

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**AZERBAJCAN YÖRESİNE AİT PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN**  
**ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Menşure MADEN ÇALIŞKOL**

**MAYIS 2013**  
**TRABZON**

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**AZERBAIJAN YÖRESİNE AİT PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN**  
**ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Menşure MADEN ÇALIŞKOL**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.05.2013**  
**Tezin Savunma Tarihi : 29.05.2013**

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

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Kimya Anabilim Dalında**  
**Menşure MADEN ÇALIŞKOL tarafından hazırlanan**

**AZERBAYCAN YÖRESİNE AİT PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN**  
**ANTIÖKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

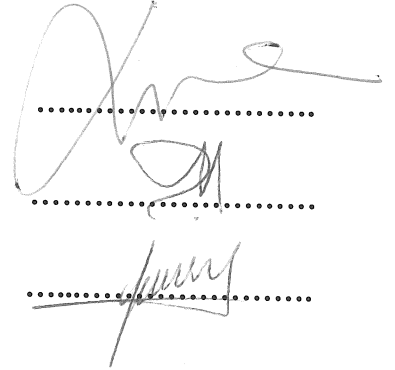
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 14.05.2013 gün ve 1505/01 sayılı**  
**kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Üye : Doç.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU**

**Üye : Yrd.Doç.Dr.Fatma YAYLACI KARAHALİL**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Azerbaycan Yöresine Ait Propolis Örneklerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya çok teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar uygulamalarında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN'e, Zehra CAN'a, Dr. Oktay YILDIZ'a ve diğer bütün biyokimya anabilim dalındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım propolis örneklerinin toplanmasında emeği geçen sayın Doç. Dr. Alsever ASADOV'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamda her türlü manevi desteğini gördüğüm eşim Mustafa ÇALIŞKOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Menşure MADEN ÇALIŞKOL  
Trabzon, 2013

## **TEZ BEYANNAMESİ**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Azerbaycan Yöresine Ait Propolis Örneklerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01/05/2013

Menşure MADEN ÇALIŞKOL

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	2
1.2.1. Propolisin Biyo-Aktif Özellikleri ve Kullanıldığı Yerler.....	3
1.3. Biyolojik Aktiflik veya Biyo-Aktivite Nedir?.....	4
1.4. Doğal Ürünlerde Bulunan Biyolojik Aktif Moleküller .....	5
1.4.1. Polifenoller .....	5
1.5. Oksidasyon ve Antioksidanlar .....	7
1.6. Antioksidan Aktivite Tayini .....	12
1.6.1. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler.....	14
1.6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TP) .....	14
1.6.1.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP).....	15
1.6.1.3. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi .....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	18
2.2. Numunelerin Toplanması ve Ham Ekstraktların Hazırlanması.....	19
2.3. Toplam Polifenol Tayini.....	19
2.4. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (FRAP) Tayini.....	20
2.5. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi.....	21
2.5.1. SC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması .....	22
2.6. İstatistiksel Analiz.....	22
3. BULGULAR.....	23
3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarları Ölçüm Bulguları .....	23

3.2.	Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP) Bulguları .....	25
3.3.	DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Testi Bulguları.....	27
3.3.1.	DPPH Aktivitesi İçin SC <sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması.....	28
3.4.	Antioksidan Testler Arasındaki Korelasyonlar .....	29
4.	TARTIŞMA.....	31
5.	SONUÇLAR.....	35
6.	ÖNERİLER.....	36
7.	KAYNAKLAR.....	37
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

AZERBAYCAN YÖRESİNE AİT PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN ANTIOKSİDAN  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Menşure MADEN ÇALIŞKOL

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

2013, 41 Sayfa

Propolis önemli bir doğal ürün olup arı kovanlarının korunmasında kullanılır. Bileşimi ve biyolojik aktif özellikleri oldukça değişken olup pek çok faktöre bağlıdır. Bu çalışmada ilk kez, Azerbaycan yöresine ait propolis örneklerinin antioksidan özellikleri incelendi. Azerbaycan'ın 15 değişik bölgesinden; Aktaş (1), Zerdap (1), İsmayilli (2), Astara (1), Şemkır (1), Qax (1), Nahçıvan (2), Mingeçevir (1), Şeki (1), Qusar(1) ve Quba (3) örnekler toplandı. Etanolik propolis ekstraktlarının antioksidan özellikleri toplam fenolik madde, demir (II) indirgeme/antioksidan kapasite (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme testleri kullanılarak tayin edildi. Toplam fenolik madde miktarları 10,94-79,23 mg GAE/g arasında bulundu. FRAP testi doğal örneklerin toplam antioksidan kapasitesini gösteren bir test olup 170- 438 µM Trolox/g propolis arasında bir dağılım gösterdi. Tüm örneklerin DPPH radikalini temizleme yeteneğine sahip olduğu ve SC<sub>50</sub> değerlerinin 18-128 µg/mL arasında değişim gösterdiği bulundu. Ayrıca toplam polifenolik madde miktarı ile FRAP ve DPPH radikal temizleme kapasitesi arasında güçlü bir korelasyon ( $R^2:0,980$  ve  $R^2: -0,792$ ;  $p<0,05$ ) olduğu bulundu. Sonuç olarak, çalışılan 15 adet propolis örneğinden İsmayilli, Zerdap ve Qax bölgelerine ait örneklerin antioksidan aktivite yönünden daha yüksek olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Propolis, Azerbaycan.



Master Thesis

SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF PROPOLIS OF DIFFERENT AREAS FROM  
AZERBAIJAN

Menşure MADEN ÇALIŞKOL

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI  
2013, 41 Pages

Propolis is an important natural product, was used beehive protection. Its composition and biological activities is highly variable depends on many factors. In this study, antioxidant properties were studied for the first time in Azerbaijan propolis. Fifteen samples were collected from different areas of Azerbaijan; Aktaş (1), Zerdap(1), İsmayilli (2), Astara (1), Şemkir (1), Qax (1), Nahçıvan (2), Mingeçevir (1), Şeki (1), Qusar(1) and Quba (3). Antioxidant activities of the samples were determined by three different antioxidant methods, namely total phenolic contents, ferric reducing/antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in the ethanolic extracts. Total phenolic content was found between 10.94-79.23 mg GAE/g propolis. Ferric reducing antioxidant power was also reflects antioxidant capacity of natural samples, and FRAP values was changed between 170- 438  $\mu$ M Trolox/g propolis. All samples showed DPPH radical scavenging activities, and the  $SC_{50}$  values changed between 18-128  $\mu$ g/mL. The antioxidant activities were also found to be related to the samples concentration. We have also a high correlation between the phenolic contents and FRAP and DPPH values ( $R^2$ : 0,980 and  $R^2$ : -0.792,  $p < 0.05$ ). Among the fifteen propolis samples investigated here, İsmayilli, Zerdap and Qax region of propolis samples were showed higher antioxidant capacity compared to the other region of Azerbaijan.

**Key Words:** Antioxidant, Propolis, Azerbaijan.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Propolis.....	3
Şekil 2. Fenolik asitler .....	6
Şekil 3. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituenleri (b).....	7
Şekil 4. Bazı flavonoidlerin yapıları.....	7
Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması.....	9
Şekil 6. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu .....	16
Şekil 7. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının indirgenmesi.....	17
Şekil 8. Gallik asit .....	20
Şekil 9. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	23
Şekil 10. Azerbaycan bölgesi propolislerinin toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması .....	24
Şekil 11. FRAP testi için Troloks® standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma eğrisi.....	26
Şekil 12. Azerbaycan bölgesi propolislerinin FRAP antioksidan değerlerinin karşılaştırılması .....	26
Şekil 13. Azerbaycan bölgesi propolislerinin DPPH radikal temizleme aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması .....	27
Şekil 14. DPPH radikalının SC <sub>50</sub> değerlerinin bulunması-1 .....	28
Şekil 15. DPPH radikalının SC <sub>50</sub> değerlerinin bulunması-2 .....	29

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1.	Çalışmada kullanılan reaktifler ve hazırlanma prosedürü ..... 18
Tablo 2.	Propolis örneklerinin toplandığı bölgeler ..... 19
Tablo 3.	Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler ..... 20
Tablo 4.	FRAP yöntemi için yapılan pipetlemeler ..... 21
Tablo 5.	DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler ..... 21
Tablo 6.	Azerbaycan'ın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri (Ort±SD) ..... 24
Tablo 7.	Antioksidan parametreler arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson test sonuçları ..... 30

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Başta kanser olmak üzere çeşitli enfeksiyonların, kalp damar hastalıklarının giderek yaygınlaşması, pek çok türden çevre kirliliği ile çeşitli ilaç ve sentetik ürünlerin yaygın olarak kullanımlarına bağlanmaktadır. Günümüzde cevap aranılan en önemli sorulardan birisi, insanın daha sağlıklı yaşaması için daha sağlıklı ürünlere nasıl ulaşabileceğidir. Çeşitli sentetik ilaçların hastalıkları tedavi etmeleri yanında pek çok yan etkileri bulunduğundan doğal yollarla yapılan tedaviler bu bakımdan daha ön plana çıkmaktadır.

