

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANZER BALI VE POLENİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ  
İLE FENOLİK BİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Esra ULUSOY**

**AĞUSTOS 2010  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANZER BALI VE POLENİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ İLE FENOLİK BİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ VE  
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ**

**Esra ULUSOY**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce  
"Doktor (Kimya)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.08.2010  
Tezin Savunma Tarihi : 25.08.2010**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2010**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır ve KTÜ Araştırma Fonu (Proje No: 2003.111.002.6) tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmada Rize Anzer yaylasından toplanan bal ve polenlerin RP-HPLC-UV ile fenolik bileşimleri incelenmiştir. Ayrıca bal ve polenlerin antioksidan aktiviteleri dört farklı antioksidan metot kullanılarak test edilmiştir.

Doktora tez çalışmam ve tüm akademik çalışmalarımda çalışma imkanlarından, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya yardımları ve çalışma boyunca göstermiş olduğu manevi desteği için en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gerek laboratuvar imkanlarından, gerekse bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme jürisi üyelerinden Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER ve Sayın Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e doktora tez izleme raporlarımın incelenmesi ve değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımdeki yardımları ve bana göstermiş oldukları destek için Doç. Dr. Ahmet ALVER, Yrd. Doç. Dr. Ahmet YAŞAR ve Arş. Gör. Emine AKYÜZ'e ve tüm Biyokimya Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Doktora süresince maddi destek gördüğüm TÜBİTAK Münir Birsal Vakfına teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bal ve polen örneklerinin temin edilmesinde yardımcı olan Çiçekli Köyü (Anzer) Tarımsal Kalkınma Kooperatifi'ne ve arıcılara, ayrıca Sayın Prof. Dr. Kadriye SORKUN'a teşekkür ederim.

Son olarak sabırlarından ve teşviklerinden dolayı sevgili aileme, eşime ve kızlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Esra ULUSOY  
Trabzon 2010

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Serbest Radikaller .....	3
1.3. Antioksidanlar .....	7
1.4. Fenolik Bileşikler .....	12
1.5. Kromatografi.....	19
1.5.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	20
1.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	22
1.5.2.1. Hareketli Faz Deposu ve Hareketli Faz .....	24
1.5.2.2. Pompa .....	25
1.5.2.3. Enjeksiyon Loopu .....	27
1.5.2.4. Kolonlar .....	28
1.5.2.5. Koruyucu Kolonlar .....	30
1.5.2.6. Kolon Fırını.....	30
1.5.2.7. Dedektörler.....	30
1.5.3. HPLC ile Miktar Tayini .....	33
1.5.4. İç Standart Kullanımı ve Seçimi .....	34
1.6. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu (SPE).....	35
1.7. Kullanılan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	39
1.7.1. Toplam Fenolik Madde Tayini .....	39
1.7.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP) Yöntemi .....	40
1.7.3. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi .....	41

1.7.4.	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi .....	43
1.8.	Bal ve Polen .....	43
1.8.1.	Balın Tarihçesi .....	43
1.8.2.	Balın Tanımı ve Bileşimi .....	44
1.8.3.	Balın Yararları.....	46
1.8.4.	Polen .....	48
1.9.	Literatür Özeti .....	50
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	57
2.1.	Kullanılan Cihazlar .....	57
2.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler .....	57
2.3.	Numuneler.....	58
2.4.	Antioksidan Aktivite Tayinleri .....	59
2.4.1.	Metanollü Ekstraktların Hazırlanması .....	59
2.4.2.	Toplam Fenolik Madde Tayini .....	59
2.4.3.	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (FRAP) Tayini .....	60
2.4.4.	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini .....	61
2.4.5.	DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi.....	62
2.4.6.	SC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması.....	63
2.5.	HPLC Analizleri .....	63
2.5.1.	Örnek Hazırlama .....	63
2.5.2.	Standartlar ve Kalibrasyon.....	64
2.5.3.	İç Standart Seçimi ve Kullanımı .....	64
2.5.4.	HPLC Çalışma Koşulları .....	65
2.5.5.	HPLC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi.....	65
2.5.6.	İstatistiksel Metot.....	66
3.	BULGULAR .....	67
3.1.	Antioksidan Aktivite Tayinleri .....	67
3.1.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	67
3.1.2.	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP) .....	69
3.1.3.	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) .....	71
3.1.4.	DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi.....	72
3.2.	HPLC Analizleri .....	74
3.2.1.	HPLC-UV Metot Geliştirme.....	74

3.2.2.	Fenolik Bileşiklerin Tayini İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi.....	76
4.	TARTIŞMA .....	85
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	94
6.	KAYNAKLAR .....	96
7.	EKLER.....	116
ÖZGEÇMİŞ		

## ÖZET

Bal insanlığın başlangıcından beri var olan çok kıymetli doğal bir ürün ve şifa kaynağıdır. Bileşimi ve buna bağlı olarak biyolojik özellikleri üretildiği bölgenin coğrafik ve floral özelliklerine bağlı olarak değişim göstermektedir.

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz bölgesine ait Anzer bal ve polenlerinin biyolojik aktif bileşenlerinin kompozisyonunun aydınlatılması ve antioksidan özelliklerinin tespit edilmesi amaçlandı. 17 adet fenolik bileşik standardı ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile analiz edildi. Tüm bal ve polen örneklerinin kateşin ve klorojenik asit hariç 15 adet fenolik bileşiğe değişen oranlarda sahip olduğu ve benzoik asit, kuersetin, *cis,trans*-absisik asit ve *trans*-sinnamik asitlerin ana fenolik bileşen olduğu tespit edildi.

Ayrıca Anzer bal ve polenlerinin antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan kuvveti (FRAP), bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi testleri kullanılarak tayin edildi. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardına göre tayin edildi. FRAP değerleri Trolox® eşdeğeri antioksidan güç (TEAP), CUPRAC değerleri Trolox® eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ve DPPH• radikali temizleme tayini sonuçları SC<sub>50</sub> olarak ifade edildi. Çalışılan tüm bal ve polenlerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları, özellikle polenlerin ballara göre yaklaşık 10-20 kat yüksek toplam fenolik madde içeriğine ve buna bağlı olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edildi.

Literatürdeki karışık çiçek balları ile karşılaştırıldığında Anzer yöresine ait bal örneklerinin, fenolik bileşiklerin gerek çeşitliliği ve gerekse de toplam miktarı bakımından daha zengin olduğu ve buna bağlı olarak antioksidanca zengin bir doğal ürün olduğu belirlendi. Yapılan çalışma, Anzer balının halk arasında şifa kaynağı olarak bilinmesinin nedeninin, yapısında bulunan çeşitli fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceğini doğrulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anzer, Bal, Polen, HPLC, Fenolik, Antioksidan

## SUMMARY

### **Determination of Phenolic Components of Anzer Honey and Pollen by High Performance Liquid Chromatography and Their Antioxidant Properties**

Honey is a very valuable product and a source of healing since mankind's beginning. Its composition and biological properties vary depending on the region's geographic and floral characteristics.

This study was aimed to elucidate the composition of the biologically active compounds and to determine the antioxidant properties of honey and pollens of Anzer region of Eastern Black Sea. Analyses of 17 phenolic compound standards were performed using reversed-phase high performance liquid chromatography. All honey and pollen samples have been found to have 15 phenolic compounds except catechin and chlorogenic acid, and benzoic acid, quercetin, *cis,trans*-abscisic acid, *trans*-cinnamic acid were found to be main phenolic compounds.

Furthermore, antioxidant activities of honey and pollens of Anzer were determined using total phenolic content, ferric (III) reducing antioxidant power (FRAP), cupric (II) reducing antioxidant capacity and DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity tests. Total phenolic contents were determined according to gallic acid standard. The results of FRAP, CUPRAC and DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity measurements were expressed as Trolox<sup>®</sup> equivalent antioxidant power (TEAP), Trolox<sup>®</sup> equivalent antioxidant capacity (TEAC) and SC<sub>50</sub>, respectively. It was determined that all investigated honey and pollen samples have antioxidant activity. Especially total phenolic content of pollen samples was approximately 10-20 times higher than that of honey samples, and accordingly pollen samples have higher antioxidant activity.

When compared with mixed flower honeys in the literature, honey samples of Anzer region were found to be richer in terms of both variety and the total amount of phenolics and accordingly it was concluded that they are a natural product rich in antioxidant. Presented study confirms the knowledge of Anzer honey known as a source of healing among people may be resulted from the phenolic compounds.

**Key words:** Anzer, Honey, Pollen, HPLC, Phenolic, Antioxidant



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Fenolik asitlerin temel kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2. Flavonoidlerin C6-C3-C6 iskelet yapısı .....	14
Şekil 3. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi .....	24
Şekil 4. Bir HPLC kolonu .....	29
Şekil 5. (a) Çeşitli ticari SPE kolon ve diskleri (b) Vakum manifoldu.....	37
Şekil 6. Katı faz ekstraksiyonunun temel prensibi.....	38
Şekil 7. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu.....	41
Şekil 8. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü .....	42
Şekil 9. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi .....	42
Şekil 10. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği .....	67
Şekil 11. Anzer balı örneklerinin toplam fenolik madde miktarları .....	68
Şekil 12. Anzer poleni örneklerinin toplam fenolik madde miktarları .....	68
Şekil 13. Trolox <sup>®</sup> kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği .....	69
Şekil 14. Anzer balı örneklerinin TEAC değerleri.....	71
Şekil 15. Anzer poleni örneklerinin TEAC değerleri.....	72
Şekil 16. Standartların HPLC kromatogramları.....	75
Şekil 17. Gallik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	76
Şekil 18. Protokatekuik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	76
Şekil 19. <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	77
Şekil 20. Kateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil 21. Klorojenik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil 22. Vanillik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	78
Şekil 23. Kafeik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	78
Şekil 24. Şiringik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	78
Şekil 25. Epikateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 26. <i>p</i> -Kumarik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	79
Şekil 27. Ferulik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	79
Şekil 28. Benzoik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	80

Şekil 29. Rutin standardına ait kalibrasyon eğrisi.....	80
Şekil 30. <i>o</i> -Kumarik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	80
Şekil 31. 2,4- <i>cis,trans</i> -Absisik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	81
Şekil 32. <i>trans</i> -Sinnamik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	81
Şekil 33. Kuersetin standardına ait kalibrasyon eğrisi .....	81

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Bazı radikaller ve reaktif türler .....	7
Tablo 2. Flavonoidlerin grupları ve bu gruplara ait bileşikler .....	16
Tablo 3. HPLC analizlerinde kullanılan fenolik bileşikler ve formülleri .....	18
Tablo 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması .....	21
Tablo 5. SPE adsorbanları.....	39
Tablo 6. Analizlerde kullanılan Anzer bal ve polenlerinin türleri .....	58
Tablo 7. Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler .....	60
Tablo 8. FRAP yöntemi için yapılan pipetlemeler .....	61
Tablo 9. CUPRAC yöntemi için yapılan pipetlemeler .....	61
Tablo 10. DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler .....	62
Tablo 11. HPLC analizlerinde kullanılan gradiyent program.....	65
Tablo 12. Anzer bal ve polenlerinin TEAP değerleri .....	70
Tablo 13. Anzer bal ve polenlerinin SC <sub>50</sub> değerleri.....	73
Tablo 14. Geliştirilen HPLC-UV metodunun parametreleri.....	75
Tablo 15. Anzer ballarında HPLC analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları.....	82
Tablo 16. Anzer polenlerinde HPLC analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları.....	83

## SEMBOLLER DİZİNİ

% BSS	: % Bağıl standart sapma
CUPRAC	: Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GC-MS	: Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GPX	: Glutatyon peroksidaz
GST	: Glutatyon-S-transferazlar
HCA	: Hidroksi sinnamik asitler
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Bikarbonat
HMF	: Hidroksimetilfurfural
HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Perhidroksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HONOO	: Peroksinitröz asit
HOCl	: Hipoklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	: İç Standart
LOD	: Dedeksiyon limiti
LOO <sup>·</sup>	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipid peroksit
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	: Süperoksit radikalik anyonu
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet oksijen
OH <sup>·</sup>	: Hidroksil radikali
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit anyonu
NO <sup>·</sup>	: Nitrozo radikali
NO	: Azot monoksit (nitrik oksit)
NO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	: Azot dioksit radikali

<i>p</i> -HBA	: <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit
PN	: Pik normalizasyonu
RP	: Ters Faz
SC <sub>50</sub>	: % 50 Temizleme konsantrasyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
TEAP	: Trolox <sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç
TEAC	: Trolox <sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan kapasite
TFA	: Trifloro asetik asit
TPTZ	: Tripridilriazin
Trolox <sup>®</sup>	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Aerobik solunumun temel gereği olan oksijen, oksidasyon sırasında hücreye büyük zararlar verebilir. Vücuda giren oksijen, oksidasyon sırasında bir yandan enerji üretirken bir yandan da serbest radikaller adı verilen molekülleri oluşturur. Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif ve kısa ömürlü bileşiklerdir. Reaktif oksijen türleri insan vücudunda normal metabolik prosesler sonucunda sürekli olarak üretilmektedir (Langseth, 1995). Serbest radikalleri oluşturan kaynakların başlıcaları; radyasyon, virüsler, ultraviyole ışınlar, petrokimya ürünleri, herbisit ve pestisitler, fosil kökenli yakıtların yanması sonucu oluşan ürünler, sigara dumanı ve strestir. Serbest radikal mekanizmasının kanser, damar tıkanıklığı, şeker hastalığı, sıtma, rheumatoid arthritis ve nörodejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığın patolojisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tsao ve Deng, 2004; Halliwell, 2002). Oksijen kaynaklı olan reaktif radikallerin hücrede aşırı miktarda oluşmaları "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Bu olay, tüm hücre bileşenleri (karbohidratlar, proteinler, yağlar) üzerinde tahrip edici etkiye sahiptir.

Organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Canlılar sahip oldukları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri sayesinde kendilerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumaktadır (Thomas,1995; Blomhoff, 2005). Fakat bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, oksidan/antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulması sonucu oksidatif stres gelişimine neden olmaktadır (Fang vd., 2002). Antioksidanlar, hücreye zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonu durduran ve böylece vücudumuzdaki hayati bileşenlerin zarar görmesini engelleyen moleküllerdir. Son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlaması nedeniyle besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır (Koleva vd., 2002; Wettasinghe ve Shahidi, 1999).

Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel alifatik veya aromatik organik moleküller olup askorbik asit, tokoferol, karotenoidler ve fenolik bileşikler bunların önemli sınıflarını oluşturur (Rice-Evans vd., 1997; Shahidi, 2000; Kaur ve Kapoor, 2001; Pellegrini vd., 2003; Tsao ve Deng, 2004; Koca ve Karadeniz, 2005; Orman ve Bağdatlıoğlu, 2005; Nichenametla vd., 2006; Perera ve Yen, 2007). Gıdalarda doğal olarak bulunan antioksidan moleküller serbest radikal bağlayıcı, indirgen ajan, metal şelatlayıcı veya singlet oksijen tutucu mekanizmalardan bir veya birkaçı yoluyla antioksidan etkilerini göstermektedir (Collins 2005; Lee vd., 2004). Tükettiğimiz gıdalardaki antioksidan bileşenlerin fizyolojik etkilerinin kolay, hızlı ve ucuz ölçüm yöntemleri antioksidan kapasite tayinleri ile mümkündür (Huang vd., 2005; Fernandez-Pancho vd., 2008) ve bu amaçla çok sayıda ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en yaygın kullanılanlar ORAC (oksijen radikal absorban kapasitesi), FRAP (demir (III) indirgeme antioksidan kapasite), TEAC (Trolox® eşdeğer/antioksidan kapasite), DPPH ve Folin-Ciocalteu yöntemleridir (Ou vd., 2002; Prior vd., 2005, Tabart vd., 2009; Pellegrini vd., 2003; Tsao ve Deng, 2004; Roginsky ve Lissi, 2005; Huang vd., 2005; Özgen vd., 2006; Saura-Calixto ve Goni, 2006). Araştırmacılar farklı metotların geniş çapta farklı sonuçlar vermesinden dolayı gıda kaynaklı antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde tek bir metodun yeterli olmayacağını bildirmişlerdir (Frankel ve Meyer, 2000; Tsai vd., 2002; Huang vd., 2005; Li vd., 2008; Hu ve Kitts, 2005).

Gıda, bitki ve ilaçların kimyasal bileşimlerinin incelenmesi amacıyla kromatografik teknikler sıkça kullanılmaktadır ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) de bu amaçla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. HPLC gıda ve bitkilerdeki amino asit, şeker, fenolik bileşikler, steroller ve vitaminler gibi bileşimlerinin incelenmesi ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (URL-1, 2010; Proestos vd., 2007; Jedrzejczuk vd., 2001).

Bal ve polen antioksidan kapasitesi yüksek birer doğal üründür. Antioksidan kapasiteleri toplandıkları bölgenin coğrafik özelliklerine, bitki florasına, üretim tekniklerine vs. bağlı olarak değişim göstermektedir. Halk arasında Anzer yöresine ait balların şifa kaynağı olduğu öteden beri bilinmektedir. Kuzeydoğu Anadolu'da yer alan Anzer bölgesi balıyla Türkiye'de ve Dünyada çok meşhurdur. Anzer balının diğer ballardan daha fazla sağlık faydaları olduğuna inanılmaktadır ve bu nedenle çok yüksek fiyatlara alıcı bulmaktadır. Bal üreticileri ve tüketicileri Anzer balının karaciğer hastalıkları, mide- bağırsak hastalıkları ve bazı cilt hastalıklarında tedavi edici olduğunu

ifade etmektedirler. Anzer balının şifa özelliğinin Anzer yaylasının zengin bitki florasından ileri geldiği düşünülmektedir. Yaklaşık 80 civarı endemik tür içeren ve 500'den fazla farklı çiçeğe sahip floral orijiniyle alakalı olduğu düşünülmektedir (URL-2, 2009). Aynı bölgede üretilen Anzer polenlerinin ise vitamin, mineral ve proteince zengin olmasının yanı sıra kansızlık olmak üzere pek çok hastalıktan koruyucu etkilerinin olduğu ifade edilmektedir.

Doğu Karadeniz Bölgesinin önemli bitki florasına sahip Anzer yöresine ait bal ve polenlerin biyolojik etkinliğinden sorumlu ajanların neler olduğu konusunda bilimsel araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle planlanan çalışmada Anzer bal ve polenlerinin biyolojik değerlerinden sorumlu bazı fenolik bileşiklerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile aydınlatılması ve in vitro olarak antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma ile Anzer ballarının diğer çiçek ballarından fenolik bileşenler yönünden farklı olup olmadığının ortaya çıkarılması planlandı. Farklılık bulunması durumunda yapılan çalışma Anzer balının otantik yapısının belirlenmesinde öncü rol oynayacak ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

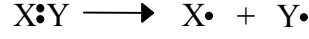
## 1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerinin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Oldukça kısa ömürlü (yaklaşık  $10^{-5}$  s) ve son derece reaktiftirler, yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmıştır. Bugün radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı artık iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücresel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlayt, 1999). Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X-ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Sies, 1991). Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup, hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezinde ve birçok organizmanın antibakteriyel savunmasında gereklidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).



Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler:

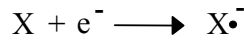
1- Kovalent bağlı bir molekülün homolitik parçalanması: Bağlı oluşturan elektron çiftinden her biri birer atom tarafından alınır ve yüksüz atom ya da atom grupları oluşur.



2- Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya heterolitik bölünme:



3- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:

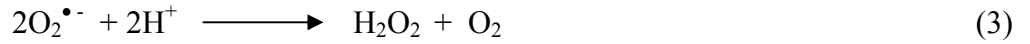
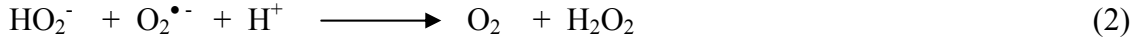


Serbest radikalleri, oksijen içeren ve oksijen içermeyen olmak üzere sınıflandırmak mümkündür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektron bulundurması, onun serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girmesini sağlar. Bu nedenle biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen radikalleridir. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek en son elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgenmediği reaksiyonlarda son ürün daima sudur. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), üç elektron almasıyla ise hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) radikali oluşmaktadır (Winston, 1991; Matés vd., 1999).

Oksijen merkezli radikaller; süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve lipid peroksil radikalidir ( $LOO^{\cdot}$ ). Oksijen merkezli radikal olmayanlar ise; hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ) ve singlet oksijendir ( $^1O_2$ ). Nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ), nitrik dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ ) ve peroksinitrit gibi nitrojen türleri ise diğer reaktif nitrojen/oksijen türleri arasında yer almaktadır (Günaydın ve Çelebi, 2003; Lee vd., 2004).

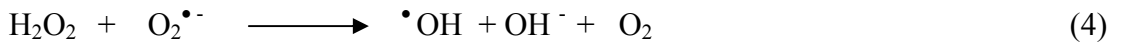
Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelen radikaldir (1). Süperoksit radikali, bir eşleşmemiş elektron içerdiğinden ne çok fazla reaktif, ne de güçlü bir oksidandır. Daha çok  $O_2^{\cdot-}$  veya  $O_2^{\cdot-}$  anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur. Fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunun yanında pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell vd., 1992).

Süperoksit radikali, diğer radikallere nazaran daha az toksik etkiye sahiptir. Çünkü bu radikal, hücre membranından yüklü olduğu için doğrudan geçemez. Ancak eritrosit membranlarındaki anyon kanalından  $\text{Cl}^-$  ve  $\text{HCO}_3^-$  iyonlarının yer değiştirmesiyle geçebilmektedir. Süperoksit radikalının esas zararlı etkisi onun protonlanmasıyla meydana gelmektedir. Protonlanma ile çok daha aktif bir radikal olan perhidroksil radikali ( $\text{HO}_2^-$ ) meydana gelir. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde biri yükseltgenirken diğeri indirgenir (2). Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu ise oksijen molekülü ve hidrojen peroksit meydana gelir (Fridovich, 1975). Süperoksit radikali hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir (Lee vd., 2004).

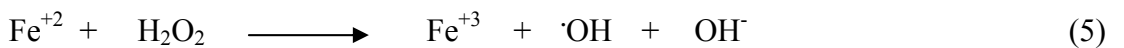


Serbest radikaller içerisinde hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), en reaktif molekül olup, diğer kimyasal türlerle sıklıkla reaksiyona girmektedir. Bu radikal, hücrelerde mevcut olan tüm organik yapılara saldırabilme yeteneğine sahiptir. Hidroksil radikali iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle de oluşturulabilir ve muhtemelen x-ışını ve  $\gamma$ -ışınlarıyla hücrelerin ölmesine sebep olan en temel türlerden biridir. Bu radikal kimyasal olarak süperoksit ve peroksit radikalleri arasındaki reaksiyonla da üretilebilir. Dolayısıyla süperoksit ve peroksitin aynı anda üretildiği canlı sistemlerde hidroksil radikalının biyokimyasal oluşumu da mümkündür.

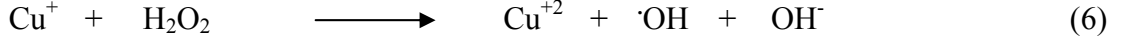
Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde doğrudan çeşitli radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalını oluşturur (4).



$\text{H}_2\text{O}_2$ 'deki O-O bağının homolitik parçalanması iki hidroksil radikali verir. Homoliz ısıyla ya da iyonize edici reaksiyonla (ışıkla) gerçekleştirilir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve Fe (II) tuzunun karışımı hidroksil radikalını verir (Fenton reaksiyonu) (5).

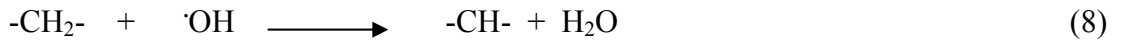
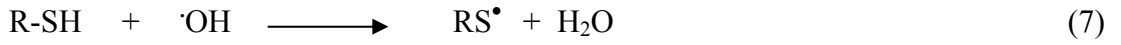


Bakır (I) tuzları, Fe (II) tuzlarına göre çok daha hızlı olarak hidroksil radikalleri vermek üzere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girer (6).

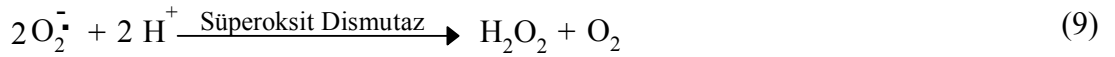


Hidroksil radikali amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve sekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Hidroksil radikalının reaktivitesi oldukça yüksek ve yarılanma ömürleri çok kısadır. Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipit peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipitlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırarak hücre ölümüne sebep olabilir (Balcı, 2007; Turna, 2008).

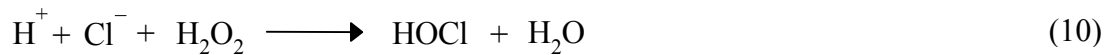
Canlı sistemlerde oluştukları anda yakınlarındaki biyolojik molekül ile derhal reaksiyona girerler. Proteinlerde sülfhidril gurupları (7) ve yağ asitleri (8) bu radikallerin etkisinde kaldıklarında çeşitli reaktiviteye sahip ikincil radikaller verirler.



Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit kolayca hücre içerisine girebilir ve hem gruplarında Fe<sup>+2</sup>'in yapısına girerek bunları güçlü oksitleyici durumlarına getirebilmektedir.



Ayrıca hidrojen peroksit reaktif bir ürün olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturmaktadır (10) (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Asad vd., 2004).



Tablo 1. Bazı radikaller ve reaktif türler (Ak Tuba, 2006)

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller	Formülü	Radikalik olmayanlar	Formülü
Süperoksit	$O_2^-$	Hidrojenperoksit	$H_2O_2$
Hidroksi	$OH\bullet$	Hipoklorikasit	$HOCl$
Peroksi	$ROO\bullet$	Hipobromikasit	$HOBr$
Alkoksi	$RO\bullet$	Ozon	$O_3$
Hidroperoksi	$HOO\bullet$	Singlet oksijen	$\Delta O_2$
Reaktif Azot Türleri			
Radikaller	Formülü	Radikalik olmayanlar	Formülü
Nitrikoksit	$NO\bullet$	Nitröz asit	$HNO_2$
Nitrojen dioksit	$NOO\bullet$	Nitrozil katyonu	$NO^+$
		Nitroksil anyonu	$NO^-$
		Dinitrojen tetraoksit	$N_2O_4$
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitroz asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	$NO_2^+$
		Alkilperoksi nitritler	$ROONO$

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri ( $L\bullet$ ) ve lipit peroksit radikallerinin ( $LOO\bullet$ ) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali ( $L\bullet$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin ( $L\bullet$ ) moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ( $LOO\bullet$ ) oluşur. Lipit peroksit radikalleri ( $LOO\bullet$ ), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipitperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

### 1.3. Antioksidanlar

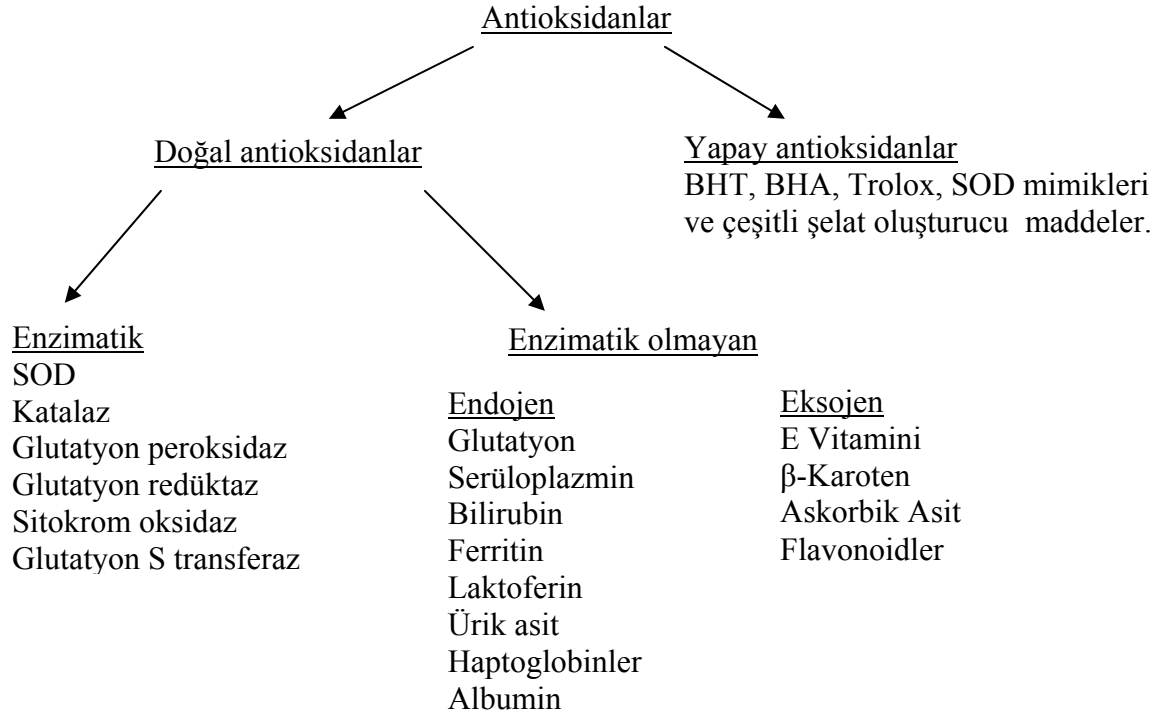
Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça çabuk reaksiyonlara girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun

ilerlemesini önleyen maddeler ise antioksidan olarak tanımlanırlar. Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler.

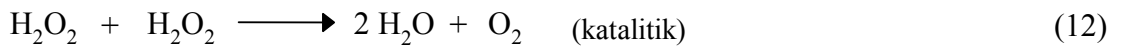
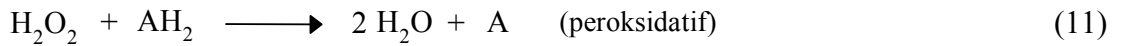
Antioksidan savunma çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedir. Bu mekanizmalar:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi (scavenging/temizleyici etki): Oluşmuş serbest radikalleri tutar veya oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler ve yeni radikal oluşumunu engellerler. Örnek olarak SOD ve glutatyon peroksidaz enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinler verilebilir.
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (quencher/giderici etki): Serbest radikallerle birleşip, onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini söndüren bileşiklerdir. Örnek olarak vitamin C-askorbat, vitamin A,  $\beta$ -karoten, vitamin E,  $\alpha$ -tokoferol, flavonoidler ve antosiyanidinler verilebilir.
3. Hücre deformasyonunun onarılması (repair/tamir edici etki): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir.
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması (chain breaking/zincir kırıcı etki): Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Vitaminler, ürik asit, bilirubin, albumin, hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması

Antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olarak ikiye ayrılırken doğal antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar ise endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılabilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir.



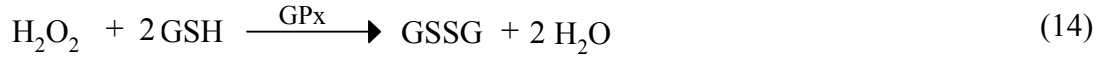
Katalaz (KAT)  $H_2O_2$  oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (11) veya  $H_2O_2$  oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime (12) ile hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) dismutasyonundan sorumlu bir enzimatik antioksidan olup etkinliğini hücre içinde gösterir. (Mates, 1999; Halliwell vd., 1992). Örneğin dört hem grubu bulunan bir hemoprotein olan ve her alt birimin molekül ağırlığı 60 kDa olan katalaz, aerobik solunum veya başka yollarla oluşan hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürerek zararlı etkisinden organizmayı korur. Katalaz, hidrojen peroksit, metil etil hidroperoksitleri küçük molekül ağırlıklı molekülleri etkilerken büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerini etkilemez (Mates, 1999).  $H_2O_2$  oluşturan enzimlerin çoğunun peroksizomlarda bulunmasından dolayı, katalaz en fazla peroksizomlarda lokalizedir.



Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumludur (13). Normalde metabolizma sırasında hücreler tarafından fazlaca süperoksit üretilmesine rağmen SOD sayesinde intrasellüler düzeyleri düşük tutulur.



Glutasyon peroksidaz (GPx) hücre içinde düşük konsantrasyonda oluşan peroksit ürünlerinin dismutasyonundan sorumlu tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Mitokondride de düşük düzeylerde bulunur. Bu enzim sitozolik hasara karşı etkin koruyucu bir mekanizma sağlar, GSH'yi kullanarak  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i ve lipid peroksitlerinin redüksiyonunu katalizler (14 ve 15) (Halliwell, 1994).



Glutasyon redüktaz (GR) NADPH varlığında yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş hale (GSH) çevirir (16). Alyuvarlarda cereyan eden pentoz fosfat yolu reaksiyon için gerekli olan NADP'yi sağlar (Murray, 1998).



Glutasyon S transferaz (GST)'lar iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. Genel olarak 3 sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. GST sisteminin sülfür atomu üzerinden elektrofillere glutasyonu aktaran enzimlerdir. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutasyondaki sisteine ait  $-\text{SH}$  grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler (17):



Solunum zincirinin son enzimi olan mitokondriyal sitokrom oksidaz, süperoksit radikallerini detoksifiye eder (18).



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Fakat çoğu zaman süperoksit üretimi bu enzimin kapasitesini aşar. Bu hallerde diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksiti detoksifiye ederler (Halliwell 1991).

Glutasyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albumin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidan olup etkinliklerini hücre içinde göstermektedirler (Meister ve Anderson, 1983; DüNDAR ve Aslan, 2000).

Süperoksit radikali dışındaki tek indirgeyici hücre sel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan  $\beta$ -karoten (vitamin A) ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili birer antioksidan maddelerdir ve etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997).

Nitrik oksit ile süperoksidin reaksiyon ürünü olan peroksinitrit çok kısa yarı ömürlü ancak oksidatif doku hasarına neden olan son derece reaktif bir moleküldür. Peroksinitritin zararlı etkilerinin engellenmesinde rol oynayan, organizmada bulunan ya da dışarıdan alınan birçok antioksidan bileşik mevcuttur (Kondo vd., 1997; Heijnen vd., 2000). Seleno bileşikler, flavanoidler, katekinler, hidroksiguanidinler, metalotiyonein, indirgenmiş nikotinamid nükleotitleri ve ürik asit peroksinitriti temizleme aktivitesi üzerine çalışma yapılmış bileşiklerdir. Bazı bileşiklerde peroksinitriti ortadan kaldırmadan ziyade, peroksinitritin gerçekleştirdiği değişikliklerin geri dönüşümü sağlanmaktadır.

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup glutasyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadır.

Sentetik olarak üretilen ve daha çok antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan ticari adlı Trolox<sup>®</sup>, rutin, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar da mevcuttur. Peroksi radikaliyle iki aşamada etkileşerek çok daha az reaktif ürünlere dönüştüren 2,6 di-tert-butil-4 metil fenol yani butillenmiş hidroksi toluen (BHT) önemli sentetik antioksidandır.



Süper antioksidan haplar, Japon eriği, kokusuz sarımsak, mavi-yeşil alg (yosun), havuç, portakal ve badem konsantreleri ilave edilmiş “Activin” üzüm çekirdeği ekstresinden oluşan bir bitkisel karışım olup ayrıca A, C, E vitaminleri, selenyum, çinko ve kalsiyum mineralleri de içermektedir. Ayrıca ürünü oluşturan doğal bitki özleri, vitaminler ve mineraller antioksidan etkileri bilinen ve bu amaç için kullanılan özel maddelerdir. Son yıllarda üretilen bu tür haplar yapay antioksidanlara örnek teşkil etmektedir

Ferritin, laktoferrin, seruloplazmin, hemoglobin,  $\alpha$ -globulin gibi plazma ve eritrosit proteinleri Fe, Cu gibi serbest metal iyonlarını bağlayabilme kabiliyetinden dolayı Fenton reaksiyonunu ve diğer radikal oluşturan reaksiyonların oluşumunu engellediği için birer antioksidan olarak rol oynarlar (Dündar ve Aslan, 2000).

#### **1.4. Fenolik Bileşikler**

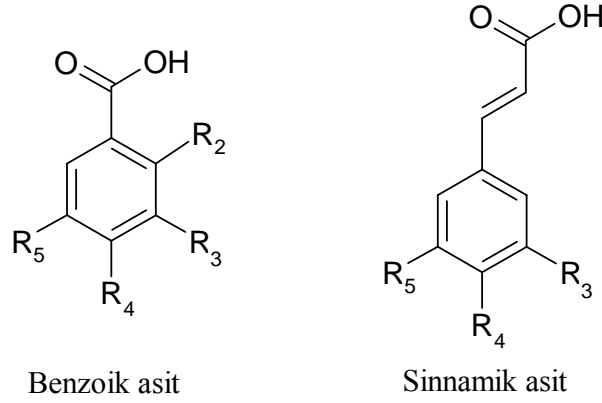
Son yüzyılda sentetik ilaçların kullanımıyla meydana gelebilen ciddi rahatsızlıklar insanoğlunu doğal tedavi yöntemlerine ve bitkisel tedaviye yönlendirdi. Yan etkilerin yol açtığı tıbbi ve ekonomik sorunlar, uluslararası ilaç sanayinin de yer aldığı, endüstrileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğine ve tedavileri henüz mümkün olmayan birçok kronik hastalığın oluşmasına yol açtığından bitkisel tedavi çok eski çağlarda olduğu gibi tekrar popüler hale gelmiştir. Bitkiler diğer canlı sistemlerden farklı olarak sınırsız sayıda aromatik ve alifatik bileşik üretebilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle de fitoterapi olarak adlandırılan bitkisel tedavi yöntemlerindeki etken maddelerin bitkiler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleri olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Bu bileşikler sinyal (haberci) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substituye olmuş halleridir. Bitkilerde bulunan başlıca polifenolik bileşikler basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetil asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, naftakinonlar, kromonenler, ksantonlar, stilbenler, antrakininonlar, flavonoidler ve ligninlerdir.

Fenolik bileşikler yapısal olarak, bir aromatik halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de dahil bir veya daha fazla hidroksil gruplarını içeren maddelerdir ve basit

fenolik moleküllerden yüksek polimerize bileşiklere sınıflandırılmaktadır. Bu yapısal çeşitliliğe karşın, bu grup bileşikler çoğunlukla polifenoller olarak isimlendirilirler. Fenolik bileşikler ve daha yaygın olarak kullanılan ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. Hidroksibenzen çoğunlukla fenol adı ile anılır. Buna göre en basit fenolik bileşik, bir tane hidroksil grubu içeren benzen, yani fenoldür. Bu bileşikler zayıf asidiklerdir: hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı oluşan fenolat anyonunun ( $C_6H_5O^-$ ) sudaki çözünürlüğü hayli yüksektir (URL-3, 2010). Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir ve bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Fang vd., 2007). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 8000'den fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Pietta ve Gardana, 2003). Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir. (Wollgast ve Anklam, 2000; Bilaloğlu ve Harmandar, 1999). Doğal olarak oluşan fenolik maddelerin en yaygın grubu flavonoidlerdir. Flavonoidlerin dışında bitki fenolleri; basit fenolleri, fenolik asitleri (benzoik ve sinamik asitler), kumarinleri, stilbenleri, hidrolize ve kondense tanenleri, lignan ve ligninleri içermektedir (Naczki ve Shahidi, 2004).

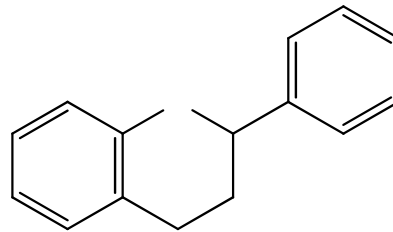
Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Fenolik asitler; sinamik ve benzoik asitler olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Fenol karbon asitleri ile de anılan fenolik asitlerden sinamik asitlerin yapısı C6-C3 iskeletine dayanmaktadır ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit örnekleridir. Benzoik asitler ise C6-C1 iskeletine dayalı bileşiklerdir ve yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit (3-4-5-trihidroksibenzoik asit), vanillik asit (3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit), şiringik asit, salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit), *p*-hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit) ve protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'tir. Şekil 1'de benzoik asit ve sinamik asit iskelet yapısı gösteren fenolik maddelerin temel kimyasal yapısı gösterilmiştir (Harborne ve Simmond, 1964; Hulme, 1971; Naczki ve Shahidi, 2004).



Şekil 1. Fenolik asitlerin temel kimyasal yapısı

Monohidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasına metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri de antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, m-p pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer (Rice-Evans vd., 1996).

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerden sorumlu oldukları için, analizlerini önemli derecede ilginç yapan bu tür ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003). Genellikle tüm flavonoidler; üç fenolik halkaya sahip ve hidroksil ile metil grubuna göre değişen 2-fenilkromanın türevleridirler. Kimyasal yapıları (C6-C3-C6) iskelet yapısına dayanır (Madhavi vd., 1996; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2006; Plochmann vd., 1997).



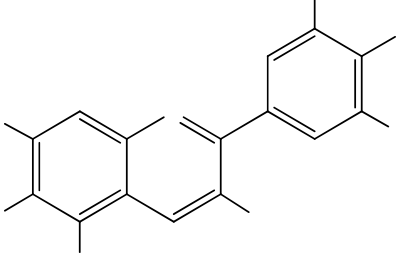
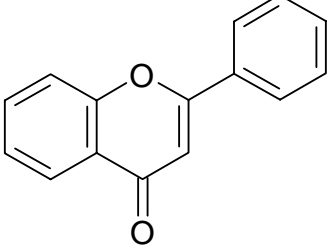
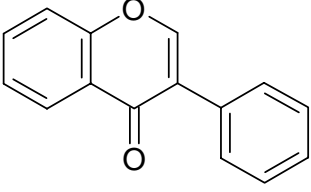
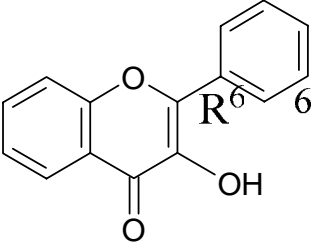
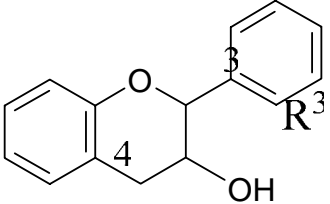
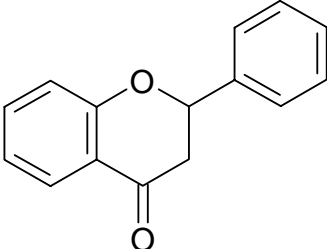
Şekil 2. Flavonoidlerin C6-C3-C6 iskelet yapısı

Flavonoidler genişçe düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon, prenilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. C halkasındaki süstitüye gruplara ve B halkasının pozisyonuna bağlı olarak flavonoidler çeşitli alt gruplara sınıflandırılmıştır Doğal olarak meydana gelen flavonoidler, kimyasal yapılarına göre altı gruba ayrılabilirler; flavanon, flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyaninler (Cam ve Hışıl, 2003; Madhavi, 1996; Peterson ve Dwyer, 1998). Tüm yapılar ana bileşik olan flavon (2-fenil benzopiron) ile ilişkilidir (Prasain vd., 2004).

