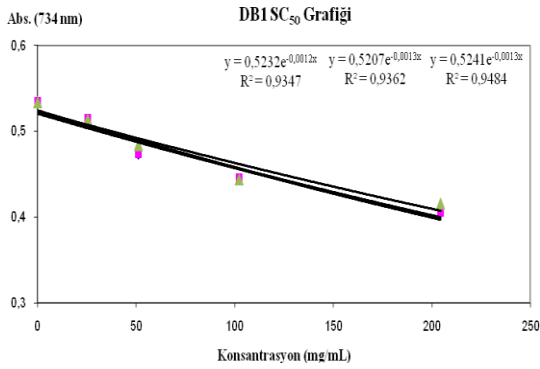
## Ek 5'in devamı



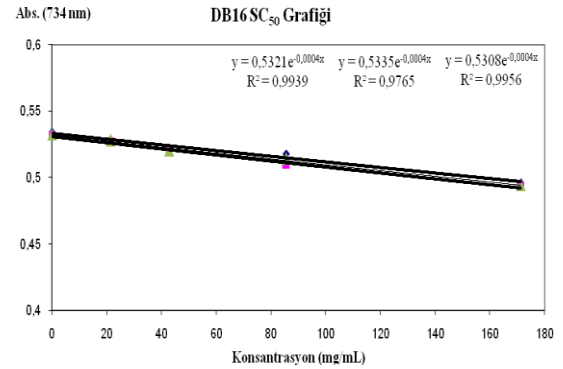
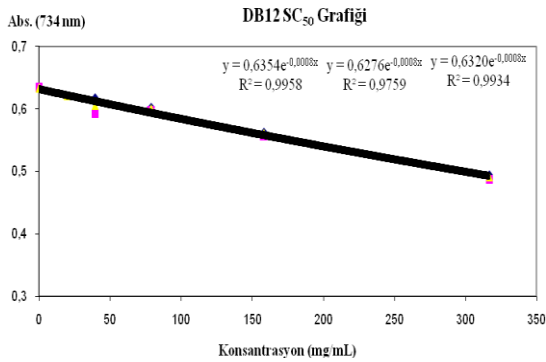
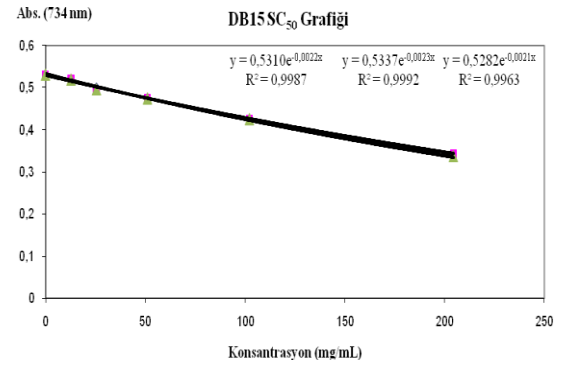
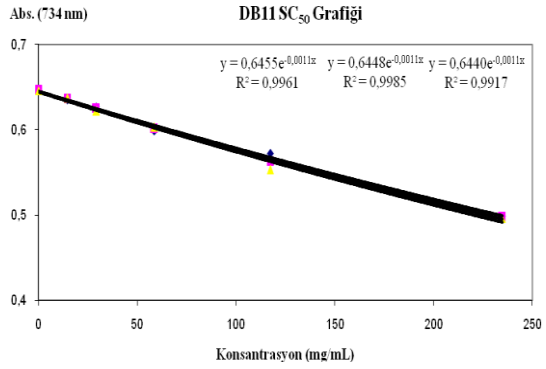
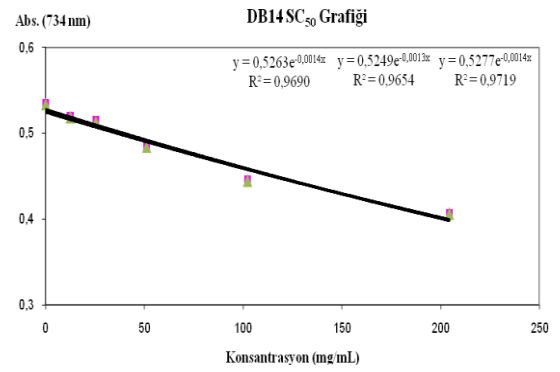
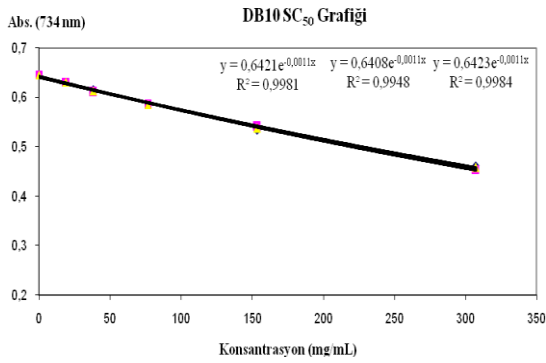
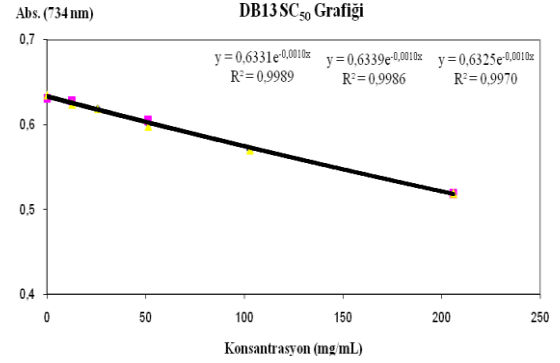
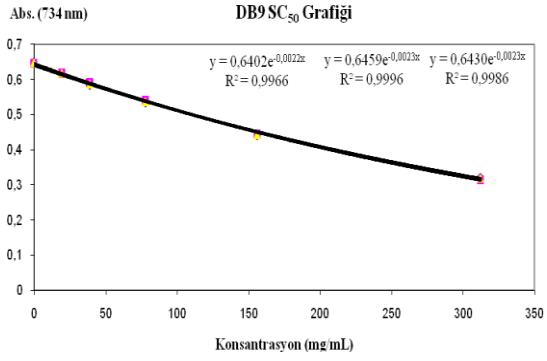
## Ek 5'in devamı