Bu amaçla doğal ürünlerin kullanımı ile gelişen fito-terapi, etno-terapi ve api-terapi gibi temel bilim dallarının amacı doğal ürünlerin hastalıklardan korunmada ve hastalıkları tedavi etmedeki rollerinin ortaya çıkartılması yararlı ve zararlı özelliklerin aydınlatılmasıdır. Bu bakımda bitkisel ürünleri ve arı ürünleri ile tedavi yöntemleri özellikle son 10-15 yıldır biyokimyacıların, eczacıların, farmakologların, herbalistlerin ve klinikçilerin ilgisini çekmektedir ve her geçen gün yeni bir doğal ürünün faydalı bir özelliği ortaya çıkartılmaktadır.

Dünyanın en saf ve en doğal ürünlerinden biri olan arı ürünleri; bal, polen, propolis, arı sütünün gıda olarak tüketilmelerinden farklı olarak çeşitli enfeksiyonların ve yaraların tedavisinde yaygın kullanım alanı bulunmaktadır.

Bu doğal arı ürünlerinden özellikle propolis arıların kovanlarını her türlü tehlikeye karşı korumak maksadıyla doğal ortamlardan topladıkları reçinemi maddelerden oluşan oldukça kompleks bir üründür.

Diğer arı ürünlerinde olduğu gibi propolisin de bileşimi ve biyolojik olarak etkinliği toplandığı bölgenin coğrafik özelliğine, botanik özelliğine ve toplandığı arının türüne göre değişim göstermektedir.

Çalışmanın amacı Azerbaycan'ın değişik bölgelerinden toplanan çeşitli propolis örneklerinin antioksidan özelliklerini ortaya çıkarmak ve aralarında farklılık olup olmadıklarını belirlemek ve literatürdeki propolis çalışmalarıyla karşılaştırmaktır.

## 1.2. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Propolis bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından bitkisel kaynaklarından toplanmış reçinemsî bir karışım olup tam olarak bileşimini belirlemek oldukça zordur ve toplandığı kaynağa bağlı olarak da değişim gösterir. Bir genelleme yapılacak olursa propolis yaklaşık olarak % 45-50 reçine ve bitki balsamı, %20-25 balmumu, % 10 uçucu yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik bileşiklerden oluşur. Bileşimindeki organik bileşiklerin ise büyük çoğunluğu bitkiler tarafından üretilen ve fenolik yapıya sahip sekonder metabolitlerden oluşmaktadır (Cisarino, 1987; Ahn vd., 2007).

Propolis'in kimyasal bileşimi gibi fiziksel özellikleri de toplandığı bölgenin coğrafik yapısına, iklimine bağlı değişim gösterir. Genel olarak propolis koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengi ve siyaha doğru değişen renklerde bulunabilir ve yaşı arttıkça rengi de koyulaşmaktadır (Şekil 1). Yaklaşık olarak 60-70 C° arasında erime noktasına sahip olan propolis düşük sıcaklıklarda sert veya donmuş bulunabilir, ayrıca 0 C°'de kırılğan özelliğe sahiptir(Banskota vd., 2001). Çözünürlüğü su ve organik çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek orandadır (Campos, 2003). Son yıllarda propolisin biyo-aktif özelliklerinden daha iyi yararlanabilmek için değişik kritik ekstraksiyon yöntemleri ile sulu çözeltileri elde edilebilmektedir(Pietta vd.,2002).

Pro-polis kelime anlamı olarak eski yunanca da şehrin korunması anlamına gelen bir isim olup arı kovanının her tür tehlikeye karşı korunması anlamında kullanılmaktadır. Propolis, ayrıca "bee glue" yani arı yapışkanı olarak da bilinir ve ilginç olarak arının kimyasal silahı olarak da ele alınmaktadır. Arılar, çeşitli bitki türlerinden ve ağaç kabuklarından topladıkları reçinemsî maddeleri bir takım enzimlerle modifikasyona uğrattıktan sonra propolis oluştururlar. Oluşan yapışkan ve kendine has bir aroması bulunan propolis ise kovan aralarındaki boşlukların kapatılmasında, kovan önünün ve girişinin dezenfeksiyonunda ve kovanın davetsiz misafirlerden (tür böcek ve haşereye karşı) korunmasında ve kovan hijyeninin sağlanmasında kullanılan tek etken doğal karışımdır(Laskar vd., 2010; Ahn, vd., 2007; Sarıkaya vd., 2009).

Kavak, ökaliptus, kestane ve atkestanesi gibi ağaç türlerinden üretilen propolislerin en kaliteli propolis olduğu bildirilmektedir. Ayrıca propolisin toplandığı coğrafyanın bitki örtüsüne bağlı olduğu gibi toplanma tekniği de oldukça önemlidir. Örneğin, propolis tuzakları ile toplanan propolislerin çerçevelerden kazınarak alınan propolislerden daha

kaliteli olduğu, büyük çatlaklardan toplanan propolislerin ise nispeten mum içeriğinin fazla olması nedeniyle kalitesinin daha düşük olduğu bildirilmektedir.



Şekil 1. Propolis

### 1.2.1. Propolisin Biyo-Aktif Özellikleri ve Kullanıldığı Yerler

Propolisin kimyasal bileşiminin zenginliğinden dolayı oldukça geniş spektrumlu biyolojik aktif özelliğe sahip doğal bir karışım olup 300'ün üzerinde bileşiğe sahip olduğu bildirilmektedir (Bankova vd., 2000; Gülçin vd., 2010). Propolis biyolojik aktif özelliği yapısında bulunan çeşitli polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, flavononlar, flavanoller, antosiyaninler, uçucu bileşiklerden ve kafeik asit fenil esterlerinden ileri geldiği ifade edilmektedir (Banskota vd., 2001; Nagaoka vd., 2003; Sarıkaya vd., 2009). Propolisin antioksidan, antibakteriyal, antikanser, antifungal, anti-inflamatuar, antiviral gibi pek çok biyolojik aktif özelliğinin olduğu çok sayıda araştırma makalesinde gösterilmiştir (Laskar vd., 2010; Banskota vd., 2001; Nagaoka vd., 2003; Ahn vd., 2007).

Arı ürünlerinin tıbbi amaçlar için kullanımı insanlık tarihi kadar eski olup eski Mısır, Arap ve Yunan medeniyetlerinde bal, polen ve propolisten faydalandığı arkeolojik kazılarda bildirilmektedir (Abd El Hady ve Hegazi, 2002). Propolisin antibakteriyal ve antioksidan özelliğinden Eski Mısırlılar da ölümlerini mumyalamada kullanıyorlardı. Antikanser, anti-inflamatuar, anti-biotik, antioksidatif, antiviral, antifungal, anestetik ve sitostatik gibi pek çok farmakolojik özellikleri bulunduğu bildirilmektedir (Choi vd., 2006; Marcucci, 1995). Propolis tarafından iyileştirilebilen hastalıklar arasında nefes darlığı, egzema, göz enfeksiyonları, boğaz enfeksiyonları, ülser ve böbrek enfeksiyonları yer alır

(Hill, 1977). %10 oranlarına kadar propolisle karıştırılmış bal içerisinde bulunmaktadır ve propolisin antibiyotik, antifungal, antiviral özelliklerinin olduğu ve bol miktarda flavonoid içerdiği için antioksidan etkisinin baldan ve BHT' den 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir(Russo vd., 2004).

Son yıllarda propolis yüksek biyolojik aktif özelliğinden dolayı sanayicilerin, herbalistlerin ve alternatif tıp ile ilgilenenlerin oldukça fazla ilgisini çekmektedir. Bu nedenle propolisin antibakteriyal etkisinden faydalanmak üzere yara ve yanık kremi üretiminde; ağız ve diş sağlığını korumak amacıyla diş macunu yapımında, ağız gargaralarında, ağız ve boğaz sprelerinde; sakız, şekerleme ve lokum üretiminde; UV ışığa karşı korunmada, güneş kremlerinde ve güzellik maskelerinde; bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde olduğu gibi pek çok biyoaktif özelliğinden dolayı çeşitli doğal el yapımı farmasötiklerin tasarlanmasında gerek karışım ve gerekse de saf propolis drajeleri halinde üretilip tüketime sunulmaktadır.

Ticari olarak bir değere sahip propolisden eczanelerde ve aktarlarda satılan pek çok ürün geliştirilmiştir ve her geçen gün bu artmaktadır. Propolisin ticari değeri onun biyolojik aktif özelliklerine bağlı olarak değişim göstermektedir. Dolayısıyla fenolik madde miktarı biyo-aktif özelliğinin bir markeri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle dünyada çalışılan ve öne çıkan bazı propolis türleri ticari olarak büyük ilgi görmektedir (Moreira vd., 2008).