Son yıllarda pek çok araştırma çalışmaları polifenoller bakımından zengin besinlerin tüketimiyle onların antioksidan özellikleri sayesinde kardiovasküler hastalıklar, belli kanser tipleri ve diğer yaşlanmayla ilgili hastalıklardan korunmayı ilişkilendirmişlerdir (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Rice-Evans ve Packer, 1998; Chang ve Kinghorn, 2001). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri onların molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısı ve flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki diğer özellikler onların antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri için önemlidir (Suschetet vd., 1998). Kuersetin dietlerde en bol bulunan flavonol olup serbest radikal temizleme aktivitesi açısından tüm doğru yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (Pietta, 2000; Erkoç vd., 2003). Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler ve bundan dolayı da başlıca günlük diyetlerden alınmalıdırlar.

Bazen aglikonları halinde mevcut olmalarına rağmen flavonoidler genellikle onların sudaki çözünürlüğünü artıran ve inaktif formda depolanmalarına müsaade eden glikozidik formlarında bulunurlar (Cuyckens ve Claeys, 2004). O- ve C- olmak üzere iki glikozidik bağ tipi vardır. C- glikozilasyon bölgesi aglikonun C-6 veya C-8 pozisyonuyla sınırlıyken, O- glukozilasyon bölgesi genelde aglikonun fenolik hidroksil grubunda bulunur (Şekil 2) (Becchi ve Fraisse, 1989). Aglikonların bir ya da daha fazla hidroksil grupları asit-kararsız glukozidik O-C bağıyla oluşan bir şekere bağlıdırlar. Flavonoidlerde genellikle glikozillenen belli hidroksil grupları vardır. Bunlar flavonlar, flavanonlar ve izoflavonlarda 7-hidroksil grubu ve flavonoller ve flavanollerde 3- ve 7-hidroksil gruplarıdır. 5-hidroksil grubu C-4 de bitişik karbonil grubuyla hidrojen bağına katıldığı için C-4 de karbonil gruplu bileşikler için 5-O-glukozidler nadirdir (Prasain vd., 2004).

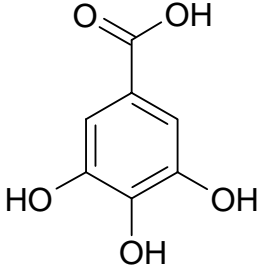
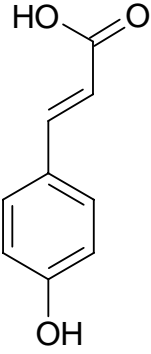
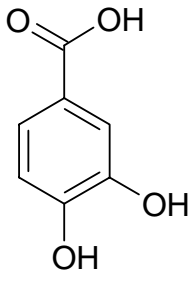
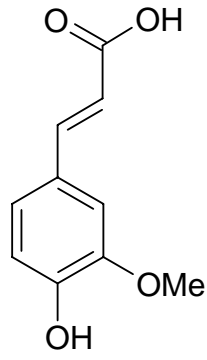
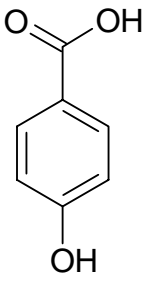
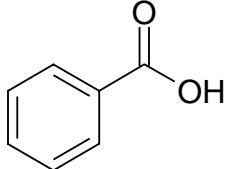
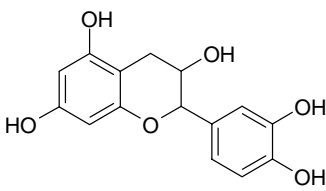
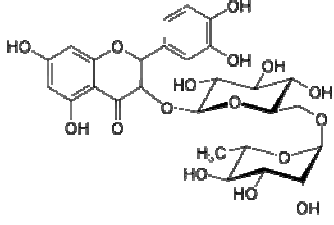
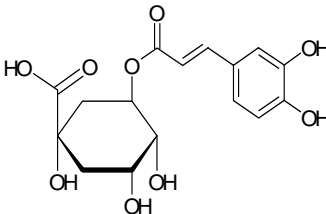
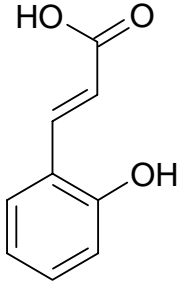
Tablo 2. Flavonoidlerin grupları ve bu gruplara ait bileşikler

Antosiyanidinler	Flavonlar	İzoflavonlar
		
<p>Siyanidin Delfiininidin Malvidin Pelargonodin Petunidin Peonidin</p> 	<p>Apigenin Baisalein Diosmin Genkwain İsohoifolin Luteloın Riyofilin Tektokrisin</p> 	<p>Biketin Daidzein Formononetin Genistein Glisitein Glisititein Daidzm Genistin Siyertim</p> 
<p>Astralagin Hiperosid İsokuersitrin İsohamnetin Kempferid Kampferol Mirisetin Kuersetin Kuersitrin Ramnetin Rutin</p>	<p>Kateşin Gallokateşin Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin-3-gallat Epigallokateşin-3-gallat</p>	<p>Diydmin Eriositrin Eriodisitiyol Hesperetin Hesperidin İsosakuranetin Naringenin Naringin Narirutin Neriositrin Neohesperidin Pinosembrin Ponsirin Prunin</p>

Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları antosiyanidinler'dir. En önemlileri; apigenidin,

siyanidin, malvidin ve delphinidin'dir. Antosiyaninler bitkilere kırmızı, mavi veya menekşe rengi veren, suda çözünür pigmentlerdir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur. Flavilyum katyonunun B halkasında yer alan bileşene bağlı olarak renk değişir; renk, -OH grubu arttıkça maviye, -OCH<sub>3</sub> grubu arttıkça kırmızıya doğru değişmektedir (Mazza ve Brouillard, 1990). Bitkilerde yaklaşık 200 farklı antosiyanin teşhis edilmiştir. Antosiyaninlerin yapısında heterosiklik bir halka olan pirilyum katyonu bulunmaktadır. Pirilyum ise yapısında pozitif yüklü bir oksijen bulunan bir oksonyum iyonudur. Antosiyaninler bu eksik elektrondan ötürü oldukça aktif niteliktedir. Antosiyaninler kimyasal olarak 2-fenilbenzopirilin'in polihidroksi ve polimetoksi türevlerinden oluşan glikozitlerdir. Bu yapı, şeker gruplarının (mono-ditri sakkaritler), şeker olmayan (aglikon) maddelerle birleşmesi ile oluşmaktadır. Antosiyaninlerin şeker olmayan kısmı, fenolik maddelerden antosiyanidinler (C6-C3-C6) olarak adlandırılmaktadır. Her bir antosiyanidin farklı şeker ya da asitlerle, farklı pozisyonlarda bağlanması ile çok sayıda antosiyanin oluşabilmektedir. (Jamet ve Ebeling, 2002). Antosiyaninler arasındaki farklılıklar moleküldeki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu, moleküle bağlanan şekerlerin sayısı, türü ve bağlanmış pozisyonu ve moleküldeki şekerlere bağlı bileşiklerin türünden kaynaklanmaktadır (Clifford, 2000). Antosiyaninler, yüksek antioksidan kapasiteye sahip olup aktif oksijen formlarının neden olduğu kanser, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedirler (Wang vd., 1997; Nakajima vd., 2004). Tablo 3'de bu çalışmada analiz edilen fenolik bileşiklerin formülleri verilmektedir.

Tablo 3. HPLC analizlerinde kullanılan fenolik bileşikler ve formülleri

Fenolik Bileşimin İsmi	Formülü	Fenolik Bileşimin İsmi	Formülü
Gallik asit		<i>p</i> -Kumarik asit	
Protokatekuik asit		Ferulik asit	
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit		Benzoik asit	
Kateşin		Rutin	
Klorojenik asit		<i>o</i> -Kumarik asit	

Tablo 3'ün devamı

Fenolik Bileşimin İsmi	Formülü	Fenolik Bileşimin İsmi	Formülü
Vanillik asit		<i>cis, trans</i> -Absisik asit	
Kafeik asit		<i>trans</i> -Sinnamik asit	
Şiringik asit		Kuersetin	
Epikateşin		Propil paraben	

### 1.5. Kromatografi

Kromatografinin ilk uygulamalarını bir Rus botanikçi olan Mikail Tswett 1903 yılında gerçekleştirmiştir. Tswett bitki pigmentlerini, içini kalsiyum karbonat ile doldurduğu bir cam boruda birbirinden ayırmıştır. Pigmentler kolunun içinde ayrılırken renkli bantlar oluşturduğunda Tswett bu yönteme Yunanca renk anlamına gelen “chroma”



ve yazma, kaydetme anlamına gelen “graphien” kelimelerini birleştirip “chromatography” adını vermiştir (Skoog vd., 1998; Gündüz, 2001; Ettre, 2003).

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır (Yıldız ve Genç, 1993). Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Sabit fazın amacı maddeleri üzerinde alıkoymak, hareketli fazın amacı da maddeleri sabit fazın üzerinde hareket ettirmektir. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal gravitasyon (yer çekimi) kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz üzerinden geçirilir. Ayırım, maddelerin sabit faz ile hareketli faz arasındaki tercihi doğrultusunda gerçekleşmektedir. Hareketli fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Karışımdaki bileşenler farklı kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı sabit faza farklı kuvvetlerde tutunmakta bu nedenle hareketli faz maddeleri farklı hızda sürüklemektedir. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana veya mobil fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir (Skoog vd., 1998; Gündüz, 2001).

### 1.5.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemleri tek bir ölçüte göre sınıflamak zordur. Birden fazla kriterde farklı özellikte kromatografik uygulamalar mevcuttur. Kromatografik yöntemler sabit fazı taşıyan yüzeye göre temelde *kolon ve düzlemsel* olarak ikiye ayrılır. Kolon ve düzlemsel kelimeleri, sabit fazın tutturulduğu yüzeyin geometrik şekillerini anlatmaktadır (Skoog vd., 1998; Gündüz, 2001).

Ayırma mekanizmalarına göre ise kromatografik yöntemler;

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma (paylaşım) kromatografisi

- İyon değiştirme kromatografisi
- Boyut eleme (jel filtrasyon) kromatografisi

olarak sınıflandırılabilir.

Tablo 4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Hareketli fazlar	Ayırma mekanizmaları	Sabit fazın tutturulduğu yüzey
Gaz kromatografisi: Gaz-sıvı; Gaz-katı	Adsorpsiyon kromatografisi	Kolon
Sıvı kromatografisi: Sıvı-sıvı; Sıvı-katı	Dağılma (paylaşım) kromatografisi	Düzlemsel
Süper kritik akışkan kromatografisi	İyon değiştirme kromatografisi Boyut eleme kromatografisi	

Adsorbsiyon Kromatografisi: Sıvı kromatografi tarihinde ilk olan ayırım yöntemidir. Adsorbsiyon kromatografisi silikajel ve alumina gibi adsorban maddelerin yüzeyi ile ilgilidir. Bu adsorban moleküller sabit fazı oluşturur. Bir maddenin tutunma gücü, molekülündeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlı olup, farklı maddeler kolonu farklı zamanlarda (alınma zamanı) terk eder (Trathning vd., 2004).

Dağılma (paylaşım) Kromatografisi: Örnekteki madde veya maddeler, sabit ve hareketli faz arasında dağılır. İki faz arasında sürekli aktarımlar sonunda çözünen moleküller, hareketli faz sisteme verildikçe numunenin çözünmüş kısmı kolonda taşınır. Çözünen madde kolonda yalnız hareketli fazla taşındığından, ortalama göç hızı, çözünen maddelerin hareketli fazda geçirdiği zamanın sabit fazda geçirdiği zamana oranına bağlıdır. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan türler için bu oran küçük, hareketli fazda tutulma büyük ise aynı oran büyüktür. Dağılma kromatografisinde sistemin ayırım gücü, sabit faz, hareketli faz ve maddenin polaritesine bağlı olarak değişir (Skoog vd., 2000).

İyon Değiştirme Kromatografisi: İyonların iyon yüklerine göre yüzeye tutturulmuş başka bir iyonun yerini alma olayıdır. İyonların (katyon-anyon) yer değiştirmesine dayanan bu kromatografi, inorganik iyonların, proteinlerin, peptidlerin ve aminoasitlerin ayırımı için oldukça uygundur. İyon değiştirme mekanizmasında hareketli fazın pH' sı ve iyonik gücü alınma süresi üzerinde, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir (Kato vd., 2004).

Boyut Eleme Kromatografisi: Jel geçirgenlik veya jel süzme kromatografisi adı verilen boyut eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen bir tekniktir. Boyut eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde moleküller, etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile uzaklaştırılır. Dolgu maddesinin ortalama gözenek açıklığından daha büyük olan moleküller dışarıda tutulur ve böylece hiç alıkonmazlar. Bu gibi türler ilk olarak elüe edilirler. Gözeneklerden önemli derecede küçük çapa sahip olan moleküller, labirent şeklindeki gözeneklere nüfuz edebilir veya geçebilir, böylece en uzun süre tutulmuş olurlar; bunlar en son elüe edilirler. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve örnekte bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler (Skoog vd., 1998).

Kromatografisi hareketli fazın özelliklerine bağlı olarak başlıca üç forma ayrılabilir: gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi, süperkritik akışkan kromatografisi. Hareketli fazın gaz olduğu kromatografisi türü gaz kromatografisi, sıvı olduğu türe ise sıvı kromatografisi denir. Kritik sıcaklığının üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılıp, basınç ile sıvılaştırılan gazlar ile gerçekleştirilen kromatografiye süper-kritik akışkan kromatografisi denir (Skoog vd., 1998).

Kromatografik yöntemde hareketli faz apolar ya da polar ise normal faz kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC), hareketli faz polara yakın sabit faz apolar ise ters faz kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC) olarak adlandırılır. Normal faz kromatografisinde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), hareketli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir. Ters faz kromatografisinde ise sabit faz apolar (hidrofobik), hareketli faz ise su ve asetonitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar (Snyder vd., 2010).

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

Sıvı kromatografisinin ilk uygulamaları, cam bir kolona doldurulan tanecik boyutları 100-250 µm olan sabit fazlarla yapılmaktaydı. Hareketli fazın bu taneciklerin arasından numuneyi sürüklemesi yer çekimi kuvvetiyle olduğundan analiz uzun sürmekte dolayısıyla

bileşenlerin bantları geniş olmaktadır. Cam kolona basınç ya da vakum uygulandığında sabit faz taneciklerinin büyük olması sebebiyle maddeler sabit fazla etkileşememekte ve ayırım gerçekleşmemektedir. Sabit faz taneciklerinin gelişen teknoloji ile 3-5 µm indirilmesi ve bu taneciklerin arasından hareketli fazı geçirebilecek basınçta pompalar geliştirilmesiyle yüksek performanslı sıvı kromatografisi oluşmuştur (A.Ü., 2006). Yüksek performanslı sıvı kromatografisine, İngilizce söylenişinin baş harfleriyle oluşmuş HPLC (High Performance Liquid Chromatography) denilmektedir. Günümüzde özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanmaktadır.

Avantajları;

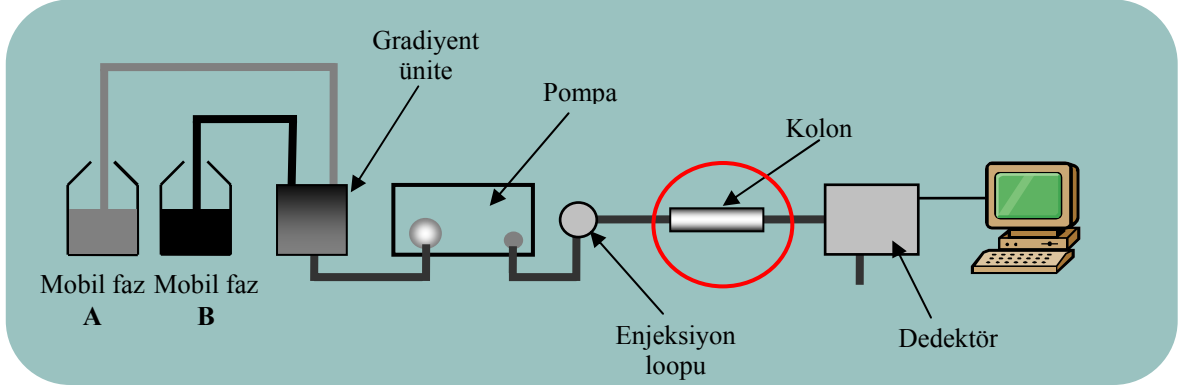
- Analiz sonuçlarının tekrar edilebilirliğinin yüksek olduğu bir cihazdır.
- Uygun kolonlar kullanıldığında tüm kromatografik tekniklerin uygulanabildiği bir cihazdır.
- Sıvı ortamda çözünebilir hemen hemen tüm bileşenlerin ayrımı için kullanılabilir.
- Uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin ayrılmasına uygundur. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler ve steroidler gibi birçok biyoteknolojik ürüne uygulanabilir.
- Farklı prensiplerle çalışan çok sayıda dedektöre uygundur.
- Analiz için kullanılan örnek hacmi küçüktür (10-100 µL).
- HPLC kolonları rejenerasyon gereksiz pek çok kez kullanılabilir.
- Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.
- Analiz süresi nispeten kısadır.

Dezavantajları;

- Hareketli faz sarfiyatı fazladır.
- HPLC’de hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin maliyeti yüksektir.

HPLC enstrümanları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı ve ihtiyaca göre bir kolon ısıtıcısı içerirler. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından

kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır.



Şekil 3. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

### 1.5.2.1. Hareketli Faz Deposu ve Hareketli Faz

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya ve enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır. Sıklıkla, ayırma etkinliği *gradyent elüsyonu* ile büyük ölçüde artırılır.

**İzokratik Elüsyon:** Kolona sabit bileşimdeki hareketli faz pompalanır. Hareketli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

**Gradient Elüsyonu:** Hareketli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır. Gradyent elüsyonda çözücünün bileşimi programlanarak ya devamlı veya basamaklı artırılabilir. Gradyent elüsyonu da düşük basınçlı ve yüksek basınçlı gradient

elüsyon olmak üzere iki kısma ayrılır. Düşük basınçlı gradient sistemde tek pompa, maksimum 4 farklı mobil faz kullanılır ve hareketli fazlar pompadan önce karıştırılır. Yüksek basınçlı gradient sistemde ise 2 ya da 3 pompa, 2 ya da 3 farklı mobil faz kullanılır ve mobil faz pompadan sonra karıştırılır.

Maddeleri kolonda sürükleyen çözücü sistemidir ve içeriği analize göre belirlenmelidir. Hareketli faz maddelerin kolona tutulmasına izin vermeli fakat aynı zamanda tutunan maddeleri sürükleyebilmelidir. Eğer hareketli faz maddelerin kolondan tutulmasına izin vermez ise maddeler birbirinden ayıramaz, kolonda tutunan bileşikleri sürükleyemez ise de kolondan çıkartıp dedektöre ulaştırılmaz ve bileşenler dedekte edilemezler (A.Ü., 2006).

Hareketli faz olarak kullanılan çözücüler çok saf olmalıdırlar ve kesinlikle partikül ve hava kabarcığı içermemelidirler. Analiz esnasında sistemde oluşabilecek bir hava kabarcığı, dedektörün önünden geçerek istenmeyen sinyaller verebilir ve kolondaki partiküllerin homojen dağılımını bozabilmektedir. Fakat çoğu çözücünün içerisinde çözünmüş gazlar bulunduğundan, hareketli fazlar hazırlandıktan sonra bu çözünmüş gazlardan arındırılmalıdırlar. Bu işleme gazan arındırma (degaz) denir.

Hareketli faz olarak kullanılacak çözücüler istenen kromatografik ayırma mekanizmasına göre belirlenir. Normal faz sıvı kromatografisinde maddeler polar kolonda adsorpsiyon prensibiyle ayrılacaksa, hareketli faz çözücüleri apolar olmalıdır (hegzan, pentan, kloroform, ksilen vb. ya da bunların karışımları). Ayırım ters faz yöntemi ile yapılacaksa hareketli faz çözücüleri polara yakın olmalıdırlar (su, metanol, asetonitril, etanol vb. ya da karışımları) (Snyder vd., 2010).

### 1.5.2.2. Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve hareketli fazın hareketlendirilmesinde kullanılan parçadır. Bir HPLC pompası 6000 psi ( $\approx 410$  atm) basınca kadar çıkabilmektedir (Skoog vd., 1998; A.Ü., 2006). Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da artırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- 400 atm'e kadar basınç üretimi,

- Puls içermeyen basınç çıkışı,
- Çok sayıda çözücünün korozyon etkisine dayanıklı (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık),
- Akış hızı hassas ayarlanabilmeli ve kararlı akış hızında çalışabilme (0,01–10 mL/dk arasında akış hızı ve %0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikte akış kontrolü).

Ticari olarak mevcut pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır (Skoog vd., 1998; URL-4, 2010):

- Pistonlu pompalar (emme basma pompa)
- Şırınga tipi (sürgülü) pompalar
- Doğrudan gaz basınç pompaları
- Pnömatik hızlandırıcı pompalar

Pistonlu pompalar en yaygın kullanılan HPLC pompalarıdır. Çalışma mekanizması tulumba gibidir. Genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Pistonlu pompalar pulslu bir akış ürettiklerinden dolayı sakıncalıdır. Pistonlu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri (35-400  $\mu$ L), yüksek basınç çıkışı (700 atm'e kadar), gradiyent elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

Şırınga tipi pompalar, enjektör gibi çalışırlar ve bir piston haznesindeki hareketli fazı sisteme enjekte ederler. Bir motordan güç alan vidalı mekanizma ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettirler. Sürgülü pompalar da viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Ayrıca çıkış akımı pulssuzdur. Sakıncaları; sınırlı çözücü kapasitesi ( $\approx$ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanması, genellikle azot veya helyum gazının kullanılmasıyla olur. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır. Bu sistem sınırlı bir hacme sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır.

Pnömatik (havalı) pompalar da gaz basıncıyla çalışır. Gaz basıncı küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonu etki eder. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır. Sıvının pompayı terk

etme hızı, çözücünün viskozitesine, pompa çıkışındaki akışın direncine ve kolon dolgu maddesiyle olan etkileşimine bağlıdır.

Modern HPLC donanım pompaları bilgi işlemci kontrollü olup, çok çeşitli firma tarafından değişik modellerde üretilmektedir. Pompaların aynı zamanda çözücü oranlarını da değiştirebilecek şekilde programlanabilmesi, *çözücü programlaması* adı verilen ve çok daha etkin bir ayırmayı sağlayan tekniğin uygulanmasına olanak verir. Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki hareketli faz için, iki yüksek basınç pompasına ya da gradiyent valfe sahiptir. Bu amaçla kullanılacak iki hareketli fazın tamamen karışabilir olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar.

### 1.5.2.3. Enjeksiyon Loopu

Analiz edilecek karışımın sisteme verildiği parçadır. HPLC cihazlarında manuel (elle kumanda edilen) ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler (auto sampler) olmak üzere 2 çeşit loop bulunmaktadır (A.Ü., 2006; URL-4, 2010).

Manuel enjektörlerde örneğin enjekte edilebilmesi için enjektör önce doldurma pozisyonuna (load position) getirilerek örnek, isteğe göre seçilebilen sabit hacimli, loop içerisine doldurulur. Loop'a doldurulan örnek hacmi loop sabit hacmini geçerse, fazla olan kısım dışarıya otomatik olarak atılır. Daha sonra enjektörün kolu enjeksiyon pozisyonuna (inject position) getirilerek örnek mobil faz içerisine enjekte edilmiş olur. Kullanılan loop hacimleri çok değişken olup genellikle 5 µL-5 mL aralığında değişir. Loop hacmi küçüldükçe tekrarlanabilirlik adına yapılan hata oranı da büyümektedir.

Oto enjektörler XY tipi ve carousel tipi olmak üzere iki tiptir. XY tipinde enjektör hareketli olup belirtilen koordinatlara giderek örneği şişesinden çekmekte ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte etmektedir. Bunun için seçilen örneklere ait bilgilerin, gerekli yazılım kullanılarak, önceden bilgi işlemciye girilmesi gerekmektedir. Carousel tipinde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı vasıtasıyla sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır. Otomatik enjektörler ile istenen hacimlerde numuneyi sisteme vermek mümkündür.

Numune enjeksiyonu yüksek basınçta yapılır. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta pompalanmakta olan hareketli fazın arasına verilir ve numune kolona doğru



hareketli faz tarafından sürüklenir (Gündüz, 2001). Ulaşma çok küçük bir hacim içinde olur (numune dağılmaz). Çünkü hareketli faz, sıvısının büyük bir kısmı yan geçişten yoluna devam ederken, çok az bir kısmı numuneyle karışıp ana hareketli fazla birleşir. Böylece numune fazla seyrelmeden (dağılmadan) kolona ulaşır. Numune seyrelirse dedektörden yayvan pikler elde edilir.

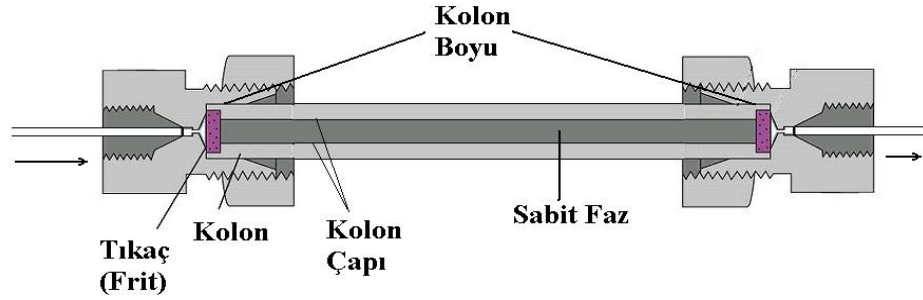
#### 1.5.2.4. Kolonlar

Modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam veya peek en sık tercih edilenlerdir.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir. Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2,1 mm, 3,2 mm ve 4,5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Kolon dolgu maddesi olarak genel de boncuk şeklinde iki tip madde kullanılır. Birinci tip maddeler gözenekli olmayan cam veya bir polimerden yapılıdır. Çapları genellikle 30-40  $\mu\text{m}$ 'dir. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirme reçinesi kaplanır. Bazı uygulamalarda bu şekilde kaplanmış olan boncukların üstüne bir kaplama daha yapılıdır, bu adsorpsiyonla kaplanmış veya yayılmış bir sıvıdır. Boncuk şeklindeki parçacıklar duruma göre doğrudan bir organik maddeyle de kaplanabilir. Bunlar halen sadece koruyucu kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Boncuk şeklinde olan ikinci tip maddeler gözeneklidir. Bunlar çapları 3-10  $\mu\text{m}$  olan mikro parçacıklardır. Bunlar da silika, alümina ve iyon değiştirme reçinelerinden yapılıdır. Ancak en çok silikadan yapılanlar kullanılır. Gözenekli madde neyle yapılmış olursa olsun, yüzeyi film şeklinde organik maddeyle kimyasal veya fiziksel olarak kaplanır (Gündüz, 2001).

Kolonun, hareketli fazın girdiği ve çıktığı uçlarında sürüklenmemesi için iki tıkaç (frit) bulunur. Tıkaçlar porlu yapıda olup sıvının geçişine izin vermekte fakat sabit fazın geçişine izin vermemektedir (A.Ü., 2006).



Şekil 4. Bir HPLC kolonu

Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kolon boyutlarının tanımlanmasına uluslararası standartlar getirilmiştir. Buna göre önce mm cinsinden uzunluk ve çap yazılmakta, bunu firma adı, sabit faz türü, A° türünden poroz yüzey çapı ve  $\mu\text{m}$  cinsinden partikül büyüklüğü izlemektedir. Örneğin, 250/4,6 Nucleosil C18 100-5 yazıldığında, kolonun 250 mm uzunluk ve 4,6 mm iç çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Kolonun firması (markası) Nucleosil olup, sabit faz türü normal fazda kullanılan bir tür olan C18'dir. Poroz yüzey çapı 100 A° olup, dolgu materyaline ait partikül büyüklüğü 5  $\mu\text{m}$ 'dir (URL-5, 2010).

### 1.5.2.5. Koruyucu Kolonlar

Analitik kolonlar, maliyetli olduklarından, ömrünü artırmak amacıyla hareketli faz bunlara gelmeden önce genellikle kısa bir kolondan geçirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşen durgun faz ile doyurularak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesini sağlar. Koruyucu kolonun dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolonunkine benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür. Koruyucu kolon kirlendiği zaman tekrar yeni dolgu maddesi ile doldurulmalı veya aynı tipteki bir yenisi ile değiştirilmelidir (Skoog vd., 1998).

### 1.5.2.6. Kolon Fırını

Birçok uygulama için kolon sıcaklığının yakından kontrolü gerekli değildir ve kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak, çoğu zaman, kolon sıcaklığı, derecenin onda bir kaçta hata ile sabit tutulduğu zaman daha iyi kromatogramlar elde edilmektedir. Birçok modern ticari cihaz, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından, 150°C'ye kadar her sıcaklıkta onda bir hata ile sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır. Kolonlar, sabit sıcaklıktaki suyla da kontrol edilebilirler (Skoog vd., 1998).

### 1.5.2.7. Dedektörler

Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımdır. Örnek, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca sürüklenerek dedektöre taşınır. HPLC cihazlarında kullanılan dedektörler, diğer sıvı kromatografisi cihazlarında kullanılan dedektörlerle aynıdır. Analizin amacına göre farklı dedektörler kullanılır. İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır (Gündüz, 2001; URL-4, 2010):

1. Düşük gürültü seviyesine sahip olmalıdır bu sayede ayrılan bileşenlerin küçük miktarları saptanabilir.
2. Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için süratli cevap zamanına sahip olmalıdır.

3. Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar cevap vermemelidir.
4. Bütün çözünenlere cevap vermelidir veya en azından tahmin edilebilir bir seçiciliğe sahip olmalıdır.
5. Elde edilen piklerden nitel pikler de elde edilebilmelidir.
6. Oluşan pikler kalitatif bilgi de sağlamalıdır.

Kullanılacak dedektörün türü analiz edilecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir. HPLC donanımında 4 temel bileşenden birisi olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir:

Ultraviyole/görünür bölge dedektörü (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS): Absorbans dedektörleri kromatografi kolonundan gelen elüantın absorbansını ölçen cihazlardır. Birçok absorbans dedektörleri çift ışın demetlidir. Işın demetlerinden birisi elüe edilmiş çözüntiden, diğer demet ise, şiddetin azaltılması için bir filtreden geçirilir. Bu demetleri ölçmek için birbirleriyle uyumlu çalışan iki fotoelektrik dedektör kullanılır. Işın yolu kesicili bir sistem de kullanılabilir. Bu durumda tek fototüp yeterli olur. Her iki durumda da kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelmiştir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür (Gündüz, 2001; URL-5, 2010).

Fotodiyot dizisi dedektörü (Photodiode array dedector-DAD): UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (URL-5, 2010).

Floresans dedektörü (Fluorescence dedector-FLD): Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. En basit floresans dedektörlerinde, uyarıcı kaynak olarak civa lambası, ışınları süzmek için de bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha iyi cihazlarda kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup floresans ışınmasını izole etmek için ise optik ağ monokromatör kullanılır. Duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre en az 10 kat fazladır (Skoog vd., 1998; URL-5, 2010).

İletkenlik dedektörü (Conductivity dedector-CDD): İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon

fırını içerisinde çalışılmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur (URL-5, 2010).

Refraktif indeks dedektörü (Refractive index detector-RID): Kırılma indisi ölçülür. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terk eder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır. Kırılma indisi dedektörlerinin, hemen hemen bütün analitlere cevap vermek gibi önemli bir üstünlüğü vardır. Ayrıca güvenilirlerdir ve akış hızından etkilenmezler. Ancak, bunlar sıcaklığa karşı oldukça duyarlı olduklarından, sıcaklıkları, derecenin binde birkaçından daha az değişecek şekilde tutulmaları gerekir. Ne var ki, bunlar diğer tip dedektörler kadar duyarlı değildir (Skoog vd., 1998; URL-5, 2010).

Elektrokimyasal dedektör (Electrochemical detector-ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır. Bu cihazlar amperometri, polarografi, kulometri ve kondüktometri esasına göre çalışmaktadır (Skoog vd., 1998; URL-5, 2010).

Kütle spektrometrik dedektör (Mass detector-MS): Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kantitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür. Bu tür bir dedektörle hem ayrılan bileşenlerin miktar tayinleri hem de yapı tayinleri yapılabilmektedir. Sıvı kromatografisi ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamadaki temel problem birincisinin bağlı olarak çok çözücü hacimleri ile diğerinin ise eser oranda maddeyle çalışmasıdır. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesinde kolondan çıkan eluat iki kısma ayrılır ve çok az bir kısım kütle spektrometriye gönderilir. Bir diğerinde ise numune bir buharlaştırma hücresine alınır. Burada çözücü uçurulduktan sonra, kalıntı (analizi yapılacak madde) iyonlaştırma odacığında iyonlaştırılır. Termosprey olarak adlandırılan yeni metotta ise kolondan çıkan ve akış hızı 2 mL/dak.'ya kadar olan eluat paslanmaz çelikten yapılmış ısıtılan kapiler bir boru içinden bir aerosol jeti halinde geçirilerek sıvı buharlaştırılır. Sprey içinde, eluat içine katılmış amonyum asetat gibi bir tuz yardımıyla, yük aktarma sonucu, analit iyonlaştırılır. Sonuçta elde edilen spektrum sadedir ve mol kütlesi hakkında bilgi verir. Fakat, termosprey bağlantı, sadece amonyum asetat gibi tuzları çözebilecek polar hareketli fazlarda yani polar analitlerde kullanılabilir (Skoog vd., 1998; Gündüz, 2001; URL-5,2010).

Evaporatif ışık dağıtıcı dedektör (Evaporative light scattering dedector-EL): Bu dedektörlerde kolondan gelen çözeltiler bir nebulizöre aktarılır. Çözelti azot veya hava akımıyla ince bir sis haline getirilir. Sis sıcaklığı kontrol edilen bir tüpten geçirilir ve çözücü buharlaştırılır. Geriye analiz edilen maddenin mikrokürecikleri kalır. Bu parçacıklar bir lazer demetinden geçirilir. Etrafa yayılan ışıklardan parçacık akımına dik yöndeki ışın demeti bir silikon fotodiyotla ölçülür. Bu ölçme metodunun avantajı uçucu olmayan tüm maddelere uygulanabilmesi ve tekrarlanabilme özelliğinin yüksek olmasıdır (Skoog vd., 1998; Gündüz, 2001).

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) dedeksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki, gıda vb. ekstraktlarının fenolik bileşimlerinin tayini için seçilen bir metottür. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını garantilemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) gibi asitler asidik modifiye ediciler olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün gelişmesi sağlanır. TFA pek çok elektrofilik flor grupları içerdiği için bunun eklenmesi durumunda da bir proton verici olarak hizmet eder ve iyon baskısına sebep olur (Wu vd., 2004).

### 1.5.3. HPLC ile Miktar Tayini

Kantitatif analizde pik yükseklikleri veya daha iyisi pik alanlarından yararlanılır. Analit pikinin yüksekliğinin veya alanının bir veya birkaç standardın pik yüksekliği veya pik alanı ile karşılaştırılmasına dayanır. Kromatografide ayrılan türlerin kapladığı alan analitik parametre olarak kullanılır. Şartlar kontrol edildiğinde bu parametreler konsantrasyonla lineer olarak değişir. Pik yüksekliği kullanılarak yapılan analizlerde, kromatografik pikin yüksekliği; pikin her iki ucunu baseline ile birleştiren doğrunun pikin tepe noktasına uzaklığının dik olarak ölçülmesiyle bulunur. Pik yüksekliği pik genişliği ile ters orantılıdır. Kromatogramlardan doğru sonuç alınması, standartların ve örneklerin kromatogramlarının alınması sırasında kolon şartlarının pik genişliğinin değişmesine engel olacak şekilde kontrolüyle sağlanır. Bunlar; kolon sıcaklığı, elüent akış hızı ve örnek enjeksiyon hızıdır. Pik alanları pik genişlemelerinden bağımsız olduğu için pik yüksekliğine göre daha uygun bir parametredir. Modern kromatografik cihazlarda dijital

elektronik integratörlerin kullanımıyla pik alanları çabuk ve doğru olarak hesaplanabilmektedir (Skoog ve Leary, 1992).

Dedektör sinyalleri ile ayrılan bileşenlerin konsantrasyonları orantılıdır. O halde miktar tayini yapılacak bileşiğin bilinen konsantrasyonlarından kalibrasyon çözeltileri hazırlanır ve bu çözeltilerin dedektör sinyalleri ile konsantrasyonları arasında bir fonksiyon oluşturulabilir. Oluşturulan fonksiyon kullanılarak miktarı bilinmeyen bir bileşenin dedektör sinyali konsantrasyona çevrilebilir. Bu işlem doğrudan dedektör sinyallerinden hesaplanan pik alanları kullanılarak yapılmaz. Eğer iç standart ekleme gibi bir yöntemden yararlanılmadıysa, hesapların daha güvenilir olması için pik normalizasyonu (PN) değerleri hesaplanır. Pik normalizasyonu iç standart gibi bir yöntem uygulanmadığı takdirde madde piki alanının kendi alıkonma zamanına bölünmesi ile hesaplanır. Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşı işaretlenen PN değerleri doğrusal bir fonksiyon oluşturmaktadır. İç standart ekleme yöntemi kullanıldığı durumda ise PN madde piki alanının iç standart piki alanına oranlanmasıyla hesaplanabilir. Bu durumda hesaplanan PN değerleri ile kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları arasında da doğrusal bir ilişki olmaktadır (Brown ve Grushka, 1995; Cazes, 2004).

#### **1.5.4. İç Standart Kullanımı ve Seçimi**

Kromatografiye içine alan tüm yöntemlerde koşulların ayarlanması hem zordur hem de olanaksızdır. Çünkü kromatografik yöntemlerde kullanılan hareketli fazın bileşimleri her zaman aynı hazırlanamaz. pH'ı veya iyon şiddeti değişmez tutulamaz. Ayrıca maddelerin göç hızları sıcaklığa bağlı olarak değişeceğinden alıkonma sürelerindeki artma veya azalma ile pik boylarındaki değişmelere yansımaktadır (Snyder vd., 2010). Bu etkiler sonucunda pik boylarında görülebilecek artma veya azalmalar iç standart kullanımı ile ortadan kaldırılabilir. Değişmez derişimde tutulan iç standartın sinyali ile madde sinyali arasındaki ilişkiye dayanarak sonuca ulaşılabilir. İç standart sinyali ile madde sinyali arasındaki oranın sabit kalacağı fikrinden hareketle, yukarıda belirtilen hatalardan kaçınılabilmektedir. Üstelik analizlerde doğruluk, duyarlılık, çabukluk ve kolaylık sağlanmaktadır.

İç standart yöntemi, numune hazırlarken oluşabilecek kayıplar ve enjeksiyon kesinliğini telafi etmek için analizi yapılacak numunedeki bileşene veya bileşenlere yapısal olarak benzeyen bir bileşiğin kullanılması ile ilgilidir. Numune hazırlama esnasında veya

kromatografik analiz öncesinde iç standardın bilinen ve sabit bir miktarı hem standart çözeltilere hem de numuneye son konsantrasyonu hep sabit kalacak şekilde katılır. Çeşitli standart konsantrasyonlarında, standardın pik yüksekliği veya alanının iç standardinkine oranı hesaplanarak bir kalibrasyon eğrisi hazırlanır. Bilinmeyen konsantrasyonu için bulunan oran değeri kalibrasyon eşitliğinde çözülerek miktarı hesaplanır. İç standart sadece doğruluğu ve kesinliği artırmak için değil, aynı zamanda kalite kontrol amaçlı işlemlerde de kullanılabilir, çünkü iç standardın yanıt değeri bütün kromatogramlarda aynı olmalıdır. İç standart seçerken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır:

- İç standart numunedeki bütün piklerden tamamen ayrılmış olmalıdır.
- Analite veya analitlere yakın elüe olmalıdır.
- Çalışılan numunelerde doğal olarak bulunan bir bileşen olmamalıdır.
- Sıvı halde numuneye eklenebilmelidir.
- Ön işlemlerde analiz edilecek maddeye benzer davranmalıdır.
- Pik yüksekliği ya da alanı çalışılan konsantrasyon aralığında analiz edilecek maddeninkine yakın olmalıdır.
- Ticari olarak saf halde sağlanabilmelidir.

### **1.6. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu (SPE)**

Kimyasal analizi yapılacak plazma, serum, idrar gibi biyolojik; su, toprak, hava gibi çevresel ve gıda, farmasotik ürünler gibi diğer numuneler, genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matriks içerirler. Bu nedenle örnek hazırlama; özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC), gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi (GCMS), radioimmün assay (RIA), atomik absorpsiyon (AA) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır (Yavuz ve Aksoy, 2006; Shulamit, 2005; Zief, 2005). Örnek hazırlama başlıca iki amaç için yapılmaktadır. Bunlar sırasıyla, örneklerin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi (clean-up) ve yoğunlaştırılmasıdır. Temizleme işlemi ile matriksten analizin yanlış sonuçlanmasına neden olabilecek, aranan maddenin tespit edilmesini engelleyebilecek veya analiz cihazlarının kirlenmesine neden olabilecek kirliliklerin uzaklaştırılması sağlanır (Shulamit, 2005; Zief, 2005; Stevenson, 2000). Yıllardan beri sıvı-sıvı ekstraksiyon ve bunu takiben çözücülerin çeşitli şekillerde uzaklaştırılması, örnek hazırlamada en çok kullanılan yöntem olmuştur. Fakat geleneksel



sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulamalarının fazla miktarda çözücü harcanması, çok zaman alması ve yüksek maliyetli olması gibi dezavantajları vardır. Ayrıca bu yöntemler, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılmaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara da neden olabilmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu dışında santrifüj etme, süzme, distilasyon, liyofilizasyon gibi diğer önemli ekstraksiyon metotları da benzer sakıncalara sahiptir (Yavuz ve Aksoy, 2006).

Örnek hazırlama işleminin basitleştirilmesi, zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, 1970'li yılların ortalarında klasik metotlara alternatif olarak yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyon metodu (solid phase extraction, SPE) kullanılmaya başlanmıştır (Zief, 2005; Pinchon, 2000; Poole vd., 2000).

Katı faz ekstraksiyonu, İngilizce olarak "Solid Phase Extraction" kelimelerinin baş harflerinden oluşturulmuş "SPE" kısaltması ile ifade edilir. Katı faz ekstraksiyonu, katı faz üzerinde, tutulma yoluyla analitlerin çözüldüden saflaştırılması ve ön deriştirme için örnek hazırlanması ve enstrümental analizler için uygun bir çözücü ile analize hazırlanması metodudur (Çıtak, 2006).