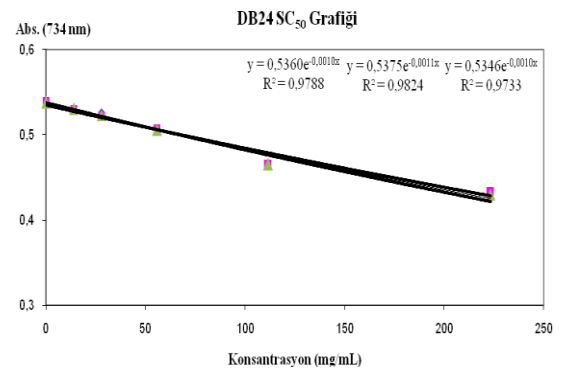
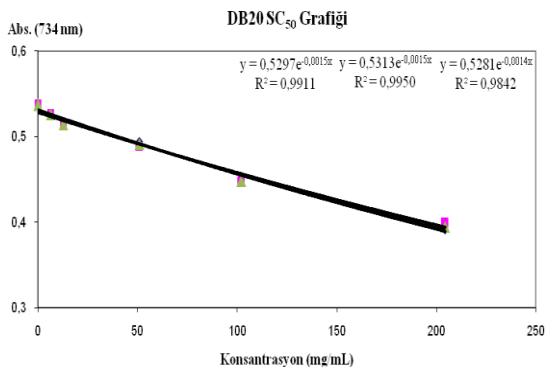
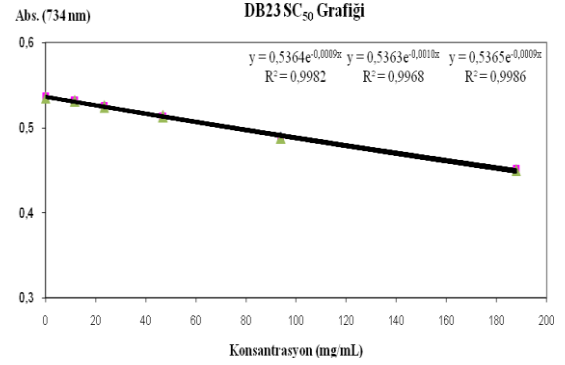
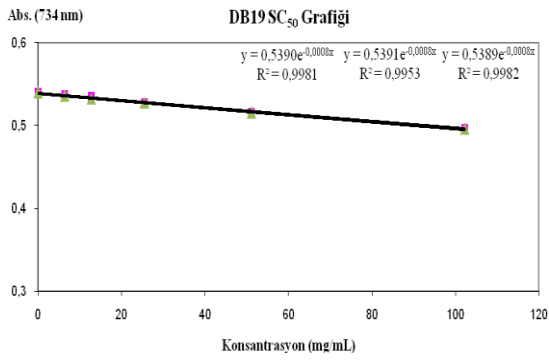
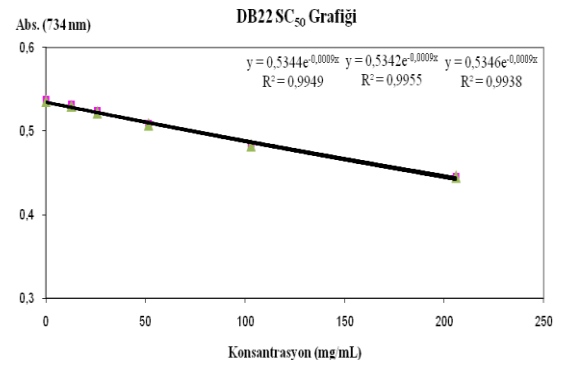
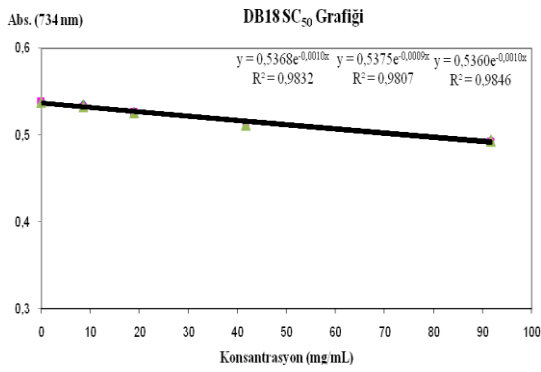
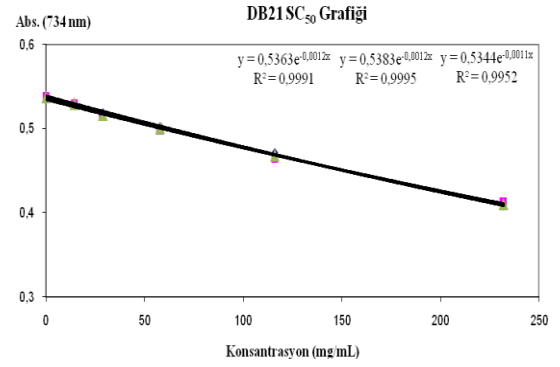
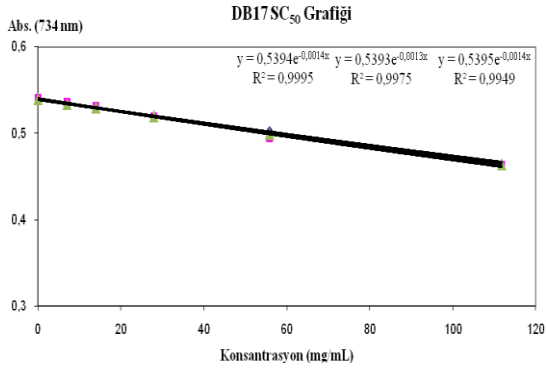
## Ek 6. Bal Örneklerinin ABTS-SC<sub>50</sub> Grafikleri



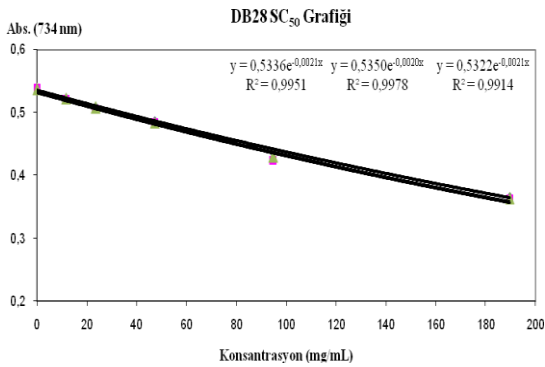
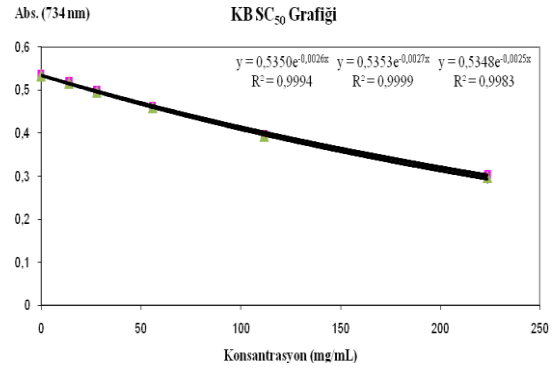
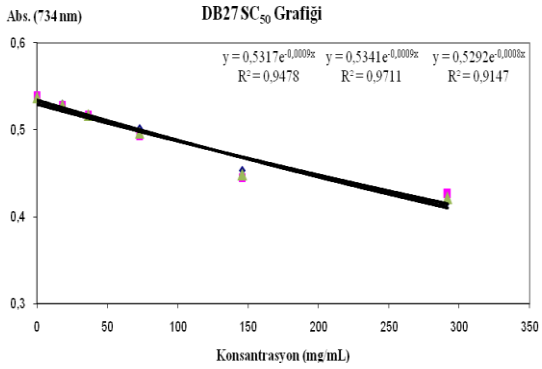
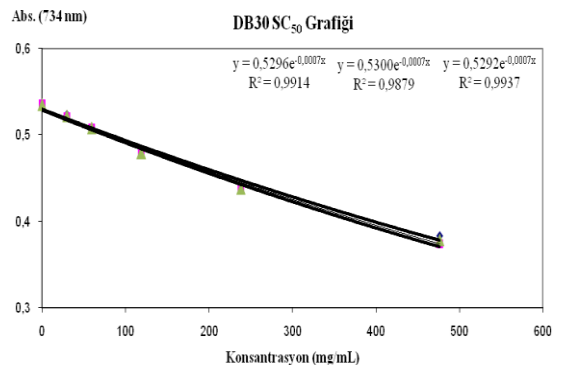
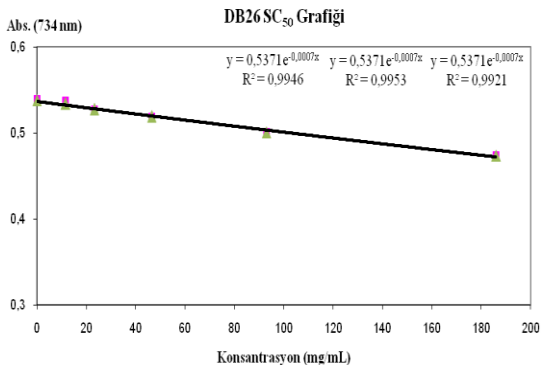
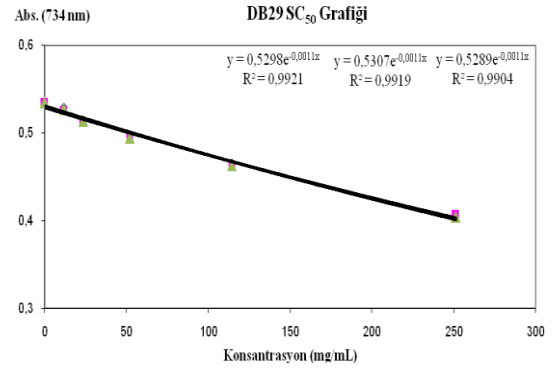
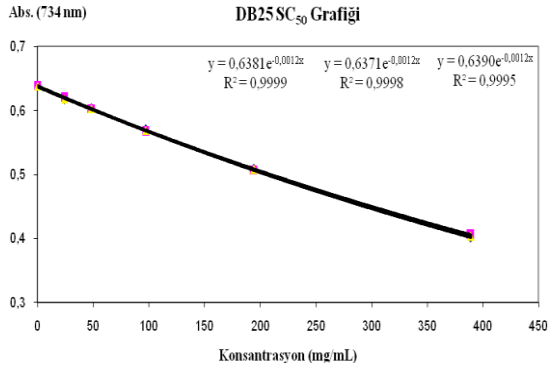
## Ek 6'nın devamı