### **1.3. Biyolojik Aktiftik veya Biyo-Aktivite Nedir?**

Biyolojik aktivite veya biyolojik etkinlik kimyasal ve biyolojik açıdan canlıya zarar veren her tür zararlı etkiyi yavaşlatan, engelleyen veya tamamen ortada kaldıran iş veya fonksiyondur. Bu zararlı etki bir oksidasyon reaksiyonu olabildiği gibi bakterilerin, virüslerin veya böceklerin neden olduğu her çeşit zararlı etkide olabilir. Kısaca bir zararlı reaksiyonu veya organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren, onu zararsızlaştıran veya yok edici etkilerin hepsine biyolojik etkinlik (aktivite) adı verilir. Bu etki *in vivo* ve *in vitro* olarak test edilebilir. *In vitro* çalışma laboratuvar ortamında canlı organizma kullanılmaksızın yapılan her tür deneysel araştırmalar olup antioksidan testlerin büyük bir çoğunluğu bu şekilde ölçülür. *In vivo* çalışmalar ise doğrudan canlı üzerinde yapılan çalışmalar olup bakterilerden deney hayvanlarına (sıçanlar, tavşanlar), böcek ve haşerelere ve insan organizmasına kadar yapılan testlerin tümünü kapsar. En doğru çalışma yöntemi

*in vivo* çalışmalar olup fakat bu çalışmalar oldukça sorumluluk gerektiren ve mutlaka etik kurul onayı gerektiren çalışmalar olup denemeler önce *in vitro* olarak yürütülür ve olumlu sonuç alınması halinde daha sonra *in vivo* çalışmalar yapılır.

Biyolojik etki gösteren maddelere biyolojik aktif maddeler adı verilir. Biyokimyasal araştırmalarda daha çok incelenen biyolojik etkinlik testleri; antioksidan aktivite (anti-ageing), serbest radikal giderici aktivite, anti-tümoral, anti-kanserojen, anti-fungal, anti-bakteriyal, anti-viral, anti-inflamatuar, anti-herbisit ve anti-inektisit etkiler vs. dir.

Bitkiler diğer organizmalardan farklı olarak sınırsız sayıda aromatik veya alifatik bileşik üretebilme kabiliyetine sahip organizmalar olup biyolojik aktif maddeler bakımından çok zenginlerdir. Bitkiler tarafından sentezlenen fenolik bileşiklerden başka biyoaktif özellik gösteren glikozitler, steroidler, organik asitler, tanenler, alkaloidler, sabit yağlar, uçucu yağlar, reçineli bileşikler, vitaminler ve antibiyotikler bulunmaktadır (Peterson ve Dwyer, 1998; Havsteen, 2002).

Bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen fenolik yapıya sahip polifenoller ve onların çeşitli ester ve glikozit türevleri ile çeşitli vitaminler birer sekonder metabolit olarak adlandırılırlar. Bunlar bitkiyi oksidatif strese, bakterilere, virüslere, böcek ve tarla zararlılarına, iklimsel ve çevresel farklılıklara vs gibi her tür zararlı etkiye karşı korumaktan sorumlu ajanlardır.

## **1.4. Doğal Ürünlerde Bulunan Biyolojik Aktif Moleküller**

### **1.4.1. Polifenoller**

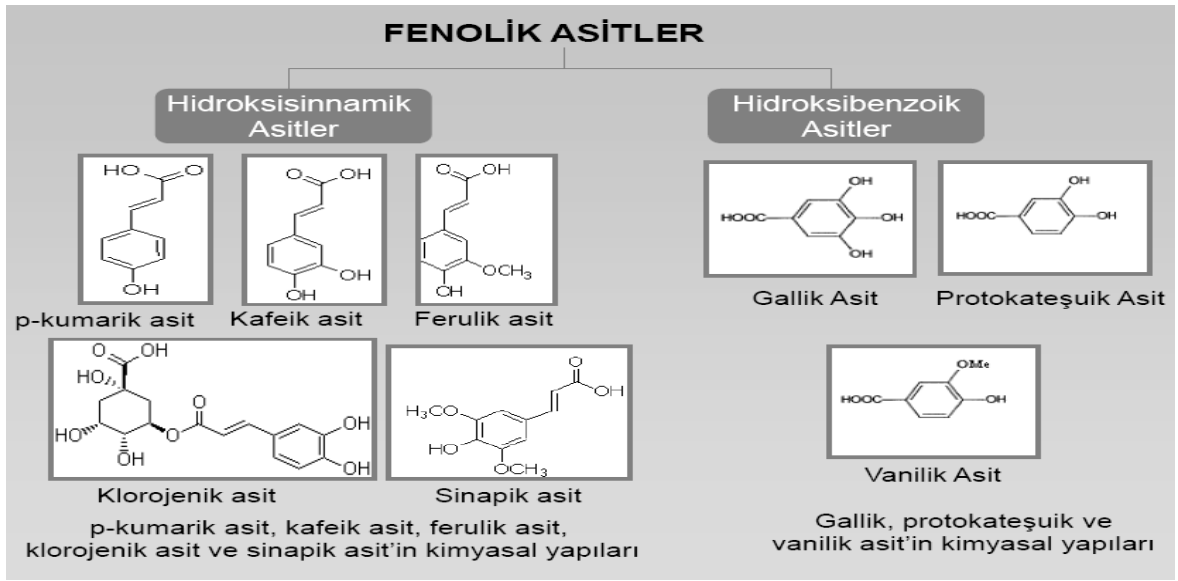
Bitkiler sınırsız sayıda aromatik ve alifatik bileşik sentezleme yeteneğine sahip ajanlardır. Tıbbi bitkiler de temel olarak bulunan fenolik asitler, flavonoidler, taninler, kumarinler, ligninler, kinonlar, stilbenler ve kurkuminoidler onların medikal özelliklerinden sorumlu ajanlardır. Bu bileşikler bitkiler tarafında sekonder metabolitler olarak üretilip bitkilerin çeşitli çevre şartlarına uymalarında ve korunmalarında sorumlu bileşiklerdir. Fenoller, oksijenli aromatik bileşiklerden olup, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik ve kristal yapıdaki bileşiklerdir (Havsteen, 2002; Peterson ve Dwyer, 1998).

Fenolik asitler, hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit türevleri olmak üzere başlıca iki alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 1.2), ve içerdikleri hidroksi ve metoksi gruplarının



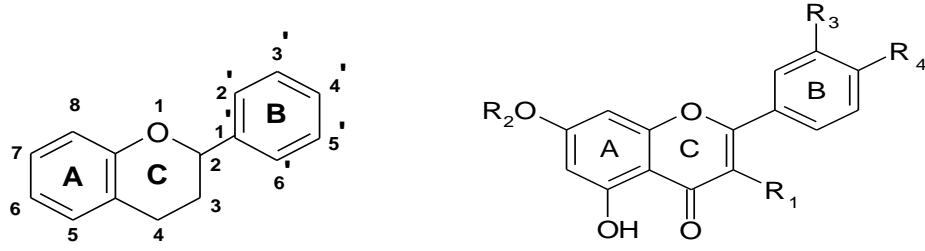
yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Gallik asit (3-4-5-trihidroksibenzoik asit), vanilik asit, şiringik asit, salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit), p-hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit), protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), vanilik asit (3-metoksi-4- hidroksibenzoik asit) bunlardan en çok bilinenlerdir.

Flavonoidler çeşitli besinlerde ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. 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 (Şekil 3.)(Madhavi vd., 1996; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2006). Benzer şekilde flavonoidler yapıları gereği flavonoller, flavonlar, flavononlar olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Bu bileşikler biyolojik etkinlikten sorumlu olabildikleri gibi ayrıca renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinden de sorumludurlar(Fabre vd., 2001; Heim vd., 2002).



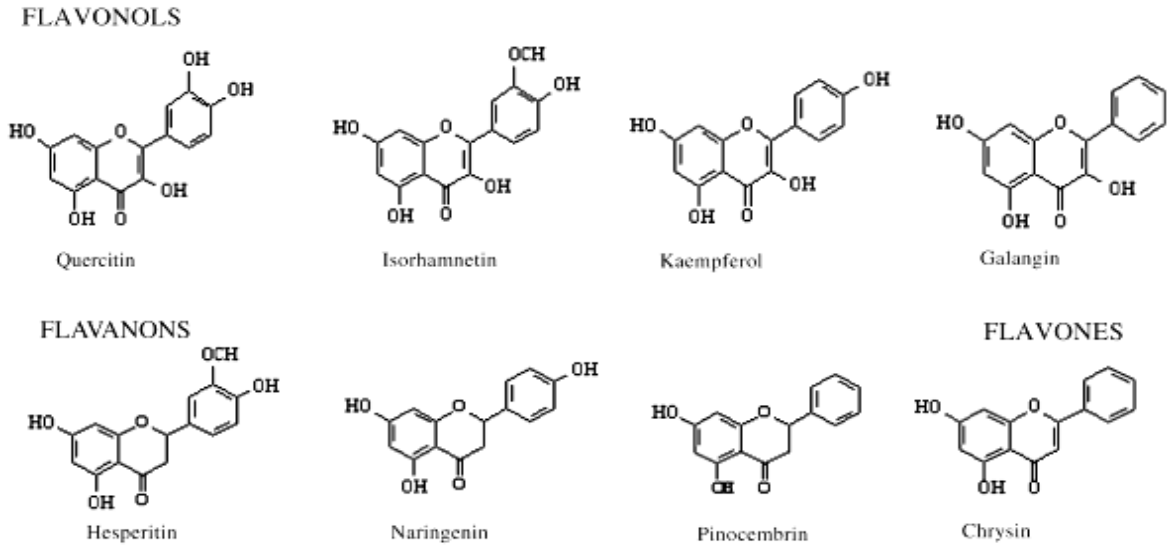
Şekil 2. Fenolik asitler

Genel olarak antioksidan aktivite, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu ile substituent ve flavonoid moleküllerin glikolizasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Flavonoid yapıdaki bazı hidroksil gruplarının varlığı antioksidan aktiviteyi artırmaktadır. A ve B halkasındaki substituent ve doymamış bağlar orto- grubu ve substituentler arasındaki çeşitli sterik etkileşimler bileşiğin antioksidan gücünü radikallere karşı radikal temizleme aktivitesini ortaya koymaktadır.