Katı faz ekstraksiyonunun temeli sulu faz içinde bulunan analitlerin katı faz üzerinde tutunmasına dayanır. Katı faz ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında daha az çözücü kullanılması, daha az zaman alması gibi bazı avantajlara sahiptir. Prensip olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer olan katı faz ekstraksiyonunda fazlardan biri katı diğeri sıvıdır ve bu fazlar arasında etkileşime dayanır. Bu uygulama yöntemi, örnek içinde bulunan analit iyonlarının katı faz üzerinde tutunması ile saflaştırma ve deriştirme sağlar. Yöntem, genellikle sıvı haldeki örneğin analitleri tutan bir katı içeren bir kolon, kartuş ya da diskten geçirilerek uygulanır. Örneğin tamamı katı fazdan geçirildikten sonra analitler uygun bir çözücü kullanılarak elüe edilir. Sıvı örneğin kolon veya kartuşlardan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manüel) gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir (Şekil 5).



Şekil 5. (a) Çeşitli ticari SPE kolon ve diskleri (b) Vakum manifoldu

Katı faz ekstraksiyonu katı fazın sıvı örnekle karıştırılmasıyla yapılan çalkalama tekniği ya da küçük bir kolon içine yerleştirilen katı fazdan sıvı haldeki örneğin geçirilmesi ile yapılabildiği gibi bir filtre üzerine yerleştirilen katı fazdan numunenin geçirilmesiyle de uygulanabilir (Fritz, 1999).

SPE dört adımda gerçekleşir. Bunlar;

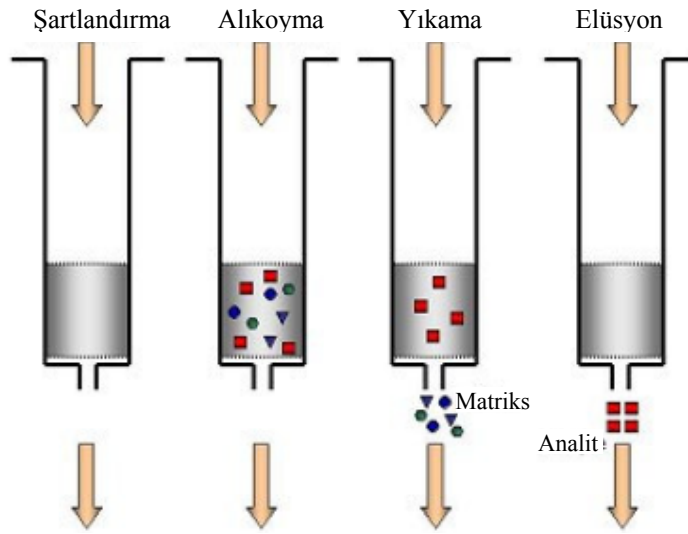
1. Şartlandırma basamağı: Şartlandırma işlemi, kolondan uygun çözelti geçirilerek tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve matriksteki maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesi amacıyla yapılmaktadır. Bu aşamada paketlenmiş materyalden çözücü, baştan sona geçerek, sorbent fonksiyonel gruplarının çözünmesi sağlanır, kolon içindeki hava uzaklaştırılır ve boşluklar çözücü ile doldurulur. Şartlandırma çözücüsü genellikle metanoldür. Ardından su veya sulu tampon çözeltisi kullanılır. Metanol ve ardından geçen su veya tampon çözelti yolu ile kolonun aktive edilmesi, sulu örneklerin tutunma mekanizmalarının uygun çalışmasını sağlamak içindir. Bu aşamada, ayrıca sorbent kurumasına izin verilmemelidir. Kuruma durumunda tutunma mekanizması etkili çalışmaz ve analitin geri kazanımı düşük olur (Çıtak, 2006; Yavuz ve Aksoy, 2006).

2. Alıkoyma basamağı: Daha sonra analiti içeren örnek, kolona ilave edilir. Örnek katı partikül içermemelidir. Örnekler yerçekimi, pompalama, vakum yolu veya otomatik sistemlerle kolondan geçirilir. Örnek sisteme ilave edilirken analit kolon üzerinde tutunur. Bu basamakta analit, sorbent üzerinde konsantre edilir. Bunun yanında bazı matriks bileşenleri tutunabileceği gibi, bazıları da tutunmadan geçer. Sorbent üzerinde uygun

bileşenlerin alikonumunu arttırmak ve ayırmak için veya istenmeyen bileşenlerin çöktürülmesi için tuz konsantrasyonu ve örnek çözeltinin organik çözücü ile bileşiminin pH'sı ayarlanmalıdır. Örnek çözeltisi ekstraksiyon cihazından vakum ya da pozitif basınç yapılarak yavaşça geçirilir. Akış derecesi alikonma oranını etkiler. Genellikle akış hızı 5mL/dk'nın üzerinde olmamalıdır.

3. Yıkama basamağı: Numune geçirildikten sonra istenmeyen maddeleri uzaklaştırmak için paketlenmiş madde yıkanmalıdır. Bu amaçla kullanılacak çözücü istenmeyen maddeleri uzaklaştırmalı fakat paketlenmiş maddede tutunan analiti çözmemelidir. Çözücü olarak genellikle numunenin çözündüğü çözücü sistemi kullanılır.

4. Elüsyon basamağı: Uygun bir çözücü ile analitin sorbentten ayrılması sağlanır. Uygun çözücü, analiti iyi ayırmalı ve analit-sorbent etkileşimine sebep olmamalıdır. Ayrıca çözücü az da olsa kolonda tutunmuş diğer maddelerin ayırımı için de uygun olmalıdır.



Şekil 6. Katı faz ekstraksiyonunun temel prensibi

SPE için kullanılan sorbentler; disklerde, kartuşlarda ve şırıngalarda olmak üzere üç temel şekilde paketlenir. Diskler, 4-90 mm arasında farklı yarıçaplarda kullanılabilir. Kartuşlar, 100 mg'dan 1 g'a kadar değişen miktarlarda sorbent içerir. Şırıngalar ise farklı hacimlerde ve farklı kütlelerde paketlenmiş malzemeler şeklinde kullanılır. Bunlar 1-25 mL hacimli olup paket ağırlıkları 50 mg ile 10 g arasındadır. Katı faz ekstraksiyonunda ayrılma ve izolasyon dört temel mekanizmaya sahiptir: ters faz, normal faz, iyon değişim ve

adsorpsiyon. SPE’de adsorban olarak sıklıkla C<sub>18</sub> ve C<sub>8</sub> kullanılmaktadır. Son zamanlarda moleküler baskılanmış polimerlerden de adsorban olarak faydalanılmaktadır (Kempe, 1996; Vlatakis vd., 1993; Theodoridis ve Manesiotis, 2002; Yang vd., 2009; Zhu vd., 2010). SPE’de sıkça kullanılan adsorbanlar Tablo’da verilmiştir.

Tablo 5. SPE adsorbanları (Zief, 2005; Hennion, 1999; Macherey-Nagel, 2004)

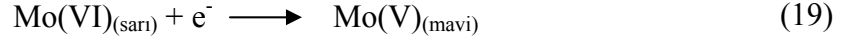
Adsorban	Formülü
Silika jel	SiOH
Alumina	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Florisil	MgSiO <sub>3</sub>
Oktadesil (C <sub>18</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>
Oktil (C <sub>8</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
Etil (C <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Siyano	CN
Fenil	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Sikloheksil	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>
Amino	NH <sub>2</sub>
Diol	COHCOH
Kuartern amin	N <sup>+</sup>
Aromatik sülfonik asit	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H
Karboksilik asit	COOH

## 1.7. Kullanılan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

### 1.7.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Gıdaların içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Folin Ciocalteu metodu doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için kullanılmaktadır. Bu metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifiyle alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 765 nm’de maksimum absorban oluşturur. Bu yöntem Singleton ve arkadaşları (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999) tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO<sub>4</sub> (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)’nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür.

Reaksiyon tamamlanınca 765 nm’de örnek absorbanları ölçülür. Bu denemede, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları,  $P(\text{MoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$  olması muhtemel mavi türlerin oluşumunu sağlar. Esasen, molibdenin kompleks içinde indirgenmesinin daha kolay olduğuna ve elektron-transfer reaksiyonunun indirgenler ve  $\text{Mo(VI)}$  arasında gerçekleştiğine inanılır (19) (Yıldız, 2007).



Fenolik bileşikler FCR (Folin Ciocalteu reaktifi) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. Reaksiyon ortamını bazikleştirmek için sodyum karbonat çözeltisi kullanılarak pH ~10’a ayarlanır. Fenolik protonun dissosiasyonu, reaktifi indirgeme yeteneğine sahip fenolat anyonunun oluşumunu sağlar (20).



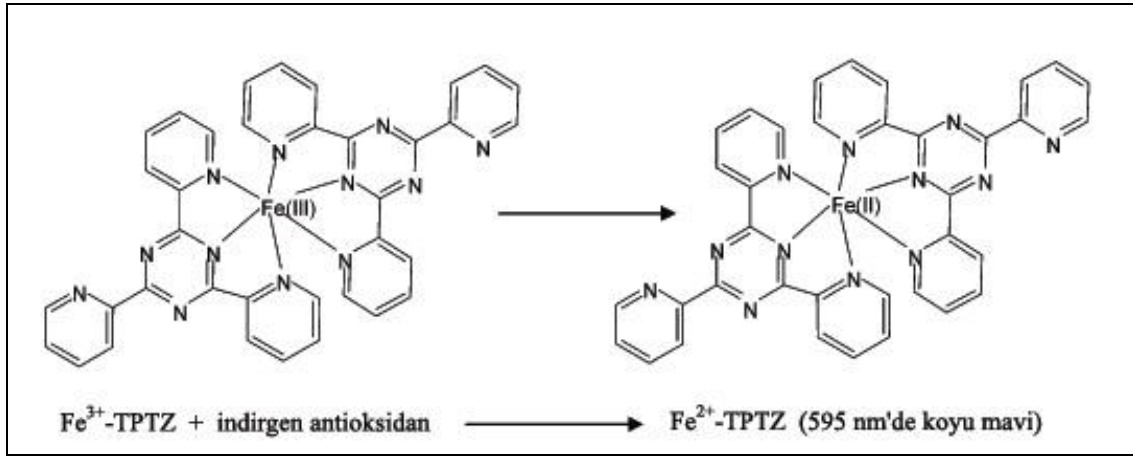
Orijinal Folin reaktifi, bir çeşit molibdotungstosforik heteropolianyon reaktifi olan  $3\text{H}_2\text{O-P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$  olarak modifiye edilmiş ve fenoller için daha seçici kılınmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemi basit, duyarlı ve kesinliği yüksek bir metottur. Ancak reaksiyon asidik pH’ta yavaştır ve spesifikliğini kaybeder. Metodun en önemli dezavantajı, ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte etmesidir. Bu nedenle spesifik bir metot olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca metodun diğer bir dezavantajı da analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğramasıdır (Huang vd., 2005; Prior vd., 2005).

### 1.7.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan metoda göre indirgeme kuvveti numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup  $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$  indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 595 nm’de takip edilerek belirlenir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır. Güncel olarak kullanılan FRAP metodunda 2,4,6-tripiridiltriazin (TPTZ)’in  $\text{Fe(III)}$  tuzu kullanılmaktadır. Bu metodun prensibi düşük pH larda oluşan  $\text{Fe(III)}$ ’ün, tripiridiltriazin ile reaksiyonu sonucu oluşan  $\text{Fe(III)}$ -tripiridiltriazin kompleksinin ( $\text{Fe(III)}$ -TPTZ) elektron veren antioksidanların varlığında renkli formuna

(Fe(II)-TPTZ) indirgenmesi esasına dayanır. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavidir ve 595 nm'de maksimum absorbands vermektedir (Benzie and Strain, 1999).

Bu yöntemle redoks potansiyeli 0,7 V'tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi H transferi ile radikal temizleyen özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.

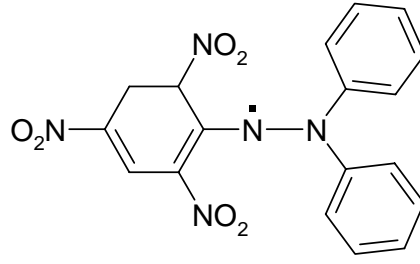


Şekil 7. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

FRAP metodu, antioksidan aktivite belirlemede uygulanan diğer yöntemlere kıyasla basit, hızlı ve ucuzdur. Ayrıca sağlıklı sonuç veren ve özel bir ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir (Prior vd., 2005).

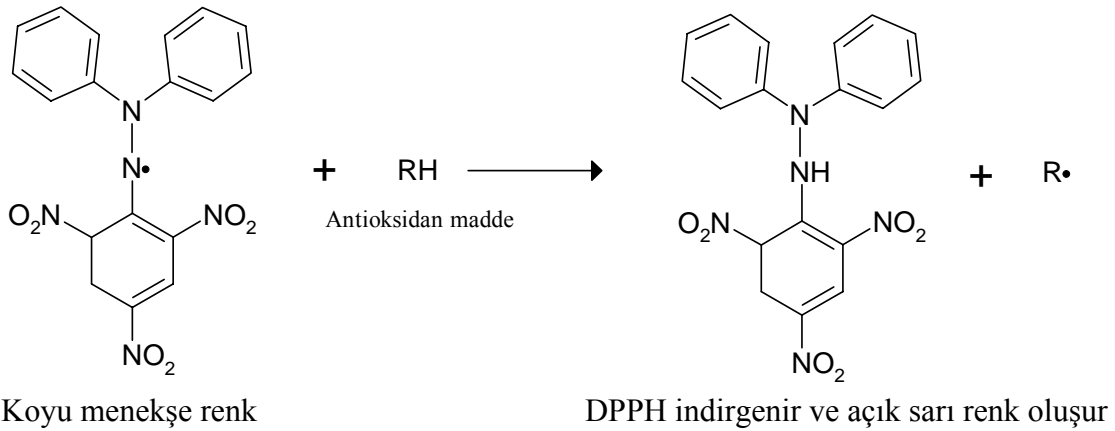
### 1.7.3. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm dalga boyunda maksimum absorbands oluşturmaktadır ve koyu menekşe renklidir (Cuendet vd., 1997).



Şekil 8. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

DPPH radikali bir antioksidan madde ile reaksiyona girdiği zaman indirgenme sonucu mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH<sup>•</sup>'in absorbansındaki değişim ölçülerek absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek  $y=ax+b$  denkleminde DPPH<sup>•</sup> konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{mg/mL}$  cinsinden belirlenmekte ve  $\text{SC}_{50}$  değeri olarak ifade edilmektedir.

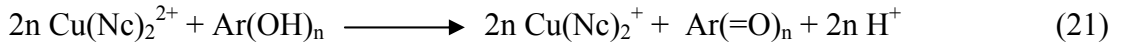


Şekil 9. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi

Bu metodun önemli bir dezavantajı büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu metoda antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu metod radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Prior vd., 2005).

#### 1.7.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayininde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kompleksine indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite tayin yöntemine “bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini” denilmiştir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır (Apak vd., 2004). CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, antioksidanlarla (Ar(OH)<sub>n</sub>) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir (21).



Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara cevap verir. Bu metod; Cu(II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asid hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir.

### 1.8. Bal ve Polen

#### 1.8.1. Balın Tarihçesi

Balın özellikleri ve üretimiyle ilgili bilinen ilk kitap, Sir John Hill tarafından yazılmış 1759'da Londra'da basılmıştır. Arı ve balın tarihçesi incelendiğinde, nektar ve polen üreten çiçekli bitkiler ile bunlardan faydalanan böceklerin 100-150 milyon yıl önce, ilk memelilerin de mevcut olduğu Jurassic/Cretaceous devresinde ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Bal üreten arılar 10-20 milyon yıl önce görülmüştür. Bal ile ilgili ilk resmi dokümanlar Anadolu'da Çatalhöyük'te bulunmuştur. M.Ö. 5000 yıllarında Sümerlerin yazılı belgelerinde bal üzerine bilgiler mevcuttur. Benzeri bilgiler Anadolu'daki başka bir uygarlık olan Hititlerin yazıtlarında da bulunmuştur. M.Ö. 3200'de Aşağı Mısır Kralı I. Dynasty, krallık sembolü olarak arıyı seçmiş ve krallığında bununla ilgili figürlere yer vermiştir. Musevi topluluklarında ise Tevrat ve Talmut'ta yazıldığı gibi Kur'anı Kerim'de



de balın yararlarından söz edilmektedir. Roma imparatorluğuna ait bazı yazıtlarda da bal ve arıcılık üzerine çeşitli bilgiler bulunmaktadır (Ötleş, 1995). Yazıtlar, resimler ve tarihi kayıtlar arı yetiştiriciliğinin eski Mısır'da başladığını, Mezopotamya, Anadolu ve Avrupa'nın da gelişiminde önemli yer tuttuğunu göstermektedir. 17. yy'da ise göçmenlerle Yeni Dünya ülkelerine taşınmıştır.

### 1.8.2. Balın Tanımı ve Bileşimi

Türk Standartları Enstitüsüne göre bal, bitkilerin çiçeklerinden ya da diğer canlı kısımlarında bulunan nektar bezlerinden salgılanan nektarın ve bitki üzerinde yaşayan bazı böceklerin, bitkilerin canlı kısımlarından yararlanarak salgıladığı tali maddelerin, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir üründür. Bal, arıların en önemli gıda maddesi olup bal olmadan arılar yaşamlarını sürdüremezler. Arılar kış aylarında aç kalmamak için petek gözlerini balla doldururlar. Genel olarak bileşimi toplandığı bitki kaynağına göre değişmekle birlikte % 16-20 'sı su geri kalanı ise karbohidratlar, enzimler, vitaminler ve minerallerden oluşmaktadır (Sönmez, 1979; Rodriguez vd., 2004).

Balın kuru maddesinin %95'ini karbohidratlar oluşturur. Bunların başında monosakkaritler (glukoz ve fruktoz) gelir ayrıca disakkaritler ve yüksek şekerler de mevcuttur. Hemen hemen tüm bal çeşitlerinde fruktoz miktar olarak diğer şekerlerden fazladır. Çeşitli balların sakkaroz, maltoz, laktoz, izomaltoz, nigeroz, gentiobiyoz, laminaribioz, maltuloz, turanoz, neorehaloz gibi disakkaritlerin yanı sıra melizitoz, erloz, maltitrioz, 1-ketoz, panoz, izomaltosil glukoz, izomaltosil trioz, theandroz, sentoz, izopanoz, izomaltosil tetroz, izomaltosil pentaoz ve rafinoz gibi yüksek şekerleri de içerdiği bildirilmiştir (White, 1979; White 2003; Krell 2001; Sunay, 2006). Bu şekerlerin pek çoğu nektarda bulunmaz, ancak balın olgunlaşması ve depolanması esnasında enzimler ve asitlerin etkisiyle oluşur.

Bal, yapısında bulunan farklı organik asitlerin ve asidik tuzların etkisiyle, zayıf asidik özellik gösterirler. Balın pH'sı 3,5-5,5 arasında değişim gösterip balda bulunan asitler glukonik asit başta olmak üzere formik asit, asetik asit, bütirik asit, sitrik asit, kaproik asit, laktik asit ve tartarik asitlerdir. Balda bulunan organik asitler, balın lezzetine etki etmekte ve balı mikroorganizmalara karşı dayanıklı hale getirmektedir (Bogdanov vd., 2004). Tüm

ballarda bulunan glukonik asit arıların olgunlaşma esnasında ekledikleri glukoz oksidaz aktivitesi sonucu oluşur. Balda en fazla bulunan enzimlerden biri diastaz (amilaz) olup invertaz, katalaz, glukoz oksidaz ve fosfatazların bir kısmı bitkiden çoğu arının midyesinden bala salgılanmaktadır. Nişastayı parçalayan diastaz enzimi nektara olgunlaşma esnasında arı tarafından ilave edilir. Nektarlar nişasta içermediğinden, bu enzimin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Arıların bu enzimi polen taneciklerindeki nişastayı sindirmek için kullandıkları tahmin edilmektedir (White 2003, White, 1979). Bu enzim de diğer enzimler gibi ısı ile inaktive olur ve ısıya invertaz enziminden daha duyarlı olduğu için ballara uygulanan ısıl işlemleri tespit etmek amacıyla kullanılır. İvertaz, glukoz oksidaz ve amilaz (diastaz) enzimlerinin kaynağı işçi arıların salgıdır. Bir miktar amilaz enzimin bitki kaynaklı olduğu bilinmektedir. Katalaz ve asit fosfataz enzimleri ise tamamen bitki kaynaklıdır (Crane, 1990). İvertaz, nektarda bulunan sakkarozu invert şekere (glukoz ve fruktoz) çeviren bir enzimdir. Glukoz oksidaz, glukozu okside ederek glukonolaktona ve glukonik aside çevirerek asitliği arttırmakta bu şekilde balın fermentasyona karşı daha iyi korunmasını sağlamaktadır.

Balın küçük ve değişken miktarlarda altı vitamin içerdiği rapor edilmiştir. Bunlar tiamin, riboflavin, pridoksin, pantotenik asit, niasin ve askorbik asittir. Ayrıca balda biotin ve folik asite de rastlanmıştır (White, 2003; Krell, 2001).

Bal, beyazdan açık sarı, koyu kahverengi, hatta siyaha kadar uzanan farklı renklere sahip olabilmektedir (Bogdanov vd., 2004). Balın rengi, mineral ve yapısındaki polifenollerden kaynaklanmaktadır. Bal rengi balın tüketici tarafından kabul edilebilirliğini etkileyen bir faktördür (Gonzales vd., 1999). Balın rengi ile içerdiği kül miktarı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Genelde koyu renkli ballar, açık renkli ballardan daha çok mineral içermektedir Balın mineral bileşimi % 0,02 ile % 1 arasında değişim gösterip başta K, Ca, P olmak üzere Fe, Cu, Zn, Se, F ve Cl bulunmaktadır (Rashed ve Soltan, 2004; Sönmez, 1979; Yao vd., 2004). Enzim proteinleri dışında balda çok az protein bulunur. Bal proteinlerinin bir kısmı arıdan bir kısmı da çiçekten gelebilmektedir. Yapılan çalışmalarda balda albümin, globün, proteoz ve peptonlara rastlanmıştır. Balda bulunan azotlu bileşiklerin %35-65'inin protein olmayan kaynaklardan geldiği bilinmektedir. Baldaki protein olmayan azotun çoğu amino asitlerden gelmektedir. Amino asitlerin bir kısmı nektara arılar tarafından ilave edilmekte bir kısmı da bitkiden taşınmaktadır. Yapılan araştırmalarda bazı amino asitlerin birbirlerine oranlarının balın üretim alanını karakterize edebildiği tespit edilmiştir. Prolin başta olmak üzere balın lizin, histidin, arginin, aspartik

asit, treonin, serin, glutamik asit, glisin, alanin, sistin, valin, metionin, izolösin, lösin, tirozin, fenilalanin, tirptofan amino asitlerini içerdiği belirlenmiştir.

Balda kalite kriteri olarak kullanılan en önemli iki biyokimyasal kriter balın HMF içeriği ve diastaz sayısıdır (White, 1994; Fallico vd., 2004). Yapılan çalışmalarda sıcaklık ve depolama süresinin artmasıyla baldaki HMF içeriğinin arttığı ve diastaz sayısının azaldığı bildirilmiştir (Dustmann, 1993). HMF, balda ısıtmadan veya uzun süre depolamadan dolayı fruktozun parçalanması ile ortaya çıkar. Ballarda HMF miktarının az olması istenir. Balda HMF miktarının artmasına, hasat sonrası ısıtma işleminin uygulanması, depolama süresi, depolama sıcaklığı ve balın pH'sı etki etmektedir. Türk Gıda Kodeksi (2005) kaliteli bir balda HMF miktarını 40 mg/kg'dan fazla olmaması gerektiğini belirtmektedir.

Diastaz sayısı, 100 g balda bulunan amilaz enzimlerinin, 38-40 °C'de, 1 saat içerisinde ve deney koşullarında parçaladığı nişasta miktarını ifade etmektedir. Kaliteli bir balın diastaz sayısı yüksektir. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2005) kaliteli bir baldaki minimum diastaz sayısını en az 8 olarak belirlemiştir. Balda diastaz kaybı istenmeyen bir durumdur, ancak balda çok yüksek düzeyde diastaz bulunması da arzu edilmez. Balda yüksek düzeyde diastaz bulunması, yüksek asit oluşumuna dolayısıyla fermentasyona neden olmaktadır (Crane,1975).

### **1.8.3. Balın Yararları**

Enerji değeri çok yüksek bir besin olan bal bebeklerin, çocukların, sporcuların ve yaşlıların beslenmesinde kullanılır. Bal doğal bir antibiyotik gibidir ve binlerce yıldan beri yara ve yanıkların tedavisinde, mide rahatsızlıklarında ve cilt rahatsızlıklarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Balın bakteri, maya, mantar ve virüsler üzerine inhibitör etkisi bulunduğu, topikal bal uygulanmasının bakteriyel enfeksiyonları yok etmede, yara iyileşmesini hızlandırmada ve deri hücreleri tarafından sitokin yapımında etkili olduğu bildirilmiştir (Al-Waili, 2004). Balın antibakteriyel özelliği; asidik yapıda oluşuna, büyük oranda kuru madde (şeker) ve ayrıca enzimlerle glukozun parçalanması sonucunda oluşan antiseptik bir madde olan hidrojen peroksit içermesine bağlıdır.

Özellikle son yıllarda Avrupa'da ve Amerika'da yanık merkezlerinde tedavi amacıyla bal kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bal kanser de dahil olmak üzere bir

çok hastalıkta enerji ve şifa kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Dustmann, 1993 ; FAO, 1996; Mundo vd., 2004; URL-6, 2010; URL-7, 2010).

Balın gerçek özelliklerinden biri uzun süre bozulmadan kalmasını sağlayan antibiyotik özellikleridir. Balın antimikrobiyal özelliklerinden dolayı doğal bir besin koruyucusu olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak bal mikroorganizmalar nedeniyle bozulmasına direncini artıran yüksek osmatik basınca sahiptir (White, 1979). Balın antimikrobiyal aktivitesi balın doğasında bulunan glukoz oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksitle ve fenolik bileşiklerle ilişkilidir. Klinik gözlemler balın kronik yaralarda iyileşmeyi başlattığı veya hızlandığını ve balın yara, yanık ve deri ülserleri tedavisi üzerinde etkili olduğunu bildirilmektedir (Tonks vd., 2003). Bal flavonoidlerinin botaniksel, coğrafi ve entomolojik orijinleri ile onların antikatarakt aktiviteleri arasındaki ilişki araştırılmıştır ve katarakt tedavisinde flavonoid içeriğinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Vit ve Tomás-Barberán, 1998; Aljadi ve Kamaruddin, 2004). Son zamanlarda bakteri ve rotavirüslerin neden olduğu gastrointestinal enfeksiyonlardan gastritis, duodenitis ve gastrik ülserde balın oral olarak kullanımının tedavi edici ve koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Alnaqdy vd., 2005). Yapılan çalışmalar sıçan ve fare tümörlerinde balın antitümör etkinliği ve antimetastatik etkilerinin olduğunu göstermektedir (Swellam vd., 2003)

Balın mide ve bağırsakla ilgili bozukluklarda (Haffeejee vd., 1985; Ladas vd., 1995), yara ve yanıkların iyileşmesinde (Efem, 1988; Subrahmanyam, 1991) bir antimikrobiyal ajan olarak etkili olduğu (Ladas vd., 1995; Ali vd., 1991), akut ve kronik mide lezyonlarına karşı gastrik koruma sağladığı bildirilmiştir (Ali, 1991; Ali, 1995).

Doğal antioksidanlar özellikle flavonoidler antibakteriyel, antialerjik, antitrombotik ve vazodilatör (kan damarı lümenlerinin genişlemesi ile ilgili) hareketleri kapsayan geniş bir aralıkta biyolojik etki gösterirler (Cook ve Sammon, 1996). Balın antioksidan aktivitesi yapısında bulunan askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferoller,  $\beta$ -karotenler gibi bileşikler yanında çok sayıda polifenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Farklı botanik orijinli ballarda birçok fenolik bileşik tanımlanmaktadır (Frankel vd., 1998). Balda bulunan bir flavonoid olan krisin'in (5,7-dihidroksiflavon) potansiyel antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Kolankaya, 2001; Weng vd., 2005). Ayrıca balın antioksidan aktivitesi ile prolin içeriği arasında korelasyon olduğu bulunmuştur. Yüksek oranda pirolin amino asiti içeren bazı balların diğer ballara göre daha yüksek düzeyde antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Meda vd., 2005). Balın içerdiği çeşitli

flavonoidlerden apigenin, pinosembrin, kampferol, kuersetin, galangin, krisin, hesperitin ve fenolik asitlerden ellagik, kafeik, p-kumarik ve ferulik asitin antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Türkmen vd., 2006).

#### 1.8.4. Polen

Polen Latince "çam unu" anlamına gelmektedir. Polenleri ve sporları inceleyen bilim dalına kökeni Yunanca olan palinoloji denmektedir. Polen ile ilgili ilk ciddi çalışmalar mikroskopun keşfi ile başlamıştır. Malpighi ve Grew ilk kez mikroskopla polenin yapısını incelemişler ve her bitkinin kendine özgü polen yapısı olduğunu görmüşlerdir (Straka, 1975). Polenler birden fazla hücre içeren minyatür organizmalardır. Polenin içinde vejetatif hücre ile bunun içerisinde yerleşmiş gibi duran iki generatif hücre (sperm hücresi) bulunur. Polenler çiçekli bitkilerde erkek organlardan (stamen) iplikçik (filament) üzerinde yer alan başçık (anterler) içindeki polen keseciklerindeki polen ana hücrelerinden oluşurlar. Olgunlaşma tamamlandıktan sonra anter zarının yırtılmasıyla serbest kalırlar.

Polenlerin asıl işlevi sperm hücrelerini çiçeğin dışı organı içerisindeki yumurta hücresine taşımaktır. Serbest kalan polenler rüzgâr, böcek gibi araçlarla dışı organın tepelik (stigma) kısmına taşınırlar. Burada çimlenen polen tanesi polen hortumunu oluşturur ve bu hortum dışı borusunu geçerek yumurtalıktaki tohum taslağına ulaşır, sperm hücreleri de hortum aracılığıyla tohum taslağına girer ve yumurta hücresini döller. Bitkinin döllenmesinde ve meyve gelişiminde esas rolü polenler oynar (Gemici vd., 1995).

Normal büyüme ve gelişme için bal arıları da tıpkı diğer hayvanlar gibi proteinlere, karbohidratlara, lipitlere, vitaminlere, minerallere ve suya gereksinim duyarlar. Arılar bu besin maddelerini topladıkları nektar, polen ve sudan sağlarlar. Çiçeklerden ve diğer kaynaklardan topladıkları nektar ile karbohidrat gereksinimlerinin çoğunu karşılarlar. Arılar çok çeşitli bitkilerden toplamış oldukları poleni öncelikle protein kaynağı olarak kullanır. Polen özellikle esansiyel amino asitlerce zengin olup bal arılarının vücut dokularının, kasların ve bezlerin gelişmesi, gıdalarında yeterli miktarda proteinlerin bulunmasına bağlıdır. Gözden yeni çıkan arıların 1-2 saat içerisinde polen tüketmeye başlamasıyla vücut gelişimleri de başlamaktadır. Genç ergin işçi arıların bol miktarda polen tüketmeleriyle yavru gıda bezleri uyarılır. Böylece proteince zengin arı sütünün salgılanması sağlanır. Tüm larvalar ilk 3 gün arı sütüyle 4 günden büyük işçi ve erkek arı

larvaları sulandırılmış bal, nektar ve polenle, ana arı larvaları ise tüm yaşamları boyunca arı sütü ile beslenirler. Bal arıları polen olmaksızın arı sütü üretemezler. Arılar poleni ayrıca yağ, vitamin ve mineral kaynağı olarak da kullanmaktadırlar (Schmidt ve Buchman, 1997; Krell, 1996).

Arılar bal yapmak için çiçeklerden besin toplarken, çiçekten çiçeğe konarlar. Böylece hem çiçeklerin döllenmesini sağlarlar hem de yavrularını beslemek için kovana polen götürürler. Polenin çok yüksek besin değerli olduğu keşfedildikten sonra kovanların girişlerine polen tuzakları yerleştirilmiş ve bu sayede arıyı rahatsız etmeden kovadaki polen stokları toplanmaya başlanmıştır (URL-8, 2010). Çiçek tozlarını arka ayaklarında küçük birer polen taneciği halinde biriktirerek kovana dönen işçi arı, kovana dışına ve giriş deliği ağzına özel olarak yerleştirilen ve adına polen tuzağı denilen ağzı dar, altı elekli kutu şeklindeki tahta kapandan sürünerek kovana geçmek isterken, arka ayaklarındaki polen taneciklerini alttaki hazneye düşürür. Kovana polensiz olarak girer. Bir kovana giren günlük polenin % 10'unun bu şekilde alınması, kovadaki bal verimini ve arı yaşamını etkilemez. Daha fazla alınırsa verim ve düzen bozulabilir (URL-9, 2010). Arıdan alınan polen o anda nemlidir ve çabuk bozulabilir. Haznede biriken polen, 1-2 gün aralıklarla boşaltılıp 42°C'yi geçmeyen sıcaklıkta kurutma depolarında kurutulup su oranı %7-8 oranına düşürülür. Daha sonra eleklerden geçirilip temizlenen polen hava almayacak şekilde ambalajlanıp 6 aya kadar olan depolama için oda sıcaklığında daha uzun depolama için soğuk ortamda saklanır. Uzun süreli saklanacak polen CO<sub>2</sub> gazı ile fümige edilebilir (URL-10, 2010). Bu nedenle ya gölge ya da havadar bir ortama serilerek kurutulabilir.

Polen tanecikleri ait oldukları bitkiye göre renk, koku, büyüklük, şekil ve içerik bakımından farklılıklar gösterirler. Polenler içerdikleri renk pigmentlerine göre çoğunlukla sarı renkte olmakla beraber siyah, kırmızı, eflatun, mor, pembe, beyaz vb. gibi farklı renk tonlarında olabilirler. Polenlere renk içeriklerini  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, likopen ve ksantofil gibi karotenoid maddeler verir. Polenin kimyasal kompozisyonu da bitki türüne göre farklılık gösterir. Yapılan çalışmalara göre arı polenleri %7,5-35 protein, %1-15 lipit, %15-45 karbohidrat, %1-5 kül, %0,1-6 fosfor, %0,15-1,1 potasyum, %0,1-0,5 kalsiyum, %0,1-0,35 magnezyum, %0,15-0,8 sodyum yanı sıra manganez, çinko, bakır gibi mineralleri 6-25  $\mu$ g/g ihtiva etmektedir. Ayrıca polenlerin tiamin, niasin, pantotenik asit, biotin, vitamin C ve karotenleri içerdiği de bildirilmiştir (Schmidt ve Buchmann, 1997). Yapılan bir başka

çalışmaya göre ise arı poleni %20-25 su, %1,8-3,7 kül, %13-17 karbohidrat, %3-5 selüloz, %6-28 protein ve %1,2-3,7 lipit içermektedir (Doğaroğlu, 1999).

Genel sağlığın korunması ve vücut direncinin artırılması yanında dengeli beslenme amacıyla polen tüketimi yaygındır. Arı poleni zihinsel ve bedensel yorgunluklarının giderilmesinde; çocukların sağlıklı gelişmesi ve beslenmesinde; düşünme, araştırma ve çalışma gücünün artırılmasında; sporcuların ve yarış hayvanlarının performanslarının artırılmasında; kansızlığın giderilmesinde ve karaciğer, prostat ve kanser hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır (URL-10, 2010). Arı polenin fenolik bileşiklerce zengin olduğu ve başlıca içerdiği flavonoidlerden kaynaklı antioksidan oldukları bildirilmiştir (Kroyer ve Hegedus, 2001, Campos vd., 2003; Leja vd., 2007; LeBlanc vd., 2009; Mārghitaş vd., 2009). Polenin serbest radikal temizleyici ve lipit peroksidasyonu inhibitörü olarak görev yaptığı ve arı poleni fenolik ekstraktlarının antialerjik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Almaraz-Abarca vd., 2004; Uzbekova vd., 2003; Medeiros vd., 2008). Kronik Hepatit B'li 47 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada polenle uygulanan kürün tedaviye iyi geldiği ve hepatik ensefalopati (hepatik koma da denir) gelişimi tehlikesini azaltabileceği bildirilmiştir (Uzbekova vd., 2001). Aliyazıcıoğlu vd. (2005) Türk polen ve propolisleriyle yaptıkları çalışmada polen ve propolis ekstraktlarının solunum patlamasını (respiratory veya oxidative burst: reaktif oksijen türlerinin farklı hücrelerden hızlı salınması) inhibe ettiğini ve özellikle polenlerin daha iyi sonuçlar verdiğini gördüler. Ancak nadiren de görüle polen bazı kişilerde alerjik reaksiyona neden olabilir. Bu durumda polenin kullanılmaması gerekir.

### 1.9. Literatür Özeti

Bal ve polenin yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğuna dair literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Balın bileşiminin ve özellikle biyolojik etkiliğinden sorumlu ajanların toplandığı bitki florasına ve coğrafik pek çok özelliğe bağlı olduğu bildirilmektedir (Weston, 1999; Anklam, 1998; Al-Mamary vd., 2002; Chen vd., 2000; Frankel vd., 1998; Gheldof ve Engeseth, 2002; Gheldof vd., 2002; Yao vd., 2003; Viuda-Martos vd., 2008).

Akbulut vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada Batı Anadolu'dan Muğla'nın farklı bölgelerinden toplanan 15 adet kızılçam balının (red pine) bazı fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra antioksidan aktiviteleri de analiz edilmiştir. Antioksidan aktiviteyi

tayin etmek amacıyla DPPH radikali temizleme aktivitesi testi uygulanmış ve balların 25,55-50,78 mg/mL aralığında SC<sub>50</sub> değerlerine sahip oldukları bulunmuştur. Yapılan toplam fenolik madde tayinine göre ise balların polifenol içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmış ve 234,9-394,0 mg/100 g olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivite ile toplam polifenol içeriği arasında anlamlı korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (R= 0,887).

Yao vd. (2005) tarafından beş farklı botanik türden Avusturya balının sekiz fenolik asit ve iki absisik asit izomerinin miktarları ve bunların botanik orijinle bağlantısı analiz edilmiştir. Ballar pH 2 olacak şekilde çözünürleştirilip ekstraksiyon kolon kromatografisi ile Amberlit XAD-2 reçinesi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Reçineden elüsyon metanolle yapıp, çözücü uçurulduktan sonra dietileter ekstraksiyonu yapılmıştır. Son kalıntı metanolde çözülüp RP-HPLC ile C18 kolonu (125 mm × 4 mm i.d., 5µm partikül) kullanarak su: formik asit (19:1) (çözücü A) ve metanol (çözücü B) çözücü sistemiyle gradient programı uygulanarak 1 mL/dk akış hızında 65 dakikalık bir analiz süresiyle çalışılmıştır. Kromatogramlar 290 ve 340 nm'de izlenmiştir. Toplam fenolik asit miktarının 2,13mg/100 g ayçiçeği bal (günebakan çiçeği, *Helianthus annuus*) ile 12,11 mg/100 g çay ağacı (*Melaleuca quinquenervia*) bal arasında değiştiği gözlenmiştir. Çay ağacı balının fenolik profilinin Avusturya *Eucalyptus* balına (*Eucalyptus intermedia*) benzediği ve gallik, ellagik, klorojenik ve kumarik asitlerden oluştuğu, çay çiçeği ve bloodwood (Avusturya'da iki farklı ağaç türü) ballarının başlıca farkının yapılarındaki klorojenik asitin toplam fenolik profile katkısı olduğu belirlenmiştir. Avustralya *Guioa semiglauca* (crow ash) balının karakteristik bir fenolik profil gösterdiği ve başlıca gallik asit ve absisik asit içerdiği ve bunların flora belirteci olabilecekleri belirtilmiştir. Kumarik asitin Avustralya ayçiçeği balının karakteristik bir bileşeni olduğu ve gallik asitle beraber balların kimlik denetimi için kullanılabilceği rapor edilmiştir.

Yao vd. (2003) çalışmalarında Avustralya ve Yeni Zelanda *Leptospermum* ballarının HPLC ile flavonoid, fenolik asit ve absisik asit bileşimini incelemiştir. Ballar pH 2 olacak şekilde çözünürleştirilip Amberlit XAD-2 reçinesi ile kolon kromatografisinden sonra metanolle elüsyon ve devamında dietileter ekstraksiyonu yapılmıştır. Son kalıntı metanolde çözülüp RP-HPLC ile C18 kolonu (125 mm × 4 mm i.d., 5µm partikül) kullanılarak %5'lik sulu formik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B)'den oluşan hareketli faz ve sabit akış hızında (1mL/dk) gradient elüsyon programı uygulanmıştır. Avustralya ballarından (*Leptospermum polygalifolium*) 15 flavonoid izole edilmiş, miktarları 2,22 mg/100g bal olarak belirlenmiş, tanımlanan ana flavonoidlerin mirisetin,



luteloin ve trisetin olduğu rapor edilmiştir. Başlıca gallik ve kumarik asit içeren bu balların ortalama fenolik asit miktarının 5,14 mg/100 g olduğu ve absisik asit miktarının (11,6mg/100g) diğer fenolik asitlerin miktarının 2 katı kadar olduğu belirlenmiştir. Yeni Zelanda ballarının (*Leptospermum scoparium*) başlıca flavonoidlerinin kuersetin, isorhammentin, krisin ve luteolin olduğu, ortalama toplam flavonoid miktarının 3,06 mg/100g bal olduğu, toplam fenolik asit miktarının 14,0 mg/100 g bala kadar olabildiği ve ana bileşenin gallik asit olduğu bildirilmiştir.