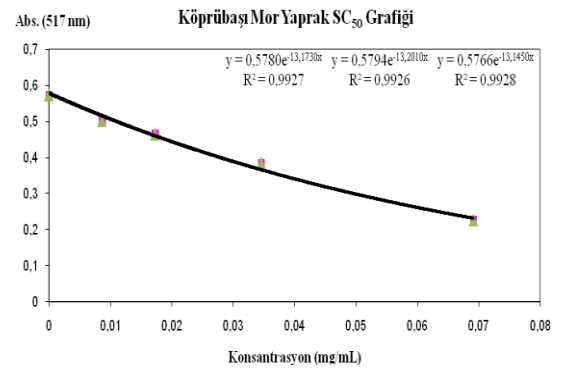
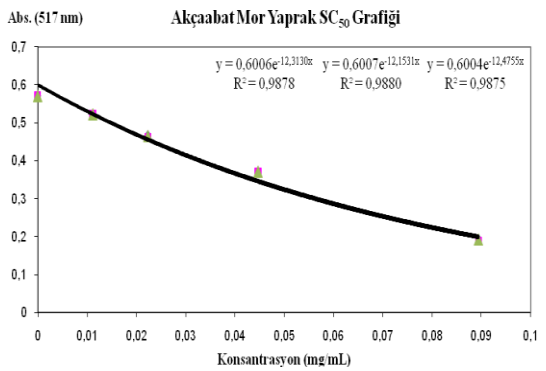
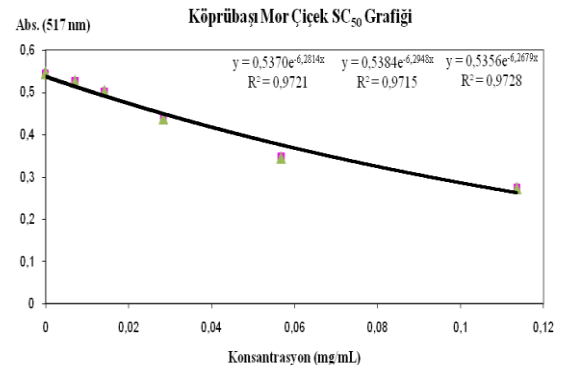
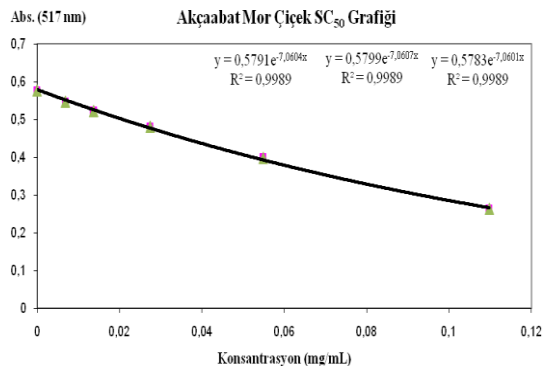
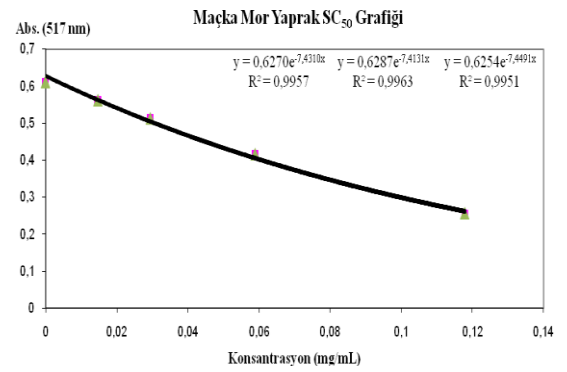
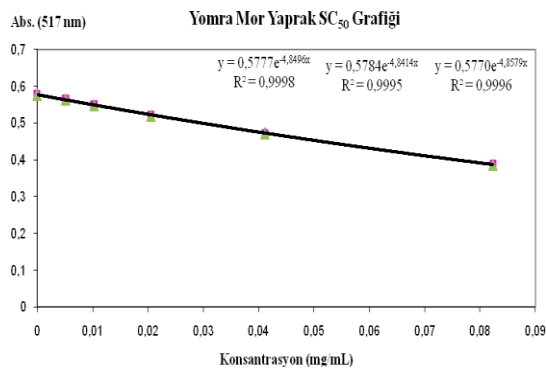
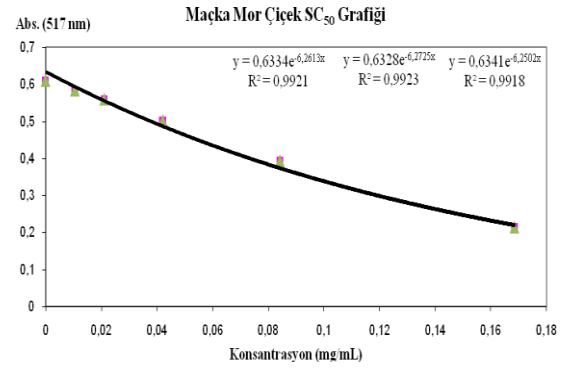
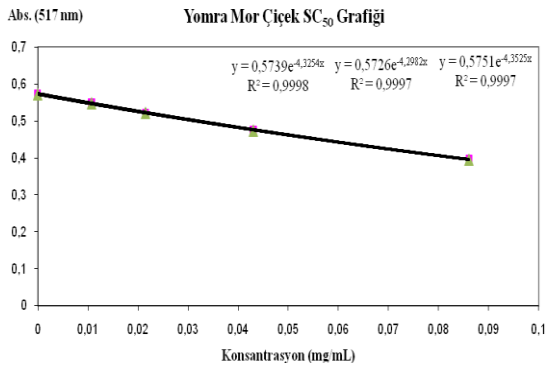
## Ek 6'nın devamı



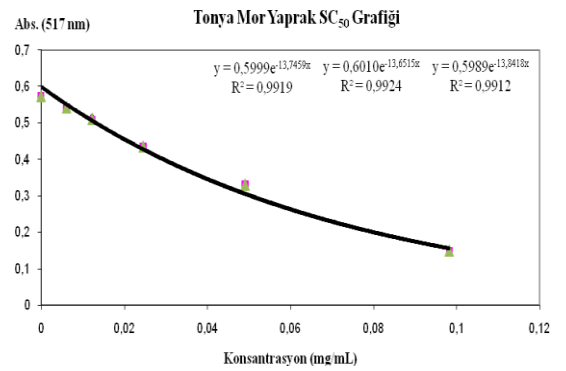
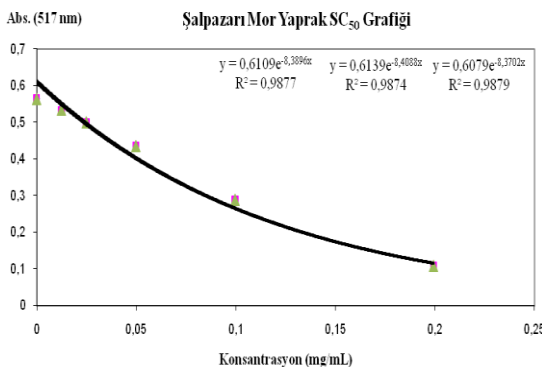
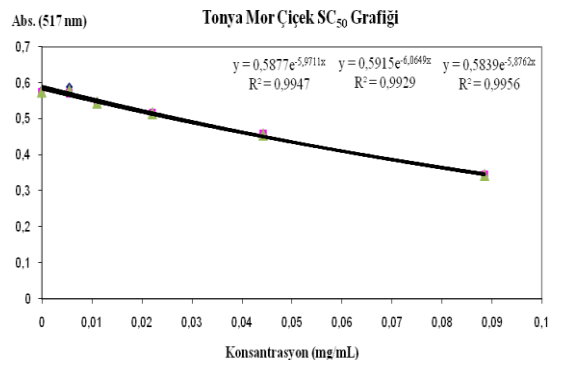
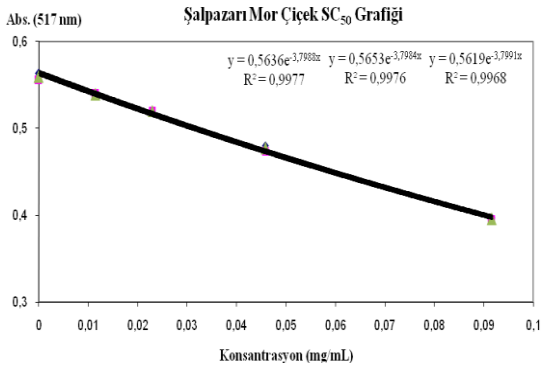
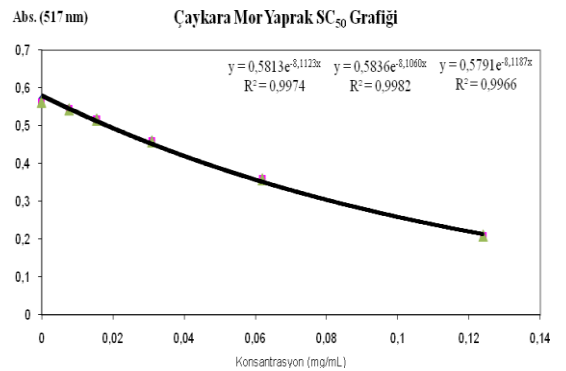
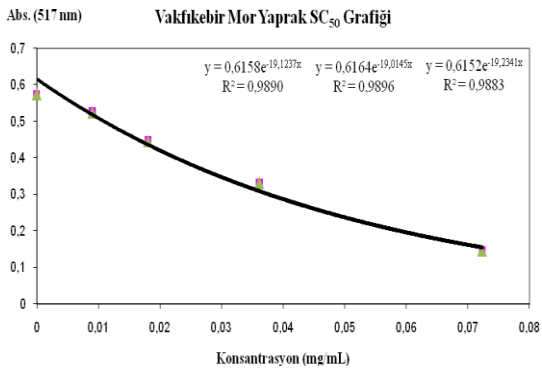
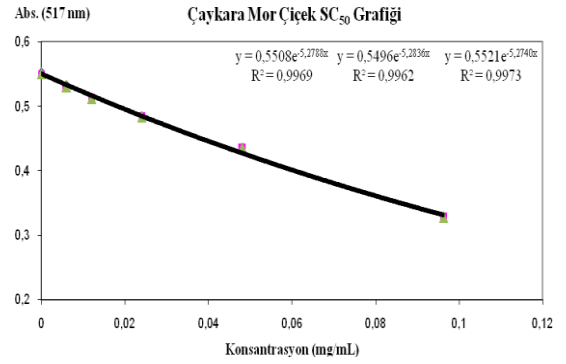
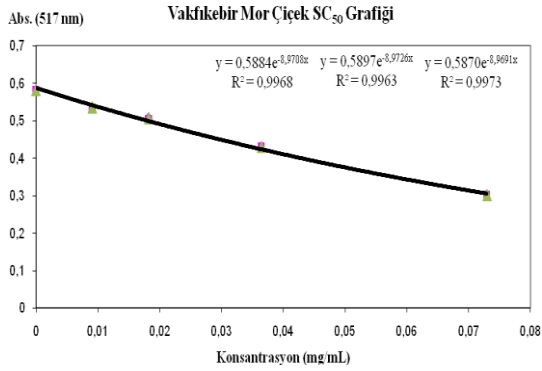
## Ek 6'nın devamı