Şekil 3. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substitüenleri (b)

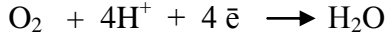
Glikolizasyon antioksidan aktiviteyi aglikon maddeye göre azaltmaktadır. Tıbbi bitkilerde yapılan çalışmada orto-dihidroksi gruplarının varlığı fenolik bileşiğin antioksidan gücünün artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Cai vd., 2006). Yapılan çalışmalarda yapısı aydınlatılmış ve üzerinde en çok çalışılan flavonoidler Kuersetin, Kamferol, Hamnetin, İzohamnetin, Galangin, Hesperetin, Naringin, Naringenin, Pinocembrin, Şirisin (Şekil 4).



Şekil 4. Bazı flavonoidlerin yapıları

### 1.5. Oksidasyon ve Antioksidanlar

Yükseltgenme, yanma veya oksidasyon olarak da adlandırılan redoks reaksiyonları biyolojik ve biyolojik olmayan sistemlerde sürekli olarak meydana gelmektedirler. Oksijenli solunum olarak bilinen ve mitokondriyal bir yanma reaksiyonunda;



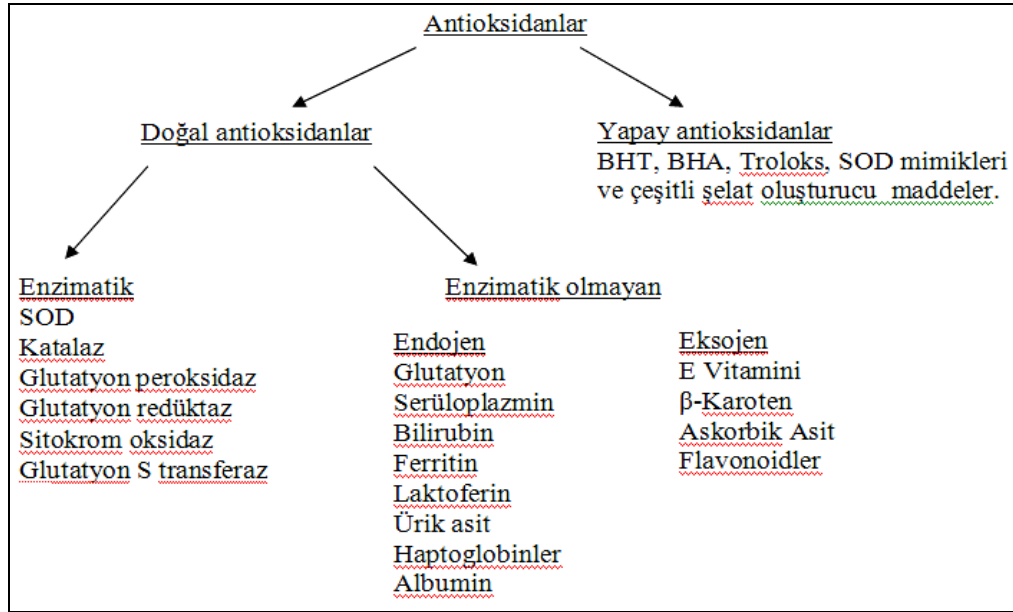
reaksiyonu gereği moleküler oksijenin indirgenmesinde toplam  $4\text{e}^-$  un birden oksijene verilmesi gerekmektedir. Oksijenin eksik veya kısmi olarak indirgenmesi esnasında oksijenden çok daha aktif ve kararsız oksijen türleri meydana gelmektedir. Oksijen kaynaklı olan reaktif radikallerin hücrede aşırı miktarda oluşmaları "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Bu olay, tüm hücre bileşenleri (karbonhidratlar, proteinler, yağlar) üzerinde tahrip edici etkiye sahiptir.

Moleküler oksijenin  $1\text{e}^-$  indirgenmesi ile süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ ) iki elektron indirgenmesi ile peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $3\text{e}^-$  indirgenmesi ile hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) radikali meydana gelir. Oksijen içeren ve çok aktif bu türlere serbest oksijen türleri veya serbest oksijen radikalleri adı verilmektedir. Oldukça kısa ömürlü (yaklaşık  $10^{-5}$  s) ve son derece reaktiftirler, yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girerler (Storz ve Imlay, 1999; Halliwell vd., 1992).

Genel olarak ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir. Son derece aktif yapıya sahip serbest oksijen radikallerinin ve onlardan ileri gelen reaksiyon mekanizmalarının bugün yaşlanma, kanser, kalp damar hastalıkları, katarak, diyabet, romatoid artrit ve nörolojik hastalıkların patolojileri ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Tsao ve Deng, 2004). Ayrıca radikallerin hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı iyi bilinmekte olup hücrel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlay, 1999). Serbest radikaller sigara dumanı, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, UV-ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, petrokimya ürünleri, herbisitler, pestisitler, fosil kökenli yakıtların yanması sonucu oluşan ürünlerde oluşum yerine sahiptir (Sies, 1991). Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyel savunmasında gereklidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Oksidasyonu durduran veya engelleyen maddelere antioksidanlar adı verilmektedir. Antioksidanlar, hücreye zarar veren her çeşit oksidatif ajanın temizlenmesinde ve başlatılan radikal zincir reaksiyonlarının durdurulmasında rol alan her oksidasyonu engellemekten başka bir fonksiyona sahip olmayan ajanlardır. Kısaca antioksidan etkili moleküller oksidasyona karşı korumada bir çeşit kurban moleküllerdir. Daima düşük konsantrasyonlarda etkilidirler.

Antioksidanları üretildikleri bölgeye göre, doğal ya da yapay oluşlarına ve etki mekanizmalarına göre pek çok sınıfta toplamak mümkündür. Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Şekil 5.' de antioksidanların sınıflandırılması verilmektedir.



Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan maddeler farklı mekanizmalar ile savunma etkilerini göstermektedir. Aşağıda beş farklı mekanizmaya göre antioksidan etkinlik sıralanmıştır;

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 Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzimleri ile metal bağlayıcı bazı proteinler (Ferritin, Albumin, Hemoglobini Transferin, Seruloplazmin) verilebilir.
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (quencher/giderici etki): Serbest radikallerle birleşip, onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini söndüren bileşiklerdir. Örnek olarak askorbik asit vitamini (C-Vitamini), karotenler (vitamin A),  $\alpha$ -tokoferol vitamin E), flavonoidler ve antosiyanidinler verilebilir.
3. Hücre deformasyonunun onarılması (repair/tamir edici etki): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir. 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.

#### 4. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması (Ulusoy, 2010).

Şekil 5'ten de görüldüğü gibi antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olarak iki kısma ayrılırlar. Doğal antioksidanlar ise etki mekanizmalarına göre enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar olarak da iki kısımda incelenirler. Non-enzimatik antioksidanlar endojen yani canlı organizma tarafından sentezlenenler ve eksojen dışardan alınan antioksidanlar olarak da kendi içinde iki sınıfa ayrılır. Canlı organizmanın sentezleyemediği ancak çeşitli gıda maddeleri ile birlikte alınan eksojen kaynaklı doğal antioksidanlar oldukça ilgi çekicidir. Bu nedenle, son yıllarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Bunun sebebi sentetik antioksidanların kanserojenik olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamaktadır. Doğal antioksidanlar canlı organizmalardaki savunma sisteminde olduğu kadar gıda sanayinde de önemli derecede yararlıdır. Bu amaçla besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü artırmak, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan antioksidanlar önemli katkı maddeleridir. Doğal kaynaklı antioksidanların çoğu bitkisel kaynaklı olup daha çok bitkilerde vitaminler (A, C, E vit.) ve polifenoller veya flavonoidler halinde bulunurlar. Bu fitokimyasal maddelerin ve antioksidanların yanısıra serbest radikallerden koruma aktiviteleri, kötü huylu kolesterol (LDL)'un oksidasyonu ve DNA hasarını onlemede rolleri ve apoptozisi indüklemedeki rolleri bulunmaktadır. Bal yapısında bulunan çeşitli vitamin ve polifenollerden dolayı doğal antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle son yıllarda oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığından diyetle alınan antioksidanlara ve dolayısıyla doğal ürünlere karşı ilgi çok artmıştır(Rice-Evans vd., 1997). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar meyve sebze tüketimi ve doğal ürünlerle beslenme ile kanser oluşumu arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Doğal ürünlerde bulunan biyolojik aktif bileşiklerin kanser vs. oluşumuna yol açan oksidasyonu engelleyici ve serbest radikal mekanizmalı reaksiyonları önlediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bir doğal ürün olan balın şifa kaynağı olduğu insanlığın başlangıcından beri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli arı ürünlerinde (bal, polen, propolis) de bulunabilen biyoaktif bileşiklerin miktarı ve türü balın florasına bağlı olarak

değişim göstermektedir (Halliwell, 1992, Rice-Evans vd., 1997; Storz ve Imlay, 1999; Weston, 1999).