Baltrušaitytė vd. (2007) tarafından Litvanya'dan toplanan farklı flora orijinli 35 balın ve 9 beabread'in (bal arıları ve larvalarının başlıca yiyeceği) fenolik ekstraktlarının radikal temizleme aktivitesi ve fenolik bileşiklerinin incelendiği bir çalışmada fenolik ekstraktlar Amberlite XAD-2 reçinesi ile (10,3 -348,8 mg ekstrakt /100 g örnek) elde edilmiştir. Bütün örneklerin radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu fakat sonuçların geniş bir aralıkta (%43,0-%95,7) değişim gösterdiği bulunmuştur. Tek floralı balların DPPH radikali temizleme aktivitesinin %36,5-86,9 olduğu, çoklu floralı balların ise % 64,2-80,9 olduğu bulunmuştur. Bazı bal örneklerinin botanik içeriklerinin çok benzer olmalarına rağmen antioksidan aktivitelerinin farklılık gösterdiği, bu sonucun balların rengiyle ilişkilendirilebileceği ve botanik orijinin antioksidan aktiviteye katkıda bulunan tek faktör olmadığı belirtilmiştir. Balların fenolik bileşikleri C18 kolonu, (250 mm × 4,60 mm i.d., 4µm) RP-HPLC-UV ile kütle spektrofotometresi kullanarak belirlenmiştir. 0,8 mL/dk akış hızında 40 dakikalık analiz süresinde %10'luk metanol ile %1'lik asetik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B) sistemiyle lineer ikili gradiyent elüyon uygulanmıştır. Kromatogramlar 254 nm'de izlenmiştir. Bütün balların *p*-kumarik asit, kampferol, krisin ve apigenin içerdiği ve farklı kaynaklardan elde edilen balların antioksidan aktivitesi ve fenolik içeriğinin fark edilir derecede değişim gösterdiği görülmüştür.

Märghitaş vd. (2009) tarafından yapılan bir araştırmada; farklı botanik orijine sahip polenlerin metanollü ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Farklı çiçek florasına sahip türlerin her birinin farklı antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve antioksidan aktivitenin toplam polifenol içeriğiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Gallik asit standardı kullanarak yapılan toplam polifenol tayininde polenlerin 4,4-16,4 mg GAE/g toplam polifenol içerdiği, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O'nun standart olarak kullanıldığı FRAP testinde polenlerin 0,255-5,355 mmol Fe<sup>+2</sup>/g FRAP değerine sahip oldukları bulunmuştur. DPPH testinde ise Trolox<sup>®</sup> standart olarak kullanıp sonuçlar Trolox<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan kapasite olarak 0,274-2,814 mmol TR/g olarak hesaplanmıştır. Toplam polifenol ile FRAP arasındaki

korelasyonun  $R=0,502$  ve toplam polifenolle DPPH testi arasındaki korelasyonun  $R=0,680$  olduğu bulunmuştur.

Sonoran Çölü çevresinden toplanan 6 farklı arı poleniyle yapılan bir çalışmada polenlerin antioksidan aktivitesi incelenmiş ve toplam polifenol içeriğiyle antioksidan aktivite arasında iyi korelasyon olduğu bulunmuştur (LeBlanc vd., 2009). Polenler 8 farklı çözücüyle çözülerek hangi çözücülerde antioksidan aktivitenin daha iyi olduğu tespit edilmek istenmiştir. FRAP testinde metanollü ( $0,93-3,96$  mM  $Fe^{+2}$ ) ve dimetilformamidli ( $0,51-4,15$  mM  $Fe^{+2}$ ) ekstraktların en yüksek aktiviteyi gösterdiği, sonuçların % aktivite olarak verildiği DPPH testinde de en yüksek aktiviteyi metanollü (%19,76-%90,45) ve dimetilformamidli (%24,46-%89,05) ekstraktların gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca metanollü ekstraktların DPPH aktivitesi  $ED_{50}$  olarak ( $ED_{50}=SC_{50}$ ) hesaplanmış ve  $0,01-0,15$  mg/mL olduğu bildirilmiştir. Metanollü ekstraktların kullanılmasıyla yapılan toplam polifenol tayininde gallik asit cinsinden toplam polifenol içeriği  $15,91-34,85$  mg/g olduğu belirlenmiştir. Testler sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren polenlerin yüksek polifenol içeriğine sahip olan polenler olduğu saptanmıştır.

Leja vd. (2007) seçilmiş bitki türlerinin arı polenleri üzerine yaptıkları çalışmada 12 bitki türünün arı polenin antioksidan aktivitesini araştırmıştır. Bu 12 polenin antioksidan aktivite ve fenolik içeriğinin değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir. Klorojenik asit cinsinden toplam polifenol içeriğinin  $15,15-82,43$  mg/g aralığında değişim gösterdiği bulunmuştur. DPPH radikali temizleme aktivitesinin % aktivite olarak %8,6-91,3 gibi geniş bir aralıkta değiştiği görülmüştür.

Kroyer ve Hegedus (2001) tarafından yapılan bir araştırmada arı poleni ve doğal polenlerin biyoaktif özellikleri incelenmiş ve arı polenin  $8,2$  mg/g doğal polenlerin ise  $21,4-24,6$  mg/g polifenol içerdiği bildirilmiştir. DPPH testinde sonuçlar % inhibisyon olarak verilmiş ve arı polenin %39 doğal polenlerin ise %39-53 inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir.

*Cystus incanus* L.'ce zengin Hırvatistan arı polenin fenolik bileşiklerinin incelenmesi ile ilgili bir araştırmada HPLC-UV, C18 kolonu ( $250 \times 4,6$  mm i.d.,  $5 \mu m$ ) ve fraksiyon toplayıcı kullanılmıştır (Šaric' vd., 2009). Enjeksiyon hacmi  $200 \mu L$ , akış hızı  $1$  mL/dk ve sıcaklık  $45^\circ C$  olarak ayarlanmıştır. Polen %5 formik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B) çözücülerıyla 45 dakikada %10'dan %90'a kadar lineer gradient elüsyonla 9 fraksiyona ayrılmıştır. İlk 7 fraksiyon %5 formik asit (A) ve asetonytril (B) ile 30 dakikada çözücü B %5'ten %53 olana kadar lineer gradiyent elüsyonla; diğer iki fraksiyon %33,5

çözücü B ile 30 dakika boyunca izokratik ayırma uygulanarak analiz edilmiştir. Polenin hidrolizli ve hidrolizsiz olarak iki farklı analizi yapılmıştır. Hidrolizsiz çalışmada polenin kafeik asit, galangin, kampferol, krisin ve pinosembrin içerdiği bulunurken hidrolizli çalışmada bunların yanı sıra isorhamnetin ve kuersetin olduğu saptanmıştır.

Michalkiewicz vd. (2008) katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile C18 kartuş kullanarak fenolik bileşikleri izole ve konsantre ederek HPLC ile farklı botanik orijinli balların fenolik asit ve flavonollerini incelemişlerdir. C18 kolunu, 2 mM formik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B) hareketli fazlarıyla gradient elüsyon kullanılmıştır. HPLC-UV ile yaptıkları analizlerde fenolik bileşiklerin LOD değerlerinin 0,01-0,12 ppm aralığında olduğu, bütün piklerin alıkonma zamanlarının BSS'lerinin %1'den küçük olduğunu ve standart çözeltilerin lineer cevaplar verdiği ( $R^2 > 0,99$ ) bildirilmiştir. Linden (ıhlamur) balının rutin (5 mg/kg) *p*-hidroksibenzoik asit (4,1 mg/kg) vanillik (3,7 mg/kg) ve kafeik asit (3,6 mg/kg) içerdiği, Heather balının ise *p*-hidroksi benzoik (2,8mg/kg) asit ve şiringik asiti (1,8 mg/kg) yüksek oranda içerdiği bulunmuştur.

LC-MS kullanarak yapılan farklı bir çalışmada 3 adet balın fenolik bileşikleri incelenmiş ve fenolik bileşiklerin tanımlaması HPLC-ESI-MS/MS kullanarak yapılmıştır (Biesaga ve Pyrzyńska, 2009). Küçük partikül çapına sahip bir C18 (50mm × 2,1mm i.d., 3µm) kolonu ile 2 mM formik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B) hareketli fazlarıyla gradient elüsyon uygulanarak 16 dakika gibi kısa bir analiz süresinde 19 adet fenolik bileşik standartının (vanillik, gallik, kafeik, şiringik, *p*-kumarik, *p*-hidroksifeniloasetik, *p*-hidroksibenzoik, klorojenik, ferulik ve sinapik asit, mirisetin, narginin, naringenin, luteolin, apigenin, isorhamnetin, kuersetin, kampferol, rutin) ayrımı başarılmıştır. Kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için 0,05-50 ppm aralığında standart çözeltiler kullanılarak lineer kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir ( $R^2 \geq 0,996$ ). LOD değerlerinin 1-15 ng/L aralığında, % BSS'ların %1,3-6,8 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerden karabuğday (buckwheat) balının yüksek oranda ferulik asit (54,4 mg/kg) *p*-hidroksibenzoik asit (22,6 mg/kg) ve *p*-kumarik asit (11,5 mg/kg) içerdiği, akasya (acacia) balının yüksek oranda ferulik asit (139,8 mg/kg) ve *p*-hidroksibenzoik asit (3,9 mg/kg) ve salgi balının yüksek oranda ferulik asit (173,8 mg/kg) içerdiği bildirilmiştir.

Liang vd. (2009) Çin narenciye (citrus) ballarının kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve hesperetin içeriğini RP-HPLC-ECD ve RP-HPLC-DAD ile incelemişlerdir. Bal örnekleri suda, standartlar metanolde çözülmüştür. Kromatografik analiz için C18 kolonu (150 × 4,6 mm i.d., 5 µm) ve koruyucu kolon olarak C18 kolonu (20 × 4,0 mm i.d., 5 µm)

kullanılmış %4'lük asetik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B) hareketli faz sistemiyle gradient elüsyon uygulanmıştır. Analiz süresince akış hızı 1 mL/dk'ya ayarlanmış ve diyot dizisi dedektörle kromatogramlar 288 ve 320 nm'de izlenmiştir. Elektrokimyasal dedektör ise 1,0 V'ta oksidatif modda çalıştırılmıştır. Dedeksiyon ve ölçme limiti için ECD ile elde edilen sonuçlar DAD ile elde edilenlerden 6-14 kat daha büyük bulunmuştur. 4 standart fenolik bileşiğin kalibrasyon eğrileri iyi lineerlik göstermiştir. ( $R^2 > 0,9994$ ). DAD ile elde edilen LOD değerleri  $3,3 \times 10^{-2}$ - $6,5 \times 10^{-2}$  ppm aralığında ECD ile  $3,2 \times 10^{-3}$ - $7,3 \times 10^{-3}$  ppm aralığında saptanmıştır.

Kenjeric' vd. (2008) tarafından Hırvatistan sahil ve adalarına özgü ve karakteristik tek floralı bir bal olan 38 adet adaçayı (*Salvia officinalis* L., sage) balının flavonoidleri (kuersetin, luteolin, mirisetin, krisin, apigenin kampferol, galangin, isorhamnetin, *p*-kumarik asit, ellagik asit ve kafeik asit) RP-HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Flavonoid ekstraksiyonu Amberlit XAD-2 reçinesi ile kolon kromatografisi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Reçinede adsorbe olan flavonoidler metanol ile elüe edilmiştir. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra etileter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından elde edilen kalıntı metanolde çözülerek HPLC'de analiz edilmiştir. Analizde C18 kolonu ( $12,5 \times 0,4$  cm i.d.,  $5 \mu\text{m}$ ), %5'lik formik asit (çözücü A) ve metanol (çözücü B)'den oluşan hareketli faz sistemi ve 60 dakikalık gradient elüsyon programı ile çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20  $\mu\text{L}$  olarak kullanılmış ve kromatogramlar 290 ve 340 nm'de izlenmiştir. Çalışılan tüm bal örneklerinin kuersetin, luteolin, kampferol apigenin, krisin ve galanginin yanı sıra *p*-kumarik asit ve kafeik asit içerdiği tespit edilmiştir. Bal örneklerindeki toplam flavonoid miktarının 109,4  $\mu\text{g}/100$  g bal ile 589,9  $\mu\text{g}/100$  g bal aralığında değiştiği gözlenmiştir. Tüm örneklerin genel ve spesifik flavonoid profiline sahip olduğu ve bunun adaçayı ballarını diğer tek floralı ballardan ayırmada bir temel olabileceği bildirilmiştir.

Farklı botanik orijine sahip 27 İtalyan balının fenolik ve flavonoid fraksiyonları ve antioksidan aktivitesi karakterize edilmiştir (Pichichero vd., 2009). Ballardan fenoliklerin ekstraksiyonu katı faz ekstraksiyonu kartuşu ile yapılmıştır. C18 kolonu ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$  i.d.,  $5 \mu\text{m}$ ), hareketli faz olarak su:TFA:asetonitril (87:3:10, çözücü A) ve su:TFA:asetonitril (40:50:10, çözücü B) mobil fazları kullanılarak gradient elüsyon uygulanmıştır. Akış hızında da gradiyent program kullanılmış ve akış hızı 0,2 mL/dk ile 0,6 mL/dk aralığında değiştirilmiştir. 65 dakikalık test süresince kolon sıcaklığı  $50^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur. Kromatogramlar 280 ve 360 nm'de kaydedilmiş ve enjeksiyon hacmi 20  $\mu\text{L}$  olarak kullanılmıştır. Analizlerde dış standart yöntemi uygulanmıştır. HPLC-UV ile

bulunan değerlere göre balların bol miktarda fenolik bileşikleri ve flavonoidleri içerdiği, incelenen balların bu bileşikleri benzer oranlarda içerdiği ve balın flora orijinine bağlı olarak her bir analitin fenolik profile katkısının farklı olduğu bildirilmiştir. Genel olarak ana flavonoidlerin mirisetin, krisin ve galangin, ana fenolik asitlerin ise gallik asit (0,195-1,770 mg/kg) ve klorojenik asit (0,166-1,172 mg/kg) olduğu görülmüştür. Folin–Ciocalteu metoduna göre yapılan tayinde toplam fenolik madde miktarının gallik asit eşdeğeri olarak 60,50-276,04 mg/kg, flavonoid miktarının kuersetin eşdeğeri olarak 41,88-211,68 mg/kg olduğu bulunmuştur. Antioksidan kapasitenin yüksek olduğu ve farklılık gösterdiği belirtilmiştir. FRAP değerlerinin 1,265-4,396 mmol Fe<sup>+2</sup>/kg, DPPH testinde SC<sub>50</sub> değerlerinin 7,08-64,09 mg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca antioksidan parametreler arasındaki korelasyonun da anlamlı olduğu ifade edilmiştir (*P* < 0,05).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

HPLC analizlerinde gerek hareketli fazın hazırlanmasında ve gerekse de fenolik bileşik standartlarının ve numunelerin hazırlanması ve seyreltilmesinde kullanılan HPLC saflıktaki su Sartorius arium 611UV (Gottingen, Almanya) cihazından elde edildi. Antioksidan aktivite tayinlerinde absorbans ölçümleri için ATİ-Unicam UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanıldı. Numune hazırlamalar esnasında çözücülerin buharlaştırılması amacıyla Buchi 461 su banyosu ve Cole-Parmer Aspiratör pompası (Kore) ile donanımlı Bibby RE 100 döner vakum evaporatörü kullanıldı. pH ölçümleri ve ayarlamaları için pH metre Hanna pH 213 (Romanya), antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılan ekstraktların hazırlanması esnasında ısı kontrollü çalkalayıcı olarak Nüve ST 402 (Türkiye) kullanıldı. Numune ve çözeltilerin hazırlanması ile testler esnasında elde edilen reaksiyon karışımlarının çözme ve karıştırma işlemleri için Labnet VX100 model vorteks (Woodbridge, NJ ABD) ve Heidolph model ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Schwabach, Almanya)'dan yararlandı. Antioksidan aktivite tayinleri için metanollü ekstraktların hazırlanmasında çözünmeyen partiküllerin uzaklaştırılması için Hettich Universal 320R (Almanya) markalı soğutmalı santrifüj cihazı kullanıldı. Katı faz ekstraksiyonunda Varian vakum manifoldu (Harbor city CA, ABD) kullanıldı.

Fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinleri ise mikro degasser (Japonya), dereceli elüsyon pompası (quaternary pump, Almanya) ve UV dedektör (Japonya) ile donanımlı bir Agilent 1100 series HPLC cihazı (ABD) ve 7725i Rheodyne enjektör sistemi ve 20 µl'lik loop kullanılarak gerçekleştirildi. Manüel enjeksiyonlar 25 µL'lik Hamilton şırınga (Bonaduz, İsviçre) ile yapıldı.

### 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Fenolik bileşik standardı olarak kullanılan gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, rutin, 2,4-*cis,trans*-absisik, *trans*-sinnamik asit ve kuersetin Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan *o*-kumarik asit Merck (Almanya)'dan

satın alındı. HPLC deneylerinde mobil faz olarak kullanılan metanol J.T. Baker (Deventer, Hollanda), asetonitril Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), asetik asit Merck (Darmstadt, Almanya)'dan satın alındı. Antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılan DPPH<sup>•</sup> (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, Folin-Ciocalteu reaktifi, neokuproin, CuCl<sub>2</sub>, amonyum asetat tamponu Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), TPTZ (tripridiltriazin) Fluka (Buchs, İsviçre), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve Trolox<sup>®</sup> (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ve HCl Merck (Darmstadt, Almanya)'dan satın alındı. Katı faz ekstraksiyonunda Supelco (Park Bellefonte PA, ABD)'dan satın alınan 6 ml'lik C-18 kartuşları kullanıldı. HPLC şırınga filtreleri (25 mm, 0,45 µm) Whatman (Clifton NJ, ABD)'dan satın alındı.

### 2.3. Numuneler

Anzer balı ve poleni Rize'nin İkizdere ilçesinde yer alan Anzer yaylasından 2007-2008 yıllarında toplandı. Toplanan Anzer polenleri +4 °C'de buzdolabında, ballar ise oda sıcaklığında muhafaza edildi. Anzer bal ve polenleri 15 Haziran-15 Temmuz aralığında, Anzer güz balı ve polenleri ise 15-20 Temmuz'dan Ağustos sonuna kadar olan aralıkta toplanmışlardır.

Tablo 6. Analizlerde kullanılan Anzer bal ve polenlerinin türleri

Balın kodu	Balın türü	Polenin kodu	Polenin türü
B1	Çiçek+anzer balı	P1	Anzer güz poleni
B2	Anzer balı	P2	Anzer güz poleni
B3	Anzer balı	P3	Anzer güz poleni
B4	Anzer balı	P4	Anzer güz poleni
B5	Anzer balı	P5	Anzer güz poleni
B6	Anzer balı	P6	Anzer güz poleni
B7	Anzer güz balı	P7	Anzer güz poleni
B8	Anzer güz balı	P8	Anzer güz poleni
B9	Anzer balı	P9	Anzer poleni
B10	Anzer balı	P10	Anzer poleni
B11	Anzer balı	P11	Anzer güz poleni
B12	Anzer balı	P12	Anzer poleni
B13	Anzer balı	P13	Anzer poleni
B14	Anzer balı		

## 2.4. Antioksidan Aktivite Tayinleri

### 2.4.1. Metanollü Ekstraktların Hazırlanması

Antioksidan aktivite tayinlerinde kullanmak amacıyla Anzer bal ve polenlerinin metanollü ekstraktları hazırlandı. Bu amaçla bal örneklerinden 5'er gram ve polen örneklerinde 1'er gram alınıp 10-15 mL destile metanolde çözülüp çalkalayıcıda 4 saat çalkalandı. Numuneler destile metanol ile 25 mL'ye tamamlandıktan sonra metanolde çözünmeyen kısım santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Elde edilen berrak % 20'lik metanollü stok bal çözeltileri ile % 4'lük metanollü stok polen çözeltileri antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere şişelendi ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Analizler esnasında ekstraktların istenen konsantrasyonlarını hazırlamak için gerekli seyreltmeler destile metanol kullanılarak yapıldı.

### 2.4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Bal ve polen numunelerinin metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği, Singleton ve Rossi (1965) tarafından geliştirilen metodun modifiye edilmesiyle belirlendi. Bu yöntem, fenolik maddelerin Folin-Ciocalteu reaktifinin içerdiği fosfomolibdik-fosfotungistik çözeltilisini indirgeyerek mavi bir kompleks oluşturmaları ve bu mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Numunelerin toplam fenolik madde içerikleri standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlendi. Bu amaçla standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Tayine başlamadan önce gallik asitin 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312, 0,0156, 0,0078 mg/mL'lik konsantrasyonları hazırlandı. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri bulunarak standart grafik çizildi. Standart grafiğe ait regresyon eşitliği kullanılarak bal ve polenlerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden mg fenolik madde/g numune olarak hesaplandı. Her bir örnek ve değişen konsantrasyonlarda gallik asit standardı için uygulanan pipetleme işlemleri Tablo 7'de özetlenmiş olup absorbanslar 765 nm'de ölçülerek grafik çizildi.



Tablo 7. Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune Körü	Standart	Test
Metanol (destile)	0,1 mL	-	-	-
Standart (değişen konsantrasyonlarda)	-	-	0,1 mL	-
Numune	-	0,1 mL	-	0,1 mL
Destile su	3,1 mL	3,9 mL	3,1 mL	3,1 mL
2 N Folin Ciocalteu Reaktifi	0,2 mL	-	0,2 mL	0,2 mL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 3 dakika sonra				
%20'lik Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,6 mL	-	0,6 mL	0,6 mL
2 saat sonra 765 nm'de köre karşı absorbans okundu.				

### 2.4.3. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (FRAP) Tayini

Demir indirgeme antioksidan kapasitesi yöntemi ucuz, tekrarlanabilir ve basit bir antioksidan aktivite tayin yöntemi olup çalışmada Benzie ve Strain (1996)'in geliştirdiği yöntem uygulandı. Metot çözelti ortamında bulunan antioksidanların Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeyebilme yeteneğine dayanır. Deneylede Fe<sup>+3</sup> kaynağı olarak FeCl<sub>3</sub> kullanıldı ve numunelerle muamelesi sonucu bileşik indirgendi ve ortamda bulunan antioksidan miktarı ile orantılı miktarda Fe<sup>+2</sup>-TPTZ'nin oluşumundan kaynaklanan mavi renk spektrofotometrik olarak gözlendi. Metoda adını veren FRAP reaktifi günlük olarak hazırlandı ve 25 mL pH 3,6 300 mM asetat tamponunun 40 mM HCl'de hazırlanmış 2,5 mL 10 mM tripridilriazin (TPTZ) ve sulu 2,5 mL 20 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edildi. Çalışılan numunelerin 100 µL'si taze hazırlanmış FRAP reaktifi ile karıştırıldı. 595 nm'de numune içermeyen referansa karşı absorbanslar 0. ve 4. dakikada okundu (Tablo 8). Kalibrasyon için Trolox<sup>®</sup>'un değişen konsantrasyonları (62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µM) kullanıldı. Sonuçlar aynı şartlarda test edilmiş standart Trolox<sup>®</sup>'la karşılaştırmalı olarak bulundu ve Trolox<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (TEAP).

Tablo 8. FRAP yöntemi için yapılan pipetlemeler

	Numune Körü	Reaktif Körü	Numune	Standart
FRAP Reaktifi	-	3 mL	3 mL	3 mL
Numune	100 µL	-	100 µL	-
Trolox® (Değişen konsantrasyonlarda)	-	-	-	100 µL
Metanol (destile)	-	100 µL	-	-
Destile su	3 mL	-	-	-

0. dakikada ve 4.dakikada 595 nm'de absorbans okundu.

#### 2.4.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

CUPRAC tayini Apak vd. (2004) metoduna göre yapıldı. Yöntem gereğince reaksiyon karışımları hazırlanırken bir deney tüpüne sırasıyla 1 mL 10 mM CuCl<sub>2</sub> çözeltisi, 1 mL 1M pH 7,0 amonyum asetat tampon çözeltisi ve 1 mL 7,5 mM etanollü neokuproin çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL numune çözeltisi ve (1,1 - x) mL destile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda reaktif körüne karşı 450 nm'deki absorbanslar ölçüldü. Reaktif körü olarak numune yerine numune çözücüsü (metanol) içeren reaksiyon karışımı kullanıldı (Tablo 9). Analizler 3 tekrarlı gerçekleştirildi.

Tablo 9. CUPRAC yöntemi için yapılan pipetlemeler

	Numune	Renk Körü	Reaktif Körü
10 mM CuCl <sub>2</sub>	1 mL		1 mL
Amonyum asetat tamponu (1 M, pH 7,0)	1 mL		1 mL
7,5 mM etanollü Neokuproin	1 mL		1 mL
Numune	0,2 mL	0,2 mL	-
Destile su	0,9 mL	3,9 mL	0,9 mL
Metanol			0,2 mL

30 dakika sonra 450 nm'de absorbanslar okundu.

CUPRAC metodunda Trolox®,un molar absorptivite katsayısı  $\epsilon=1,67 \times 10^{-4}$  L/mol.cm olduğundan Trolox® için kalibrasyon eğrisi orijinden geçer. Kullanılan numune

ekstraktlarındaki Trolox<sup>®</sup>'a eşdeğer numune konsantrasyonu CUPRAC testi sonucu elde edilen absorbansın Trolox<sup>®</sup>'un molar absorblama katsayısına ( $\epsilon_{TR}$ ) bölünmesiyle bulunabilir. Trolox<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), ekstrakttaki tüm seyrelmeler hesaba katılarak ve materyalin başlangıçtaki tartım miktarına oranlanarak Trolox<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan kapasitesi (mmol TR/g madde) aşağıdaki formül kullanılarak bulunabilir(22).

$$TEAC \text{ (mmol TR/g)} = (A_f / \epsilon_{TR})(V_f/V_s)r(V_{cup}/m) \quad (22)$$

m= gram materyal

$V_{cup}$ = başlangıç hacmi

r = seyreltme katsayısı

$V_s$  = analizde kullanılan seyreltilmiş ekstrakt hacmi

$V_f$  = test karışımının son hacmi

$A_f$ = absorbans

#### 2.4.5. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi

Çalışmada radikalın 150  $\mu$ M'lık metanollü çözeltisi kullanıldı. Ekstraktlar değişen konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu amaçla Anzer bal ve polenlerinin metanollü ekstraktlarının gerekli seyreltme işlemleri metanol kullanılarak yapıldı. Eşit hacimde DPPH çözeltisi ve numuneler karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı (Tablo 10). Süre sonunda DPPH'nin maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Bütün numuneler 3 tekrarlı çalışıldı. Reaktif körü olarak DPPH çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözelti kullanıldı. Bulunan absorbanslar ve karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek  $SC_{50}$  değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı.

Tablo 10. DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler

	Numune Körü	Reaktif Körü	Numune
Bal / Polen (Değişen konsantrasyon)	750 $\mu$ L	-	750 $\mu$ L
Metanol (Destile)	750 $\mu$ L	-	-
DPPH (150 $\mu$ M)	-	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L
Numune çözücüsü	-	750 $\mu$ L	-

50 dak. sonra 517 nm de absorbans okundu.

#### 2.4.6. 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<sub>50</sub> değerini vermektedir. SC<sub>50</sub> değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

### 2.5. HPLC Analizleri

#### 2.5.1. Örnek Hazırlama

Bal ve polen numunelerindeki fenolik bileşikler katı faz ekstraksiyonuyla elde edildi ve bu amaçla literatürdeki metotlar modifiye edilerek kullanıldı (Martos, Cossentini, Ferreres & Tomas-Barberan, 1997; Martos, Ferreres & Tomas-Barberan, 2000; Martos, Ferreres, Yao vd., 2000). Katı faz ekstraksiyonunda Supelco (Park Bellefonte PA, ABD)'dan satın alınan 6 mL'lik C-18 kartuşları kullanıldı. Numunelerin yeterli miktarları saf suda çözülüp flavonoid glikozitlerinin hidrolizi amacıyla pH 1'e ayarlandı. Numuneler çözünmeyen kısmın uzaklaştırılması için süzüldü. Daha sonra şartlanmış C-18 kartuşundan geçirildi. Kartuşları şartlandırmak için kartuşlar 2 mL metanolla yıkandı devamında 2 mL su ile yıkandı ve daha sonra numune çözeltileri geçirildi. Fenolik bileşenler kartuşta adsorbe oldu ve istenmeyen bileşenleri tamamen uzaklaştırmak için kartuş yeteri kadar saf su ve pH'ı 1 olan saf su ile yıkandı. Kartuşta adsorbe olan fenolik bileşikler metanolla yıkanarak alındı ve metanol evaporatörde 40°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 5 mL destile su ile çözüldü ve 3'er defa 5 mL dietileter ve etilasetat ile ekstraksiyon yapıldı. Birleştirilen ekstraksiyon çözeltileri evaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı HPLC saflıkta metanolde çözüldü. Standartlarla aynı koşulların sağlanması amacıyla metanollü çözeltilerden gerekli hacimler alınarak destile su ile metanol:su oranı 40:60 olacak şekilde seyreltildi ve 0,45 µm'lik filtreden süzülerek HPLC'de analiz edildi.

### 2.5.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Çalışmada 17 adet fenolik bileşik standardı kullanıldı: Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, 2,4-*cis,trans*-absisik asit, *trans*-sinnamik asit ve kuersetin.

Rutin ve kuersetin dışında tüm stok çözeltiler %40'lık metanolde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Rutin %50'lik, kuersetin ise %100'lük metanolde 1 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandılar. Kalibrasyon grafiklerini belirlemek amacıyla ana stok çözeltilerinden %40'lık metanolle seyreltme koşuluyla 17 adet standardın 50, 25, 15, 10, 5 ve 2,5 mg/L'lik standart fenolik bileşik karışımları hazırlandı. İç standart olarak kullanılan propil parabenin tüm kalibrasyon çözeltileri ve analiz edilen numunelerin son hacmindeki konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde ayarlandı. İç standart da diğer standartlar gibi aynı koşullarda hazırlandı.

### 2.5.3. İç Standart Seçimi ve Kullanımı

Bu çalışmada iç standart olarak daha önce literatürde de kullanılmış bir bileşik olan propil paraben kullanıldı (Öztürk vd., 2007). Bitkilerin propil paraben içermemesi ve sudaki çözünürlüğünün yüksek oluşundan dolayı bu sentetik bileşik iç standart olarak kullanıldı. Propil paraben HPLC analizlerinde standart bileşiklere yakın ve en son elue olmaktadır. Analiz süresinin uzamasına sebep olmaması ve analiz süresi zarfında elue olması tercih sebeplerindedir. Bal ve polen numuneleri propil paraben ihtiva etmemekte ve bütün standartların piklerinden rahatça ayrılmaktadır.

Yapılan analizlerde propil parabenin numunelerde ve standart çözelti karışımlarında son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde ayarlandı. Her bir standardın farklı konsantrasyonlarına karşı oluşan pik alanları, iç standardın pik alanına oranlandı. Bu değerler konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Numuneler içinse elde edilen kromatogramlarda bilinmeyen miktardaki fenolik bileşiklerin pik alanları iç standardın pik alanına oranlandı. Kalibrasyon eğrileri kullanılarak ve tüm seyreltmeler hesaba katılarak fenolik bileşiklerin konsantrasyonları hesaplandı.

#### 2.5.4. HPLC Çalışma Koşulları

HPLC analizleri bir uv dedektör ile donanımlı Agilent 1100 series HPLC’de yapıldı. Chemstation (Agilent) programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül; ABD) tersfaz kolonu kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril/su içindeki %0,5 asetik asitin çözeltilerinden oluşmaktaydı (de Villers vd., 2004). Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı: Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-5 dk %5 B; 5-8 dk %5-20 B; 8-10 dk %20-22 B; 10-17 dk %22-25 B; 17-19 dk %25-27 B; 19-30 dk %27-40 B; 30-35 dk %40-45 B; 35-40 dk %45-65 B; 40-43 dk %65-100 B 43-45 dk %100 B. 45 ile 50. dakikalar arasında asetonitril ile temizlik yapıldı ve 50-52. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. Kullanılan gradiyent program Tablo11’de özetlenmiştir. Akış hızı 1,2 mL.dk<sup>-1</sup> ve enjeksiyon hacmi 20 µL idi. Dedektör 280 nm’de çalıştırıldı.

Tablo 11. HPLC analizlerinde kullanılan gradiyent program

Zaman (dakika)	% A *	% B **	% D ***	Akış Hızı (mL.dk <sup>-1</sup> )
0	95	5	0	1,2
5	95	5	0	1,2
8	80	20	0	1,2
10	78	22	0	1,2
17	75	25	0	1,2
19	73	27	0	1,2
30	60	40	0	1,2
35	55	45	0	1,2
40	35	65	0	1,2
43	0	100	0	1,2
45	0	10	0	1,2
50	0	0	100	1,2
52	95	5	0	1,2

\* A: %2 Asetik asitli su; \*\* B:50/50 asetonitril:su içerisinde %0,5 asetik asit; \*\*\* D: asetonitril

#### 2.5.5. HPLC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi

EPA metoduna göre dedeksiyon limiti hesaplandı (US EPA, 1984). Tüm 17 standardın 2 ppm’lik karışımı HPLC ile analiz edildi. Her bir analitin sinyalinin gürültüye oranına (S/N) dayanan değer Chemstation’dan belirlendi, 6 seviyesinde bir S/N sağlamak

için gerekli konsantrasyon hesaplandı. Sonuç olarak, 0,2 ppm'de *o*-kumarik asit ve *trans*-sinnamik asit; 0,4 ppm'de gallik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve *cis,trans*- absisik asit; 0,8 ppm'de protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanillik asit ve kuersetin; 1,5 ppm'de rutin ve epikateşin ve 2 ppm'de kateşin ve benzoik asit içeren kalibrasyon çözeltisi hazırlandı ve 7 kez analiz edildi. Ardından her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik alanı ve alıkonma zamanının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) olarak hesaplandı.

## 2.6. İstatistiksel Metot

Analizler en az üç testin ortalaması alınarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer ve standart sapma cinsinden hesaplandı. Ortalama değer  $\pm$  SD Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) programı yardımıyla hesaplandı. Tüm istatistik testler SPSS (version 9.0 for Windows 98, SPSS Inc.) programı yardımıyla yapıldı. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis non-parametrik testi kullanıldı. İki bağımsız grup arasında korelasyon olup olmadığı Pearson korelasyon testine göre  $p < 0,05$  seviyesinde incelendi.

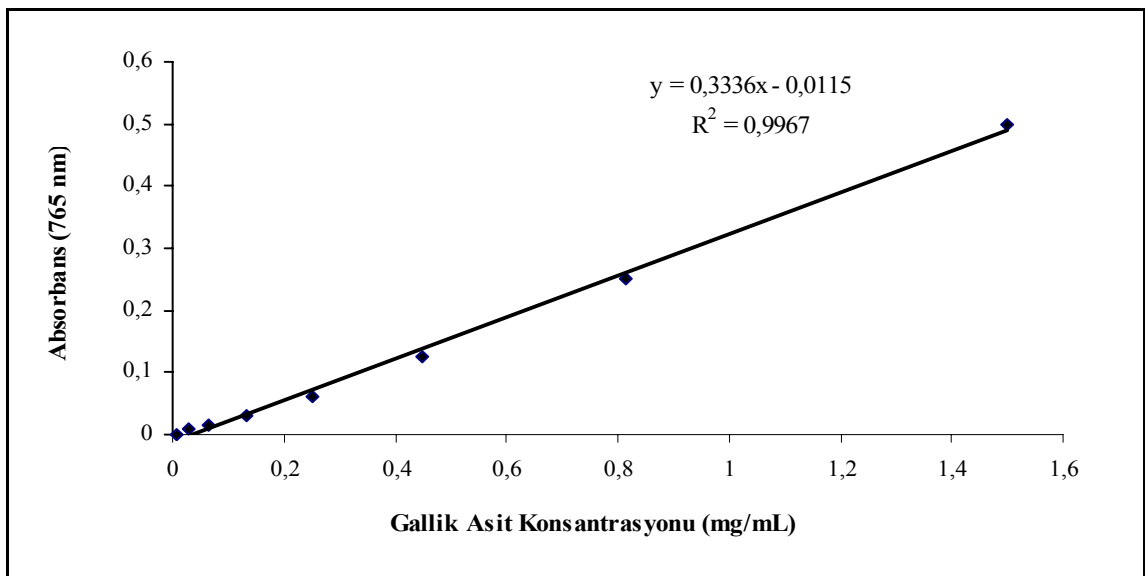
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Antioksidan Aktivite Tayinleri

##### 3.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarları

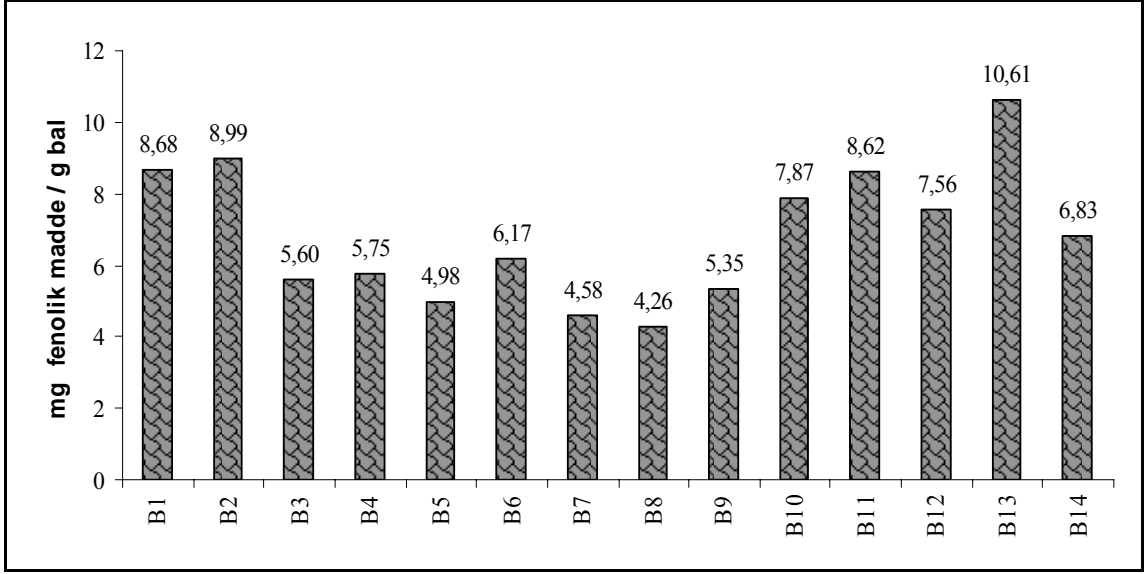
Metanollü bal ve polen ekstraktlarının gerekli olan seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardına göre tayin edildi. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan (0,0078-0,5 mg/mL'lik) standart gallik asit çözeltileri ile Bölüm 2.4.2'de anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 765 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = 0,3336x - 0,0115$  olarak tespit edildi (Şekil 10). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bal veya polenin içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarları belirlendi.

Metanollü Anzer balı numunelerinin içerdiği toplam fenolik madde miktarları Şekil 11'de, metanollü Anzer poleni numunelerinin içerdiği toplam fenolik madde miktarları da şekil 12'de verilmektedir.

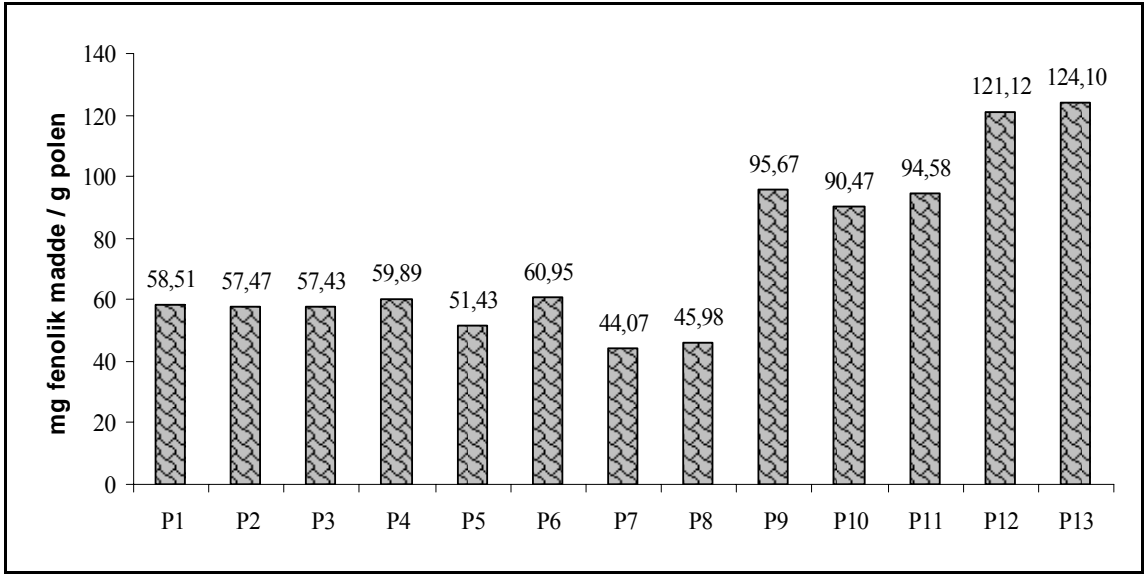


Şekil 10. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği





Şekil 11. Anzer balı örneklerinin toplam fenolik madde miktarları



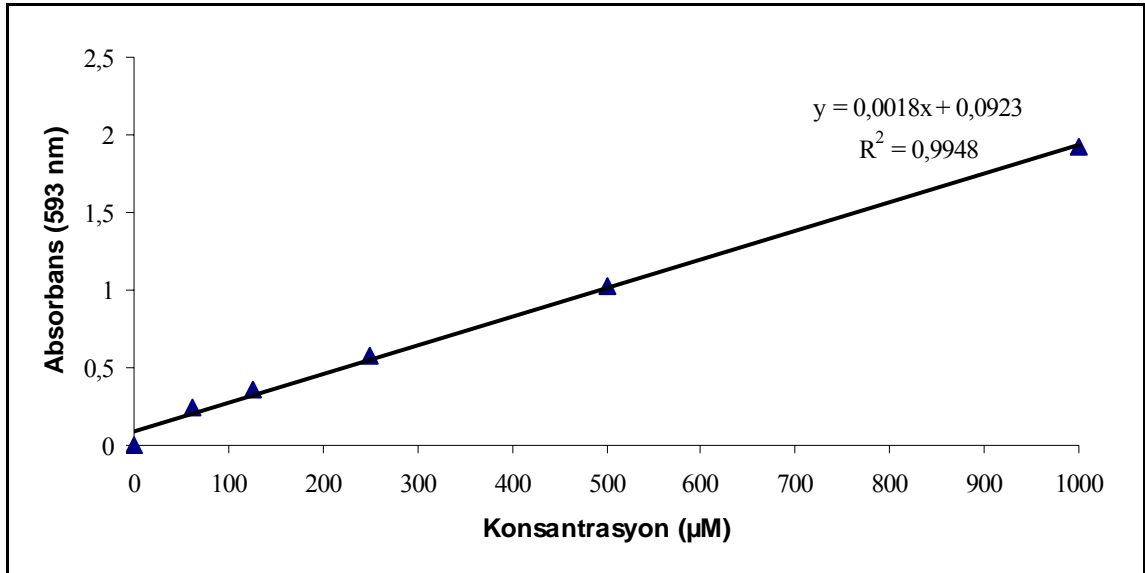
Şekil 12. Anzer poleni örneklerinin toplam fenolik madde miktarları

Balların toplam fenolik madde miktarlarının 4,26-10,61 mg/g aralığında, polenlerin ise 44,07-124,10 mg/g aralığında olduğu bulundu. En yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip balların B13, B2, B1 ve B11 olduğu, en düşük toplam fenolik madde içeriğine ise B8, B7 ve B5 kodlu balların sahip olduğu bulundu. Metanollü Anzer polenlerinden P13 ve P12'nin yüksek miktarda, P7 ve P8'in ise diğer polenlere göre daha düşük miktarda toplam fenolik madde içerdiği tespit edildi. Polenlerin genel olarak

ballardan 10-20 kat daha fazla toplam fenolik madde içerdiği ve fenolikçe zengin oldukları belirlendi.