## Ek 7. Orman Gülü Bitkileri DPPH SC<sub>50</sub> Grafikleri-Mor Çiçekli Bitkiler

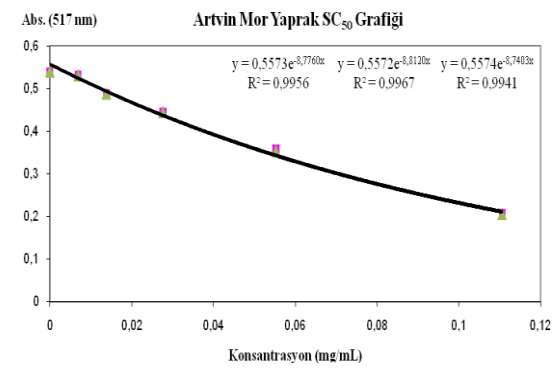
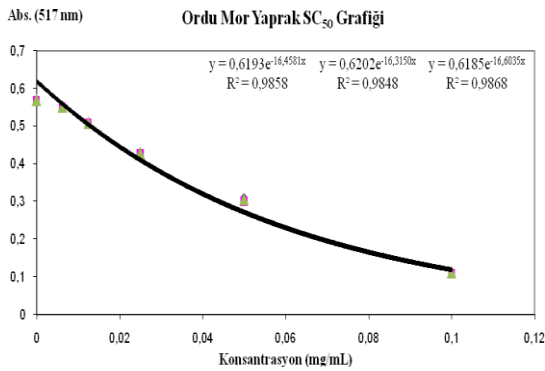
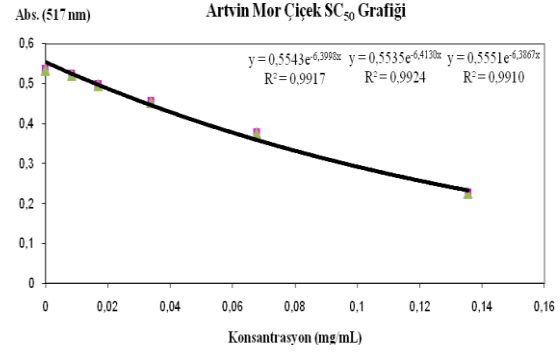
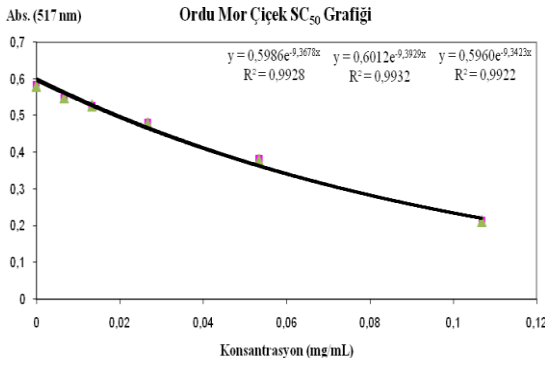
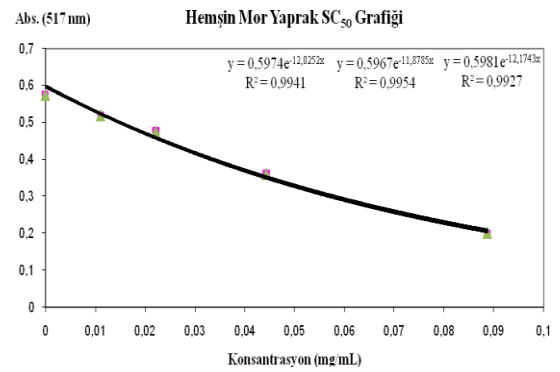
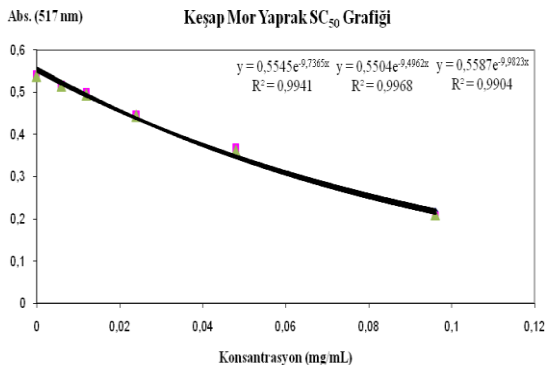
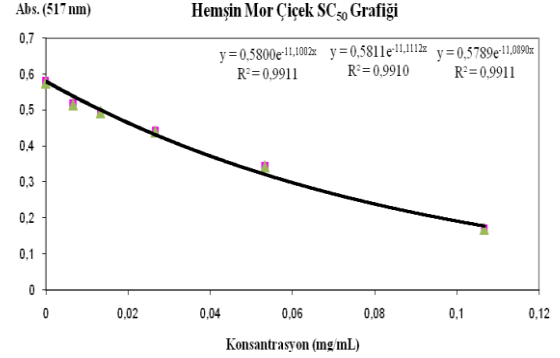
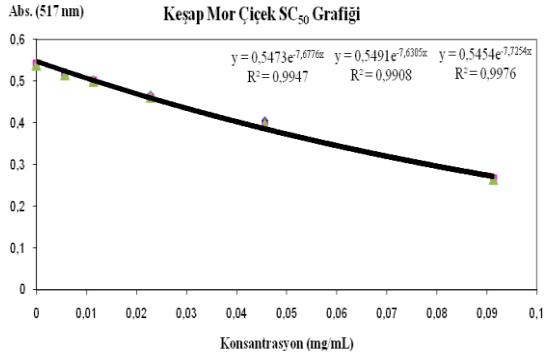