Bal, propolis ve polen doğal ürünlerinin yüksek antioksidan kapasiteye sahip bileşikler olduğu bilimsel olarak son 15-20 yıldır ciddi şekilde fark edilmiş ve bu konuda çok sayıda çalışma devam etmektedir. Bu doğal ürünlerin antioksidan, antibakteriyal ve diğer biyolojik etkinliklerinden sorumlu ajanlar bu örneklerin çok az bir kısmından (% 1-2) ileri gelmekte olup bu bileşiklerin fenolik asitler, organik asitler ve flavonoidlerin türü ajanlar olduğu ve bunların miktarının ve türünün toplandıkları bölgeye, zamana ve bitkisel çeşitliliğe ve vejetasyona bağlı olarak değişim gösterdikleri pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Gómez-Caravaca vd., 2006; Ahn vd., 2007; Winston, 1991, Socha vd., 2009; Silva vd., 2006). Nitekim Ahn vd., 2007’de yaptıkları çalışmada Çin’in 12 değişik bölgesinden topladıkları propolislerle yaptıkları çalışmada Yunnan bölgesi hariç diğer tüm propolislerin antioksidan özelliğe sahip oldukları ve kafeik acid, ferulik acid and kafeik asit fenil esterlerince zengin olduğu bildirmektedirler. Socha vd., (2009)’a göre Polonya’nın 10 farklı bölgesinden toplanan herbs ballarında yapılan çalışmada bu balların antioksidan özellikleri ve HPLC ile 8 tane fenolik bileşeni analiz edildi ve p-Kumarik asitin baskın fenolik bileşik olduğu bildirildi. LeBlanc vd., (2009)’da yaptıkları çalışmada Amerika birleşik devletlerinde 6 farklı bölgeden toplanan polen türlerinde ve 6 değişik çözücü sistemi ile çalışarak yaptıkları çalışmada fenolik ajanları SPME kolonu kullanarak ve GC-MS ile tayin ettiler ve sonuç olarak en etkili çözücünün Dimetilformamid (DMF) ile metanol olduğunu ve Minosota yöresi polenlerin naringenince zengin olduğunu bildirdiler. Moreira vd., (2008)’de yaptıkları çalışmada Portekiz’ in iki değişik bölgesinden toplanan polen ve propolislerinin sadece antioksidan özellikleri ile polenin mikroskopik analizlerini yayınladılar. Yüksek antioksidan kapasiteye sahip propolislerin yüksek polen içeriğine de sahip olduklarını bildirdiler. Brazilya’nın 49 ayrı bölgesinden toplanan etanolik propolis ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini incelediler ve toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite arasında lineer ilişki bulunduğu ve *Staphylococcus aureus* bakterisine karşın propolisin etkili olduğu bildirilmektedir. Propolis üzerine yapılan bir başka çalışmada etanolik ve metanolik ekstraktlarının gıdaların besin değerlerini ve koruyuculuğunu artırmak için kullanılabileceğini bildirmektedirler (Kroyer ve Hegedus, 2001). Almaraz- Abarca vd., (2007)’de yaptıkları çalışmada Meksida florasına ait etanolik polen ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe edici ve polen

ekstraktlarının HPLC analizinde bir flavonoid türevi olan kalkonlarca zengin olduğunu gösterdiler.

Ülkemiz, apikültür zenginliği bakımından nadir ülkeler arasında olmasına rağmen, ülkemizde üretilen apikültür ürünler üzerinde yapılan ve uluslar arası indekslere giren dergilerdeki yayımlanan araştırmaların sayısı yeterli değildir. Sorgun vd., (2001) ve Basım vd., (2006)'de yaptıkları *in vitro* çalışmada polen ve propolis metanolik ekstraktlarının pek çok patojenik bakteriye karşı antibakteriyal aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Ötles, (1995)'e göre arılar için toksik etkiye sahip bileşikler taşıyan polenlerin de bulunduğunu, bu toksin ve alkaloidlerden kendilerini korumak için polenlerin karışımını tüketme yoluna gittiğini ifade etmektedir. Son yıllarda kestane balı üzerine yapılan çalışmalar oldukça artış göstermektedir. Bunun önemli bir sebebi kestane balının polifenol içeriğinin diğer ballardan farkedilir oranda yüksek bulunmasından kaynaklanmaktadır (Küçük vd., 2007; Sarıkaya vd., 2009; Al-Mamary vd., 2002; Aljadi ve Kamaruddin, 2004). Polen ergin işçi arıların (1-14 günlük yastaki) ve üç günden daha yaşlı olan işçi ile erkek arı larvalarının beslenmesinde kullanılmaktadır (Erdogan ve Dodologlu, 2005). Ancak bal arıları poleni farklı bitkilerden topladığı için, polenin kimyasal kompozisyonu da oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle polenin standart bir bileşiminin ortaya çıkartılması oldukça zordur (Ötles, 1995).

Basım vd., (2006)'ye göre *in vitro* çalışmada metanolik propolis ekstraktlarının pek çok patojenik bakteriye karşı antibakteriyal aktivite gösterdiklerini rapor ettiler. Ahn vd., (2007) ve Kumazawa vd., (2004)'e göre Avrupa ve Çin propolisinin etanolik özütlerinin yaklaşık 200-300 mg/g fenolik bileşik içerdiğini bildirmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise koyu renkli bal ve propolislerin fenolik bileşiklerinin daha yüksek oranda olduğu ve kestane bal ve polenin bu bakımından çok güçlü olduğu bildirilmektedir (Al-Mamary vd., 2002; Aljadi ve Kamaruddin 2004; Beratta vd., 2005; Küçük vd., 2007, Sarıkaya vd., 2009).

### **1.6. Antioksidan Aktivite Tayini**

Oksidasyonun engelleyen veya durduran veya geciktiren her tür bileşik antioksidan olarak adlandırılır. Yeni sentezlenen, doğal bir maddenin yapısından izole edilen veya elde edilen bir ekstraktın antioksidan özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek için geliştirilen pek çok analiz yöntemi bulunmaktadır. Bitkisel veya doğal kaynakların antioksidan

özellikleri üretmiş oldukları sekonder metabolit ajanlardan ileri geldiğinden bu ajanların ayrı ayrı neler olduğunu belirlemek ve yapılarını aydınlatmak çoğu zaman mümkün olamamaktadır. İnce tabaka, kolon, gaz ve likid kromatografi yöntemleri gibi analitik ayırma yöntemleri ile bileşenlerin varlığı ve yapılarının aydınlatılması farmakognozi olarak adlandırılır ki bu teknikler bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda enstrümantal analiz cihazlarının gelişmesine ve yaygınlaşmasına paralel olarak bitkisel veya doğal bir materyalde bulunan sekonder metabolit ajanların yine polaritelerine göre kromatogramları alınmak suretiyle çalışmalar yürütülmektedir. Örneğin doğal bir materyalin uçucu bileşenlerinin belirlemek amacıyla Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) kullanılmaktadır. Bu teknik ile su buharı destilasyonu ile uçucu faz elde edilir ve GS-MS ile uçucu bileşenlerin varlığı kolonda alıkonma sürelerine göre kütüphanelerdeki bilgiler ile karşılaştırılmak suretiyle belirlenir. Uçucu olmayan nispeten polar ve büyük moleküllerin izole edilmesinde ve yapılarının aydınlatılmasında ise LC-MS veya LC-MS/MS kromatografi yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu teknikler çok pahalı olduklarından çok az laboratuarda bulunmaktadır.

Bütün bu zorluklardan dolayı çoğu zaman doğal ekstraktların öncelikle *in vitro* olarak toplam antioksidan kapasiteleri ve diğer biyolojik aktif özellikleri belirlenir ve daha sonra yapıları aydınlatılmaya çalışılır.

Doğal ürünlerin antioksidan kapasiteleri onların içerdikleri fenolik bileşiklerin miktarına ve cinsine bağlı olarak değişim gösterirler. Bu bileşikler örneğin, oluşan bir radikali radikal temizleyici (scavenging), hidrojen verici, singlet oksijen yakalayıcı, metal iyonu şelatlayıcı gibi değişik mekanizmalar üzerinden aktivite gösterirler (Beratta vd., 2005; Küçük vd., 2007).

Şelat (bir ligand ile bağlanma) oluşturma mekanizması dışında antioksidan maddeler etkinliklerini çoğu zaman redoks reaksiyonları üzerinden gerçekleştirdiklerinden antioksidan kapasitenin ölçülmesinde de çoğu zaman hidrojen atomu transferi ve elektron transferine dayanan yöntemler olarak iki ayrı mekanizmada etki gösterirler (Huang vd., 2005). Hidrojen atomu transferi ile oksidan etkiye sahip molekülün indirgenmesini sağlayan testlerden bazıları; Oksijen radikal/antioksidan kapasite testi (ORAC) (Huang vd., 2005), bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) (Apak vd., 2004), Lipoprotein oksidasyonu antioksidan yöntemlerdir (TBARS) (Uchiyama ve Mihara, 1978) yöntemleridir. Toplam fenolik madde (TP) miktarının belirlenmesine dayanan Folin yöntemi (Slinkard ve Singleton, 1977), Troloks eşdeğeri antioksidan yöntemi



(TEAC)(Miller vd., 1993), demir (III) indirgeme/antioksidan yöntemi (FRAP) (Benzie ve Strain, 1996),  $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemi (Dapkevicius vd., 1998) ve 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Cuendet vd., 1997) radikali temizleme yöntemleri elektron transferine dayanan antioksidan testlerdendir.