### 3.1.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kuvveti (FRAP)

Radikal zincir reaksiyonlarının kırılma kapasitesini yansıtan Fe (III) indirgeme kuvveti testi, antioksidan kapasitenin iyi bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Gülçin vd., 2003). Kalibrasyon için Trolox<sup>®</sup>'un değişen konsantrasyonları (62,5-1000 µM) kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği aşağıda verilmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Trolox<sup>®</sup> kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak bal ve polen numuneleri için sonuçlar mikromol Trolox<sup>®</sup>/g numune cinsinden hesaplandı ve Trolox<sup>®</sup> eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (TEAP) (Tablo 12). Verilen değerler üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Bu metotta yüksek TEAP değeri yüksek Fe<sup>+3</sup> indirgeme kuvvetini göstermektedir.

Tablo 12'den görüldüğü gibi Anzer polenlerinin TEAP değerlerinin ballardan oldukça yüksek olduğu bulundu. En yüksek TEAP değerine sahip balların B13 ve B2 kodlu Anzer balları olduğu gözlemlendi. B13 ve B2 ballarının toplam fenolik madde içeriği de diğer ballardan yüksek bulunmuştu. En düşük Fe (III) indirgeme kuvveti gösteren balların

B3, B7 ve B8 olduğu ve yine bu balların diğer bal ve polenlerden daha düşük miktarda toplam fenolik madde içerdiği gözlemlendi. Genel olarak bakıldığında balların kendi aralarında toplam fenolik madde içeriğiyle TEAP değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu görüldü ( $R=0,899$ ). En yüksek TEAP değerine sahip polenlerin ise sırasıyla P9, P12, P10, P11 ve P13 olduğu; en düşük TEAP değerine sahip polenlerin ise sırasıyla P7, P8 ve P5 olduğu gözlemlendi. En yüksek TEAP değerlerine sahip olan polenlerin yüksek toplam fenolik madde içeriğine de sahip olan polenler oldukları görüldü. Fakat bu beş polenin kendi aralarında toplam fenolik madde içerikleri ile TEAP değerleri arasında korelasyon olmadığı görüldü ( $R= -0,263$ ). Bütün polenleri bir arada değerlendirdiğimizde ise toplam fenolik madde içeriği ile TEAP değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu ( $R=0,754$ ). Ballar ve polenler hepsi bir arada değerlendirildiklerinde toplam fenolik madde içeriğiyle TEAP değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ( $R=0,850$ ).

Tablo 12. Anzer bal ve polenlerinin TEAP değerleri

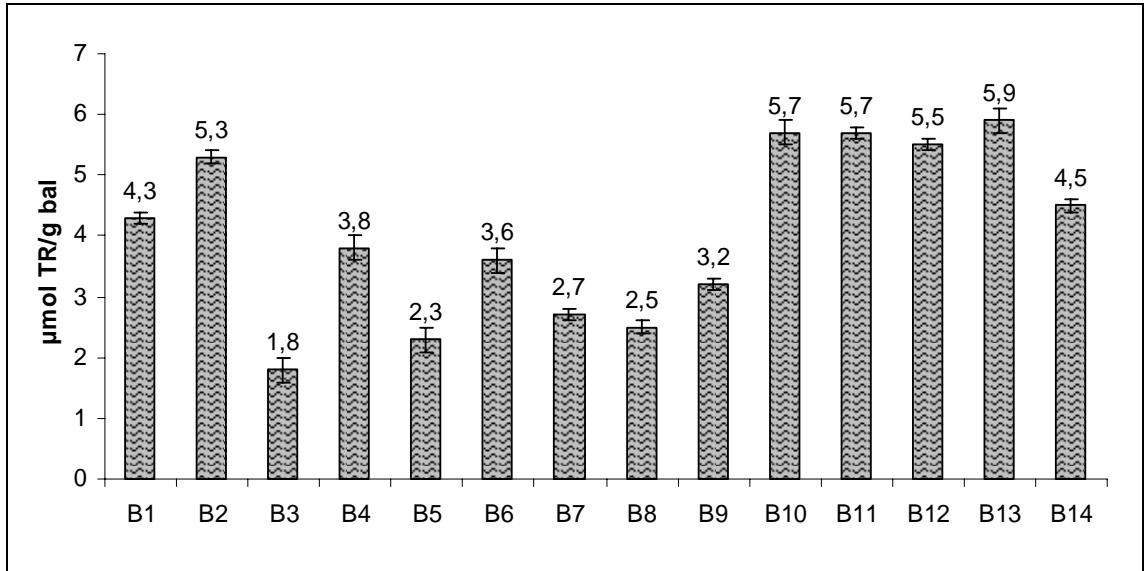
Ballar		Polenler	
Numune Kodu	TEAP değerleri ( $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g bal}$ )	Numune Kodu	TEAP değerleri ( $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g polen}$ )
B1	0,75 $\pm$ 0,03	P1	11,77 $\pm$ 0,63
B2	1,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	P2	24,22 $\pm$ 0,20
B3	0,20 $\pm$ 0,01	P3	19,36 $\pm$ 0,39
B4	0,68 $\pm$ 0,01	P4	15,38 $\pm$ 0,16
B5	0,38 $\pm$ 0,01	P5	13,71 $\pm$ 0,42
B6	0,60 $\pm$ 0,02	P6	14,01 $\pm$ 0,66
B7	0,25 $\pm$ 0,02	P7	12,32 $\pm$ 0,58
B8	0,34 $\pm$ 0,01	P8	15,66 $\pm$ 1,05
B9	0,35 $\pm$ 0,04	P9	105,06 $\pm$ 0,59
B10	0,93 $\pm$ 0,04	P10	65,06 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>
B11	0,89 $\pm$ 0,01	P11	42,79 $\pm$ 0,58
B12	0,99 $\pm$ 0,02	P12	73,39 $\pm$ 1,77
B13	1,17 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	P13	42,69 $\pm$ 1,67
B14	0,81 $\pm$ 0,02		

<sup>a</sup>: Kruskal Wallis yöntemine göre güz polenine göre istatistiksel farklılık; <sup>b</sup>: Kruskal Wallis yöntemine göre ballar arasındaki istatistiksel farklılık

### 3.1.3. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC)

$\text{Cu}^{+2}$  indirgeme yöntemi olarak da bilinen CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu metotta numunelere ait sonuçlar bölüm 2.4.4'te bahsedilen formül kullanılarak hesaplandı ve değerler mikromol TR/g numune cinsinden kapasite olarak ifade edildi. Bu metotta yüksek Trolox® eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yüksek Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasiteyi göstermektedir. Kısaca yüksek CUPRAC değerleri FRAP metodunda olduğu gibi yüksek antioksidan kapasiteyi göstermektedir.

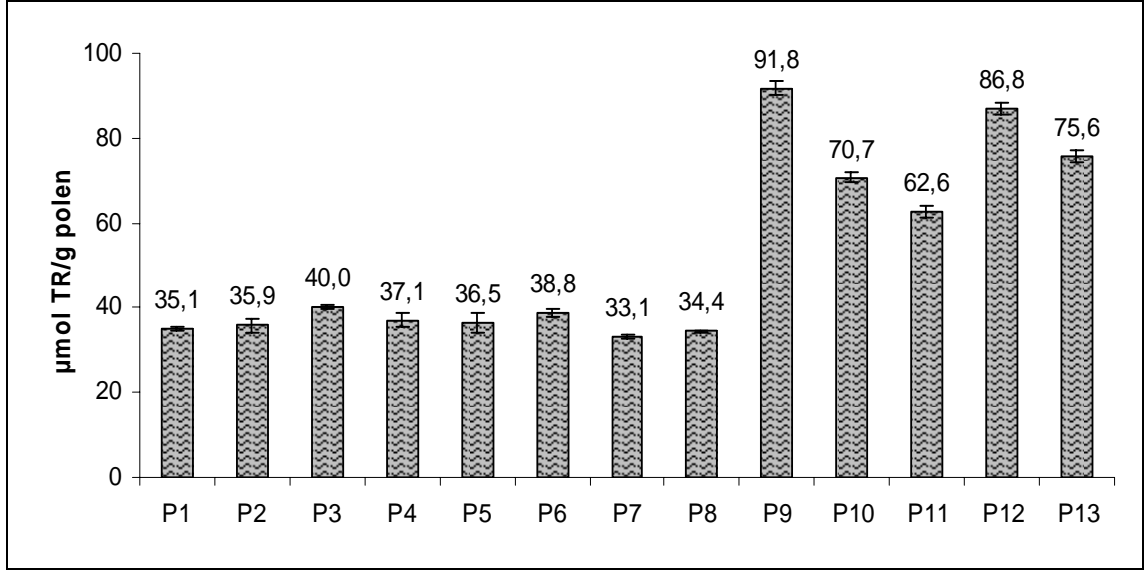
Şekil 14 ve Şekil 15'de Anzer bal ve polenlerine ait TEAC değerleri üç paralel çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir.



Şekil 14. Anzer balı örneklerinin TEAC değerleri

Polenlerin ballardan çok daha yüksek Cu(II) iyonu indirgeme kapasitesine sahip oldukları görüldü. B2, B10, B11, B12 ve B13 kodlu Anzer ballarının benzer miktarda ve en yüksek TEAC değerine sahip ballar oldukları gözlemlendi. Düşük Cu (II) indirgeme kapasitesi gösteren B5, B7 ve B8 ballarının diğer bal ve polenlerden daha düşük miktarda toplam fenolik madde içeren numuneler olduğu belirlendi. En yüksek TEAC değerine sahip polenlerin ise sırasıyla P9, P12, P13, P10 ve P11 olduğu ve bu polenlerin diğer polenlerden yaklaşık iki kat daha fazla aktivite gösterdikleri ve bu polenlerin en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip numuneler oldukları bulundu. Anzer ballarının

toplam fenolik madde içeriğiyle TEAC değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu görüldü ( $R=0,872$ ). Aynı şekilde Anzer polenlerinin de toplam fenolik madde içeriğiyle TEAC değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu ( $R=0,919$ ). Bal ve polenler birlikte değerlendirildiğinde de toplam fenolik madde içeriği ile Cu (II) iyonu indirgeme kapasiteleri arasında pozitif korelasyon olduğu bulundu ( $R=0,978$ ).



Şekil 15. Anzer poleni örneklerinin TEAC değerleri

Toplam fenolik madde içeriğiyle CUPRAC tayini yanı sıra FRAP ve CUPRAC tayinleri arasındaki korelasyon ilişkileri de incelendi. Anzer ballarının FRAP ve CUPRAC tayinlerine ait sonuçlar arasındaki pozitif korelasyon değerinin  $R=0,961$ , polenlerin FRAP ve CUPRAC tayinlerine ait sonuçlar arasındaki pozitif korelasyon değerinin  $R=0,946$  olduğu ve bütün numuneler birlikte değerlendirildiğinde ise korelasyon değerinin  $R=0,932$  olduğu belirlendi.

#### 3.1.4. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH ticari olarak üretilen bir radikal olup radikal scavenger aktivitenin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH• radikali temizleme yöntemine göre belirlenen numune antioksidan kapasiteleri Tablo 13'de verildi. Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafikler kullanılarak antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edildi. Antioksidan aktivite,

numunelerin SC<sub>50</sub> deęerleri belirlenerek karřılařtırılmıřtır. SC<sub>50</sub>, bařlangıç DPPH• radikal konsantrasyonunu (kontrolün absorbandsını) yarıya dūřüren numune konsantrasyonudur ve genellikle mg/mL ya da mM olarak ifade edilmektedir. DPPH radikali temizleme tayininde kūçük SC<sub>50</sub> deęeri yūksek radikal temizleme kapasitesini gōstermektedir. Tablo 13'de Anzer bal ve polenlerine ait SC<sub>50</sub> deęerleri ūç paralel çalıřmanın ortalaması olarak verilmiřtir. Polenlerin ballardan çok daha yūksek radikal temizleme aktivitesine sahip oldukları gōrūldū. B1, B2, B10, B11, B12 ve B13 kodlu Anzer ballarının benzer miktarda ve dūřuk SC<sub>50</sub> deęerine yani yūksek DPPH radikali temizleme aktivitesine sahip ballar oldukları gōzlendi. Dūřuk radikal temizleme aktivitesine sahip balların B7, B8 ve B9 olduęu bulundu. Anzer polenlerinin radikal temizleme aktivitelerinin oldukça yūksek olduęu gōrūldū. Őzellikle en dūřuk SC<sub>50</sub> deęerlerine sahip polenlerin ise sırasıyla P9, P10, P12, P11 ve P13 olduęu ve bu polenlerin en yūksek toplam fenolik madde içerięine sahip numuneler oldukları belirlendi. Anzer ballarının toplam fenolik madde içerięiyle SC<sub>50</sub> deęerleri arasında negatif korelasyon olduęu gōrūldū (R=-0,872). Aynı řekilde Anzer polenlerinin de toplam fenolik madde içerięiyle SC<sub>50</sub> deęerleri arasında negatif korelasyon olduęu bulundu (R=-0,777). Bal ve polenler birlikte deęerlendirildięinde de toplam fenolik madde içerięi ile DPPH radikali temizleme aktiviteleri arasında negatif korelasyon olduęu bulundu (R=-0,826).

Tablo 13. Anzer bal ve polenlerinin SC<sub>50</sub> değerleri

Ballar		Polenler	
Numune Kodu	SC <sub>50</sub> (mg/mL)	Numune Kodu	SC <sub>50</sub> (mg/mL)
B1	31,0	P1	4,59
B2	33,8	P2	2,27
B3	62,3	P3	3,08
B4	51,8	P4	3,60
B5	47,7	P5	5,88
B6	44,8	P6	3,02
B7	77,8	P7	8,20
B8	59,5	P8	5,98
B9	65,8	P9	0,65
B10	35,7	P10	1,10
B11	33,6	P11	1,58
B12	38,4	P12	1,18
B13	28,7	P13	1,62
B14	47,8		

DPPH testi ile diğerk antioksidan aktivite tayin yöntemleri arasındaki korelasyon ilişkileri de incelendi. Anzer ballarının DPPH ve CUPRAC tayinlerine ait sonuçlar arasındaki negatif korelasyon değerinin  $R=-0,750$ , polenlerin DPPH ve CUPRAC tayinlerine ait sonuçlar arasındaki negatif korelasyon değerinin  $R=-0,763$  olduğu ve bütün numuneler birlikte değerlendirildiğinde ise korelasyon değerinin  $R=-0,816$  olduğu belirlendi. DPPH ve FRAP tayinlerine ait değerler arasında da negatif korelasyon bulundu. Anzer ballarının DPPH ve FRAP tayinlerine ait sonuçlar arasındaki negatif korelasyon değerinin  $R=-0,852$ , polenlerin DPPH ve FRAP tayinlerine ait sonuçlar arasındaki negatif korelasyon değerinin  $R=-0,730$  olduğu ve bütün numuneler birlikte değerlendirildiğinde ise korelasyon değerinin  $R=-0,638$  olduğu belirlendi.

### **3.2. HPLC Analizleri**

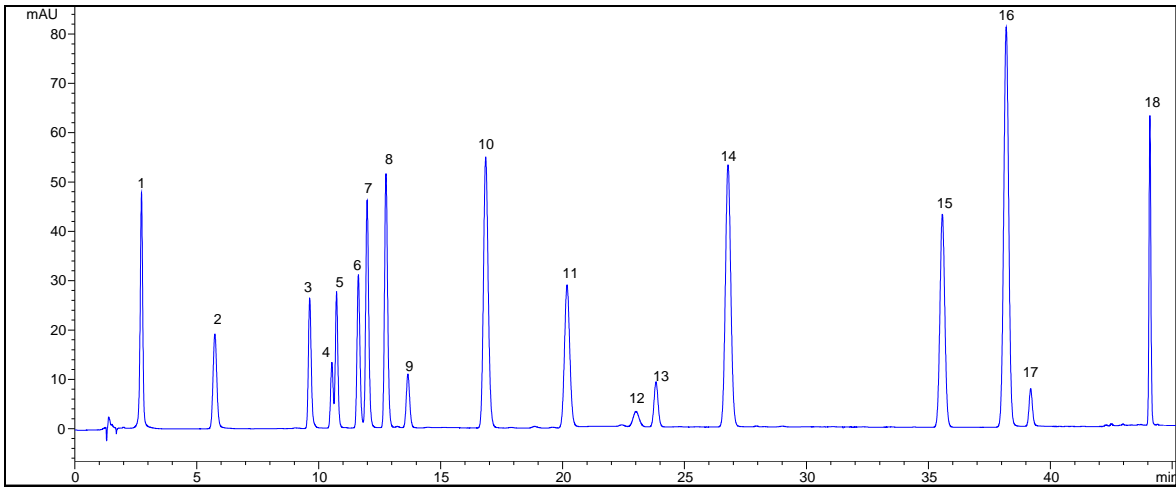
#### **3.2.1. HPLC-UV Metot Geliştirme**

Optimize edilen RP-HPLC-UV metodu kullanılarak 17 standart fenolik bileşimin ve iç standardın analizine ait kromatogram Şekil 16'da görülmektedir. Kullanılan metot ile 50 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılması sağlandı. Başlangıçta geliştirilen HPLC-UV metodu hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının çözünürlüğü LOD için standartlarla hazırlanan çözeltinin 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Sonuçlar hesaplanan dedeksiyon limiti (LOD) ile birlikte Tablo 14'de mevcuttur. Düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulunurken, alıkonma zamanlarının mükemmel çözünürlüğü elde edildi. Ayrıca tüm 17 standart için lineer cevaplar ( $R^2>0,9977$ ) elde edildi (Tablo 14). Tüm standartlar için LOD değerleri 0,15 ppm'in altındadır ki bu değer bal ve polenlerde bulunan fenolik bileşiklerin dedeksiyonu için yeterlidir.

Tablo 14. Geliştirilen HPLC-UV metodunun parametreleri

No	Bileşik	%BSS* (RT)	%BSS* ( Alan )	R <sup>2</sup>	LOD**
1	Gallik asit	0,4875	3,9013	0,9989	0,0493
2	Protokatekuik asit	0,5054	2,0211	0,9998	0,0885
3	<i>p</i> -OH benzoik asit	0,4238	3,3126	0,9995	0,0466
4	Kateşin	0,2946	1,0255	0,9978	0,0223
5	Klorojenik asit	0,2737	4,4459	0,9998	0,0391
6	Vanillik asit	0,2761	4,1799	0,9989	0,0798
7	Kafeik asit	0,349	4,0161	0,9985	0,1199
8	Şiringik asit	0,3126	3,2053	1	0,0825
9	Epikateşin	0,3554	1,4334	0,9999	0,0192
10	<i>p</i> -Kumarik asit	0,5415	10,0251	0,9996	0,0481
11	Ferulik asit	0,45	7,3008	0,9998	0,0599
12	Benzoik asit	0,4071	3,1427	0,9984	0,0321
13	Rutin	0,3809	1,5461	0,9997	0,0407
14	<i>o</i> -Kumarik asit	0,4841	7,2793	0,9998	0,0875
15	<i>2,4-cis,trans</i> -Absisik asit	0,1146	8,3386	0,9999	0,0776
16	<i>trans</i> -Sinnamik asit	0,3056	4,2876	0,9999	0,1313
17	Kuersetin	0,2512	2,4411	0,9977	0,065

\*; BSS: bağıl standart sapma, \*\*; dedeksiyon limiti (ppm)

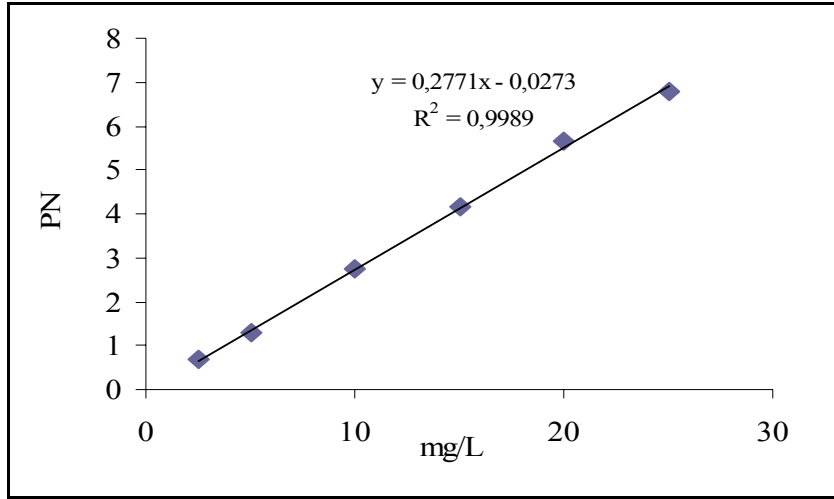


Şekil 16. Standartların HPLC kromatogramları (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (4) kateşin, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis, trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.

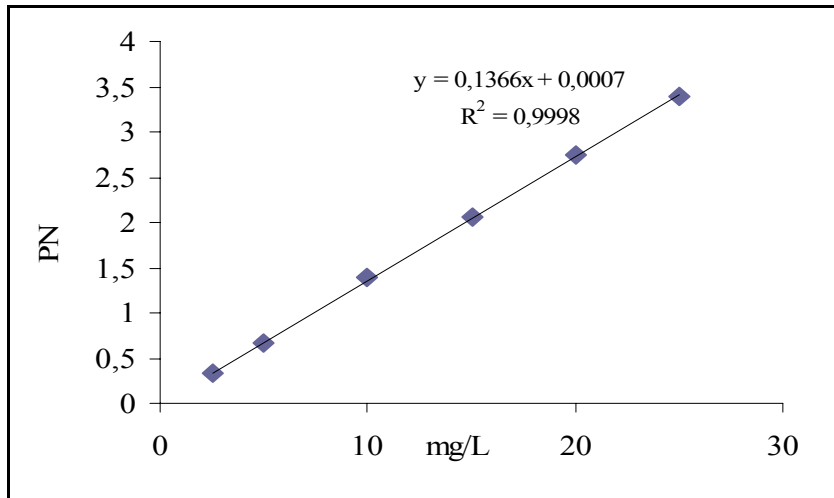


### 3.2.2. Fenolik Bileşiklerin Tayini İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

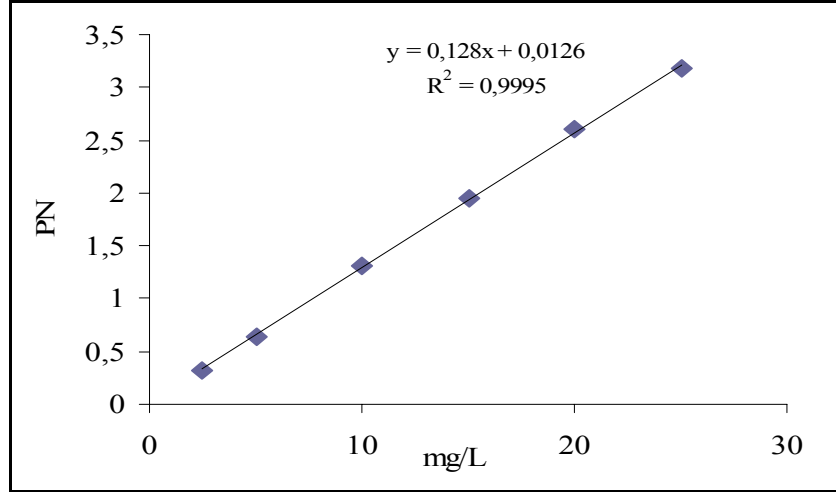
Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması için altı farklı derişimde fenolik bileşik standartları (2,5, 5,0, 10, 15, 20, 25 mg/L) kullanılmış olup çalışma eğrileri için bulunan denklemler ve  $R^2$  değerleri ait oldukları grafikler üzerinde gösterilmiştir. İç standart propil parabenin tüm kalibrasyon çözeltilerindeki son derişimi sabit ve 10 ppm olarak tutulmuştur. Standartların derişimleri x eksenine, standartların pik alanlarının iç standardın pik alanına oranı (pik normalizasyonu: PN) da y eksenine gelecek şekilde kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 17-Şekil 33).



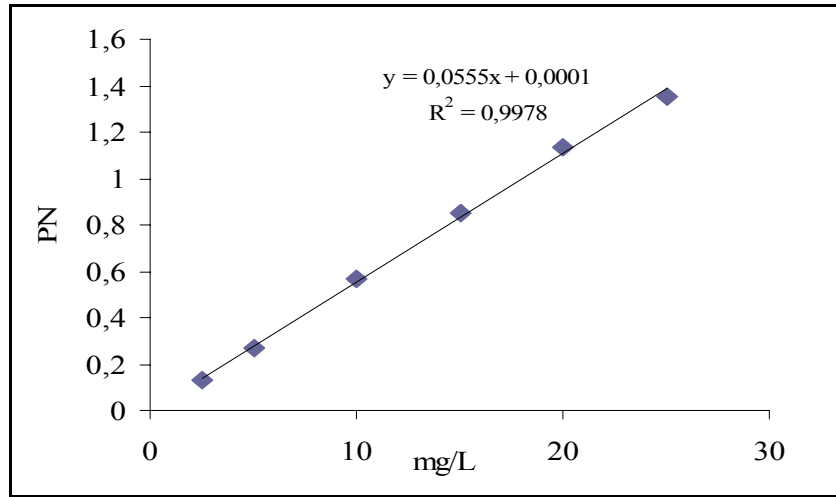
Şekil 17. Gallik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



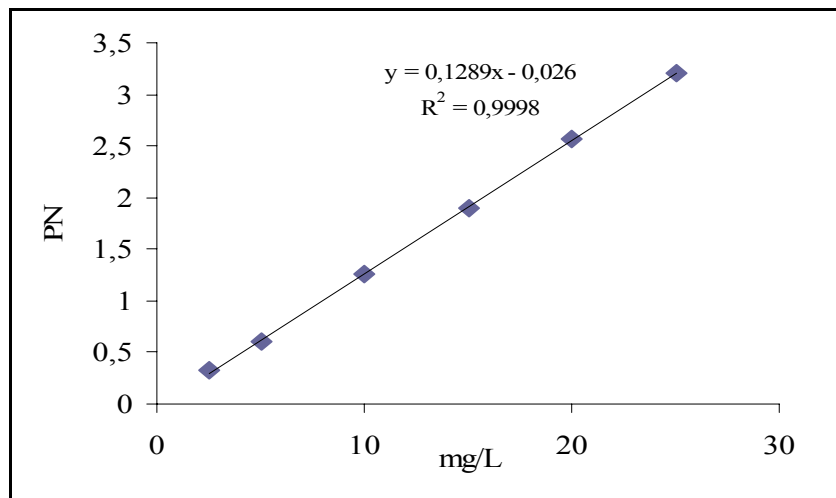
Şekil 18. Protokatekuik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



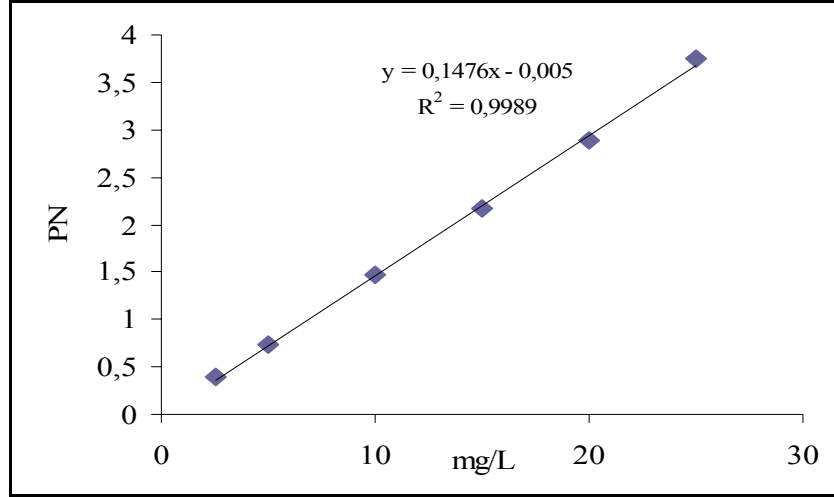
Şekil 19. *p*-Hidroksibenzoik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



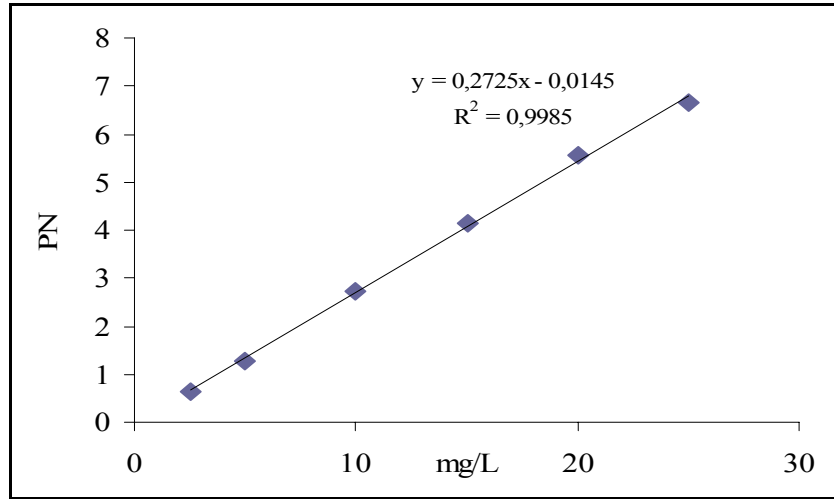
Şekil 20. Kateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi



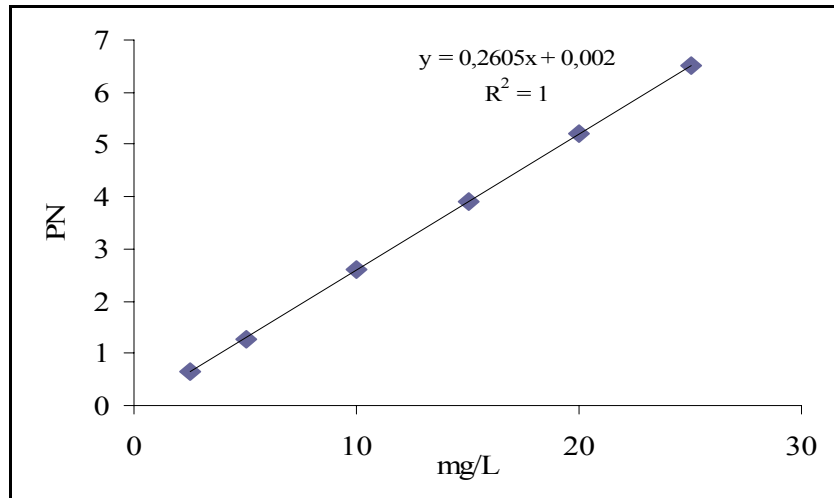
Şekil 21. Klorojenik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



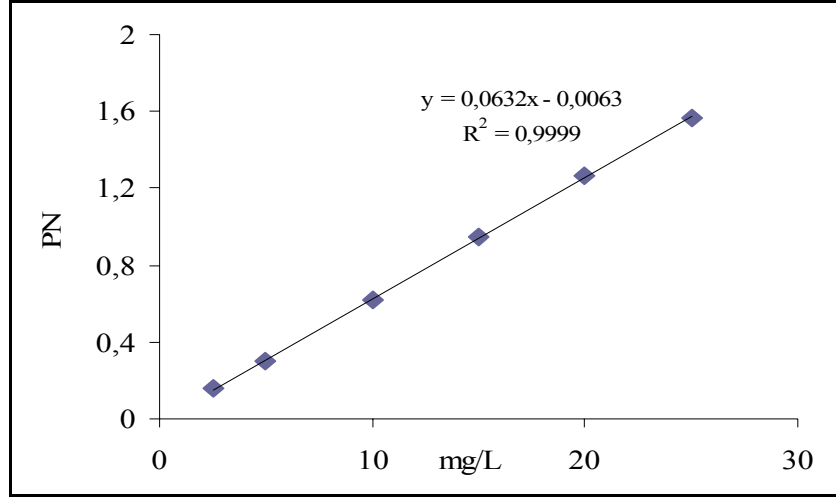
Şekil 22. Vanillik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



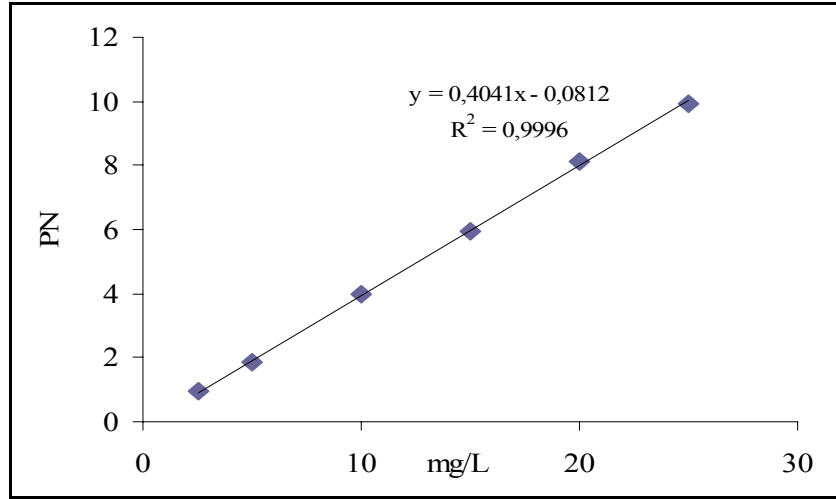
Şekil 23. Kafeik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



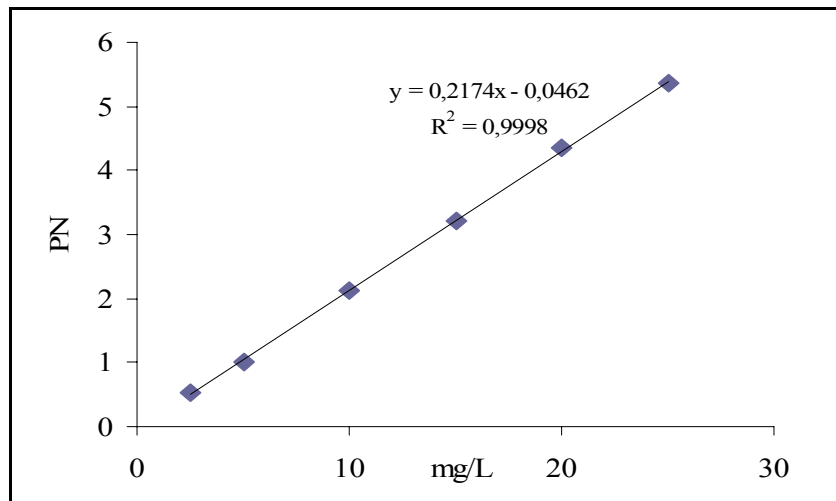
Şekil 24. Şiringik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



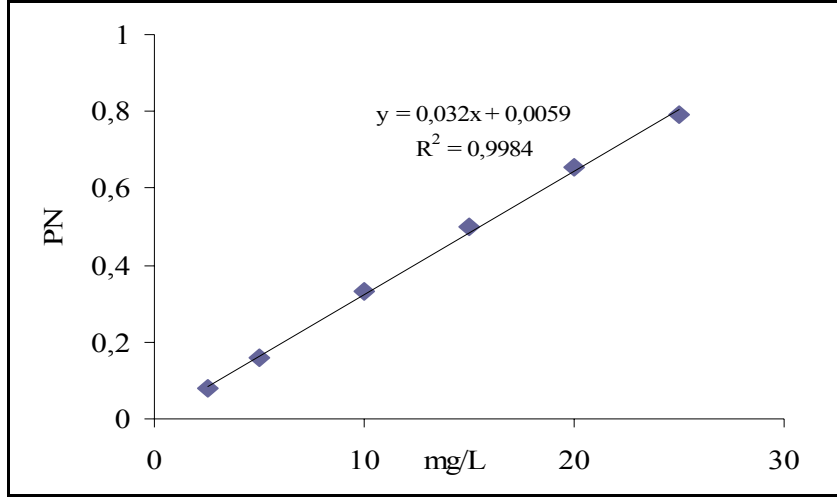
Şekil 25. Epikateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi



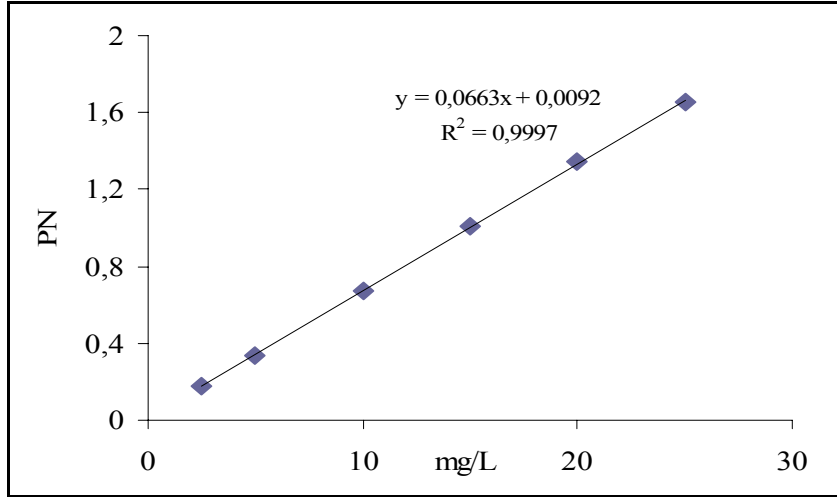
Şekil 26. p-Kumarik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



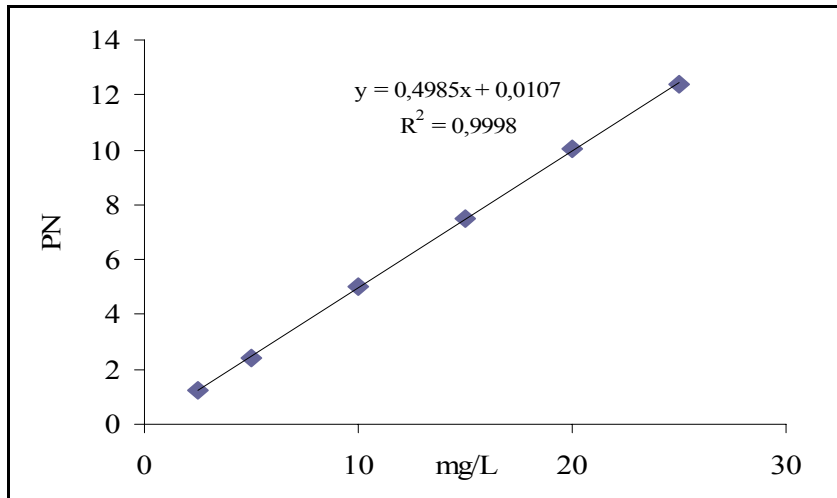
Şekil 27. Ferulik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



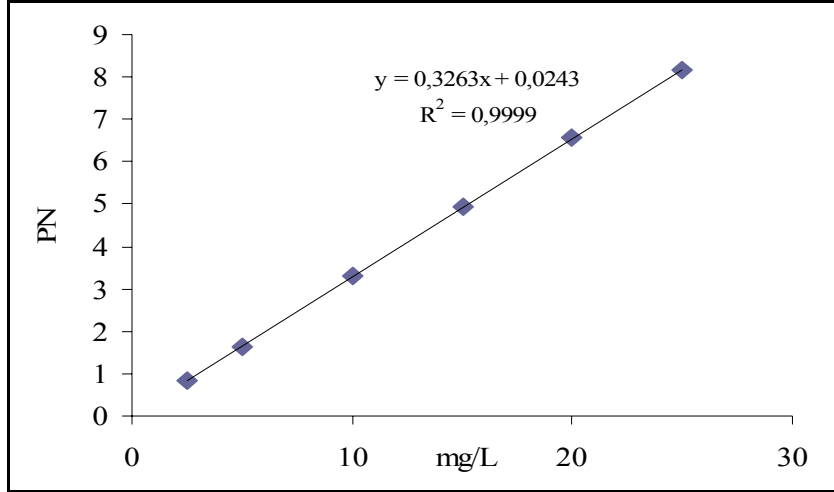
Şekil 28. Benzoik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



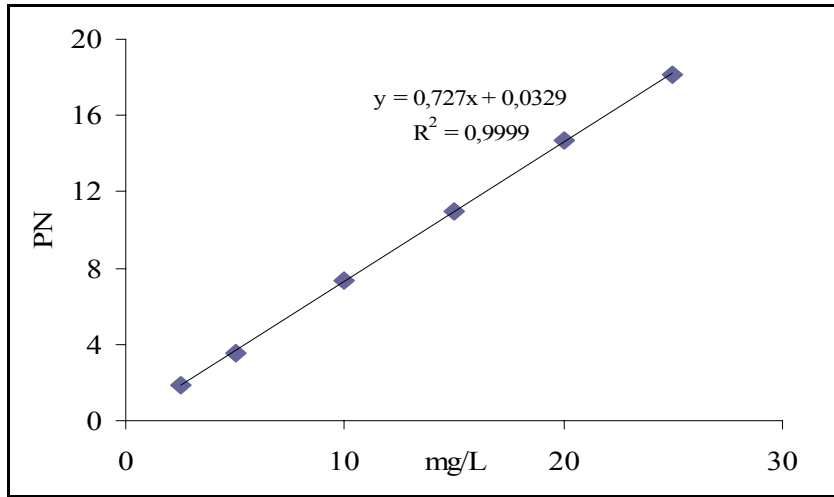
Şekil 29. Rutin standardına ait kalibrasyon eğrisi



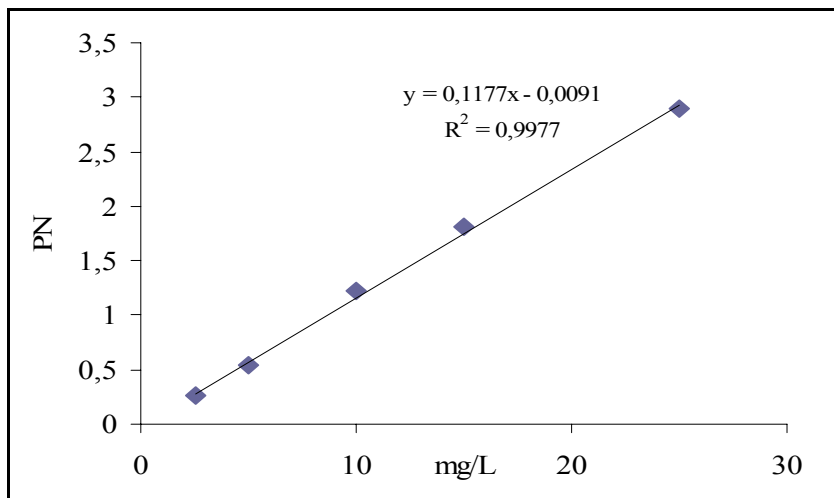
Şekil 30. o-Kumarik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 31. 2,4-cis,trans-Absisik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 32. trans-Sinamik asit standardına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 33. Kuersetin standardına ait kalibrasyon eğrisi