## Ek 7'nin devamı

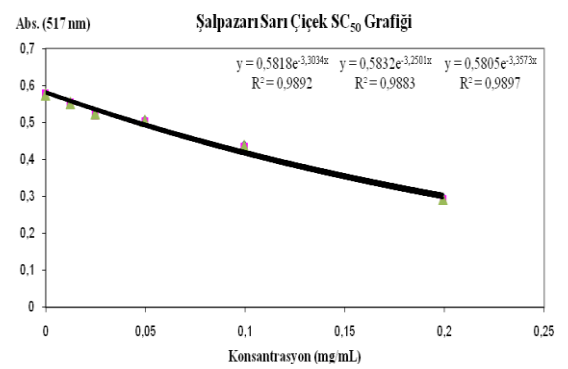
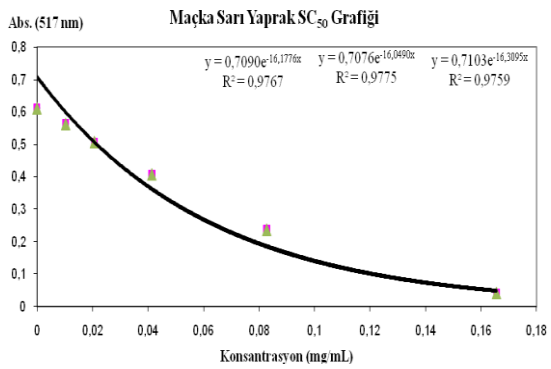
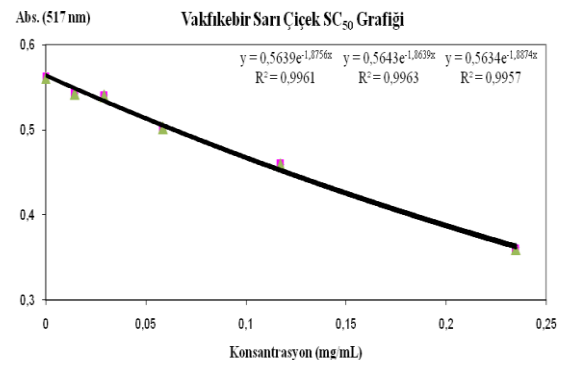
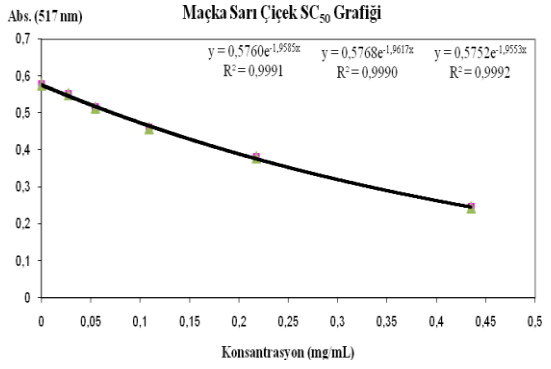
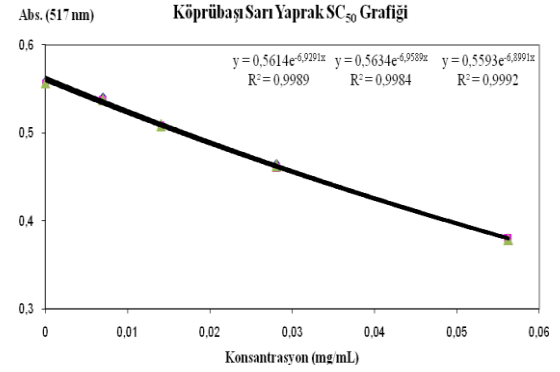
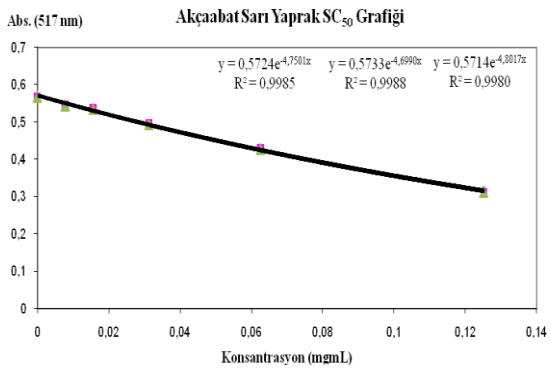
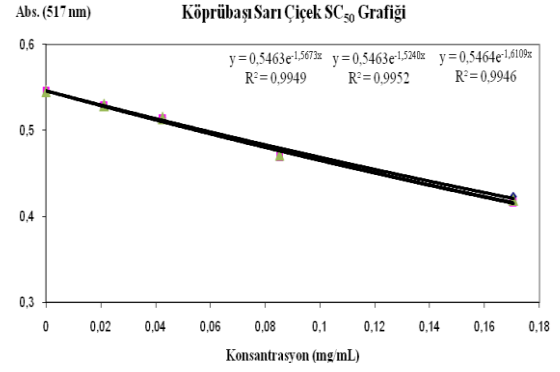
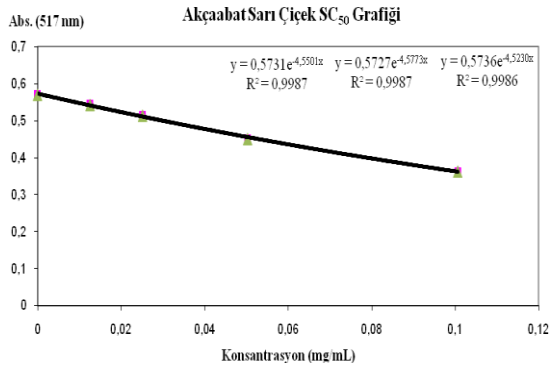




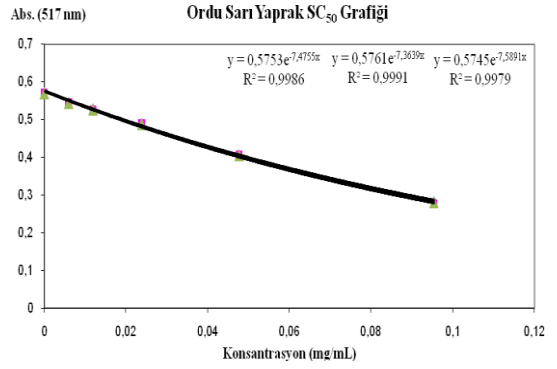
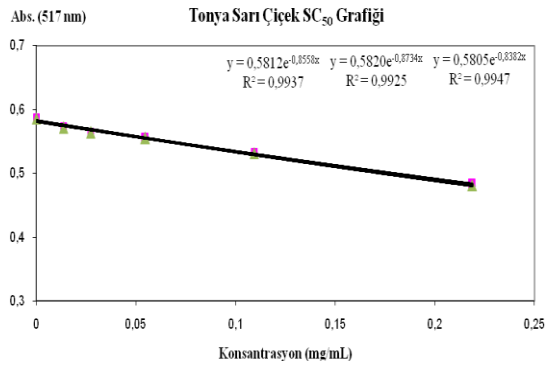
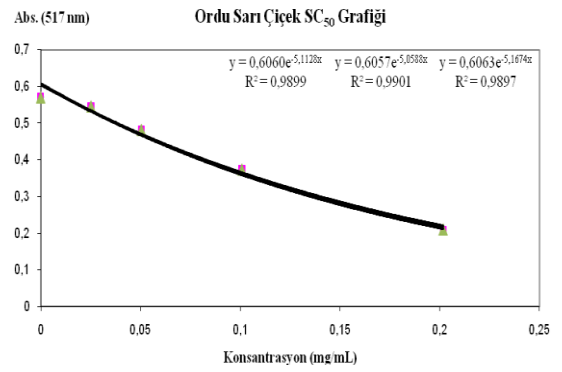
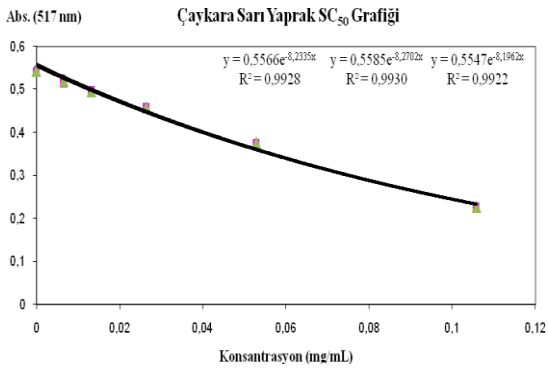
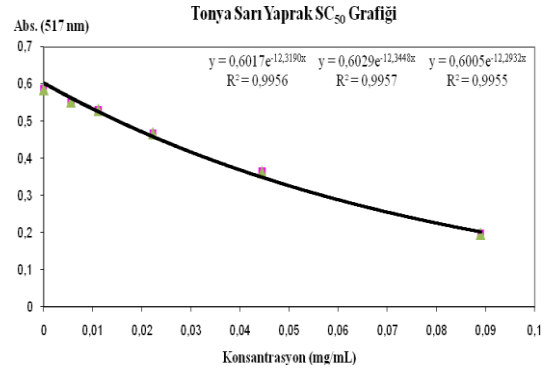
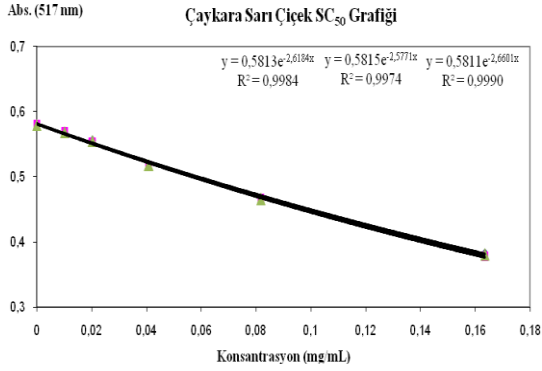
## Ek 7'nin devamı