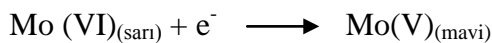
### 1.6.1. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler

Etanolik propolis ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde üç farklı yöntem kullanılmıştır.

#### 1.6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TP)

Doğal ürünlerde bulunan ve sekonder metabolit olarak üretilmiş bulunan fenolik karaktere sahip polifenoller değişik tür ve konsantrasyonda olup antioksidan kapasiteden sorumlu ajanlardır. Total olarak belirlenmeleri buldukları kaynağın antioksidan karakterini ortaya koymaktadırlar. Ayrıca doğal ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir.

Folin Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanan Folin (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999) metodu ile renk doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için en çok kullanılmaktadır. Yöntem, sulu ortama da bulunan fenolik yapıya sahip bileşiklerinin Folin reaktifiyle ( $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ ) (Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi) alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Bu reaksiyonda, absorpsiyon değişiminin muhtemelen geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları ile oluşan fosfomolibdat [ $\text{P}(\text{MoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$ ] dan ileri gelen mavi türlerden ileri geldiği düşünülmektedir .



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.



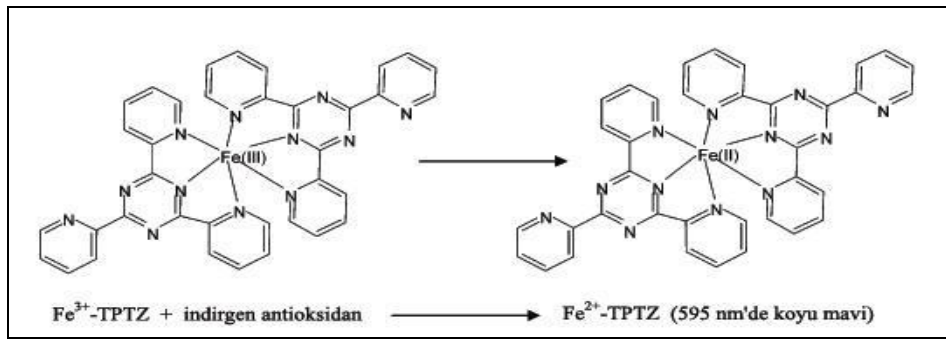
Orijinal Folin reaktifi, bir çeşit molibdotungstosforik heteropolianyon ( $3\text{H}_2\text{O-P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ ) reaktifi olup fenoller için daha spesifiktir. Folin-Ciocalteu yöntemi basit, duyarlı ve kesinliği yüksek bir metottur. Ancak reaksiyon asidik pH'ta yavaştır ve spesifikliğini kaybeder. Metodun diğer önemli bir dezavantajı, ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte etmesidir. Bu nedenle spesifik bir metot olarak kabul edilmemektedir. Metodun başka dezavantajı da Folin Reaktifinin analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğramasıdır (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999; Huang vd., 2005; Prior vd., 2003).

#### 1.6.1.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP)

FRAP yöntemi Hidrojen transferi ile radikal temizleyen özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçülmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, doğal ürünlerin ve ekstraktların toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olup ilk olarak Oyaizu (1986) tarafından geliştirilmiş ve sonra Benzie ve Strain (1999) tarafından modifiye edilmiştir. Ayrıca yöntem, toplam antioksidan aktivite belirlemede uygulanan diğer yöntemlere kıyasla basit, hızlı ve ucuzdur. Ayrıca sağlıklı sonuç veren ve özel bir ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir (Prior vd., 2003). FRAP yönteminin dezavantajı, özellikle bitkilerde bulunan ve önemli antioksidan aktivite gösteren glutatyonlar gibi bazı antioksidanlarla çok yavaş tepkimeye girmesidir. Ancak glutatyonlar, metot için uygun dalga boyu aralığında (593 nm) çok iyi absorbe edilemedikleri için bu dezavantaj ortadan kalkmakta ve meyve ve sebzelerde antioksidan aktivite tayininde FRAP metodu geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Guo, vd., 2003)

Yöntem basit olarak  $\text{Fe}^{+3}$ 'ün  $\text{Fe}^{+2}$  ye indirgenesi esasına dayanır ve bu indirgeme reaksiyonu muhtemelen antioksidan özelliğe sahip sulu bir ortamda bulunan demir (III) tuzlarının demir (II) tuzlarına indirgenmesi ile bir renk değişimine neden olur. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır.

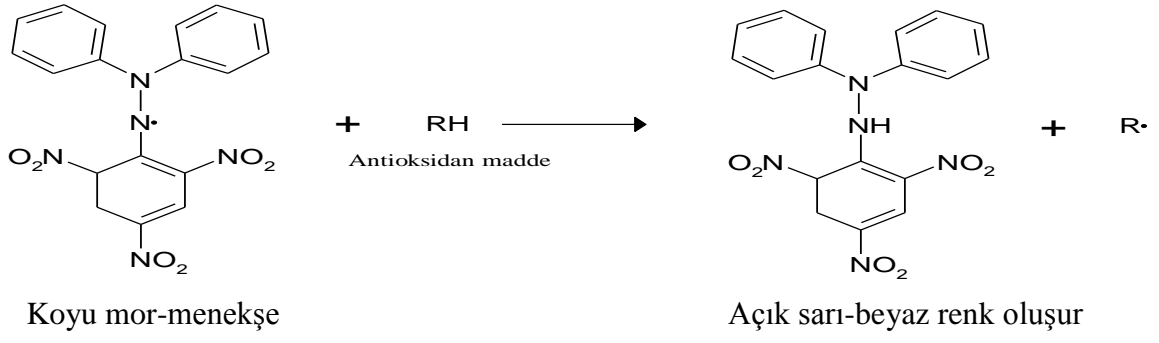
Benzie ve Strain (1999) tarafından modifiye edilen ve daha kararlı demir tuzları oluşumu esasına dayanan metottur. FRAP reaktifi (2,4,6-tripiridiltriazin) (TPTZ)'nin düşük pH'larda oluşan Fe(III)-tripiridiltriazin kompleksinin (Fe(III)-TPTZ) elektron veren antioksidanların varlığında renkli (Fe(II)-TPTZ) formuna indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 6). Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin mavi rengi 595 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bu yöntemle daha çok redoks potansiyeli 0,7 V'tan daha düşük olan bileşiklerin antioksidan kapasitesi ölçülmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir.



Şekil 6. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

### 1.6.1.3. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi

Yöntem kolaylığı, ucuzluğu ve kısa sürede sonuç vermesi bakımından serbest radikal temizleme aktivitesi tayinlerinde en sık kullanılan yöntemlerdendir. DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans oluşturmaktadır ve koyu menekşe renklidir (Cuendet vd., 1997). DPPH radikali bir antioksidan madde ile reaksiyona girdiği zaman indirgenme sonucu mor-menekşe rengin şiddeti azalarak absorbansın azalmasına nede olmaktadır. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerle muamele edilen DPPH•'ın absorbansındaki değişim ölçülerek absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek  $y=ax+b$  denkleminde DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{mg/mL}$  cinsinden belirlenmekte ve  $\text{SC}_{50}$  değeri olarak ifade edilmektedir. Şekil 7. de DPPH radikalinin antioksidan varlığındaki reaksiyonu gösterilmektedir.



Şekil 7. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin indirgenmesi

Bu metodun dezavantajı ise büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılan tüm reaktifler ve çözücüler analitik saflıkta olup çözeltilerin hazırlanışı Tablo 1.' de gösterilmektedir. Bu amaçla kullanılan DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, Folin-Ciocalteu reaktifi Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), TPTZ (tripridiltriazin) Fluka (Buchs, İsviçre), Troloks<sup>®</sup> (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) Sigma Aldrich firmasından ve HCl, etanol ise Merck (Darmstadt, Almanya)'dan satın alındı.