Tablo 15. Anzer ballarında HPLC analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  bal)

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14
Gallik asit	1,55	-	1,25	1,46	-	2,60	1,31	2,47	1,26	0,56	0,56	0,95	0,83	0,58
Protokatekuik asit	1,96	-	1,63	1,83	0,51	3,62	1,75	2,69	1,04	0,98	0,69	1,44	0,83	0,49
<i>p</i> -OH benzoik asit	3,15	4,41	2,45	4,00	0,87	5,23	1,82	3,49	1,32	1,16	0,38	1,83	0,71	0,67
Kateşin	-	18,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klorojenik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,14	0,92	-
Vanillik asit	4,92	5,30	6,18	8,25	1,49	6,42	2,84	7,63	1,70	1,31	0,62	1,82	1,18	0,82
Kafeik asit	12,30	6,11	5,19	14,88	3,20	9,21	3,67	7,95	5,53	1,15	0,69	1,89	1,43	1,15
Şiringik asit	8,05	4,33	2,80	13,95	0,54	2,11	1,71	4,20	0,91	0,86	0,60	1,39	0,78	0,50
Epikateşin	-	20,15	9,78	9,52	-	-	5,97	13,30	8,54	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Kumarik asit	18,68	50,87	21,40	27,13	2,18	27,82	9,16	28,48	5,97	3,45	1,67	2,74	2,36	4,30
Ferulik asit	12,01	36,40	19,83	21,21	5,17	19,32	16,56	41,66	11,43	7,08	4,02	5,61	3,91	12,32
Benzoik asit	96,77	174,62	45,07	48,11	15,10	11,97	22,35	36,66	16,10	58,37	25,08	81,62	53,59	63,28
Rutin	14,43	87,80	48,21	19,53	12,84	2,90	17,35	42,55	24,35	12,27	5,45	12,63	9,67	6,59
<i>o</i> -Kumarik asit	4,64	7,78	2,14	1,50	4,21	1,57	-	2,02	-	0,40	0,67	1,24	0,72	0,87
<i>cis</i> , <i>trans</i> -Absisik asit	14,60	138,17	20,03	26,59	17,25	15,96	28,11	32,23	51,88	15,22	21,29	20,38	16,93	27,97
<i>trans</i> -Sinnamik asit	43,91	81,95	9,20	24,74	-	5,63	15,04	7,77	24,46	3,67	3,24	5,87	4,40	9,89
Kuersetin	11,34	23,88	12,07	-	0,27	64,97	-	43,83	7,74	39,78	42,55	54,33	41,39	56,78
TOPLAM	248,31	660,66	207,22	222,69	63,62	179,31	127,65	276,92	162,22	146,25	107,51	194,88	139,65	186,20

Tablo 16. Anzer polenlerinde HPLC analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  polen)

	P1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P11	P12	P13
Gallik asit	9,46	10,97	18,59	15,82	14,04	12,13	9,15	9,91	8,34	11,47	9,87	-	-
Protokatekuik asit	-	8,31	19,77	16,48	12,92	9,95	9,29	4,73	18,01	14,37	17,75	19,16	-
<i>p</i> -OH benzoik asit	12,49	73,09	122,68	57,36	8,49	19,81	16,10	11,97	2,74	14,03	88,40	34,53	45,45
Kateşin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klorojenik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	14,64	18,21	-	34,64	75,08
Vanillik asit	35,67	55,70	77,45	46,61	45,87	59,96	87,02	27,57	25,88	22,96	25,16	28,40	31,79
Kafeik asit	10,88	13,37	27,78	18,10	16,40	36,03	24,33	12,31	44,93	46,14	67,52	44,66	98,03
Şiringik asit	39,64	72,06	181,03	109,40	259,53	151,06	184,71	132,94	23,32	24,36	39,75	10,55	17,55
Epikateşin	-	520,02	-	-	-	-	-	-	-	110,91	201,54	39,15	-
<i>p</i> -Kumarik asit	36,24	65,38	83,66	42,42	52,19	48,81	53,87	34,16	184,23	81,01	127,85	120,91	111,73
Ferulik asit	65,85	54,03	95,93	65,15	62,20	61,65	40,95	37,42	81,34	146,08	230,55	191,80	36,83
Benzoik asit	102,11	246,87	205,39	181,75	145,51	85,11	143,19	46,87	-	-	393,19	-	1077,64
Rutin	54,50	330,84	435,96	220,09	101,31	171,40	139,03	34,40	25,59	439,00	692,85	272,79	63,14
<i>o</i> -Kumarik asit	-	-	-	-	-	9,25	7,32	2,63	-	-	-	-	42,23
<i>cis</i> , <i>trans</i> -Absisik asit	22,30	23,52	26,07	33,64	32,59	21,04	30,74	26,05	23,38	182,92	288,70	121,34	54,18
<i>trans</i> -Sinnamik asit	19,05	11,56	22,76	37,61	41,95	34,15	16,89	6,82	46,13	35,72	56,38	43,05	8,74
Kuersetin	94,74	157,27	55,94	61,40	79,93	153,74	99,74	195,91	194,31	-	421,08	499,20	75,13
TOPLAM	502,94	1643,01	1373,02	905,83	872,93	874,09	862,33	583,69	692,85	1147,18	2660,60	1460,18	1737,50



Çalışılan bal numunelerinin tümünün *p*-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, rutin ve *cis,trans*-absisik asit içerdiği bulundu (Tablo 15). Balların 17 adet fenolik bileşiği toplam 63,62-660,66 µg/100 g aralığında içerdiği tespit edildi. Bütün balların yüksek oranda benzoik asit, rutin ve *cis,trans*-absisik asit içerdiği gözlemlendi. B2 balının dışındaki diğer balların hiçbirinin kateşin içermediği görüldü. Balların büyük çoğunun gallik asit (0,56-2,60 µg/100 g) ve protokatekuik asit (0,49-3,62 µg/100 g) içerdiği ve bu fenolik asitleri düşük oranda içerdiği belirlendi. B5 balı hariç diğer bütün balların *trans*-sinnamik asit içerdiği ve bu fenolik asiti değişen oranlarda (3,24-81,95 µg/100 g) içerdiği bulundu. Balların çoğunun *o*-kumarik asit içerdiği ve bu bileşenin ballardaki miktarının düşük olduğu gözlemlendi. Ballardan 12 tanesinin kuersetin içerdiği ve kuersetin içeren 7 adet balın kuersetin içeriğinin (23,88-64,97 µg/100 g) diğerlerine göre yüksek olduğu belirlendi.

Anzer polenlerinin hepsinin farklı miktarlarda *p*-OH benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, *cis,trans*-absisik asit ve *trans*-sinnamik asit içerdiği belirlendi (Tablo 16). Polenlerin 17 adet fenolik bileşiği toplam 502,94-2660,60 µg/100 g aralığında içerdiği bulundu. P10 poleni hariç bütün polenlerin kuersetin içerdiği (55,94-499,20 µg/100 g) ve bu fenolik bileşiğin polenlerde yüksek oranda bulunduğu tespit edildi. Ayrıca polenlerde rutin miktarının da yüksek olduğu belirlendi (25,59-692,85 µg/100 g). 13 polenin 10 tanesinin benzoik asit içerdiği ve bu fenolik bileşiği içeren polenlerin benzoik asit içeriğinin çok yüksek olduğu belirlendi (46,87-1077,64 µg/100 g). Polenlerin çoğunun gallik asit (8,34-18,59 µg/100 g) ve protokatekuik asit (4,73-19,77 µg/100 g) içerdiği ve bu iki fenolik asiti de düşük oranda içerdiği (3,24-81,95 µg/100 g) gözlemlendi. 4 polen hariç diğer polenlerin klorojenik asit içermediği bulundu. Ballardakine paralel olarak polenlerde de kateşine rastlanılmadı. Anzer bal ve polenlerinin HPLC analizlerine ait kromatogramlar Ek Şekil 1 - Ek Şekil 27'de verilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

Bal ve polen bileşimleri toplandıkları bölgenin coğrafik ve floral özelliklerine bağlı olarak değişim göstermekle birlikte her ikisi de son derece yüksek besin değerine sahip birer doğal üründürler. Bal ve polenin besin değerlerinden daha ziyade biyolojik yönden önemli birer doğal ürün olmaları son 10 yılda özellikle öne çıkmaktadır. Bu nedenle de biyolojik yönden aktif olan ballar günümüzde daha da önem kazanmaktadır. Bal ve polenin biyolojik değeri diğer bitkisel ekstraktlarda olduğu gibi başta antioksidan aktivite olmak üzere, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuar, antikanserojen gibi etkilidir. Bu nedenle bazı balların biyolojik aktif özellikleri ile ön plana çıkmalarından dolayı ticari değerleri de artmaktadır. Bu bağlamda ise Dünyada öne çıkan bazı ballar bulunmaktadır. Özellikle Yeni Zelanda Manuka balları ve Avusturalya'da heather balı gibi ballar aranan ballar arasındadır (Weston vd., 1999; Molan, 1999; Andrade vd., 1999).

Türkiye bulunduğu coğrafik konumdan dolayı dünyanın zengin bitki florasına sahip nadide ülkelerinden biridir. Ülkemiz arıcılık potansiyeli ve bal üretimi bakımından dünyada ön sıralarda olmasına rağmen gerek apiterapik yönden ve gerekse de ürünlerin tanıtımı bakımından ön planda değildir, dünyadaki tanınırlığı bakımından hak ettiği yeri almamıştır.

Halk arasında çok değerli olduğuna inanılan Anzer balı ile yapılan bilimsel çalışmaların sayısı da yetersizdir. Bal taşıdığı sıklıkla ve kolaylıkla yapılabilmekte ve piyasada Anzer balı adı altında satılan ballar üretilenden fazla miktarda bulunmaktadır. Bu da Anzer balının gerçek değerini düşürmektedir.

Balın biyolojik değeri yapısında yaklaşık olarak % 1 oranında bulunan sekonder metabolik ürünlerinden ileri gelmektedir (Weston, 1999). Bu metabolitlerin önemli bir kısmı ise bitkiler tarafından shikimate metabolik yolu üzerinden sentezlenen aromatik ve alifatik sınırsız sayıda bileşiklerden meydana gelmektedir. Aromatik yapıya sahip sekonder metabolitlerin büyük çoğunluğunu ise fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Balın biyolojik aktivitesi yapısında bulunan bu fenolik ajanlardan ileri gelmektedir. Nitekim yapılan çalışmalar ile balın toplam fenolik madde miktarı ile biyolojik aktivitesi arasında paralellik olduğu bildirilmektedir (Sarıkaya vd., 2009; Ulusoy vd., 2010).

Bu nedenle çalışmamızda son derece zengin çiçek florasına ait ve halk arasında meşhur olan Anzer bal ve polenin biyolojik aktif yapısını ortaya çıkarmak ve fenolik

bileşenlerinin aydınlatılması ve diğer ballardan bu bileşenler yönünden farkını ortaya çıkarmak ve dünyada meşhur olan diğer Manuka ve Heather balları ile karşılaştırmayı amaçladık.

Çoğu bitki geniş çapta polifenol ve flavonoid içermektedir ve her bitki tipik fenolik profile sahiptir. Polifenolik bileşiklerin konsantrasyonu ve tipi balların floral orijiniyle alakalıdır ve antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antikanser aktiviteleri gibi biyolojik aktivitelerden sorumlu ana faktörlerdir. Bitkilerde çok farklı antioksidanlar mevcuttur ve her bir antioksidan bileşeni tek tek belirlemek oldukça çok zordur. Bu nedenle her ekstraktın antioksidan potansiyelini değerlendirmek için birkaç farklı test kullanmak daha bilgilendirici ve hatta gerekli olabilir (Frankel ve Meyer, 2000; Tsai vd., 2002; Beretta vd., 2005; Huang vd., 2005; Hu ve Kitts, 2005; Li vd., 2008; Zalibera vd., 2008.). Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi belirlemek için başlıca dört metot kullanılmıştır: toplam fenolik madde tayini, demir (III) indirgeme antioksidan kuvveti (FRAP) tayini, bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) tayini ve DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi tayini. Kullanılan metotlar antioksidan testler arasında uluslararası literatürde kabul görmüş metotlardır (Ou vd., 2002; Prior vd., 2005; Tabart vd., 2009; Pellegrini vd., 2003; Tsao ve Deng, 2004; Roginsky ve Lissi, 2005; Huang vd., 2005; Özgen vd., 2006; Saura-Calixto ve Goni, 2006).

Bir redoks reaksiyonu olan ve kısaca demir indirgeme kuvveti (FRAP) olarak adlandırılan test, biyolojik materyallerin toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İndirgeme kuvveti örnekte bulunan bütün bileşiklerin indirgeme potansiyellerinin toplamını oluşturur. Bu metotta yüksek FRAP değeri yüksek  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetini göstermektedir. Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) son yıllarda kullanılmaya başlanılan Apak vd. (2004) tarafından geliştirilen bir metottur. FRAP testine benzer şekilde bu test  $Cu^{+2}$ -kompleksinin indirgenmesine dayanır. Yapılan çalışmada toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için her iki metodu da kullanmamızın sebebi hem birbirlerini desteklemeleri ve çalışmaların doğruluğundan emin olmaktır. Balın toplam fenolik madde miktarı balın toplam antioksidan kapasitesinden sorumlu olduğu ve fenolik madde içeriği yüksek doğal ürünlerin antioksidan kapasitelerinin de yüksek olduğu yapılan pek çok bilimsel çalışmada bildirilmektedir (Al-Mamary vd., 2002; Küçük vd., 2007; Kolaylı vd., 2008).

Çalışılan tüm Anzer bal ve polen numunelerinin  $Fe^{+3}$  indirgeme yeteneğine sahip oldukları ve tüm polenlerin ballardan çok daha yüksek TEAP değerine (Troloks® eşdeğeri

antioksidan güç) sahip oldukları bulundu. Anzer ballarının TEAP değerleri 0,20-1,17  $\mu\text{mol}$  Troloks<sup>®</sup>/g aralığında polenlerinki ise 11,77-105,06  $\mu\text{mol}$  Troloks<sup>®</sup>/g aralığında bulundu. Çalışılan polenlerin TEAP değerlerinin Marghitaş vd. (2009)'nin çalıştıkları farklı floralı 12 polenden biraz daha düşük olduğu görüldü. Toplam fenolik madde tayininde ise Anzer polenlerinin mg GAE/g numune cinsinden toplam fenolik madde miktarının da daha yüksek olduğu görüldü. İki çalışma da yüksek fenolik madde içeriğine sahip numunelerin yüksek FRAP değeri sergilemeleri açısından paralellik göstermektedir. Bu iki test arasındaki korelasyon değeri Anzer polenleri için Marghitaş vd. (2009)'nin çalıştığı polenlerden daha yüksektir. Literatürdeki başka bir çalışmayla karşılaştırıldığında ise Anzer poleni metanollü ekstraktlarının fenolik madde içeriğinin ve FRAP değerinin Sonoran Çölü'nden 6 farklı polenin metanollü ekstraktlarından daha yüksek olduğu görüldü (LeBlank vd., 2009). Sonoran Çölü polenlerinin FRAP değerleri ve toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 0,775-9,079  $\mu\text{mol}$  Troloks<sup>®</sup>/g ve 15,91-34,85 mg/g iken Anzer polenlerinki 11,77-105,06  $\mu\text{mol}$  Troloks<sup>®</sup>/g ve 44,07-124,10 mg/g'dır. Sonoran Çölü polenlerinin de FRAP değeri ile toplam fenolik madde içeriği arasında korelasyon bulunduğu bildirildi (R=0,873). Anzer poleninin toplam fenolik madde içeriğinin Polonya'dan toplanan 12 bitki poleninininki (12,93-82,43 mg/g) ile yakın değerlerde olduğu görüldü (Leja vd., 2007). Avusturya'da yapılan bir araştırmada 10 adet arı poleninin toplam fenolik madde içeriği incelendi ve elde edilen değerlerin (7,4-9,7 mg/g) Anzer polenlerinin toplam fenolik madde içeriğinin altında olduğu görüldü (Kroyer ve Hegedus, 2001).

Anzer ballarının toplam fenolik madde içeriğinin 4,26-10,61 mg GAE/ g olduğu bulundu. 40 adet Çek balının (çok floralı, lime, rape, raspberry, karışık ve salgı balları) incelendiği bir çalışmada (Lachman vd., 2010) balların toplam fenolik madde içeriğinin 0,083-0,242 mg GAE/ g olduğu bulundu ve Anzer ballarının toplam fenolik madde içeriği bu ballardan çok daha yüksek bulundu. Aynı çalışmadaki FRAP değerleri ise askorbik asit eşdeğeri cinsinden yaklaşık 0,635-2,358  $\mu\text{mol/g}$  (Troloks eşdeğeri cinsinden yaklaşık 0,318-1,179  $\mu\text{mol/g}$ ) olarak ve Anzer ballarından düşük bulundu ve FRAP ile toplam fenolik madde içeriği arasında pozitif korelasyon (R=0,852) bulunduğu bildirildi (Lachman vd., 2010). Anzer ballarının FRAP ile toplam fenolik madde içeriği arasındaki korelasyon değerleri literatürdeki birçok çalışma ile uyumluluk göstermektedir (Guo vd., 1997; Velioğlu vd., 1998; Aljadi ve Kamaruddin, 2004; Beretta vd., 2005; Blasa vd., 2006; Lachman vd., 2010; Gheldof ve Engeseth, 2002; Saxena vd., 2010; Alvarez-Suarez vd.,

2010). Türkiye'ye ait 50 ormangülü balı üzerine yapılan bir çalışmaya göre orman gülü ballarının toplam fenolik madde (0,24 -141,83 mg /100 g bal) içeriği Anzer ballarından düşük bulundu. Yine başka bir çalışmaya göre Anzer ballarının toplam toplam fenolik madde içeriğinin gallik asit eşdeğeri olarak akasya (0,026–0,068 mg/g), lime (0,090–0,159 mg/g), kestane (0,147–0,272 mg/g), köknar ağacı (fir) (0,163–0,286 mg/g), ladin ağacı (spruce) (0,186–0,239 mg/g), karışık floralı (0,127–0,195 mg/g) ve orman (0,192–0,270 mg/g) ballarından daha yüksek olduğu belirlendi (Bertoncelj vd., 2007).

DPPH radikali temizleme testi, çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal temizleme yeteneğinin ölçülmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir metottur (Hatano vd., 1997; Ahn vd., 2007; Nagai vd., 2003). DPPH stabil ve ticari olarak satın alınan bir radikal olup bir elektron veya hidrojen aldığında 517 nm'de absorbans verir (Huang vd., 2005). DPPH radikalinin % 50'sinin oluşumunu engelleyen madde miktarı SC<sub>50</sub> olarak tanımlanır ve düşük SC<sub>50</sub> değeri yüksek radikal temizleme aktivitesini gösterir.

Anzer ballarının DPPH radikali temizleme aktivitesine sahip oldukları ve balların SC<sub>50</sub> cinsinden radikal temizleme aktivitelerinin 31,0-77,8 mg/mL aralığında olduğu bulundu. Bu SC<sub>50</sub> değerleri akasya (33,9–63,9 mg/mL) ballarıyla benzerlik göstermektedir (Bertoncelj vd., 2007). Anzer ballarının radikal temizleme aktiviteleri lime (20,6–36,1 mg/mL), kestane (7,8–14,0 mg/mL), köknar ağacı (6,4–11,7 mg/mL), ladin ağacı (5,4–9,7 mg/mL), karışık floralı (8,1–13,9 mg/mL) ve orman (5,3–8,7 mg/mL) gibi ballara göre biraz daha düşük oranda olduğu bulunurken (Bertoncelj vd., 2007), Ferreira vd. (2009)'nin analiz ettikleri biberiye/rosemary (168,94 mg/mL), engerek otu/ *Echium vulgare* (130,39 mg/mL) ve heather (106,67 mg/mL) ballarından daha iyi olduğu belirlendi. Anzer ballarının DPPH radikali temizleme aktivitesi ile toplam fenolik madde içeriği arasında negatif korelasyon olduğu bulundu (R=-0,872) ve birçok araştırmacı tarafından da benzer korelasyonlar bulunduğu bildirilmektedir (Bertoncelj vd., 2007; Saxena vd., 2010; Zalibera vd., 2008). Ayrıca Anzer ballarının DPPH ve FRAP testleri arasında da korelasyon olduğu (R=-0,852) ve benzer sonuçların diğer çalışmalarda da bulunduğu gözlemlendi (Bertoncelj vd., 2007; Saxena vd., 2010).

Literatürdeki tüm bu çalışmalarda DPPH radikali temizleme aktivitesi değerleri farklı birimlerle (% inhibisyon gibi) verildiğinden ve sonuçlar numune g başına değil de çeşitli çözücü ekstraktlarının miktarına göre hesap edildiğinden Anzer polenlerinin DPPH değerleri bu literatürlerle karşılaştırılmamaktadır. Brezilya'da Sarmiento Silva vd. (2006)'nın sarı ve kahverengi polen olarak adlandırdıkları iki polen üzerindeki

çalışmalarında polenleri üç farklı çözücü ile ekstrakte ettiklerinde en iyi DPPH radikali temizleme aktivitesini etil asetat ekstraktının gösterdiğini buldular (SC<sub>50</sub>: 41,9-43,7µg/mL).

Tüm Anzer balı ve polenlerin Cu(II) iyonu indirgeme kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Trolox® eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak mikromol TR/g numune cinsinden balların TEAC değerleri 1,8-5,9 polenlerin ise 33,1-91,8 olarak bulundu. Verilerden anlaşılacağı üzere polenler ballardan daha yüksek Cu(II) iyonu indirgeme kapasitesine sahiptir. Literatürde bal ve polenlerle ilgili CUPRAC çalışması bulunmamaktadır.

Önceleri, araştırmacılar balların floral orijinini belirlemek için polen analizine tamamlayıcı olarak balların amino asit bileşimini incelediler (Bosi ve Battaglini, 1978; Davies, 1976; Davies ve Harris, 1982). Son yıllarda ise kütle spektroskopisine bağlı gaz kromatografisi ile uçucu bileşenleri (Bonaga vd., 1986; Darcy vd., 1997), fenilalaninin yıkım ürünlerini (Speer ve Montag, 1987), aromatik asitleri ve esterlerini (Steeg ve Montag, 1988a, 1988b, 1988c), aromatik ve karotenoid benzeri bileşenleri (Tan vd., 1989a, Tan vd., 1990; Tan vd., 1989b; Wilkins vd., 1993), aromatik aldehit ve heterosiklikleri (Hausler vd., 1989, 1990, 1991) analiz ederek balların floral orijinini değerlendirmeye çalışmışlardır. Bu çalışmalara balların fenolik bileşikler gibi uçucu olmayan fitokimyasal bileşenlerinin analizi için daha iyi HPLC metotları ilave olmuştur (Amiot vd., 1989; Ferreres, vd., 1994a; Ferreres, vd., 1993; Ferreres vd., 1994b; Sabatier vd., 1992). Bu HPLC analizlerinin balın floral orijinin doğru olup olmadığını belirlemede çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Andrade vd., 1997a; Andrade vd., 1997b; Martos vd., 2000a; Martos vd., 2000b).

Balların fenolik bileşenlerinin analizi floral ve coğrafik orijin çalışmalarında gelecek vaat eden bir yol olarak kabul görmektedir (Ferreres vd., 1994; Antony vd., 2000; Merken vd., 2000; Tomas-Barberan vd., 2001; Küçük vd., 2007; Yao vd., 2004; Oddo ve Bogdanov, 2004; Bogdanov vd., 2004; Cuevas-Glory vd., 2007; Pyrzynska ve Biesaga, 2009). Örneğin, hesperetin narenciye (citrus) balının, kampferol biberiye (rosemary) balının ve kuersetin ayçiçeği (sunflower) balının markeri olarak kullanılmaktadır (Thomas-Barberan vd., 2001). Bazı fenolik asitler de floral marker olarak kullanılmaktadır: ellagik asit heather balında (Antony vd., 2000), kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asitler kestane balının temel fenolik bileşenleridir (Merken vd., 2000). Balın botanik kaynağı onun ana kalite parametresidir ve balın değeri genellikle floral kaynağına bağlıdır. Balın

uçucu bileşen (Cuevas-Glory vd., 2007) ve mineral içeriği (Pohl, 2008) analizlerinin de botanik ve coğrafi orijini karakterize etmede yararlı olabileceği bildirilmiştir. Akasya ve lavanta çiçeği (acacia ve lavender) balı gibi bazı bal örneklerinde ise floral marker olabilecek uygun bir fenolik bileşik bulunamamıştır (Tomas-Barberan vd., 2001).

Genel olarak fenolik bileşenlerin ayrı ayrı belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemler belli başlı basamaklar içerir: fenolik bileşenlerin matriksten izolasyonu, analitik ayırma ve tanımlama ve miktar tayini. İzolasyon basamağı katı faz ekstraksiyonu (SPE) veya çözücü ekstraksiyonunu (farklı polaritedeki çözücülerle sırayla ekstraksiyon) içerir. Ayırma basamağı ise sıkça kullanılan HPLC veya kapiler elektroforezle, bazı durumlarda da gaz kromatografisiyle yapılır (Pyrzynska ve Biesaga, 2009). Çoğu ayırma basamağında ters faz (RP) ile birlikte tipik olarak C18 kolonu ve çeşitli mobil fazlar kullanılır. Dedeksiyon da rutin olarak ultraviyole (UV) absorpsiyonu, bazen fotodiyot dizisi dedektör veya kütle-spektral metotlarla yapılır (Pyrzynska ve Biesaga, 2009).

Doğal ürünlerin fenolik bileşenlerinin incelenmesi kapsamında fenolik asit ve flavonoid bileşenlerinin HPLC ile araştırılması son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan fenolik standartlar bu çalışmada da kullanılan gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, 2,4-*cis,trans*-absisik, *trans*-sinnamik asit ve kuersetin gibi bileşenler olup bunların yanı sıra literatürde kampferol, mirisetin, trisetin, isorhamnetin, luteolin, pinosembrin, pinobanksin, hesperetin, galangin, apigenin, krisin, tektokrisin, ellagik asit, fenilasetik asit ve homogentisik asit ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Bu fenolik bileşenlerin kromatografik ayrılımlarında literatürde en sık karşılaşılan kolon tipleri 150 mm veya 250 mm uzunluk, 4mm veya 4,6 mm iç çap ve 5 µm partikül büyüklüğüne sahip ters faz C18 kolonlardır (Yao vd, 2003; Paola-Naranjo vd., 2004; Yaoa vd., 2005; Scanu vd., 2005; Michalkiewicz vd., 2008; Saric vd., 2009; Truchado vd., 2009). Anzer bal ve polenin HPLC analizlerinde literatüre benzer şekilde ters faz C18 (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm) kolonu kullanıldı. Numune hazırlama, modern kimyasal analizlerde anahtar rol oynamaktadır. Katı faz ekstraksiyonu (SPE) ucuz, hala geçerli olan, esnek ve çok yönlü numune hazırlama metotlarından biridir (Michalkiewicz vd., 2008).

HPLC ve kapiler elektroforez öncesi balın matriks bileşenlerinin uzaklaştırılmasında SPE metodunun yaygın olarak kullanıldığını bildiren çeşitli araştırmacılar bulunmaktadır (Tomas-Barberan vd., 1992; Martos vd., 2000; Weston vd., 2000; Korta vd., 2001; Yao

vd., 2003; Yao vd., 2004; Yaoa vd., 2005; Paramas vd., 2006; Dimitrova vd., 2007). Bu amaçla başlıca kullanılan materyaller Amberlit-XAD tipi polistiren non-iyonik sorbentler, Dowex 50WX8 gibi kuvvetli asidik iyon değiştirme reğineleri veya C18 SPE kartuşlarıdır. Anzer bal ve polenlerinin numune hazırlama basamağında C18 SPE kartuşunun kullanımı uygun bulundu. Geliştirilen RP-HPLC-UV metodu ile 50 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılması sağlandı. Düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulunurken, alıkonma zamanlarının mükemmel çözünürlüğü elde edildi. Ayrıca tüm 17 standart için lineer cevaplar ( $R^2 > 0,9977$ ) elde edildi. Tüm standartlar için LOD değerleri 0,15 ppm'in altındadır ki bu değer bal ve polenlerde bulunan fenolik bileşiklerin dedeksiyonu için yeterlidir.

Çalışılan tüm Anzer ballarının *p*-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, rutin ve *cis,trans*-absisik asit içerdiği ve balların çoğunun gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kuersetin, *trans*-sinnamik asit ve *o*-kumarik asit içerdiği görüldü. Gallik asit, protokatekuik asit ve *o*-kumarik asit içeriğinin diğer bileşenlere oranla ballarda daha az oranda olduğu bulundu ve ballarının çoğunun kateşin ve klorojenik asit içermediği belirlendi. Benzoik asitin miktar olarak öne çıktığı görüldü. Michalkiewicz vd. (2008) ıhlamur ve heather ballarıyla yaptıkları çalışmada iki balın da *p*-HBA, vanillik, kafeik ve şiringik asit, rutin ve kuersetin içerdiğini, ıhlamur balının gallik asit içerdiğini fakat heather balının ise içermediğini bildirmektedirler. Sözü geçen bileşenlerin heather ve ıhlamur balına oranla Anzer ballarında daha düşük oranda olduğu görüldü. Michalkiewicz vd. (2008) alışmalarında kullandıkları standartların UV ile LOD değerlerini 0,01-0,12 ppm aralığında hesaplarken bizim çalışmamızda ilgili standartların LOD değerleri 0,04-0,12 ppm olarak bulundu. İki çalışmada da standartlar için bulunan lineer cevapların yüksek olduğu görüldü.

Yeni Zelanda Manuka ballarının fenillaktik asit, metilglioksal, metil şiringat ve trimetoksibenzoik asit içeriğinin yüksek olduğu bunların yanı sıra daha düşük oranlarda absisik asit, 4-metoksifenillaktik, 2-metoksibenzoik asit, ve şiringik asit içerdiği bildirilmiştir (Stephens vd., 2010). Manuka ballarının düşük miktarda sinnamik asit de ihtiva ettiği fakat vanillik asit, *p*-HBA ve benzoik asit içermediği de rapor edilmiştir (Weston vd., 2000). Anzer ballarının sinnamik asit içeriğinin Weston vd. (2000) bildirdiğinden daha yüksek olduğu, şiringik asit miktarlarının ise benzer oranlarda olduğu görüldü. Weston vd. (2000) heather balının benzoik asit ve vanillik asitce zengin olduğunu



bildirdiler. Anzer balı da benzoik asitce zengin olmakla birlikte vanillik asit de ihtiva etmektedir.

Truchado vd. (2009) tek floralı 13 farklı türden 27 adet balın HPLC ile fenolik bileşiklerini incelediler ve bütün balların krisin, hemen hepsinin galangin, metilkuersetin, apigenin + isorhamnetin, pinobanksin ve pinosembrin içerdiğini, çalışılan balların 17 tanesinin de kuersetin içerdiğini buldular. Dört ökaliptüs balından üçünün, iki yonca (lucerne) balından birinin ve beş tilia (bir ağaç) balından üçünün kuersetin içerdiğini bildirdiler. Aynı tür balların bütün bileşenlerinin aynı olmadığı, bir bileşeni aynı tür baldan biri içerirken diğerinin veya diğerlerinin içermediği ve içerilen aynı bileşen miktarının çok farklı olabildiği görülmektedir.

Biesaga ve Pyrzyńska (2009) karabuğday (buckwheat), akasya ve salgı ballarının LC-Tandem Kütle Spektroskopisi ile 15 adet fenolik bileşimini incelediler. Bu bileşenler arasında bizim çalışmamızla ortak olarak gallik asit, *p*-HBA, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin ve kuersetin bulunmaktadır. Karabuğday balının gallik asit içermediği diğer balların bu fenoliklerin hepsini içerdiğini bildirdiler. Bu üç balın da diğer bileşenlerden daha yüksek oranda ferulik asit (54,4-173,8 mg/kg) içerdiği bulundu. Biesaga ve Pyrzyńska (2009) elde ettikleri verileri diğer literatürlerle karşılaştırmadıklarını çünkü uygulanan numune hazırlama metotlarının farklı olduğunu ve bundan ziyade farklı fenolik asit ve flavonoid standartlarının çalışıldığını bildirdiler.

Anzer polenlerinin tümü *p*-OH benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, *cis,trans*-absisik asit ve *trans*-sinnamik asit içerdiği ve polenlerinin çoğunun gallik asit, protokatekuik asit, benzoik asit ve kuersetin içerdiği bulundu. Anzer ballarına benzer şekilde polenlerin hiçbiri kateşin içermezken birkaç polen hariç çoğu klorojenik asit de bulundurmamaktadır. Anzer bal ve polenlerinin bir kısmının epikateşin içerirken bir kısmının içermediği ve epikateşin içeren dört polende bu bileşen miktarının diğer bileşenlere kıyasla yüksek miktarda olduğu tespit edildi. Anzer bal ve polenlerin fenolik bileşimlerinin küçük değişimler göstermesinin nedeni, kovanların farklı alanlarda yayılmış olması olabilir. Anzer bitkilerinin dağılımı dağın eteklerinde tepesine değişim göstermektedir. Anzer ballarının hepsinde benzoik asit bulunurken ve miktarı yüksekken üç polen dışındaki tüm polenlerin benzoik asit içerdiği ve polenlerde de benzoik asit miktarının yüksek olduğu görüldü. Hırvatistan poleniyle yapılan çalışmada hidrolizsiz polenin kafeik asit galangin, kampferol, krisin ve pinosembrin içerdiği hidrolizli polenin

bu bileşiklere ilaveten isorhamnetin ve kuersetin içerdiği bildirildi (Saric vd., 2009). Anzer polenleri de çalışılan ortak bileşenlerden kafeik asit ve kuersetini değişen miktarlarda ihtiva etmektedir.

Sonuç olarak Anzer balı ve polenin fenolik bileşim yönünden paralellik gösterdiği, toplam fenolik madde yönünden diğer karışık ve tek floralı ballardan daha zengin olduğu gözlemlendi.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Anzer ballarının toplam fenolik madde miktarının 4,26-10,61 mg GAE/g bal olduğu tespit edildi. Aynı şekilde Anzer polenlerinin toplam fenolik madde miktarının 44,07-124,20 mg GAE/g polen olduğu tespit edildi. Buna göre polenlerin fenolik madde içeriğinin ballardan yaklaşık 10-20 kat daha zengin olduğu bulundu. Antioksidan kaynağı olarak kullanılacaksa 1 g polen tüketimi ile 10-20 g bal tüketimi birbirine eşdeğer ölçüdedir. Bu nedenle Anzer balı kadar Anzer poleni de önemli antioksidan ve şifa kaynağıdır.
- Geliştirilen RP-HPLC-UV metodu ile 50 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılması sağlandı. Düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulunurken, alıkonma zamanlarının mükemmel çözünürlüğü elde edildi. Ayrıca tüm 17 standart için lineer cevaplar ( $R^2 > 0,9977$ ) elde edildi. Tüm standartlar için LOD değerleri 0,15 ppm'in altındadır ki bu değer bal ve polenlerde bulunan fenolik bileşiklerin dedeksiyonu için yeterlidir.
- Anzer yöresine ait bal ve polen örneklerinin benzoik asit bakımından çok zengin olduğu ve klorojenik asit ile kateşin içermedikleri tespit edildi. Bu da bize Anzer ballarının diğer ballardan ayırt edilmesinde (veya tağşişinde) önemli ipuçları sağlayabilir.
- Ayrıca, Anzer ballarının yüksek oranda rutin ve cis,trans-absisik asit içerdiği ve balların tümünün p-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, rutin ve cis,trans-absisik asit içerdiği belirlendi. Anzer polenlerinin ise yüksek oranda kuersetin ve rutin içerdiği ve polenlerin hepsinin farklı miktarlarda p-OH benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin ve cis,trans-absisik asit içerdiği belirlendi.
- Anzer bal ve poleninin fenolik bileşenler yönünden nitelik bakımından bire bir örtüştüğü ve balın fenolik bileşenlerinin polenden kaynaklandığı tespit edildi.
- Yapılan *in vitro* antioksidan aktivite testlerinde FRAP, CUPRAC ve DPPH yöntemlerinin gerek kendi aralarında ve gerekse de toplam fenolik madde miktarları arasında yüksek korelasyonlar bulundu. Bu da bize kullanılan testlerin

doğruluğu ve antioksidan aktivitelerin toplam fenolik madde miktarından kaynaklandığını göstermektedir.

- Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar Anzer yöresine özgü bal ve polenlerin antioksidan aktivite açısından önemli fenolik bileşiklerce zengin olduğunu ve yapılan antioksidan test sonuçları meşhur Anzer balının sağlık açısından faydalarını doğrulamaktadır.
- Yapılan çalışma ile bal ve polenlerin biyolojik özelliklerinden sorumlu 17 adet fenolik bileşik standardı kullanıldı. Literatürde son yıllarda restretratrol adı verilen ve antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bildirilen ve üzüm çekirdeğinin temel bileşeni olan fenolik bileşiğin de Anzer bal ve poleninde olup olmadığı araştırılabilir.
- Bal oldukça matriks bir karışım olup aromasından sorumlu uçucu yağların tespit edilmesi Anzer balının teşhis edilmesinde ve biyolojik değerinin tayininde fayda sağlayacaktır. Balın uçucu bileşenlerinin tespit edilmesinde gaz kromatografisi-kütle Spektroskopisinden (GC-MS) faydalanılabildi.
- Yapılan çalışmada Anzer balının biyolojik aktif özelliği *in vitro* olarak antioksidan aktivite yönünden ele alındı. Balın biyolojik değeri tek bir parametreye göre değil aynı zamanda *in vitro* antimikrobiyal aktivite ve *in vivo* antioksidan, antikanserojen ve antiinflatuar yönden çalışmalar yapılabilir.
- Anzer balının biyoaktif bileşenler yönünden farklılığını literatürdeki verilere göre ortaya çıkardık. Oysa çalışmada diğer çiçek ballarının aynı çalışma şartlarında çalışılması karşılaştırma yapma imkanını genişletmiş olacaktır.
- Anzer yöresine ait bitki florası iklim şartlarına bağlı olduğundan Anzer bal ve polenin yılara göre fenolik yapısının ve biyolojik değerinin farklılığı değişik yıllara göre toplanacak bal ve polen örneklerinden tespit edilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ak, T., 2006. Curcuminin Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Akbulut, M., Özcan, M.M. ve Çoklar, H., 2009. Evaluation of Antioxidant Activity, Phenolic, Mineral Contents and Some Physicochemical Properties of Several Pine Honeys Collected From Western Anatolia, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60,7, 577–589.
- Ali, A. T., Chowdhury, M.N. ve Al-Humayyd, M.S., 1991. Inhibitory Effect of Natural Honey on *Helicobacter pylori*, Trop. Gastroenterol., 12, 73-77.
- Ali, A.T., 1991. Prevention of Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats by Natural Honey, and Its Possible Mechanism of Action, Scand. J. Gastroenterol., 26, 281-288.
- Ali, A.T., 1995. Natural Honey Exerts Its Protective Effects Against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats by Preventing Depletion of Glandular Nonprotein Sulfhydryls, Trop. Gastroenterol., 16, 18-26.
- Aliyazıcıoğlu, Y., Değer, O., Ovalı, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioğlu, Y., ve Karahan, S.C., 2005. Effects of Turkish Pollen and Propolis Extracts on Respiratory Burst for K-562 Cell Lines, International Immunopharmacology, 5, 1652– 1657.
- Aljadi, A.M. ve Kamaruddin, M.Y., 2004. Evaluation of the Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys, Food Chemistry, 85, 513-518.
- Al-Mamary, M., Al-Meerı, A. ve Al-Haborı, M., 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey, Nutrition Research, 22,9, 1041–1047.
- Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Avila-Reyes, A., Naranjo-Jimenez, N., Herrerra-Corral, J. ve Gonzales-Valdez, L. S., 2004. Variability of Antioxidant Activity Among Honeybee-Collected Pollen of Different Botanical Origin, Intersciencia, 29,10, 574–578.
- Alnaqdy, A., Al-Jabri, A., Mahrooqi, Z.A., Nzeako, B. ve Nsanze, H., 2005. Inhibition effect of Honey on The Adherence of *Salmonella* to Intestinal Epithelial Cells in vitro, Int. J. Food Microbiol., 103, 347-351.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz , 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, 2490–2499.

- Al-Waili, N.S., 2004. An alternative Treatment For Pityriasis Versicolor, Tinea Corporis and Tinea Faciei with Topical Application of Honey, Olive Oil and Beeswax Mixture: An Open Pilot Study, Complement Ther. Med., 12, 45-47.
- Amoit, M.J., Aubert, S., Gonnet, M. ve Tacchini, M., 1989. The Phenolic Compounds in Honeys: Preliminary Study Upon Identification and Family Quantification, Apidologie, 20,2, 115-125.
- Anadolu Üniversitesi, 2006. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Uygulamaları II Ders Notları, Eskişehir.
- Andrade, P., Ferreres, F. ve Amaral, M. T., 1997a . Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 20,14, 2281–2288.
- Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M.I. ve Tomas-Barberan, F.A., 1997b. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis, Food Chemistry, 60,1, 79–84.
- Andrade, P.B., Amaral, M.T., Isabel, P., Carvalhoc, J.C.M.F., Seabraa, R.M. ve da Cunha, A.P., 1999. Physicochemical Attributes and Pollen Spectrum of Portuguese Heather Honeys, Food Chemistry, 66,4, 503-510 .
- Anklam, E., 1998. A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey, Food Chemistry, 63,2, 549-562.
- Antony, S.M., Han, I. Y., Rieck, J.R. ve Dawson, P.L., 2000. Antioxidative Effect of Maillard Reaction Products Formed from Honey at Different Reaction Times, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,9, 3985–3989.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek M. ve Karademir, S. E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970–7981.
- Asad, N.R., Asad, L.M.B.O., Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral- Neto, J.B. ve Leitão, A.C., 2004. Several Pathways of Hydrogen Peroxide Action That Damage the E. coli Genome, Genetics and Molecular Biology, 27,2, 291-303.
- Balcı, N., 2007. Sürekli Gürültüye Maruz Kalınan Bazı İş Kollarında Çalışan Kişilerde Serum Total Sialik Asit, Ksantin Oksidaz, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Arginaz ve Ornitin Değerleri, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R. ve Čeksterytė, V., 2007. Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts, Food Chemistry, 101,2, 502-514.