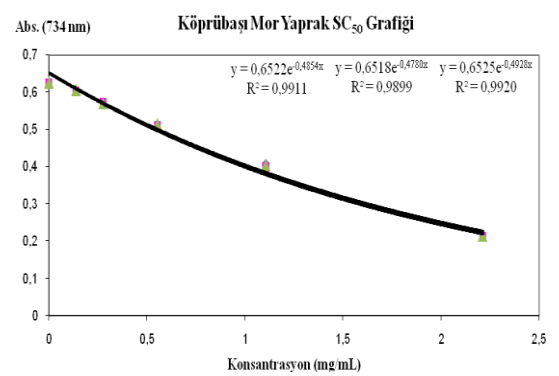
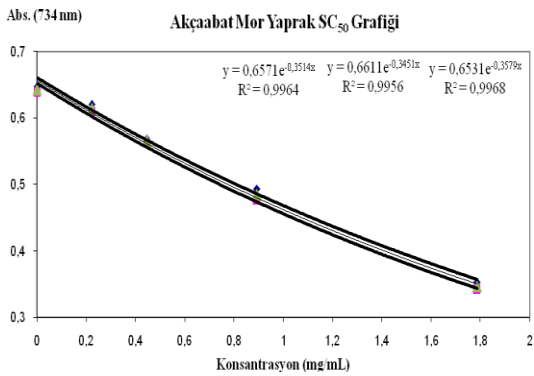
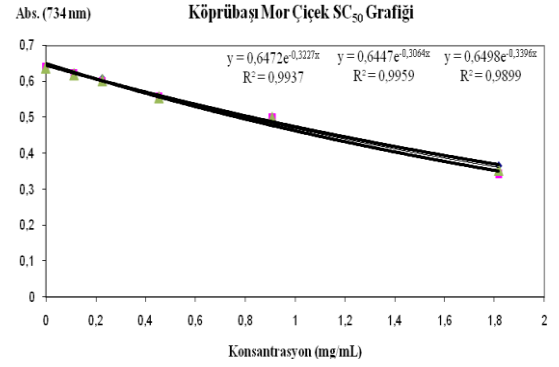
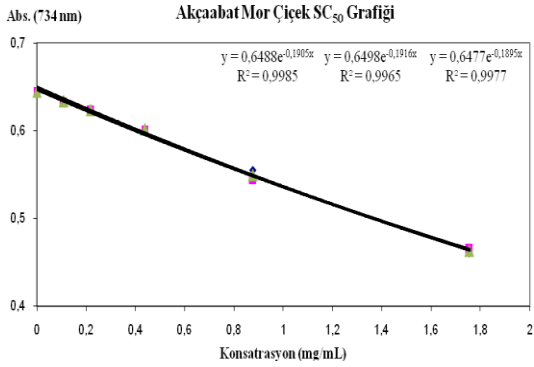
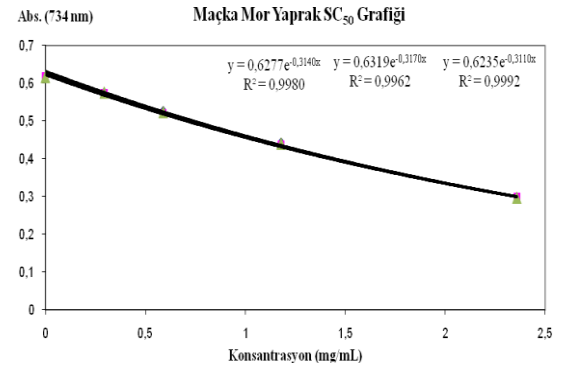
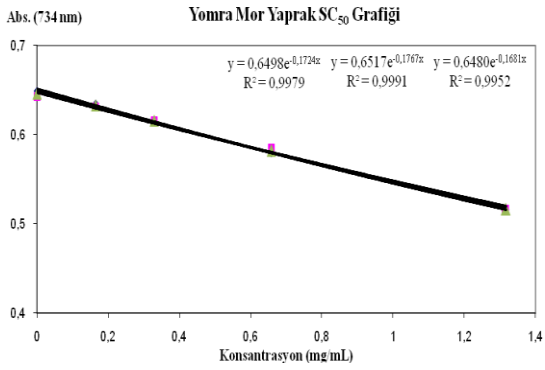
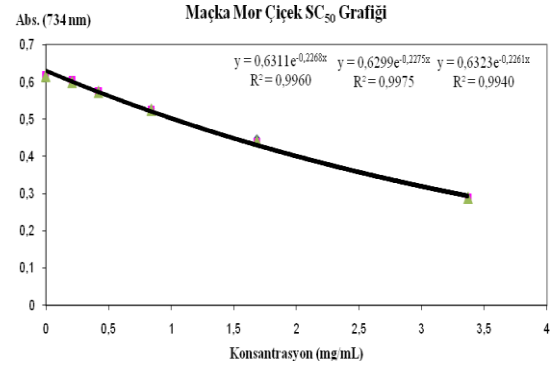
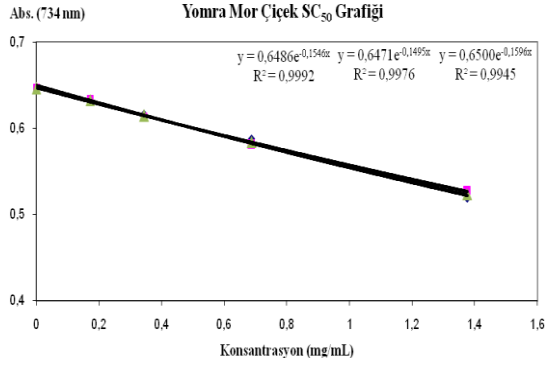
## Ek 8. Orman Gülü Bitkileri DPPH SC<sub>50</sub> Grafikleri-Sarı Çiçekli Bitkiler



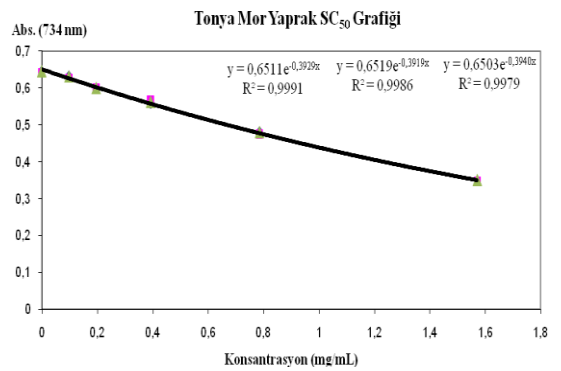
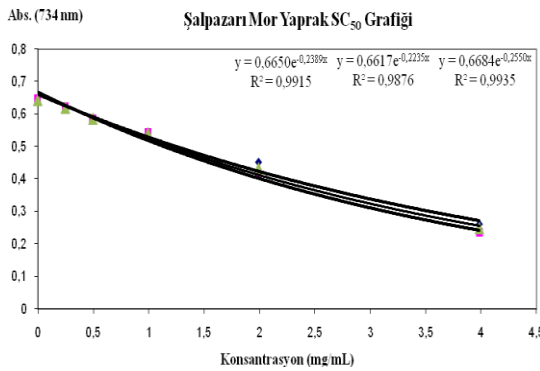
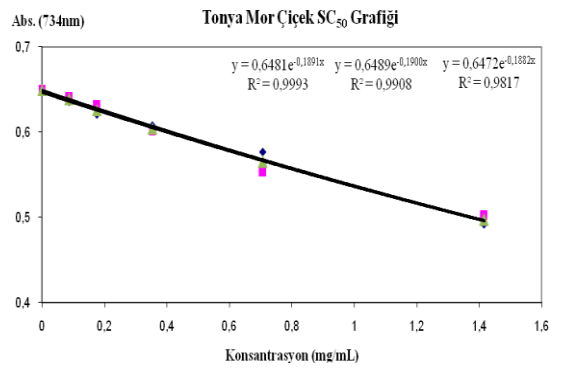
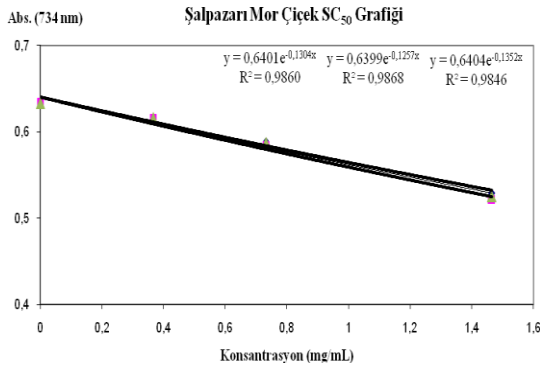
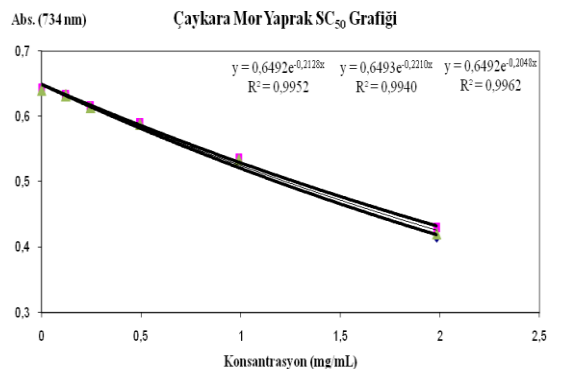
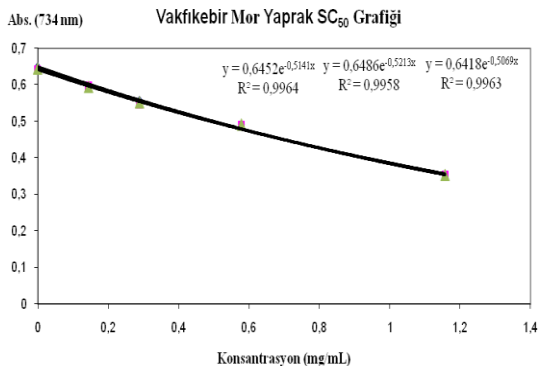
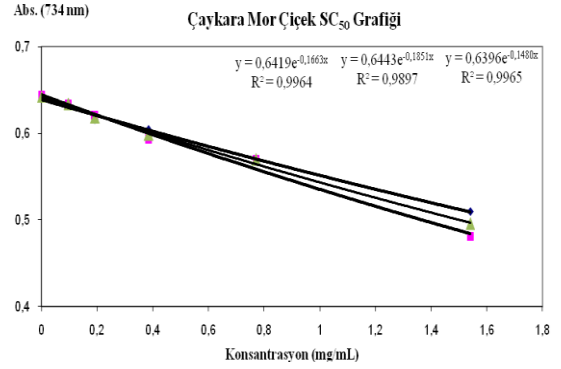
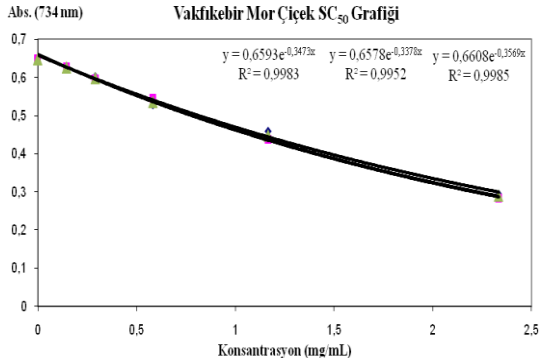
## Ek 8'in devamı