Propolis örneklerinde ham ekstrakt hazırlamak için biyokimya araştırma laboratuvarında bulunan cihazlar kullanıldı. Çalkalayıcı Shaker Heidolph Promax 2020 (Germany), karıştırıcı Vortex Mixer S0100-230V (Woodbridge NJ USA) cihazları ekstraksiyon amacıyla için kullanıldı. Ayrıca antioksidan aktivite ölçümleri için UV-VIS-spektrofotometrede Spectro UV-Vis Double PC-8 autocell Labomed.inc. (U.S.A) kullanıldı. Etanol ile ekstrakte edilen propolislerden çözücüyü uçurmak için döner başlıklı Rotary Evaporatory (IKA, China) kullanıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan reaktifler ve hazırlanma prosedürü

0,2 N Folin Ciocalteu Reaktifi	2,0 N lik Folin reaktifinden distile su ile seyreltilerek hazırlandı
%20'lik Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g saf Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> saf suda çözüldü ve 100 mL ye tamamlandı
10mM TPTZ (FRAP reaktifi)	7,8083mg TPTZ 2,5 mL 40mM HCl de çözünür.
1000 mM Troloks <sup>®</sup> (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit)	Destile su ile 100 mL ye tamamlanır. 500, 250, ve 100 µM konsantrasyonlara distile su ile seyreltilerek kullanılır
40mM HCl	%37 340µL HCl su ile 100 ml tamamlanır
20mM FeCl <sub>3</sub>	324,4mg FeCl <sub>3</sub> destile su ile 100 ml tamamlanır
DPPH	0,150 µM DPPH distile suda hazırlandı
Asetat tamponu(pH:3,6 300 mM)	0,75g NaH <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O
FRP reaktifi	25mL asetat tamponu: 2,5 ml TPTZ, 2,50 mL FeCl <sub>3</sub> karıştırılarak taze hazırlanır

## 2.2. Numunelerin Toplanması ve Ham Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan 15 adet propolis örneği Azerbaycan'ın değişik bölgelerinden Doç. Dr. Elsevar Asadav tarafından 2012 yılında toplandı. Tablo 2.'de propolislerin toplandığı iller ve bölgeleri verilmektedir. Her bir propolisten yaklaşık 5 g alınarak etanollü ekstraktların hazırlanması için çalkalayıcıda (Heidolph Shaker, Schwabach, Germany) 24 saat boyunca tutulmuştur. Çözeltideki katı partiküllerin arındırılması için önce adi süzgeç kâğıdı, sonra mavi bant süzgeç kâğıdı kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirildi. Konsantrasyonları son hacimleri ayarlanarak belirlendi. Analiz süresine kadar stok çözeltiler +4°C'de muhafaza edildi.

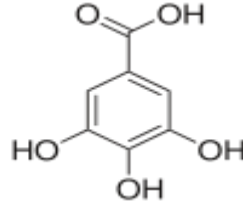
Tablo 2. Propolis örneklerinin toplandığı bölgeler

Örnek No	İller	Bölge	Toplanma Zamanı
1	Aktaş	Aran	Haziran 2012
2	Zerdap	Aran	Haziran 2012
3	İsmayılı	Büyük Kafkas	Haziran 2012
4	Astara	Lenkoran-Astara	Haziran 2012
5	Şemkir	Kiçik Kafkas	Haziran 2012
6	Qax	Büyük Kafkas	Haziran 2012
7	Naheivan-I	Kiçik Kafkas	Haziran 2012
8	Mingeçevir	Aran	Haziran 2012
9	Şeki	Büyük Kafkas	Haziran 2012
10	Qusar	Büyük Kafkas	Haziran 2012
11	Naheivan-2	Naheivan	Haziran 2012
12	İsmayılı-2	Büyük Kafkas	Haziran 2012
13	Quba-1	Büyük Kafkas	Haziran 2012
14	Quba-2	Büyük Kafkas	Haziran 2012
15	Quba-3	Büyük Kafkas	Haziran 2012

## 2.3. Toplam Polifenol Tayini

Ham propolis örneklerinin etanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği, Singleton ve Rossi (1965) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi. Bu amaçla önce gallik asit standardı kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Bunun için gallik asitin farklı konsantrasyonları (500; 250; 125; 62,5; 31,25 ve 15,625 µg/mL) hazırlandı ve Folin reaktifi ile Tablo 3.'deki pipetleme ve inkübasyon işlemleri uygulanarak 760 nm'de

absorbanslar okundu. Daha sonra konsantrasyonlara karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı bulunarak, seyreltme faktörleri de kullanılarak asıl numunenin mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/100g propolis olarak fenolik madde miktarı hesaplandı.



Şekil 8. Gallik asit

Tablo 3. Toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
Distile su	0,1 mL	-	-
Değişik konsantrasyonlarda Standartlar (gallik asit)	-	0,1 mL	-
Ham propolis ekstraktı	-	-	0,1 mL
Distile su	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
0,2 N Folin Reaktifi	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
%2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
2 saat inkübe edilir, 760 nm'de köre karşı absorbans okunur			

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

Yöntem, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ tuzlarını oluşturması ve bu kompleksin 593 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie ve Strain, 1999).

Metoda adını veren FRAP reaktifi günlük olarak hazırlandı. Bu amaçla 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3,6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl<sub>3</sub> (10: 1: 1 )] ile 100 µL numune karıştırıldı ve 4 dakika sonra 593 nm'de absorbans okundu. 595 nm'de numune içermeyen referansa karşı absorbanslar 0. ve 4. dakikada okundu (Tablo 4.) Kalibrasyon için Trolox<sup>®</sup>'un değişik konsantrasyonları (62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µM) kullanıldı. Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart

Troloks®'la karşılaştırmalı olarak bulunarak  $\mu\text{M}$  Troloks® eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi.

Tablo 4. FRAP yöntemi için yapılan pipetlemeler

	<b>Reaktif Tanık Tüpü</b>	<b>Numune Renk Tanık Tüpü (Metanol)</b>	<b>Numune Renk Tanık Tüpü (su)</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
FRAP Reaktifi	3 mL	-	-	3 mL	3 mL
Numune	-	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	-	100 $\mu\text{L}$
Troloks (Değişen kons)	-	-	-	100 $\mu\text{L}$	-
Damıtık Su	-	-	3 mL	-	-
Metanol	100 $\mu\text{L}$	3 mL	-	-	-
0. dakikada ve 4.dakikada 595 nm'de absorbans okunur					

## 2.5. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH<sup>\*</sup> radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerimizde satın alınan bu radikalin 150  $\mu\text{M}$ 'lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Denemelerde Cuendet vd. (1997) metodu kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750  $\mu\text{L}$ ) DPPH<sup>\*</sup> çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletilir. Süre sonunda DPPH<sup>\*</sup>'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Tanık olarak DPPH<sup>\*</sup> çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı (Tablo 5.) Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek  $\text{SC}_{50}$  değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı. Bütün numuneler 3 tekrarlı çalışıldı. Reaktif körü olarak DPPH<sup>\*</sup> çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözelti kullanıldı.

Tablo 5. DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
Trolox	-	750 $\mu\text{L}$	-
Propolis (Değişen konsantrasyon)	-	-	750 $\mu\text{L}$
Metanol (Destile)	750 $\mu\text{L}$	-	-
DPPH (150 $\mu\text{M}$ )	750 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$
Numune çözücüsü	-	-	-
50 dak. sonra 517 nm' de absorbans okunur.			



### **2.5.1. SC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

SC<sub>50</sub>, radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonu olarak tanımlanır ve SC<sub>50</sub> değerinin bulunması için en az 3 farklı numune konsantrasyonunda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC<sub>50</sub> değerini vermiştir. SC<sub>50</sub> değeri µg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

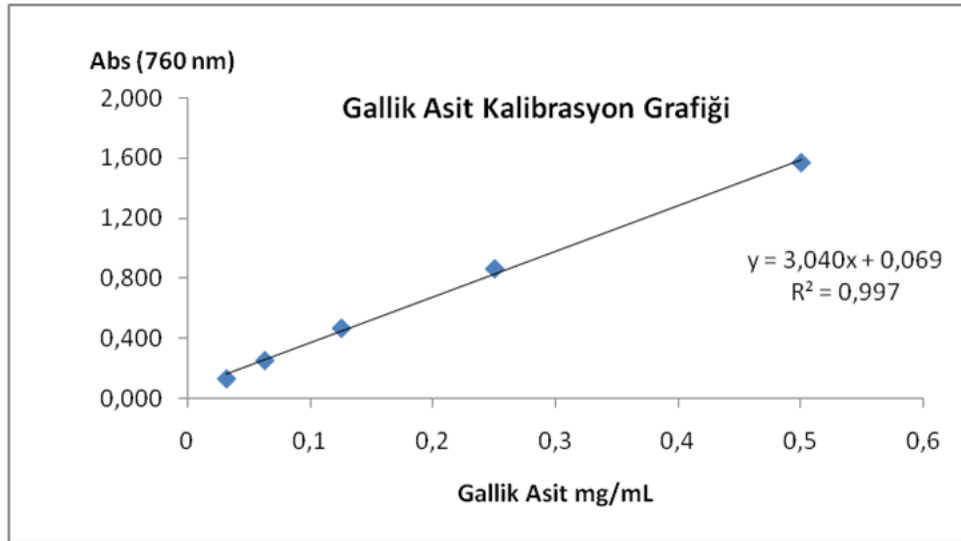
### **2.6. İstatistiksel Analiz**

Analizler en az üç testin ortalaması alınarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer ve standart sapma cinsinden (Ortamala değer ± SD) hesaplandı. Tüm istatistik testler SPSS (version 9.0 for Windows 98, SPSS Inc.) programı yardımıyla yapıldı. Gruplar arasında istatistik 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. Toplam Fenolik Madde Miktarları Ölçüm Bulguları