- Becchi, M. ve Fraisse, D., 1989. Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-Activated Dissociation/Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids, Biomed. Environ. Mass Spectrom., 18, 122-130.
- Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as A Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, Analytical Biochemistry, 239,1, 70-76.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. ve Facino, R.M., 2005. Standardization of Antioxidant Properties of Honey by A Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics, Analytica Chimica Acta, 533, 185-191.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M. ve Golob, T., 2007. Evaluation of The Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey, Food Chemistry, 105, 822-828.
- Biesaga, M. ve Pyrzynska, K., 2009. Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Studies of the Phenolic Compounds in Honey, Journal of Chromatography A, 1216, 6620-6626.
- Bilaloğlu, G. V., Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354 s.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C. ve Piatti, E., 2006. Raw Millefiori Honey is Packed Full of Antioxidants, Food Chemistry, 97, 217-222.
- Blomhoff, R., 2005. Dietary Antioxidants and Cardiovascular Disease, Current Opinion in Lipidology, 16, 47-54.
- Bogdanov, S., Ruoff, K. ve Oddo, L.P., 2004. Physico-Chemical Methods for The Characterisation of Unifloral Honeys: A Review, Apidologie, 35,1, 4-17.
- Bonaga, G., Giumanini, A.G. ve Gliozzi, G., 1986. Chemical Composition of Chestnut Honey: Analysis of The Hydrocarbon Fraction, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34,2, 319-326.
- Borbalán, Á.M.A., Zorro, L., Guillén, D.A. ve Barroso, C.G., 2003. Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry and Its Relationship to Antioxidant Power, Journal of Chromatography A, 1012, 31-38.
- Bosi, G. ve Battaglini, M., 1978. Gas Chromatographic Analysis of Free and Protein Amino Acids in Some Unifloral Honeys, Journal of Apiculture Research, 17,3, 152-166.
- Brown, P.R. ve Grushka, E., 1995. Advances in Chromatography, Volume 35, ISBN: 0-8247-9361-7, Marcel Dekker Inc., New York, 218-220 s.

- Cam, M. ve Hışıl, Y., 2003. Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemleri, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2-4 Ekim, Ankara, 67-82 s.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchall, K.A. ve Da Cunha, A.P., 2003. Age-induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and The Contribution of Constituent Flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 742–745.
- Cazes, J., 2004. Encyclopedia of Chromatography, ISBN: 0-8247-2153-5, Marcel Dekker Inc., New York.
- Chang, L.C. ve Kinghorn, A.D., 2001. In : C. Tringali (Ed.), Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, London, 159 s.
- Chen, L.H., Boissonneault, G.A. ve Glauert, H.P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8, 739-748.
- Chen, L., Mehta, A., Berebaum, M., Zangerl, A.R. ve Egeseth, N.J., 2000. Honeys From Different Floral Sources as Inhibitors of Enzymatic Browning in Fruit and Vegetable Homogenates, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,10, 4997–5000.
- Çıtak, D., 2006. Zeytinyağı ve Pirina Yağındaki BAP Kirliliğinin HPLC ile Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Clifford, M.N., 2000. Anthocyanins-Nature, Occurrence and Dietary Burden, J. Sci. Food Agric., 80, 1063-1072.
- Collins, A.R., 2005. Antioxidant Intervention as a Route to Cancer Prevention, European Journal of Cancer, 41,1923-1930.
- Cook, N.C. ve Sammon, S., 1996. Flavonoids: Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources, Nutr. Biochem., 7, 66-76.
- Crane, E., 1975. Honey: A Comprehensive Survey. Heineman, 608 pp, London, UK.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. Ve , Dyatmiko, W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimica Acta, 80, 1144-1152.
- Cuevas-Glory , L.F., Pino, J.A., Santiago, L.S. ve Sauri-Duch, E., 2007. A Review of Volatile Analytical Methods for Determining The Botanical Origin of Honey, Food Chemistry, 103,3, 1032-1043.
- Cuyckens, F. ve Claeys, M., 2004. Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, J. Mass Spectrom., 39, 1-15.



- Darcy, B.R., Rintoul, G.B., Rowland, C.Y. ve Blackman, A.J., 1997. Composition of Australian Honey Extractives. 1. Norisoprenoids, Monoterpenes, and Other Natural Volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45,5, 1834–1843.
- Davies, A.M.C., 1976. The Application of Amino Acid Analysis to The Determination of The Geographical Origin of Honey, Journal of Food Technology, 11,5, 515–523.
- Davies, A.M.C. ve Harris, R.G., 1982. Free Amino Acid Analysis of Honeys from England and Wales: Application to The Determination of The Geographical Origin of Honeys, Journal of Apiculture Research, 21,3, 168–173.
- de Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A. ve Sandra, P., 2004. Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, Chromatographia, 59, 403-409.
- Dimitrova, B., Gevrenova, R. ve Anklam, E., 2007. Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography, Phytochem. Anal., 18,1, 24-32.
- Doğaroğlu, M., 1999. Modern Arıcılık Teknikleri. Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tekirdağ, 296 s.
- Dustmann, J.H., 1993. Honey Quality and Its Control. Amer. Bee J., 133,9, 648–651.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Edge, R., Mc Garvey, D.J. ve Truscott, T.G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants-A Review, J. Photoc. Photobio., 41, 189-200.
- Effem, S.E., 1988. Clinical Observations on the Wound Healing Properties of Honey, Br. J. Surg., 75, 679-681.
- Erkoç, Ş., Erkoç, F. ve Keskin, N., 2003. Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, J. Mol. Struct. (Theochem), 631, 141-146.
- Ettre, L. S., 2003. “M.S. Tswett and, the Invention of Chromatography” in Milestones in Chromatography, LCGC , 21, 458.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, D.E. ve Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 707-715.
- Fallico, B., Zappala, M., Arena, E. ve Verzea, A., 2004. Effect of Conditioning on HMF Content in Unifloral Honeys, Food Chemistry, 85, 305-313.

- Fang, Y.Z., Yang, S. ve Wu, G., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition, Nutrition, 18, 872-879.
- Fang, Z., Zhang, 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.
- FAO, 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Service Bulletin, Rome, Italy.
- Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., ve Garcia-Parrilla, M.C., 2008. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From in vitro Results to in vivo Evidence, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 649-671.
- Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Tomas-Lorente, F. ve Tomas-Barberan, F.A., 1993. Hesperetin: A Marker of The Floral Origin of Citrus Honey, Journal of the Science of Food and Agriculture, 61, 121-123.
- Ferreres, F., Blázquez, M.A., Gil, M. I. ve Tomas-Barberan, F.A., 1994. Separation of Honey Flavonoids by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, Journal of Chromatography A, 669,1-2, 268-274.
- Ferreres, F., Andrade, P. ve Tomas-Barberan, F.A., 1994a. Flavonoids from Portuguese Heather Honey, Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 199, 32-37.
- Ferreres, F., Giner, J.M. ve Tomas-Barberan, F.A., 1994b. A Comparative Study of Hesperetin and Methyl Anthranilate as Markers of The Floral Origin of Citrus Honey, Journal of the Science of Food and Agriculture, 65, 371-372.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. ve Estevinho, L.M., 2009. Antioxidant Activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and Phenolic Extract, Food Chemistry, 114, 1438-1443.
- Frankel, E.N. ve Meyer, A.S., 2000. The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. J. Sci. Food Agric., 80,13, 1925-1941.
- 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.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 44, 147-159.
- Fritz, J.S., 1999. Analytical Solid Phase Extraction, Wiley-VCH, New York, 2-14 s.
- Gemici, Y., Güven, A. ve Gemici, M., 1995. Polenler, Bilim ve Teknik Dergisi, 28,330, 74-79.

- Gheldof, N. ve Engeseth, N.J., 2002. Antioxidant Capacity of Honeys From Various Floral Sources Based on The Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,10, 3050–3055.
- Gheldof, N., Wang, X-H. ve Engeseth, N.H., 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys From Various Floral Sources, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,21, 5870–5877.
- Gonzales, A. P., Burin, L. ve Buera, M. P., 1999. Color Changes During Storage of Honeys in Relation to Their Composition and Initial Color, Food Research International, 32, 185-191.
- Guo, C., Cao, G., Sofic, E. ve Prior, R.L., 1997. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulmetric Array Detection of Electroactive Components in Fruits and Vegetables. Relationships to oxygen radical absorbance capacity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1787–1796.
- Günaydın, B. ve Çelebi, H., 2003. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, Anestezi Dergisi, 11, 87-98.
- Gündüz T., 2001. İnrümentel analiz, Gazi Büro Kitapevi, Ankara.
- Haffeejee, I. E. ve Moosa, A., 1985. Honey in the Treatment of Infantile Gastroenteritis, BMJ, 290, 1886-1887.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease, Method Enzymol., 186, 1-80.
- Halliwell, B., 1991. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease, Am. J. Med., 91,3c, 145-225.
- Halliwell, B., Gutteridge J. M. ve Cross, E. C., 1992. Free Radical, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now?, J. Lab. Clin. Med., 119,6, 598-620.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence, Lancet., 344, 721-724.
- Halliwell, B., 2002. Effect of Diet on Cancer Development: Is Oxidative DNA Damage A Biomarker?, Free Radical Biology and Medicine, 32,10, 968-974.
- Harborne, J.B. ve Simmonds, N.W., 1964. The Natural Distribution of the Phenolicaglicones. In Biochemistry of Phenolic Compounds. Ed: J.B. Harborne. Academic Press, London and New York.
- Hatano, T., Takagi, M., Ito, H. ve Yoshida, T., 1997. Phenolic Constituents of Liquorice. VII. A New Calcone with A Potent Radical Scavenging Activity and Accompanying Phenolics, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 45, 1485–1492.

- Hausler, M. ve Montag, A., 1989. Isolation, Identification and Quantitative Determination of The Norisoprenoid (S)-(+)-dehydrovomifoliol in Honey, Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 189, 113–115.
- Hausler, M. ve Montag, A., 1990. Minor Constituents of Honey with Aroma-Relevance. III. Nectar Flow-Specific Distribution of Aromatic Aldehydes, & Presence of Nitrogen, Sulphur Heterocyclic Compounds, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 86,6, 171–174.
- Hausler, M. ve Montag, A., 1991. Minor Constituents of Honey with Aroma Relevance. IV. Presence and Nectar Flow-Specific Distribution of The Aroma Compound Precursor (S)-dehydrovomifoliol, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 87,2, 35–36.
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Wiseman, S.A., Tijburg, L.B.M. ve Bast, A., 2000. The Interaction of Tea Flavonoids with The NO-System: Discrimination Between Good and Bad NO, Food Chemistry, 70, 365-370.
- Hennion, M.C., 1999. Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 856, 3–54.
- Hu, C. ve Kitts, D.D., 2005. Dandelion (*Taraxacum officinale*) Flower Extract Suppresses Both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide and Prevents Lipid Oxidation in vitro, Phytomedicine, 12,8, 588-597.
- Huang, D., Ou, B., ve Prior, R.L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.
- Hulme, A.C., 1971. The Biochemistry of Fruits and Their Products. Vol.2, A.R.C.Food Research Institute, Norwich, England, 172-205 s.
- Jamet, A. ve Ebeling, P.W., 2002. Stabilization Mechanisma for Anthocyanin: The Case for Copolymerization Reactions. Engineering and Food for the 21.st Centruy, CRC Pres LLC, 1-4 s.
- Jedrzejczuk, A., Góralczyk, K., Czaja, K., Struciński, P. ve Ludwicki, J.K., 2001. High Performance Liquid Chromatography: Application in Pesticide Residue Analysis, Rocz Panstw Zakl Hig., 52,2, 127-38.
- Kato, Y., Nakamura, K., Kitamura, T., Tsuda, T., Hasegawa, M. ve Sasaki, H., 2004. Effect of Chromatographic Conditions on Resolution in High-Performance Ion-Exchange Chromatography of Proteins on Macroporous Anionexchange Resin, Journal of Chromatography A, 1031, 101-105.
- Kaur, C. ve Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in Fruits and Vegetables-The Millennium's Health. International Journal of Food Science and Technology, 36, 703-725.
- Keha, E.E. Ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, 348-370 s.

- Kempe, M., 1996. Antibody-Mimicking Polymers as Chiral Stationary Phases in HPLC, Anal. Chem., 68,11, 1948-1953.
- Kenjeric' D., Mandic' M. L., Primorac L., Čačić F., 2008. Flavonoid Pattern of Sage (*Salvia officinalis* L.) Unifloral honey, Food Chemistry, 110, 187–192.
- Koca, N. ve Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler, Gıda, 30, 229-236.
- Kolankaya D., 2001. Antioksidan Etki ve Bal, Mellifera, 1.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linnsen, J.P.H., de Groot, A. ve Evstatieva, L.N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study of Three Testing Methods, Phytochem. Anal., 13, 8-17.
- Kondo, H., Takahashi, M. ve Niki, E., 1997. Peroxynitrite-Induced Hemolysis of Human Erythrocytes and Its Inhibition by Antioxidants, FEBS Letters, 413,2, 236-238.
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B. ve Vincente, B., 2001. Study of Semi-Automated Solid-Phase Extraction for The Determination of Acaricide Residues in Honey by Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 930,1-2, 21-29.
- Krell, R., 1996. Value Added Products from Beekeeping, FAO Agricultural Services Bulletin, 124, 85-94.
- Krell, R., 2001. Value Added Products from Beekeeping, Food and Agricultural Organisations of the United Nations, Rome.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., ve Etherton, T.D., 2002. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer, American Journal of Medicine, 113, 71-88.
- Kolaylı, S., Küçük, M., Duran, C., Candan, F. ve Dinçer, B., 2003. Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem.(*Cherry Laurel*) Fruit Grown in the Black Sea Region, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7489-7494.
- Kroyer G. ve Hegedus N., 2001. Evaluation of Bioactive Properties of Pollen Extracts As Functional Dietary Food Supplement, Innov. Food Sci. Emerg., 2,3, 171-174.
- 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.
- Lachman, J., Orsak, M., Hejtmenkova, A. ve Kovarova E., 2010. Evaluation of Antioxidant Activity And Total Phenolics Of Selected Czech Honeys, LWT-Food Science and Technology, 43, 52–58.

- 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, Am. J. Clin. Nutr., 62, 1212-1215.
- Langseth, L., 1995. Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention. ILSI Press, Washington, DC.
- LeBlanc B. W., Davis O. K., Boue S., DeLuca A. ve Deeby, T., 2009. Antioxidant Activity of Sonoran Desert Bee Polen, Food Chemistry, 115,4, 1299-1305.
- Lee, J., Koo, N., ve Min, D.B., 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 21-33.
- Leja M., Mareczek A., Wyzgolik G., Klepacz-Baniak J. ve Czekońska, K., 2007. Antioxidative Properties of Bee Pollen in Selected Plant Species, Food Chemistry, 100,1, 237-240.
- Li, H.B., Wong, C.C., Cheng, K.W. ve Chen, F., 2008. Antioxidant Properties In Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants, LWT-Food Sci Technol., 41, 385–390.
- Liang Y., Cao W., Chen W., Xiao X. ve Zheng J., 2009. Simultaneous Determination of Four Phenolic Components in Citrus Honey by High Performance Liquid Chromatography Using Electrochemical Detection, Food Chemistry, 114, 1537–1541.
- Macherey-Nagel, 2004. Sample Preparation, Solid Phase Extraction, In: Macherey-Nagel Catalogue, 184-241 s.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. ve Salunkhe, D.K., 1996. Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. Markel Dekker, Newyork.
- Mărghitaş L.A., Stanciu O.G., Dezmirean D.S., Bobiş O., Popescu O., Bogdanov S. ve Campos, M.G., 2009. *In vitro* Antioxidant Capacity of Honeybee-Collected Pollen of Selected Floral Origin Harvested from Romania, Food Chemistry, 115,3, 878-883.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. ve Tomas-Barberan, F.A., 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2824-2829.
- Martos, I., Ferreres, F. ve Tomas-Barberan, F.A., 2000a. Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of Eucalyptus Honeys from Australia, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 1498–1502.
- Martos, I., Ferreres, F., Yao, L.H., Darcy, B.R., Caffin, N. ve Tomas-Barberan, F.A., 2000b. Flavonoids in Monospecific Eucalyptus Honeys From Australia, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 4744–4748.

- Matés, J. M., Pérés-Gomez, C. ve de Castro, I. N., 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases, Clin. Biochem., 32,8, 595-603.
- Mazza, G. ve Brouillard, R., 1990. The Mechanism of Copigmentation of Anthocyanins in Aqueous Solutions, Phytochemistry, 29, 1097-1102.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. ve Nacoulma, O.G., 2005. Determination of Total Phenolic, Flavonoid and Proline Contents in Burkina Fasan Honey, as well as Their Radical Scavenging Activity, Food Chemistry, 91, 571-577.
- Medeiros, K.C.P., Figueiredo, C.A.V., Figueredo, T.B., Freire, K.R.L., Santos, F.A.R., Alcantara-Neves, N.M., Silva, T.M.S. ve Piuvezam, M.R., 2008. Anti-allergic Effect of Bee Pollen Phenolic Extract and Myricetin in Ovalbumin-Sensitized Mice, Journal of Ethnopharmacology, 119, 41-46.
- Meister, A. ve Anderson, M. E., 1983. Glutathion, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-60.
- Merken, H.M. ve Beecher, G.R., 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, J. Agric. Food Chem., 48,3, 577-599.
- Michalkiewicz A., Biesaga M. ve Pyrzynska K., 2008. Solid-phase Extraction Procedure for Determination of Phenolic Acids and Some Flavonols in Honey, Journal of Chromatography A, 1187,1-2, 18-24.
- Molan, P.C., 1999. The Role of Honey in The Management of Wounds, J Wound Care, 8, 415-418.
- Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I. ve Worobo, R.W., 2004. Growth Inhibition of Foodborne Pathogens and Food Spoilage Organisms by Select Raw Honeys, Int. J. Food Microbiol., 97, 1-8.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W., 1998. Harper's Biochemistry, Dikmen, N., Özgünen, T., Harper'ın Biyokimyası, İstanbul Barış kitabevi, İstanbul, 127-799 s.
- Naczka, M. ve Shahidi, F., 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food, Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. ve Suzuki, N., 2003. Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis, Food Chemistry, 80, 29-33.
- Nakajima, J. I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. ve Saito, K., 2004. LC/PDA/ESIMS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries, J. Biomed. Biotechnol., 5, 241-247.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., and Exon, J. H., 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46, 161-183.

- Orman, S. ve Bağdatlıoğlu, N., 2005. Gıdalaradaki Antioksidanlar ve Sağlık Üzerine Etkileri, Standart, Ekonomik ve Teknik Dergi, 44, 52-61.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., and Deemer, E. K., 2002. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) And Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3122-3128.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Özgen, M., Reese, R. N., Tulio Jr., A. Z., Scheerens, J. C., ve Miller, A. R., 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1151-1157.
- 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 & Related Technologies, 30, 587-596.
- Paola-Naranjo, R.D.D., Sánchez-Sánchez, J., González-Paramás, A.M., ve Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Liquid Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis of Anthocyanin Composition of Dark Blue Bee Pollen from *Echium plantagineum*, Journal of Chromatography A, 1054, 205–210.
- Paramas, A.M.G. , Barez, J.A.G., Marcos, C.C., Garcia-Villanova, R.J. ve Sanchez, J.S., 2006. HPLC-Fluorimetric Method for Analysis Of Amino Acids in Products of The Hive (Honey and Bee-Pollen), Food Chemistry, 95, 148-156.
- Parke, D. V., 2001. Nutritional Antioxidants and Disease Prevention: Mechanisms of Actions. Antioxidans in Human Health and Diseases, Eds: Basu, T.K., Temple, N.J., ve Garg, M.L., CAB International, New York, 1-13 s.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Rio, D. D., Salvatore, S., Bianchi, M. ve Brighenti, F., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy by Three Different in vitro Assays, Journal of Nutrition, 133, 2812-2819.
- Perera, C. O. ve Yen, G. M., 2007. Functional Properties of Carotenoids in Human Health, International Journal of Food Properties, 10, 201-230.
- Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A. L., Beecher, G. ve Aladesanmi, J., 2005. Major Flavonoids in Dry Tea, Journal of Food Composition and Analysis, 18, 487-501.



- Pichichero, E., Canuti, L. ve Canini, A., 2009. Characterisation of the phenolic and Flavonoid Fractions and Antioxidant Power of Italian Honeys of Different Botanical Origin, J Sci. Food Agric., 89, 609–616.
- Pichon, V., 2000. Solid-Phase Extraction for Multiresidue Analysis of Organic Contaminants in Water, Journal of Chromatography A, 885, 195–215.
- Pietta, P. ve Gardana, C., 2003. Flavonoids in Herbs, in *Flavonoids in Health and Disease* 2nd Ed. Revised and Expanded, Eds. Rice-Evans, C.A. & Packer, L., Marcel Dekker Inc., New York, 49-69.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as Antioxidants, J. Nat. Prod., 63, 1035-1042.
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P. ve Scheller, C., 2007. Structure–Activity Relationships of Flavonoid-Induced Cytotoxicity on Human Leukemia Cells, Archives of Biochemistry and Biophysics, 460,1, 1-9.
- Pohl, P., 2009. Determination of Metal Content in Honey by Atomic Absorption and Emission Spectrometries, Trends in Analytical Chemistry, 28 ,1, 117-128.
- Poole, C.F., Gunatilleka, A.D. ve Sethuraman, R., 2000. Contributions of Theory to Method Development in Solid-Phase Extraction, Journal of Chromatography A, 885, 17–39.
- Prasain, J. K., Wang, C. C. ve Barnes, S., 2004. Mass Spectrometric Methods for the Determination of Flavonoids in Biological Samples, Free Rad. Bio. Med., 37,9, 1324-1350.
- Proestos, C., Kapsokefalou, M. v Komaitis, M., 2008. Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants byRP-HPLC and GC-MS After Silylation, Journal of Food Quality, 31,3, 402-414.
- Prior, R. L., Wu, X. ve Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290–4302.
- Roginsky, V. ve Lissi, E. A., 2005. Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food, Food Chemistry, 92, 235–254.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G., 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, Free Radical Biology & Medicine, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganda, G., 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, Trends Plant Sci., 2, 152-159.
- Rice-Evans, C. ve Packer, L., 1998. *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel-Dekker, New York.

- Sabatier, S., Amoit, M.J., Tacchini, M. ve Aubert, S., 1992. Identification of Flavonoids in Sunflower Honey, Journal of Food Science, 57,3, 733–734.
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Tunçel, M., Öztürk, N., Kolaylı, S., 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania sativa Mill.*) Honey and Propolis, Journal of Food Biochemistry, 33,4, 470-481.
- Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D. ve Marotti, T., 2009. Antioxidant Effects of Flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. Rich Bee Polen, Food Chem. Toxicol., 47, 547–554.
- Sarmiento Silva, T.M., Camaraa, C.A., da Silva Linsa, A.C., Barbosa-Filhoa, J.M., Sarmiento da Silva, E.M., Freitas, B.M. ve dos Santos, F.A.R., 2006. Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of Polen Loads from Stingless Bee *Melipona subnitida* Ducke, Journal of Food Composition and Analysis, 19, 507–511.
- Saura-Calixto, F. ve Goni, I., 2006. Antioxidant Capacity of the Spanish Mediterranean Diet, Food Chemistry, 94, 442-447.
- Scanu, R., Spano, N., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Sana, G. ve Tapparo, A., 2005. Direct Chromatographic Methods for The Rapid Determination of Homogentisic Acid in Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey, Journal of Chromatography A, 1090, 76-80.
- Schmidt, J. O. ve Buchmann, S. L., 1997. Pollen, Chapter 22. The Hive and the Honey Bee. Revised edition. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, 928-931 s.
- Shahidi F., 2000. Antioxidants in Food and Food Antioxidants. Nahrung, 44,3, 158-163.
- Shulamit, L., “Solid Phase Extraction (SPE)”, [http://www.forumsci.co.il/HPLC/spe\\_abic.pdf/](http://www.forumsci.co.il/HPLC/spe_abic.pdf/), 12.07.2010.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stress from Basic Research to Clinical Application, Am. J. Med., 9, 31-37.
- 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., Holler, F.J. ve Niemann, T.A., 2000 . “Analitik Kimya Temelleri”, 1.baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Skoog, D.A. ve Leary, J., 1992. Principles of Instrumental Analysis, fourth edition, Saunders College Publishing, Orlando, Florida.

- 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, US, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. ve Dolan J.W., 2010. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey.
- Speer, K. ve Montag, A., 1987. Phenylalanine Decomposition Products as Flavour Compounds in Honey, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 83,4, 103–107.
- Steege, E. ve Montag, A., 1988a. Minor Constituents of Honey, Related to Aroma. 1. Aromatic Carboxylic Acids and Esters, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 84,4, 103-108.
- Steege, E. ve Montag, A., 1988b. Minor Constituents of Honey, Related to Aroma. 2. Decomposition Products of Aromatic Carboxylic Acids, and Glycoside-Bound Aromatic Compounds That Contribute to Aroma, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 84,5, 147-150.
- Steege, E. ve Montag, A., 1988c . Quantitative Determination of Aromatic Carboxylic Acids in Honey, Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 187, 115–120.
- Stephens, J.M., Schlothauer, R.C., Morris, B.D., Yang, D., Fearnley, L, Greenwood, D.R. ve Loomes, K.M., 2010. Phenolic Compounds and Methylglyoxal in Some New Zealand Manuka and Kanuka Honeys, Food Chemistry, 120, 78-86.
- Stevenson, D., 2000. Immuno-Affinity Solid-Phase Extraction, Journal of Chromatography B, 745, 39-48.
- Storz, G. ve Imlay, J. A., 1999. Oxidative Stress, Current Opinion in Microbiology, 2,2, 188-194.
- Straka, H., 1975. Pollen und Sporenkunde, Gustav Fischer Verlag, Band 13, Stuttgart, 235 s.
- Subrahmanyam, M., 1991. Topical Application of Honey in the Treatment of Burns, Br. J. Surg., 78, 497-498.
- Saxena, S., Gautam, S. ve Sharma, A., 2010. Physical, Biochemical and Antioxidant Properties of Some Indian Honeys, Food Chemistry, 118, 391-397.
- Sunay, A.E., 2006. Balda Orijin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. ve Canivenc Lavier, M. C., 1998. In : INRA (Ed.), Polyphenols 96, Les Colloques, Paris, 166-204 s.

- Swellam, T., Miyagana, N., Onozawa, M., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T. ve Akaza, H., 2003. Antineoplastic Activity of Honey in an Experimental Bladder Cancer Implantation Model: *In vivo* and *in vitro* Studies, Int. J. Urol., 10, 13-219.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O. ve Dommes, J., 2009. Comparative Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds Measured by Various Tests, Food Chemistry, 113,4, 1226-1233.
- Tan, S.T., Wilkins, A.L., Holland, P.T. ve McGhie, T.K., 1989a . Extractives from New Zealand Unifloral Honeys. 2. Degraded Carotenoids and Other Substances from Heather Honey, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37,5, 1217–1221.
- Tan, S.T., Wilkins, A.L., Molan, P.T., Holland, P.T. ve Reid, M.A., 1989b. A Chemical Approach to The Determination of Floral Sources of New Zealand Honeys, Journal of Apiculture Research, 28, 212–222.
- Tan, S.T., Wilkins, A.L., Holland, P.T. ve McGhie, T.K., 1990. Extractives From New Zealand Honeys: 3. Unifloral Thyme and Willow Honey Constituents, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38,9, 1833–1838.
- Temple, N. J., 2000. Antioxidants and disease: More questions than answers, Nutrition Research, 20, 449-459.
- Theodoridis, G. ve Manesiotis, P., 2002. Selective Solid-Phase Extraction Sorbent for Caffeine Made by Molecular Imprinting, Journal of Chromatography A, 948, 163-169.
- Tomas-Barberan, F.A., Blazquez, M.A., Garcia-Viguera ,C., Ferreres, F., Thomas-Lorente, F., 1992. A Comparative Study of Different Amberlite XAD Resins in Flavonoid Analysis, Phytochem. Anal., 3, 178.
- Tomas-Barberan, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S. ve Anklam, E., 2001. HPLC Flavonoid Profiles as Markers for The Botanical Origin of European Unifloral Honeys, Journal of the Science of Food and Agriculture, 81,5, 485-496.
- Thomas, M. J., 1995. The Role Of Free Radicals And Antioxidants: How do We Know That They are Working?, Critical Reviews in Food Science, 35, 21-39.
- Tonks, A. J., Cooper, R. A., Jones, K. P., Blair, S., Patron, J. ve Tonks, A., 2003. Honey Stimulates Inflammatory Cytokine Production from Monocytes, Cytokine, 21, 242-247.
- Trathnigg, B., Frady, S. ve Veronik, M., 2004. Thermodynamic Study of Retention in Liquid Exclusion-Adsorption Chromatography, Journal of Chromatography A, 1038, 43-52.

- Truchado, P., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., 2009. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Reveals the Widespread Occurrence of Flavonoid Glycosides in Honey, and Their Potential as Floral Origin Markers, Journal of Chromatography A, 1216, 7241–7248.
- Tsai, P. J., Macintosh, J., Pearce, P., Camden, B. ve Jordan, B. R., 2002. Anthocyanin and Antioxidant Capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Extract, Food Research International, 35, 351-356.
- Tsao, R. ve Deng, Z., 2004. Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals, Journal of Chromatography B, 812, 85-99.
- Tsimogiannis, D.I. ve Oreopoulou, V., 2006. The Contribution of Flavonoid C-Ring on The DPPH Free Radical Scavenging Efficiency. A Kinetic Approach for The 3',4'-Hydroxy Substituted Members, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 7, 140-146.
- Turna, G., 2008. Ehrlich Asit Solid Tümör Modeli Oluşturulmuş Farelerde Thymus Sipleus ve Taurinin Karaciğer MDA, Glutasyon, AOPP Düzeylerine ve SOD Aktivitesine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Türkmen, N., Sarı, F., Poyrazoğlu, E. S. ve Velioglu Y. S., 2006. Effects of Prolonged Heating on Antioxidant Activity and Colour of Honey, Food Chemistry, 95, 653-657.
- Ulusoy, E., Kolaylı, S. ve Sarıkaya, A.O., 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Floral Origin Honeys from Türkiye, Journal of Food Biochemistry, 34,1, 321 – 335.
- URL-1, [http://www.ehow.com/about\\_6711931\\_chemical-analysis-plants.html](http://www.ehow.com/about_6711931_chemical-analysis-plants.html), 04.04.2010.
- URL-2, [www.anzerbali.com](http://www.anzerbali.com), 03.12.2009.
- URL-3, <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenol>, 02.05.2010.
- URL-4 [http://www.cilginbiyologlar.com/forum/viewthread.php?thread\\_id=6396](http://www.cilginbiyologlar.com/forum/viewthread.php?thread_id=6396), 02.05.2010.
- URL-5, [http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz\\_okulu/hplc.htm](http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/hplc.htm), 18.04.2010.
- URL-6, <http://www.balparmak.com.tr/bal.hakkinda.balin.faydalari.asp>, 18.04.2010.
- URL-7, [http://tr.wikipedia.org/wiki/Bal#Tedavide\\_Kullan.C4.B1m\\_Alanlar.C4.B1](http://tr.wikipedia.org/wiki/Bal#Tedavide_Kullan.C4.B1m_Alanlar.C4.B1), 12.06.2010.
- URL-8, <http://www.mucizekarisim.com/polen.htm>, 08.05.2010.
- URL-9, <http://www.ariurunleri.com/beeweb.swf>, 08.05.2010.
- URL-10, <http://www.zaybir.com/index.php?id=54>, 08.05.2010.

- US EPA, 1984, Definition and Procedure for the Method Detection Limit-Revision 1.11, 40 CFR Part 136, Appendix B, EPA.
- Uzbekova, D., Makarova, V.G., Chugunova, L.G., Chernobavskaya, N.A. ve Mirgorodskaya, L.N., 2001. Bee-Collected Pollen and Lactulose in Treatment of Chronic Hepatitis B in Children, Journal of Hepatology, 34,1, 194.
- Uzbekova, D.G., Makarova, V.G., Khvoynitskaya, L.G. ve Slepnev, A. A., 2003. Evaluation of Bee-Collected Pollen Influence on Lipid Peroxidation, Antioxidant System and Liver Function in Old Animals, Journal of Hepatology, 38,2 203.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. ve Oomah, B.D., 1998. Antioxidant Activity And Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4113–4117.
- Vit, P. ve Tomás-Barberán, F. A., 1998. Flavonoids in Meliponinae Honeys from Venezuela Related to Their Botanical, Geographical and Entomological Origin to Assess Their Putative Anticataract Activity, Z. Lebensm. Forsch. A., 206, 288-293.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. ve Perez-Alvarez, J.A., 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, Journal of Food Science, 73, 117-124.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller R. ve Mosbach, K., 1993. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting, Nature, 361, 645–647.
- Wang, H., Cao, G. ve Prior, R. L., 1997. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 304-309.
- Weng, M. S., Ho, Y. S. ve Lin, J. K., 2005. Chrysin Induces G1 Phase Cell Cycle Arrest in C6 Glioma Cells Through Inducing p21Waf1/Cip1 Expression: Involvement of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, Biochem. Pharmacol., 69, 1815-1827.
- Weston, R. J., Mitchell, K. R. ve Allen, K. L., 1999. Antibacterial Phenolic Components of New Zealand Manuka Honey, Food Chemistry, 64, 295-301.
- 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.
- Wettasinghe, M. ve Shahidi, F., 1999. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Properties of Ethanolic Extracts of Defatted Borage (*Borago officinalis* L.) Seeds, Food Chemistry, 67,4, 399-414.
- White, J. W., 1979. Composition of Honey. In: Crane. E. (Ed.) Honey: A Comprehensive Survey. Heinemann, London.
- White, J. W., 1994. The Role of HMF and Diastase Assays in Honey Quality Evaluation, Bee World, 75, 104-117.

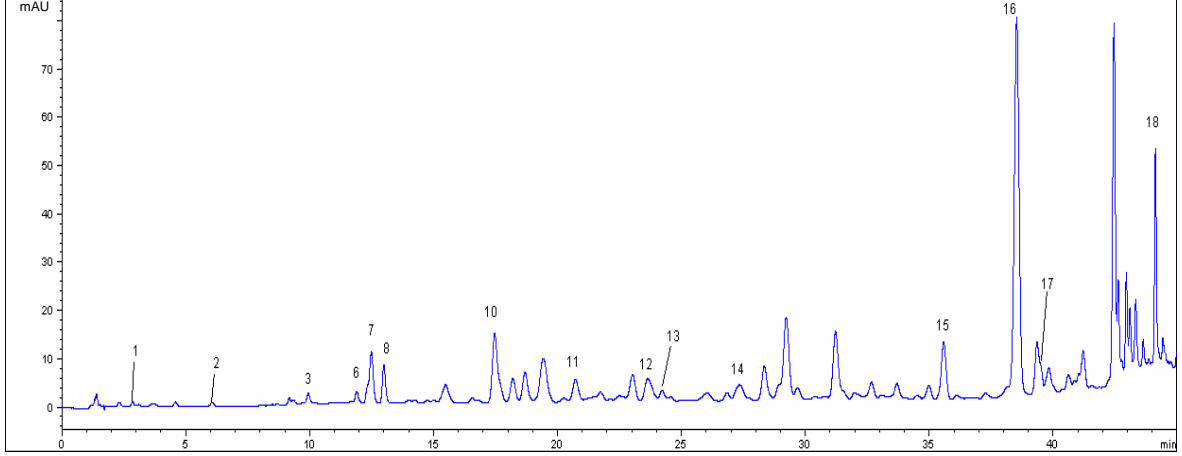
- White, J.W., 2003. Honey, in *The Hive and The Honey Bee*, Eds. Graham, J.M., Dadant and Sons. Inc., Ohio, 869-918 s.
- Winston, G. W., 1991. Oxidant and Antioxidants, in *Aquatic Animals*, Comp. Biochem. Phys., 100, 173-176.
- Wollgast, J. ve Anklam, E., 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. Int., 33, 423-347.
- Wu, Q., Wang, M. ve Simon J. E., 2004. Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, Journal of Chromatography B, 812, 325-355.
- Yang, H., Zhou, W., Guo, X., Chen, F, Zhao, H., Lin, L. ve Wang, X., 2009. Molecularly Imprinted Polymer as SPE Sorbent for Selective Extraction of Melamine in Dairy Products, Talanta, 80,2, 821-825.
- Yao L., Datta N., Tomás-Barberán F. A., Ferreres F., Martos I. ve Singanusong R., 2003. Flavonoids, Phenolic Acids and Abscisic Acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* Honeys, Food Chemistry, 81,2, 159-168.
- Yao, L., Jiang, Y., Darcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N. ve Raymont, K., 2004. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys, J. Agric. Food Chem., 52,2, 210–214.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N. ve Raymont, K., 2004. Phenolic Acids and Abscisic Acid in Australian Eucalyptus Honeys and Their Potential for Floral Authentication , Food Chemistry, 86, 169.
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., ve Raymont, K., 2005. Phenolic Acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* Honeys and Their Potential for Floral Authentication, Food Res. Int., 38,6, 651-658.
- Yavuz, O. ve Aksoy, A., 2006. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu, F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi, 20,3, 259-269.
- Yıldız, A., Genç, Ö., 1993. Enstrümenal Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, ISBN : 975-491-028-6, Ankara, 421-438 s.
- Yıldız, L., 2007. Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Zalibera, M., Stasko, A., Sleboğova, A., Jancovicova, V., Cermakova, T. ve Brezova, V., 2008. Antioxidant and Radical-Scavenging Activities of Slovak Honeys-An Electron Paramagnetic Resonance Study, Food Chemistry, 110, 512–521.

Zhu, R., Zhao, W., Zhai, M., Wei, F., Cai, Z., Sheng, N. ve Hu, Q., 2010. Molecularly Imprinted Layer-Coated Silica Nanoparticles for Selective Solid-Phase Extraction of Bisphenol A from Chemical Cleansing and Cosmetics Samples, Analytica Chimica Acta, 658,2, 209-216.

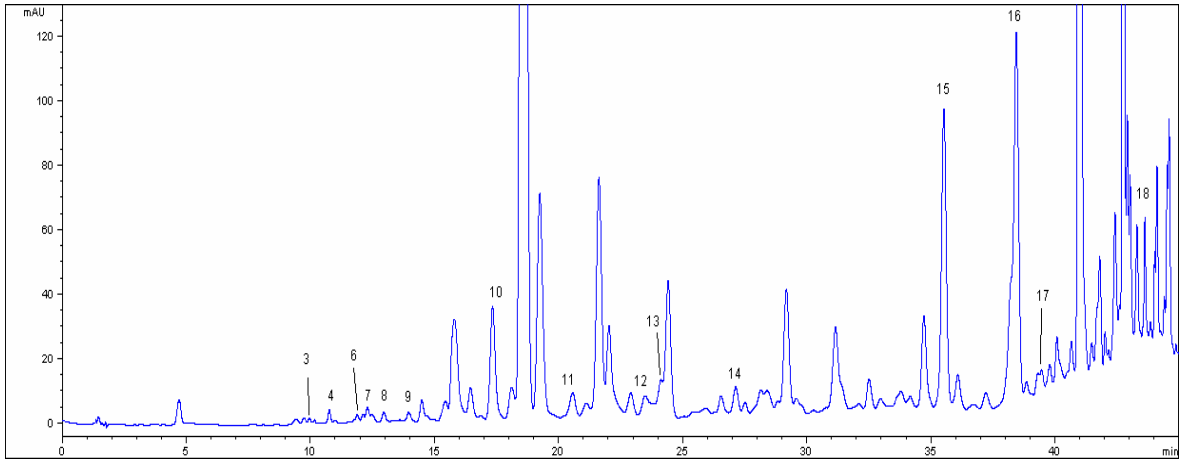
Zief, M., 2005. Solid Phase Extraction for Sample Preparation, Phillipsburg: JT Baker.