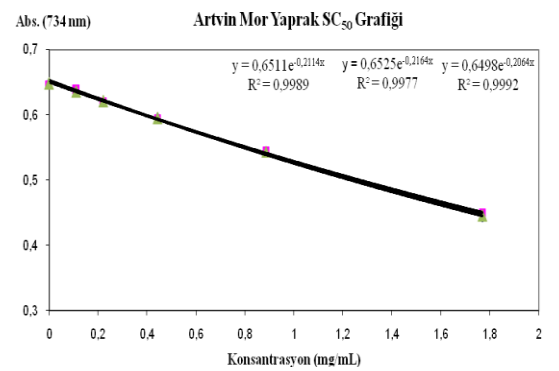
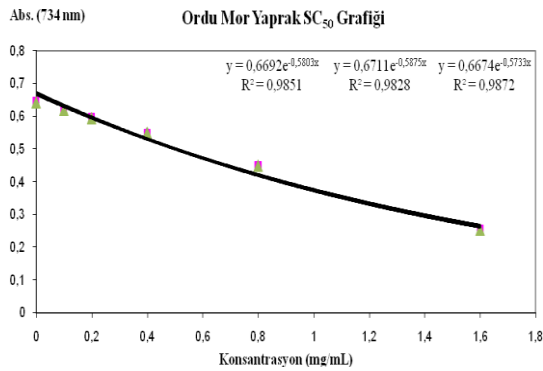
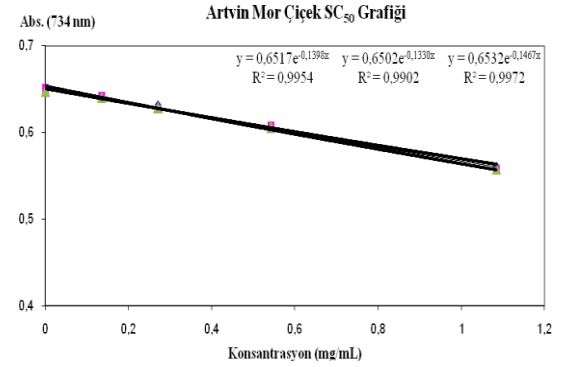
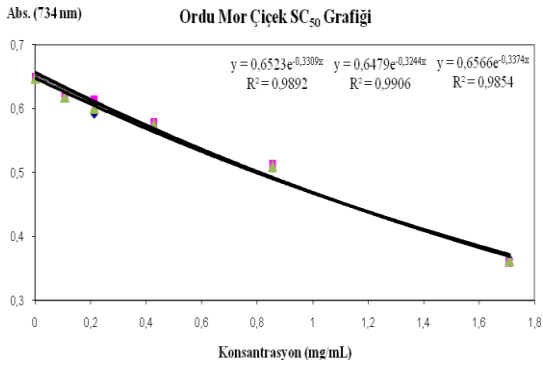
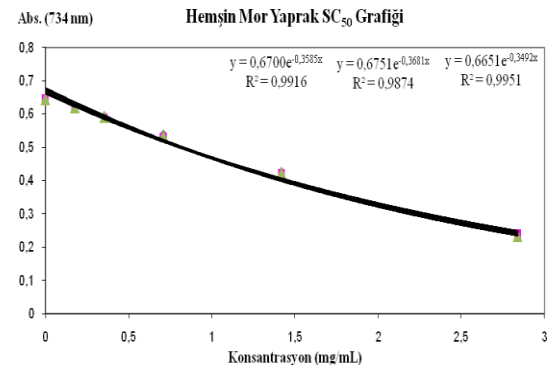
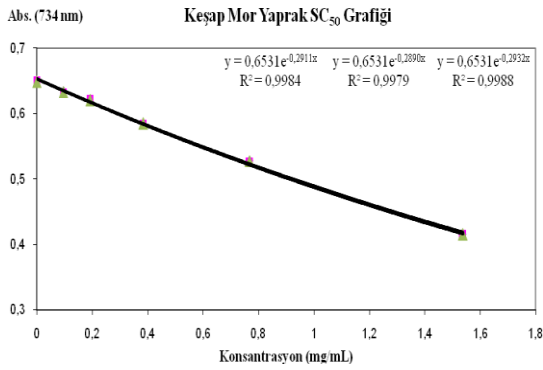
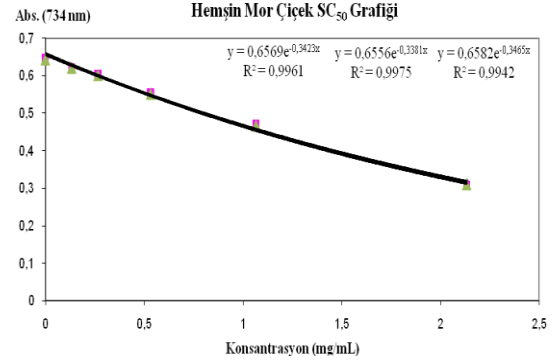
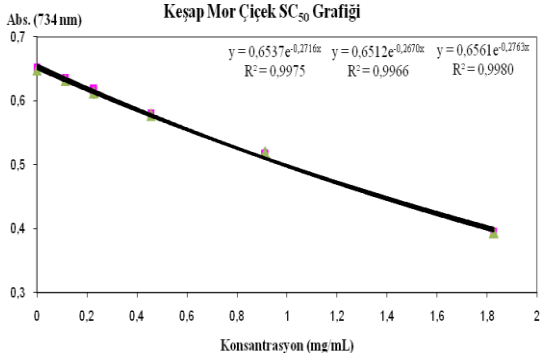
## Ek 9. Orman Gülü Bitkileri ABTS SC<sub>50</sub> Grafikleri-Mor Çiçekli Bitkiler