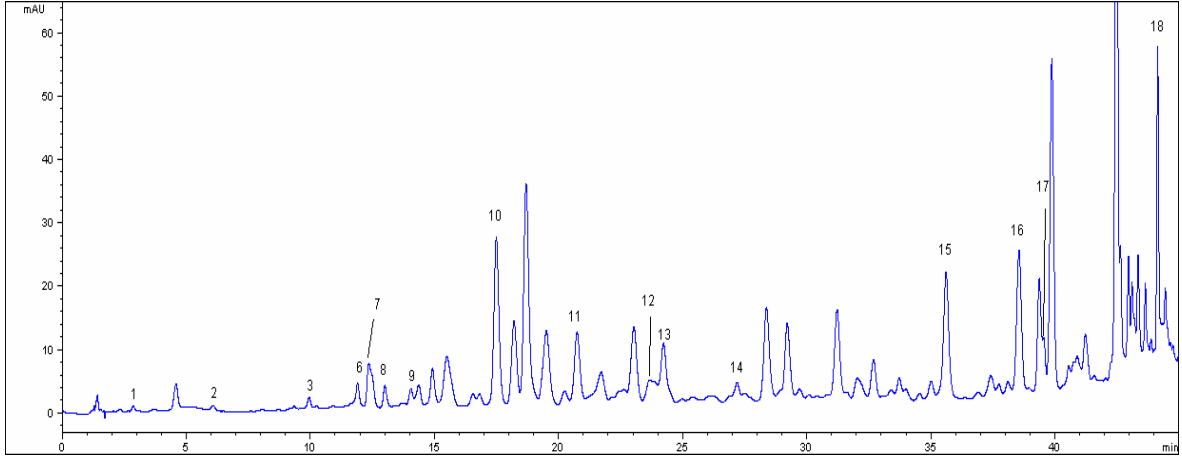
## 7. EKLER



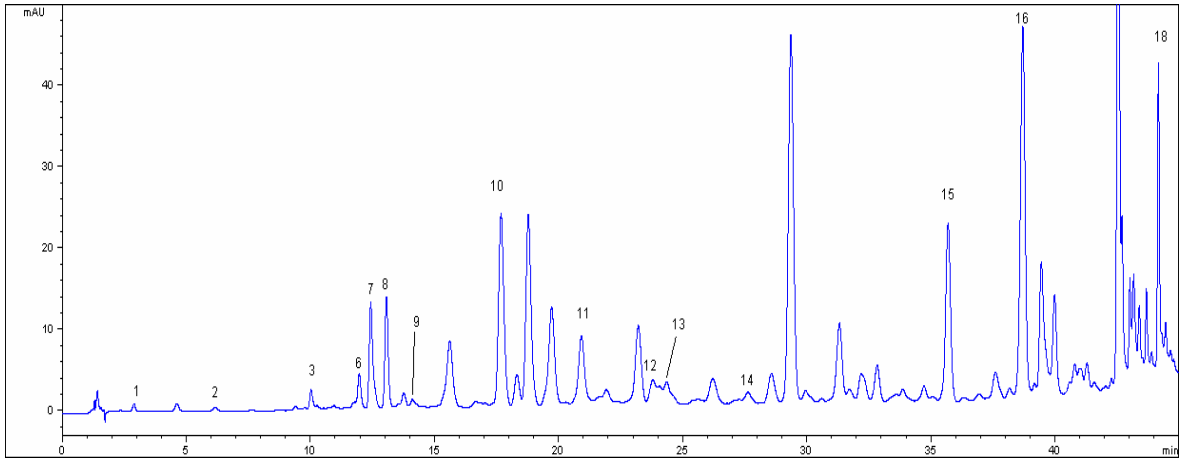
Ek Şekil 1. B1 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



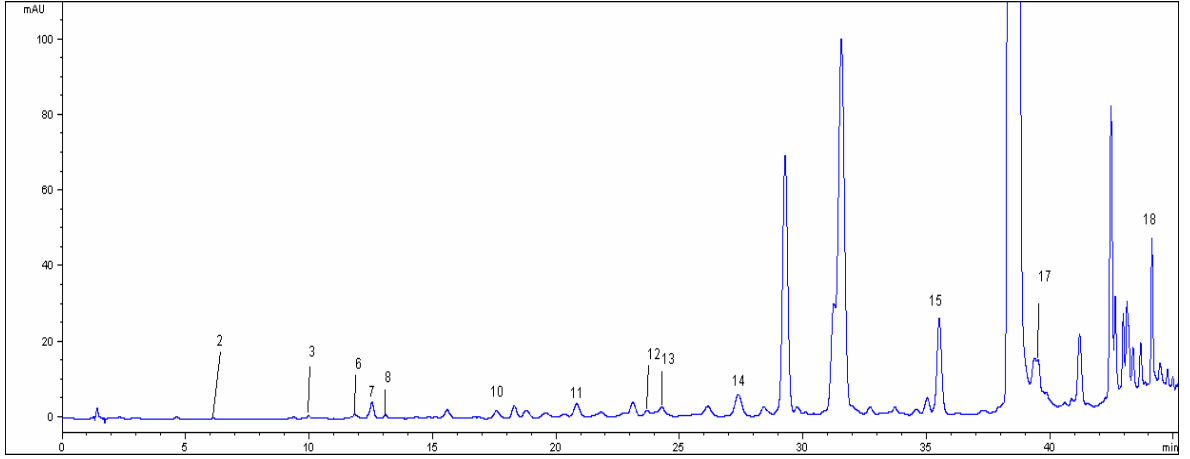
Ek Şekil 2. B2 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (3) *p*-OH benzoik asit, (4) kateşin, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



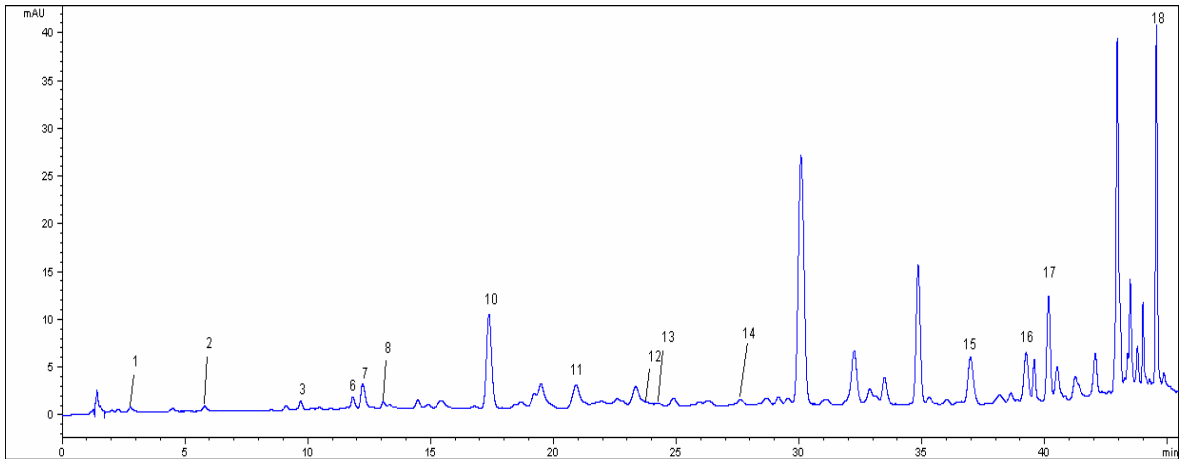
Ek Şekil 3. B3 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



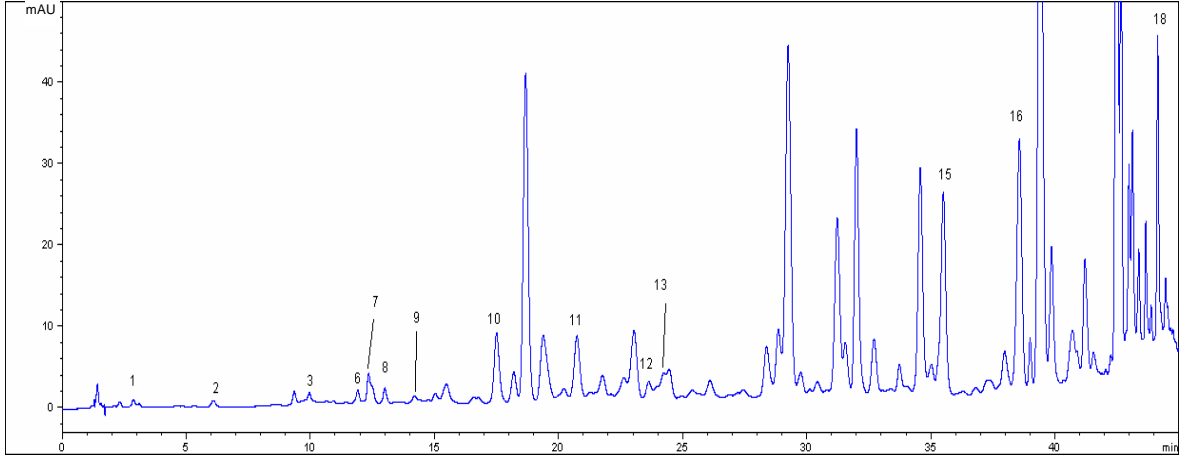
Ek Şekil 4. B4 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit ve (18) propil paraben.



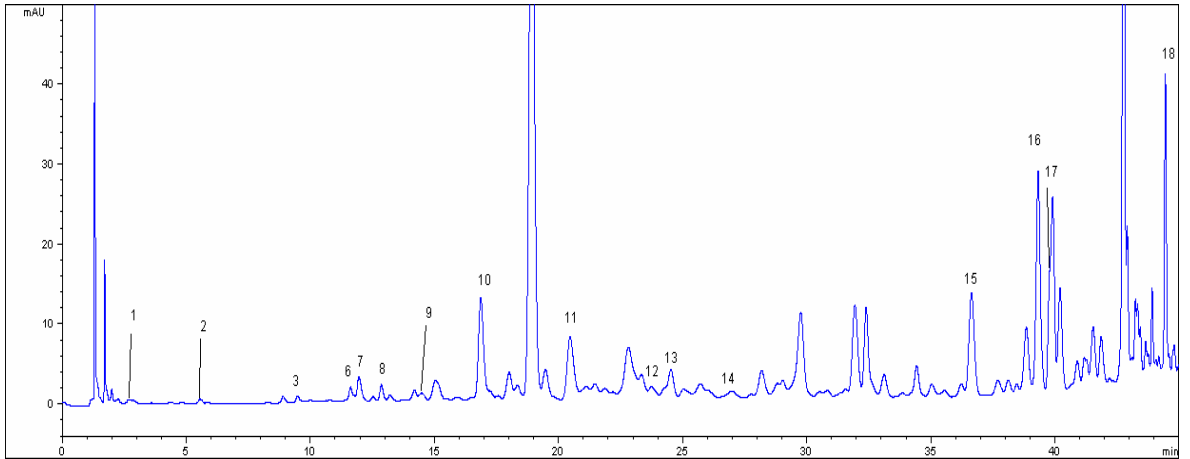
Ek Şekil 5. B5 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis, trans*-absisik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



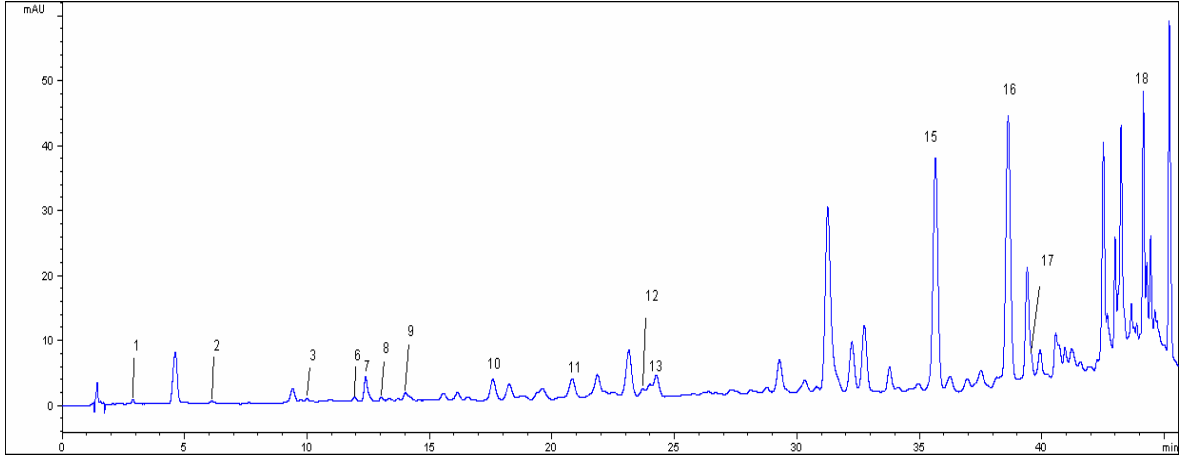
Ek Şekil 6. B6 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis, trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



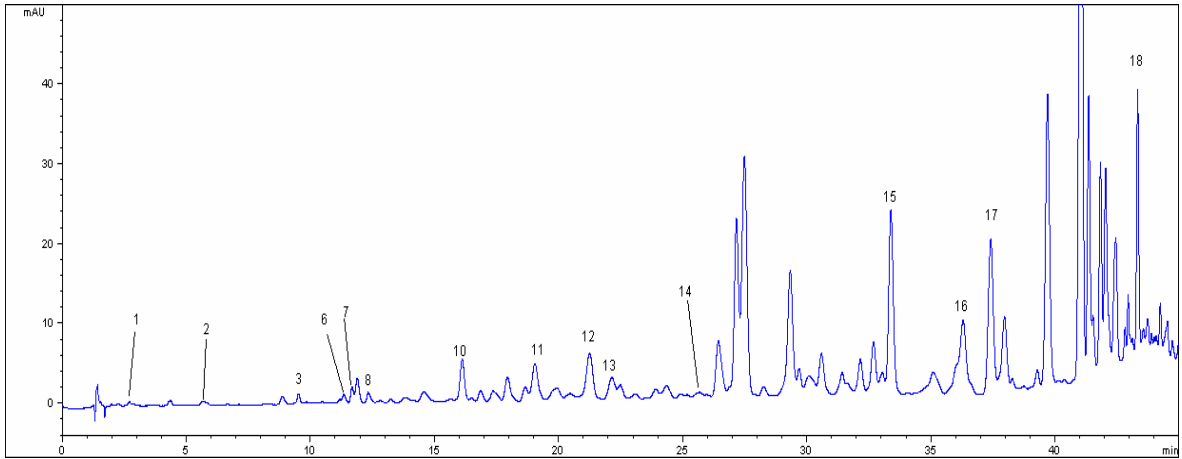
Ek Şekil 7. B7 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit ve (18) propil paraben.



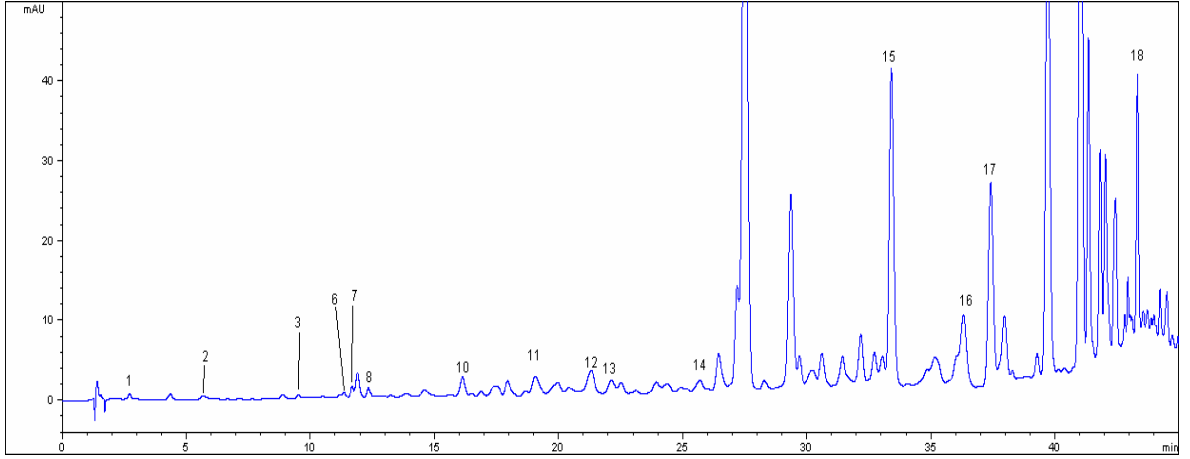
Ek Şekil 8. B8 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



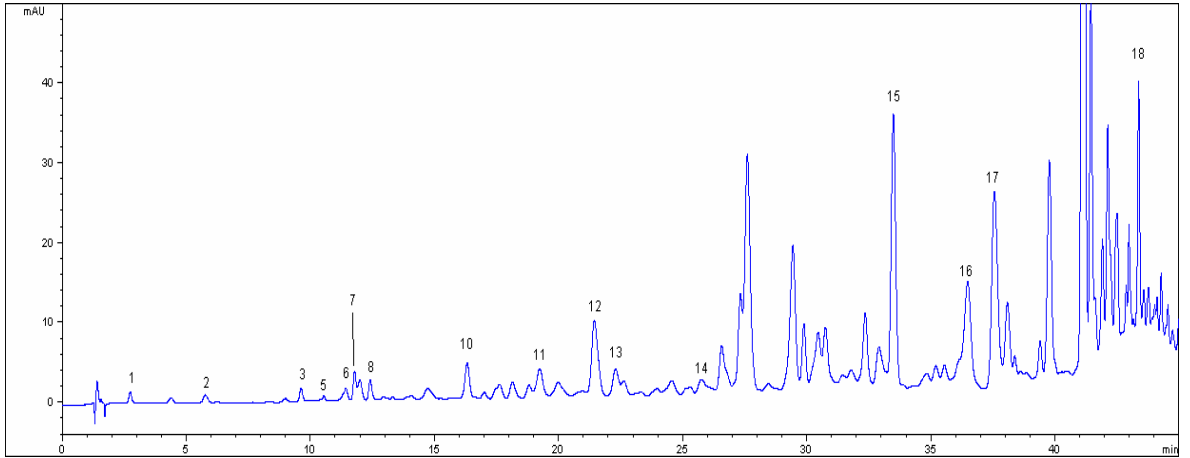
Ek Şekil 9. B9 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



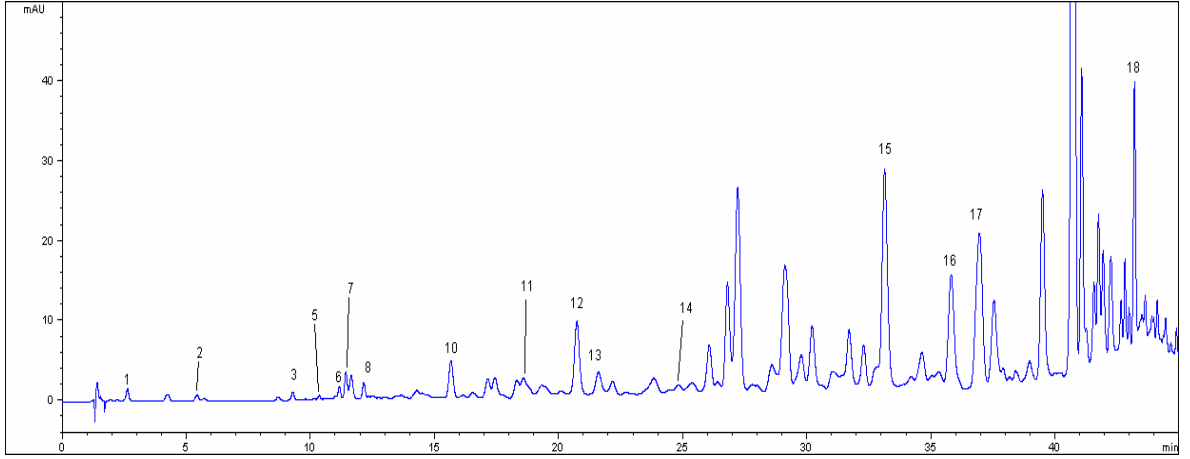
Ek Şekil 10. B10 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



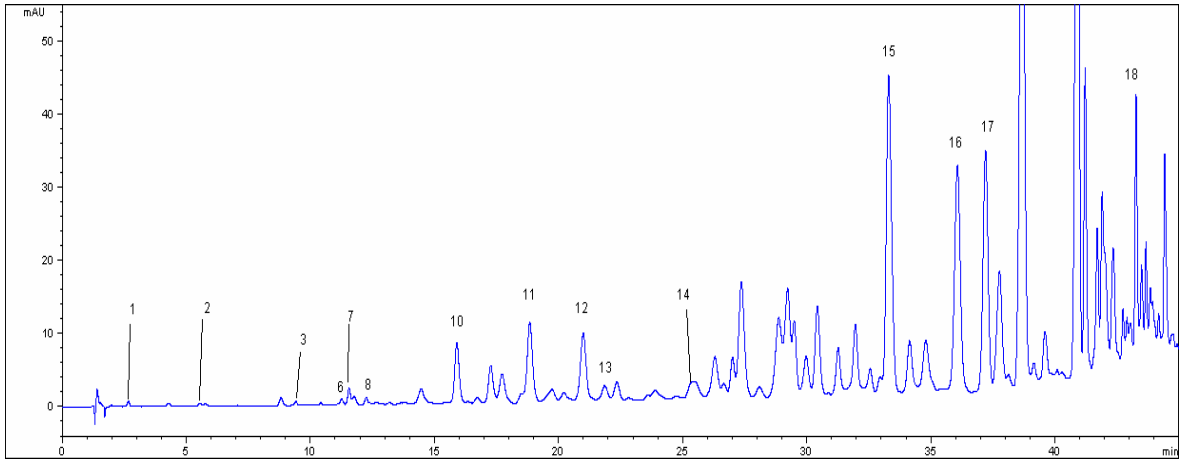
Ek Şekil 11. B11 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



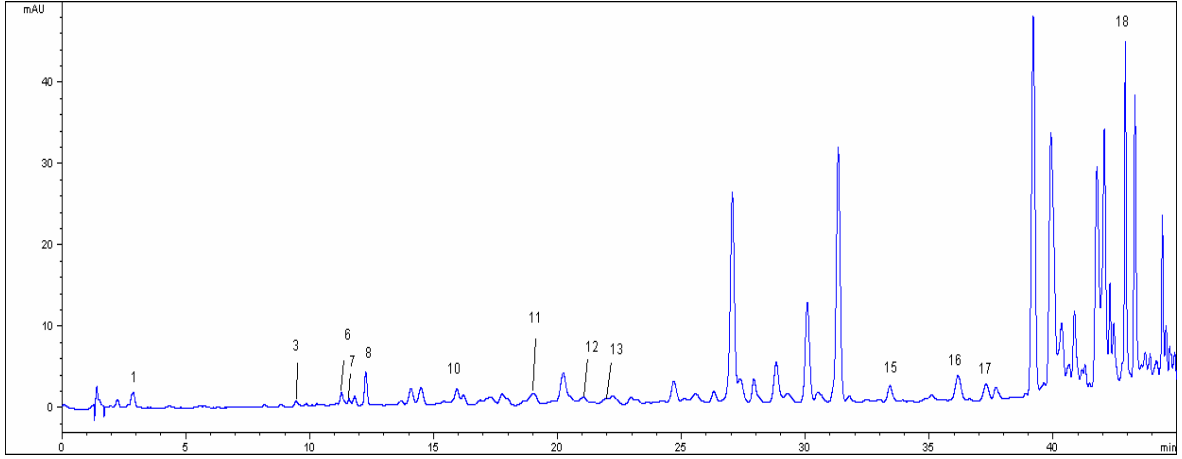
Ek Şekil 12. B12 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



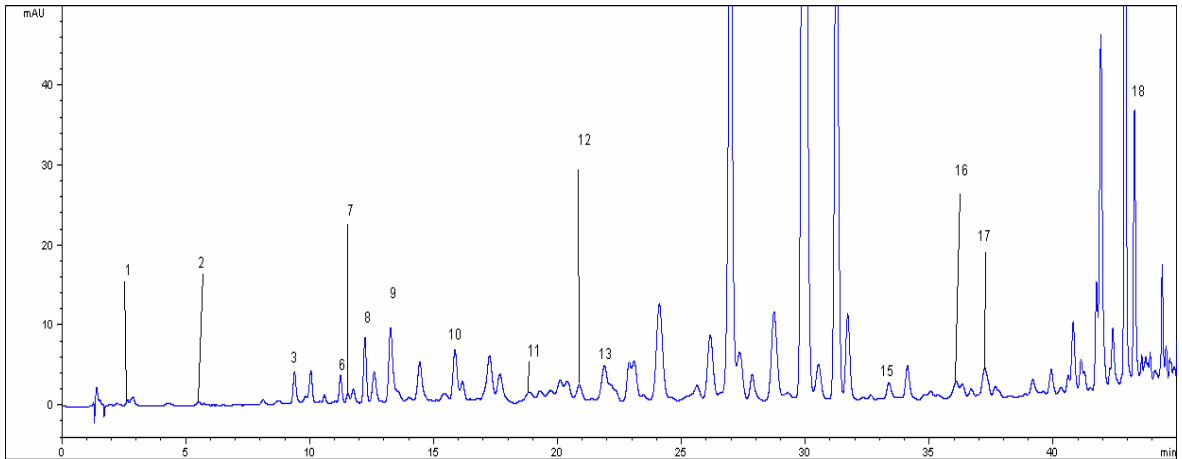
Ek Şekil 13. B13 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



Ek Şekil 14. B14 balının HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.

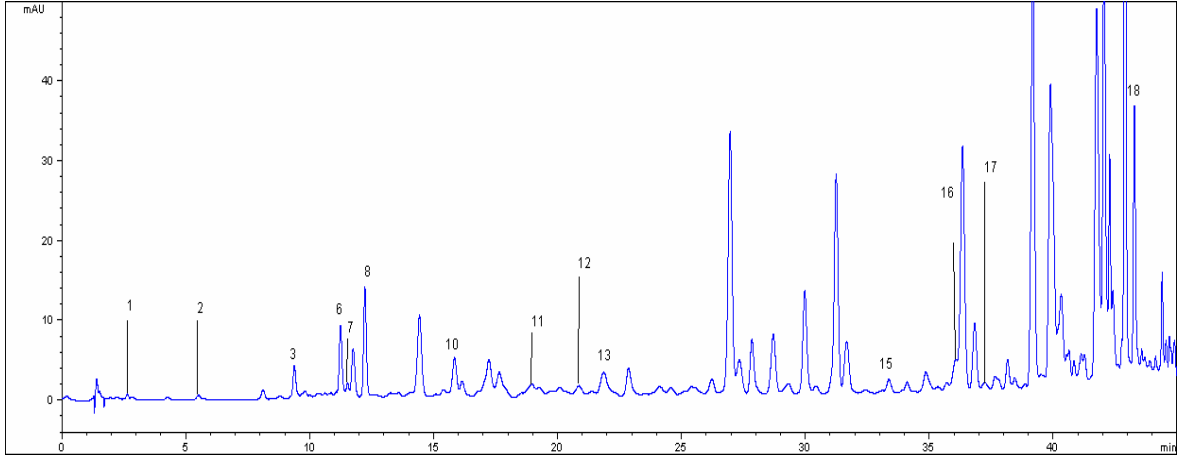


Ek Şekil 15. P1 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.

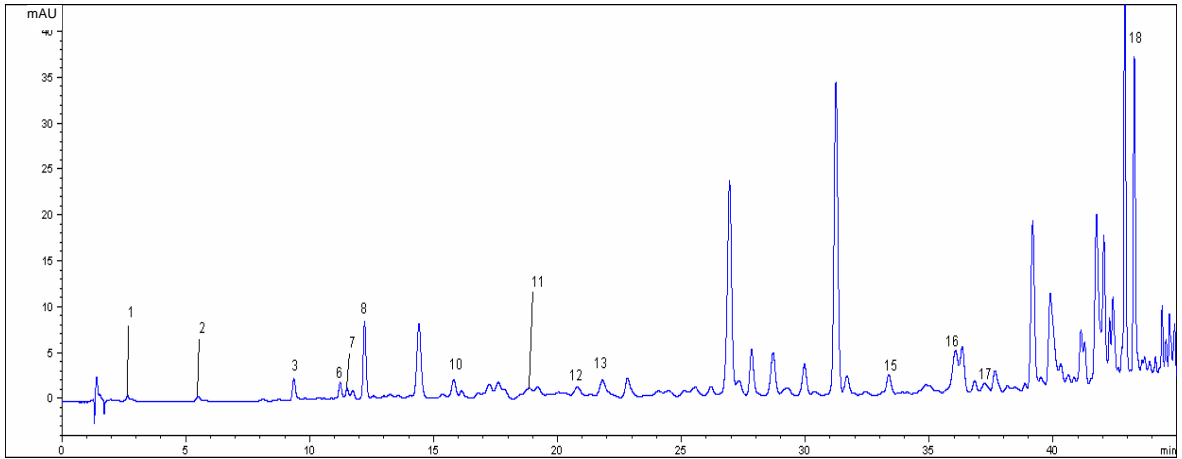


Ek Şekil 16. P2 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.

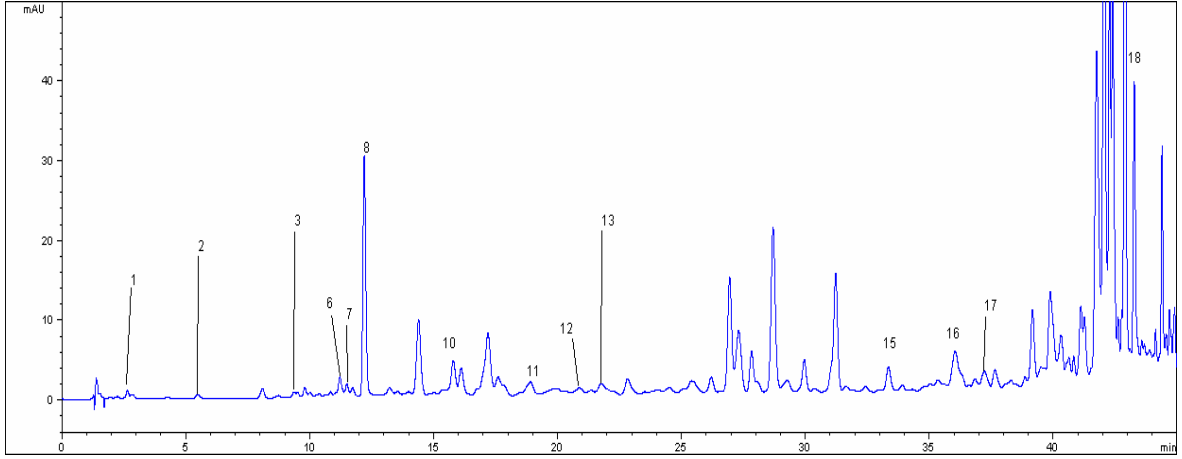




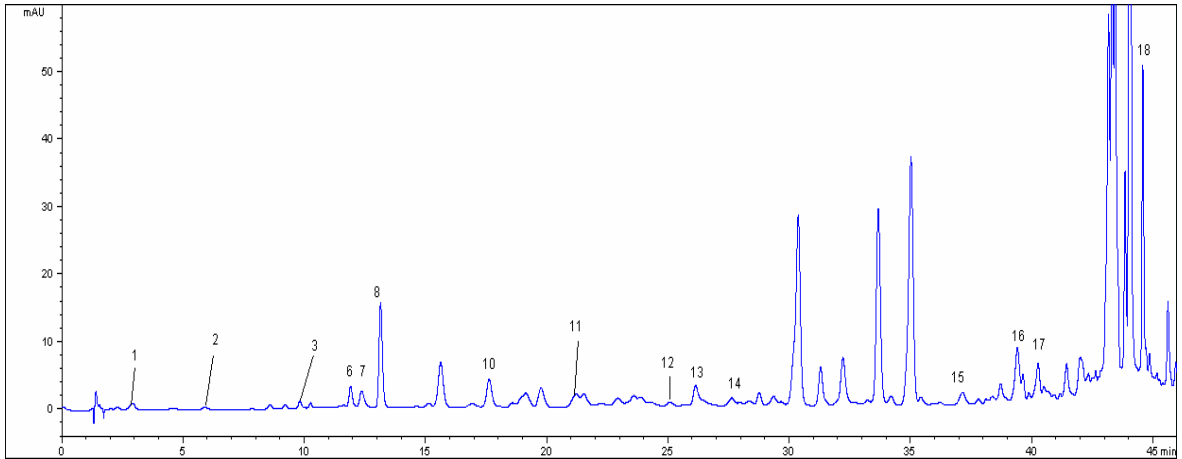
Ek Şekil 17. P3 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



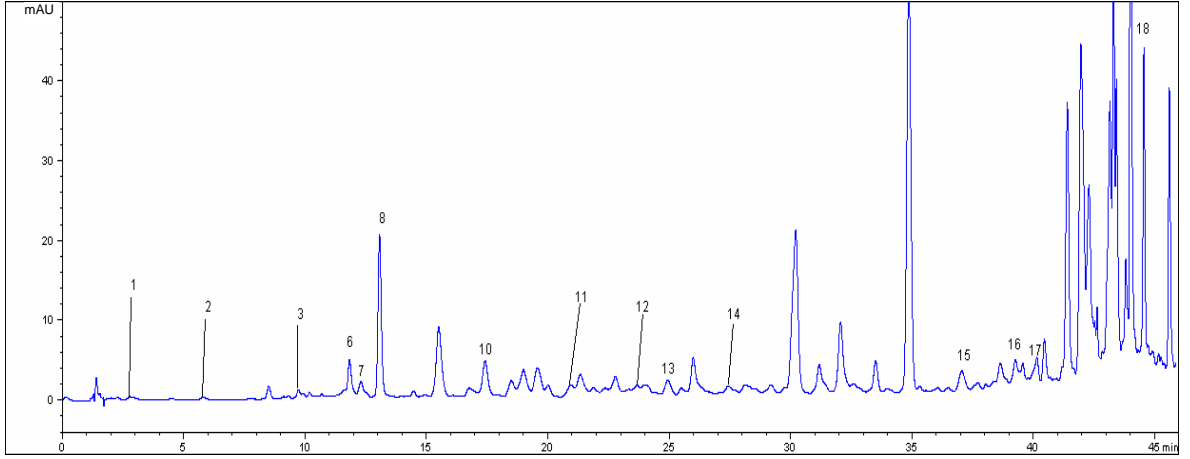
Ek Şekil 18. P4 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



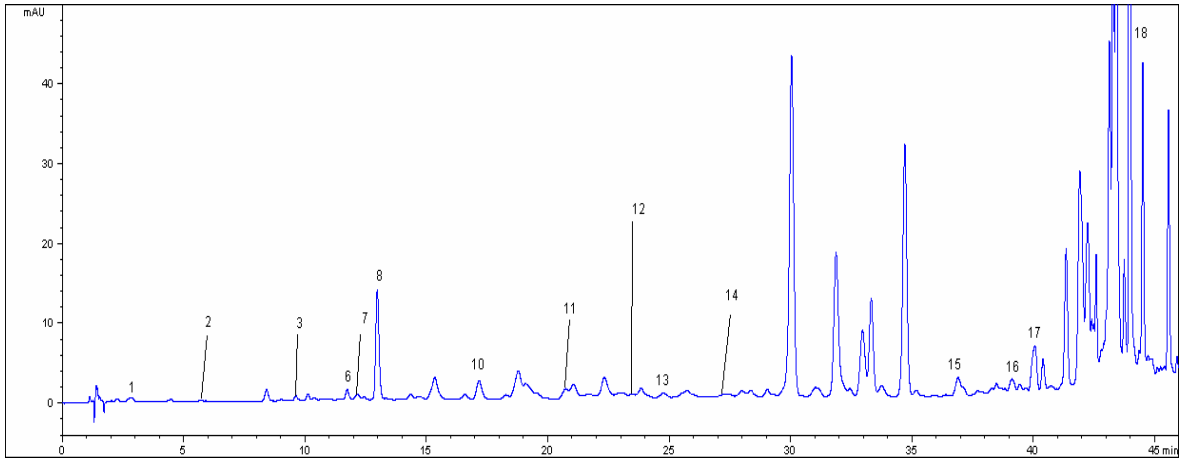
Ek Şekil 19. P5 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



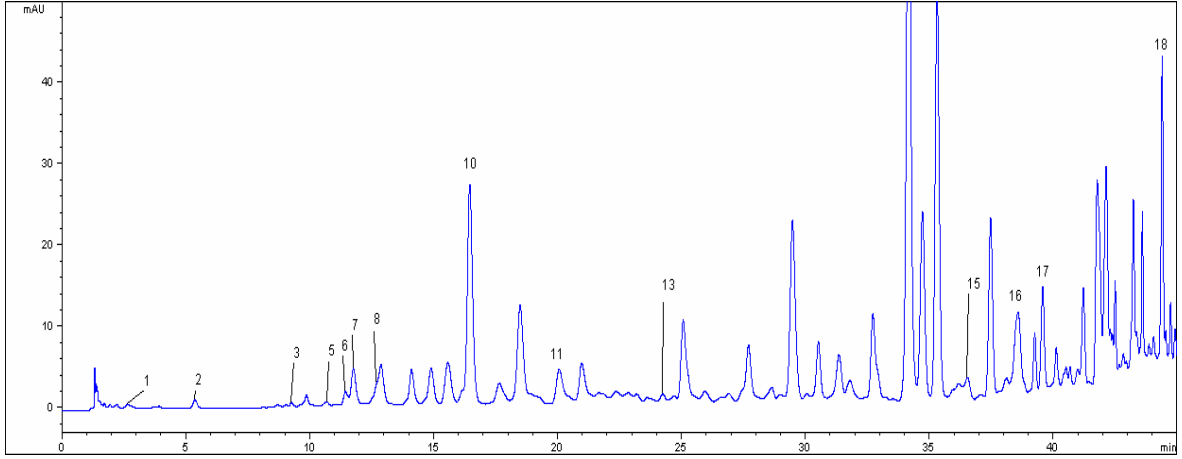
Ek Şekil 20. P6 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



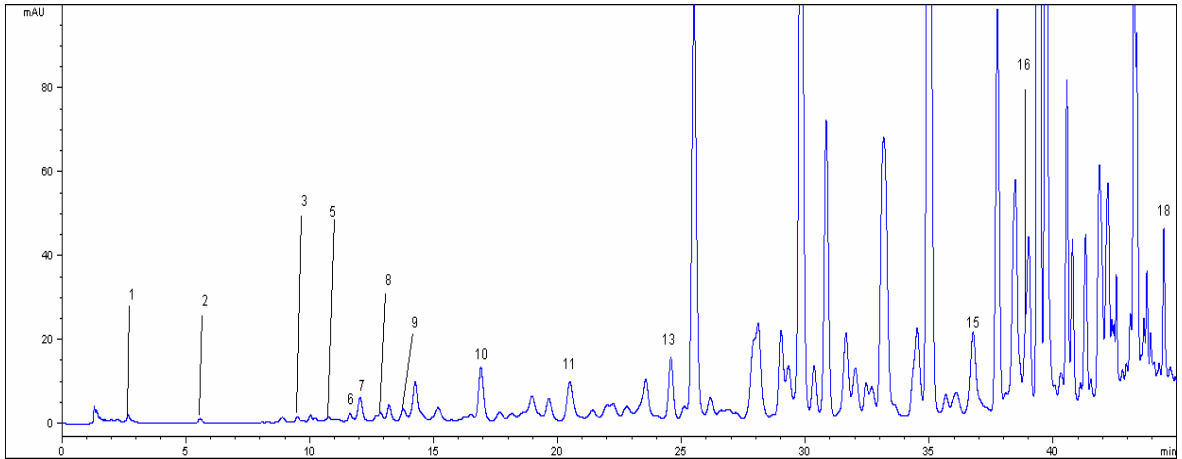
Ek Şekil 21. P7 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



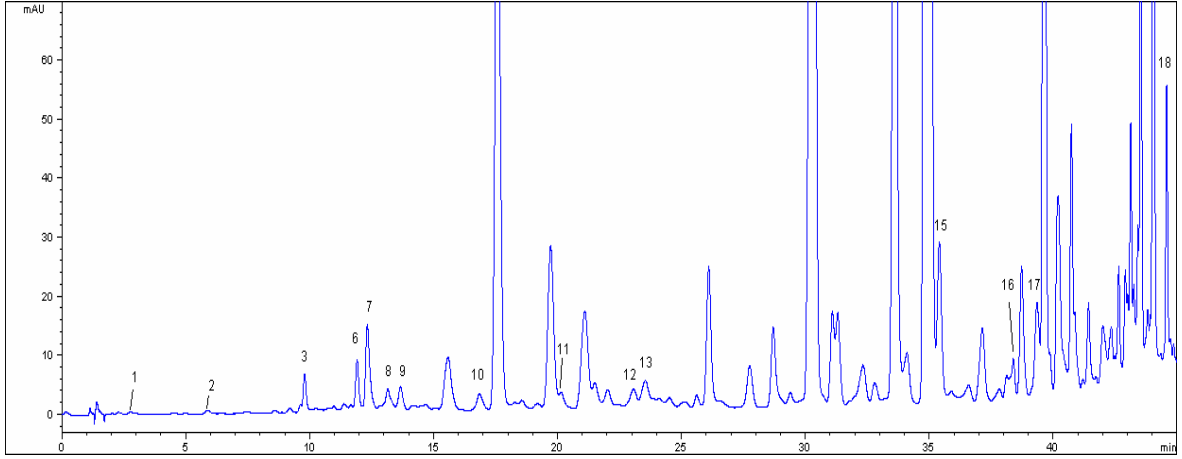
Ek Şekil 22. P8 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



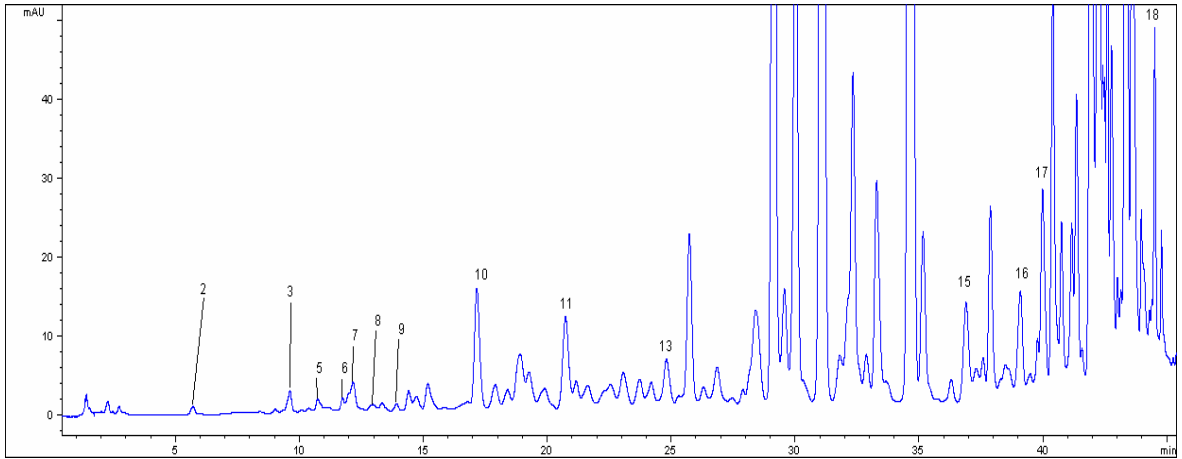
Ek Şekil 23. P9 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



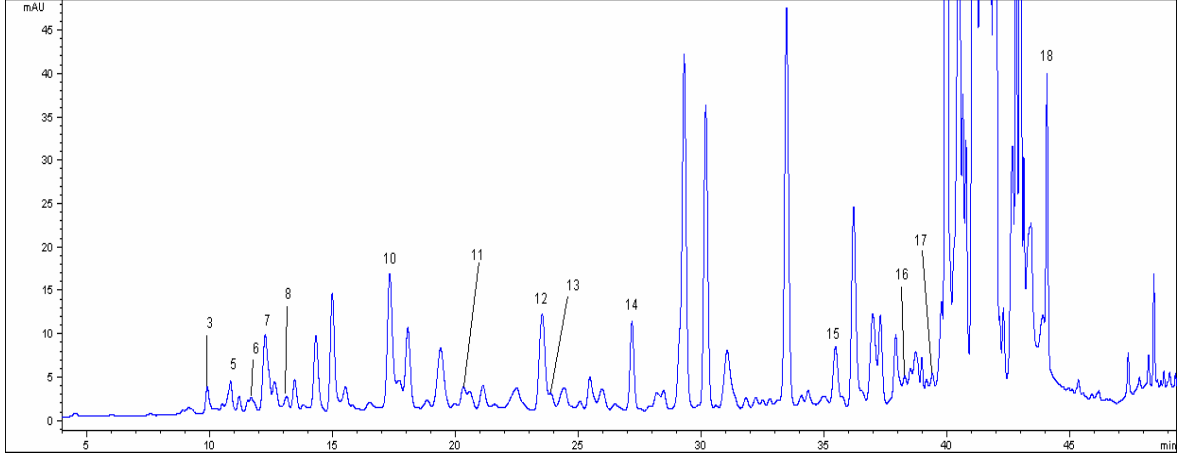
Ek Şekil 24. P10 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit ve (18) propil paraben.



Ek Şekil 25. P11 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



Ek Şekil 26. P12 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (2) protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (9) epikateşin, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (13) rutin, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.



Ek Şekil 27. P13 polenin HPLC kromatogramı (280 nm): (3) *p*-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanillik asit, (7) kafeik asit, (8) şiringik asit, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) benzoik asit, (13) rutin, (14) *o*-kumarik asit, (15) *cis*, *trans*-absisik asit, (16) *trans*-sinnamik asit, (17) kuersetin ve (18) propil paraben.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini burada tamamladı. 1996-1997 Eğitim-Öğretim yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girdi. 2001 yılının Ağustos ayında bu bölümden "Gıda Mühendisi" ünvanı ile mezun oldu. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programı'na başladı. Aynı yıl Kimya bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılının Şubat ayında Yüksek Lisansı bitirdi ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir. Evli ve iki çocuk annesidir.