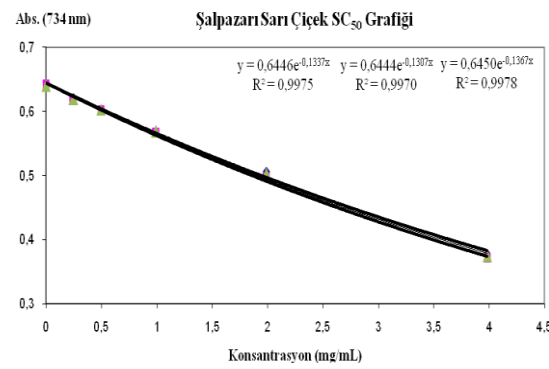
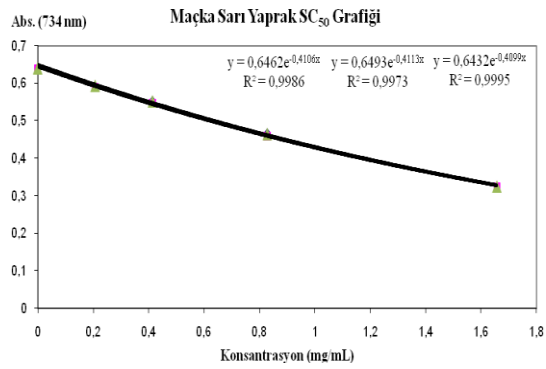
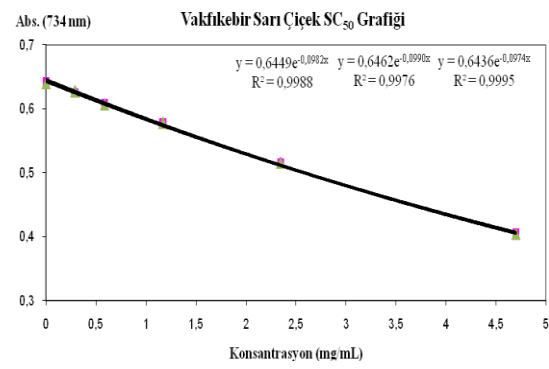
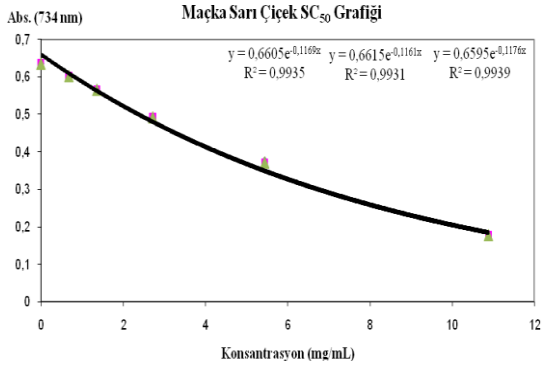
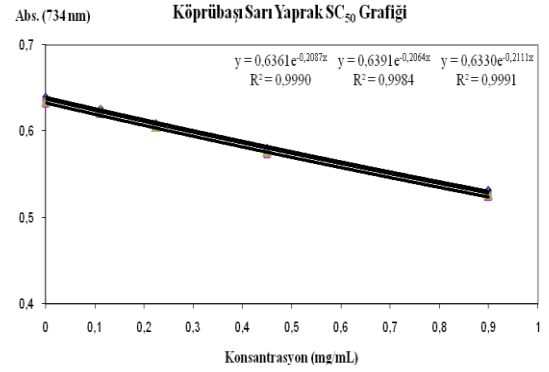
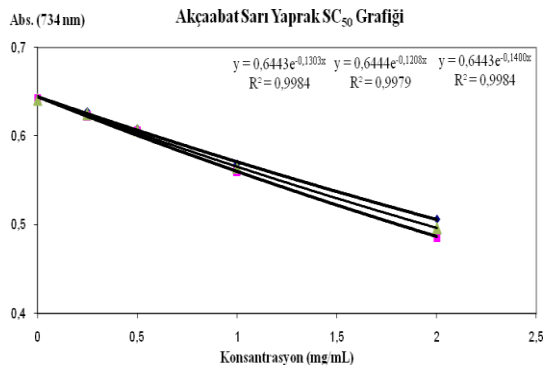
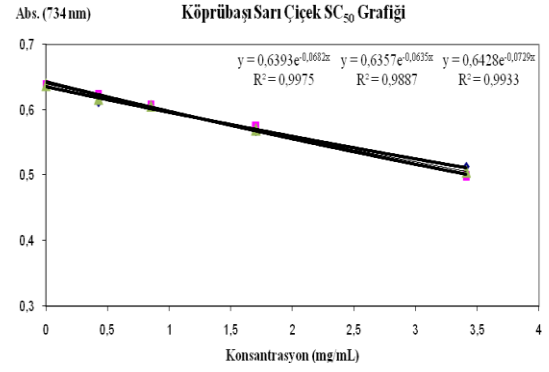
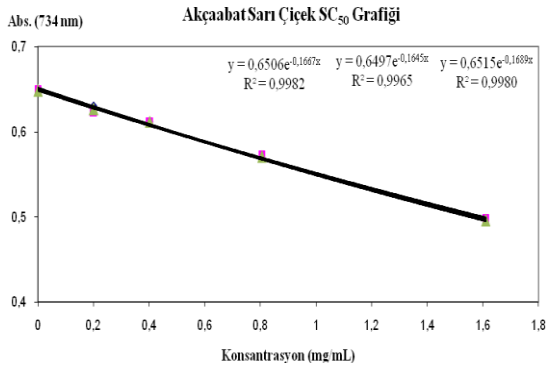
## Ek 9'un devamı



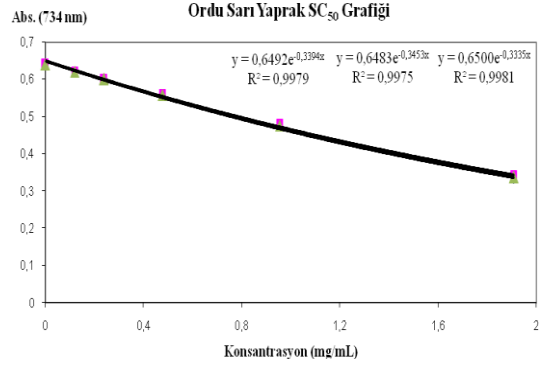
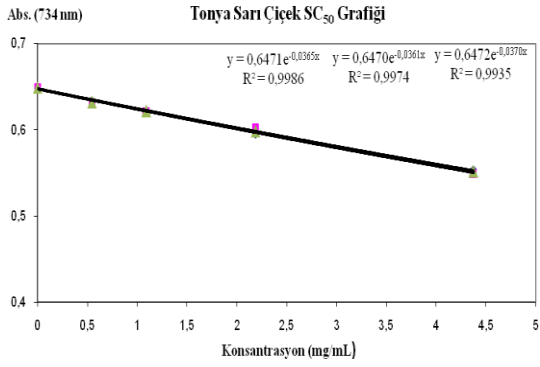
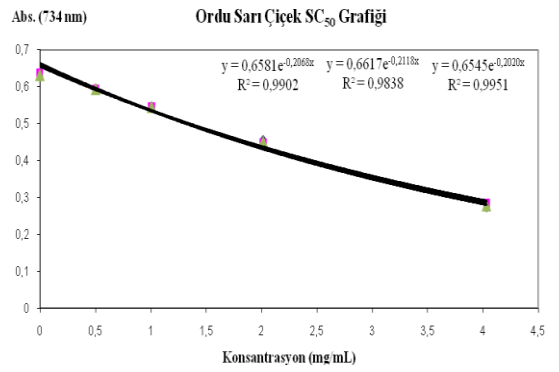
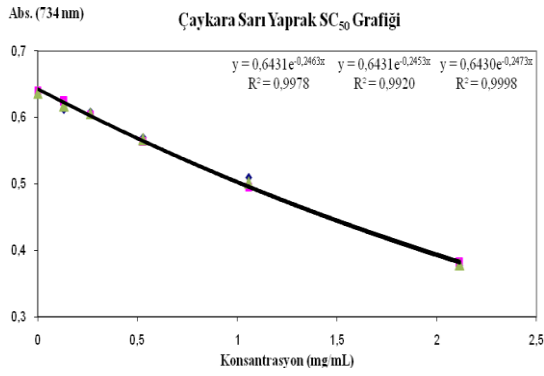
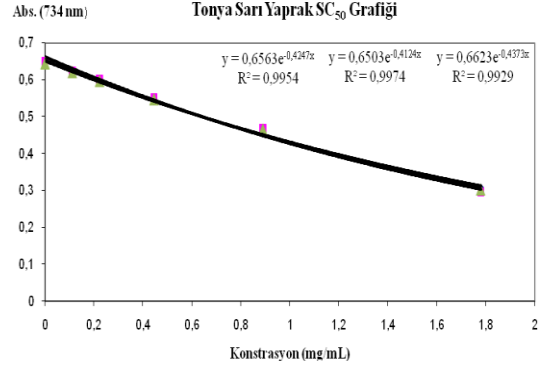
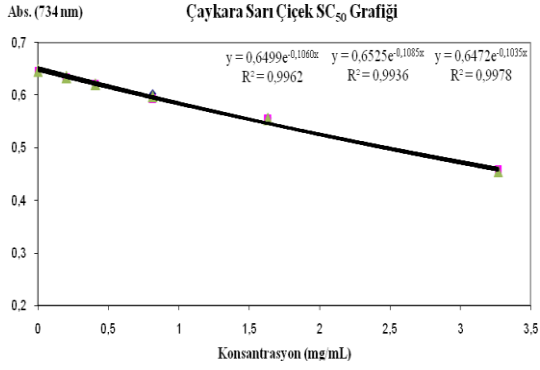
## Ek 9'un devamı



## Ek 10. Orman Gülü Bitkileri ABTS SC<sub>50</sub> Grafikleri-Sarı Çiçekli Bitkiler



## Ek 10'un devamı





## ÖZGEÇMİŞ

11.09.1984 tarihinde Sivas'ta doğdu. İlk ve orta öğretimini Ankara'da tamamladı. 2003 yılında K.T.Ü., O.F.M.A.E. Bölümü, Kimya Öğretmenliği programını kazandı ve 2008 yılında aynı bölümden tezsiz yüksek lisans derecesi alarak ikincilik payesiyle tamamladı. 2008 yılı güz döneminde K.T.Ü., Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya kürsüsünde doğrudan doktora eğitimine başladı. Doktora eğitimi süresince TÜBİTAK-BİDEB kapsamında yurt içi doktora burs programıyla desteklendi. 2009 yılında aynı kürsüde araştırma görevlisi olarak akademik çalışma hayatına atıldı. Doktora akademik hayatı boyunca, 16'sı SCI indeks kapsamına giren toplam 20 bilimsel makale çalışmasında, 35 ulusal ve 2 uluslararası sempozyum ya da kongre bildirisinde ve uluslararası camiada yayınlanan iki farklı kitabın 3 farklı bölümünde ismine yer vermiştir. Yabancı dili İngilizce'dir.