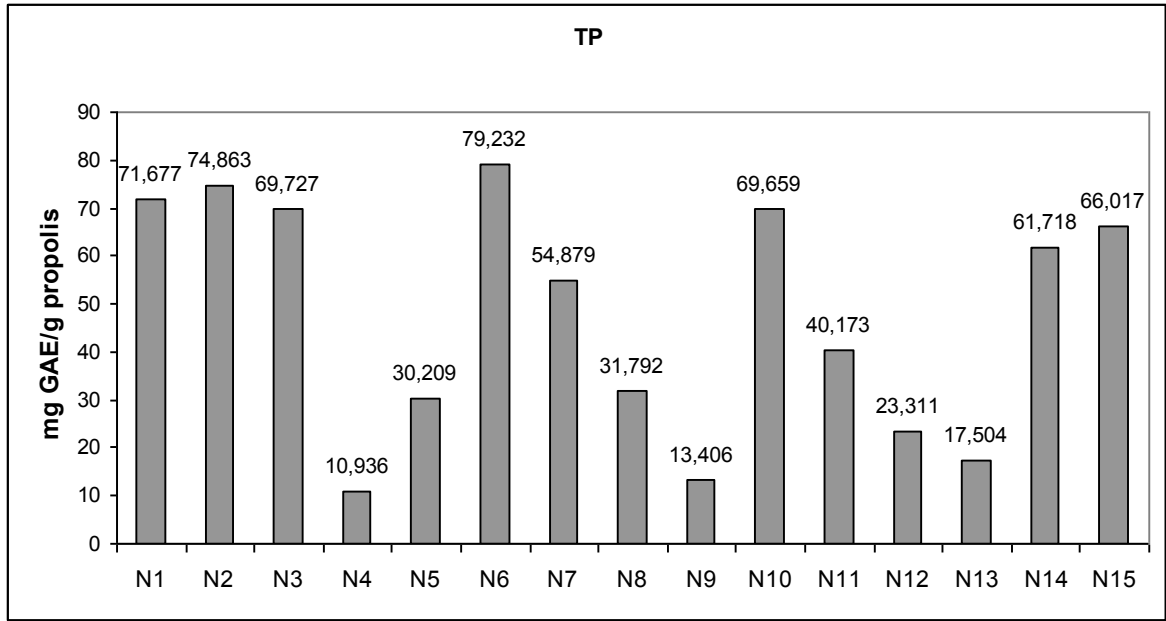
Etanolik propolis ekstraktlarının gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardına göre tayin edildi. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart gallik asit çözeltileri Folin reaktifi ile muamele edilip Bölüm 2.3.'de anlatılan metoda göre gereken işlemler yapıldıktan sonra konsantrasyona karşı gelen 760 nm'deki absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin doğruluğu ve anlamlılığı lineer olup  $R^2$  değerine göre test edildi ve  $R^2$  değeri: 0.997 olarak tespit edildi. Bu değer bize çalışılan gallik asitin konsantrasyonu ile Folin reaktifi arasında oluşan kompleksin doğru orantılı olarak oluştuğunu göstermektedir. Elde edilen grafiğin doğru denkleminde ( $y=3.040x+0.069$ ) propolis numunelerinin absorbans değerlerine göre konsantrasyonları ölçüldü (Şekil 9.). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak g propolis başına mg cinsinden toplam fenolik madde miktarları belirlendi.



Şekil 9. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği

Etanolik propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Tablo 6'da ayrıntılı olarak verilmektedir. Ayrıca çalışılan propolis örneklerinin toplam fenolik madde

miktarlarını karşılaştırmak amacıyla sütun grafik hazırlandı ve Şekil 10'da verilmektedir. Grafiklere göre en yüksek toplam fenolik madde miktarı 79,232 mg GAE/g propolis ile en düşük 10,936 mg GAE/g propolis arasında değerlerde bulundu ve en yüksek polifenol içeriğine sahip örneklerinin Zerdap ve Qax bölgesinde toplanan propolislerin olduğu tespit edildi. En düşük toplam fenolik madde miktarına sahip örneklerin ise Astara ve Şeki bölgesi propolislerine ait olduğu bulundu.



Şekil 10. Azerbaycan bölgesi propolislerinin toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması

Tablo 6. Azerbaycan'ın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri (Ort±SD)

Kod	İller	Bölge	Toplam Polifenol (mg GAE/ g propolis)	FRAP (µM Troloks/g propolis)	DPPH SC50 (µg/mL)
N1	Aktaş	Aran	71,677±0,64 <sup>j</sup>	400,23±4,97 <sup>i</sup>	22±1,1 <sup>c</sup>
N2	Zerdap	Aran	74,86±1,76 <sup>k</sup>	436,43±2,65 <sup>l</sup>	15±1,0 <sup>a</sup>
N3	İsmayıllı-I	Büyük Kafkas	69,73±2,02 <sup>j</sup>	437,90±8,00 <sup>l</sup>	18±1,2 <sup>abc</sup>
N4	Astara	Lenkoran-Astara	10,94±0,15 <sup>a</sup>	170,27±0,38 <sup>a</sup>	198±3,4 <sup>f</sup>
N5	Şemkir	Kiçik Kafkas	30,21±0,88 <sup>e</sup>	250,63±7,97 <sup>d</sup>	108±2,3 <sup>g</sup>
N6	Qax	Büyük Kafkas	79,23±2,06 <sup>l</sup>	429,95±1,09 <sup>k</sup>	30±2,1 <sup>d</sup>
N7	Nahcivan-I	Kiçik Kafkas	54,88±1,79 <sup>g</sup>	330,34±2,88 <sup>f</sup>	58±3,1 <sup>e</sup>
N8	Mingeçevir	Aran	31,79±1,62 <sup>e</sup>	255,22±3,25 <sup>d</sup>	67±2,0 <sup>f</sup>

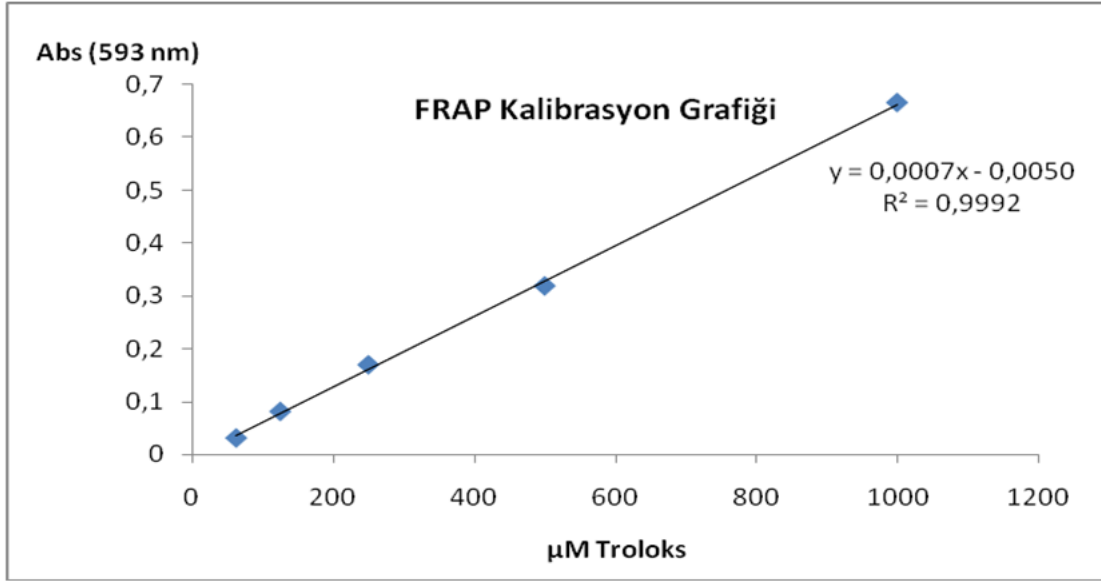
Tablo 6'nın devamı

Kod	İller	Bölge	Toplam Polifenol (mg GAE/ g propolis)	FRAP ( $\mu$ M Troloks/g propolis)	DPPH SC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
N9	Şeki	Büyük Kafkas	13,41±1,31 <sup>b</sup>	178,21±0.89 <sup>b</sup>	58±3,4 <sup>e</sup>
N10	Qusar	Büyük Kafkas	69,66±0,97 <sup>j</sup>	380,45±2,21 <sup>h</sup>	20±2,3 <sup>bc</sup>
N11	Nahcivan-2	Nahcivan	40,17±1,103 <sup>f</sup>	300,41±2,37 <sup>e</sup>	31±1,2 <sup>d</sup>
N12	İsmayıllı-2	Büyük Kafkas	23,31±1.62 <sup>d</sup>	190,45±0,95 <sup>c</sup>	109±3,2 <sup>g</sup>
N13	Quba-1	Büyük Kafkas	17,50±0.89 <sup>c</sup>	195,45±1,77 <sup>c</sup>	128±6,1 <sup>h</sup>
N14	Quba-2	Büyük Kafkas	61,72±0.65 <sup>h</sup>	414,13±3,12 <sup>j</sup>	16±2,0 <sup>ab</sup>
N15	Quba-3	Büyük Kafkas	66,02±0.49 <sup>i</sup>	370,89±1,48 <sup>g</sup>	65±3,4 <sup>f</sup>
Ortalama±Standart sapma			47,67±24.65	312,84±98,38	62,87±52,67

a,b,c,d,e,f,g,h Değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

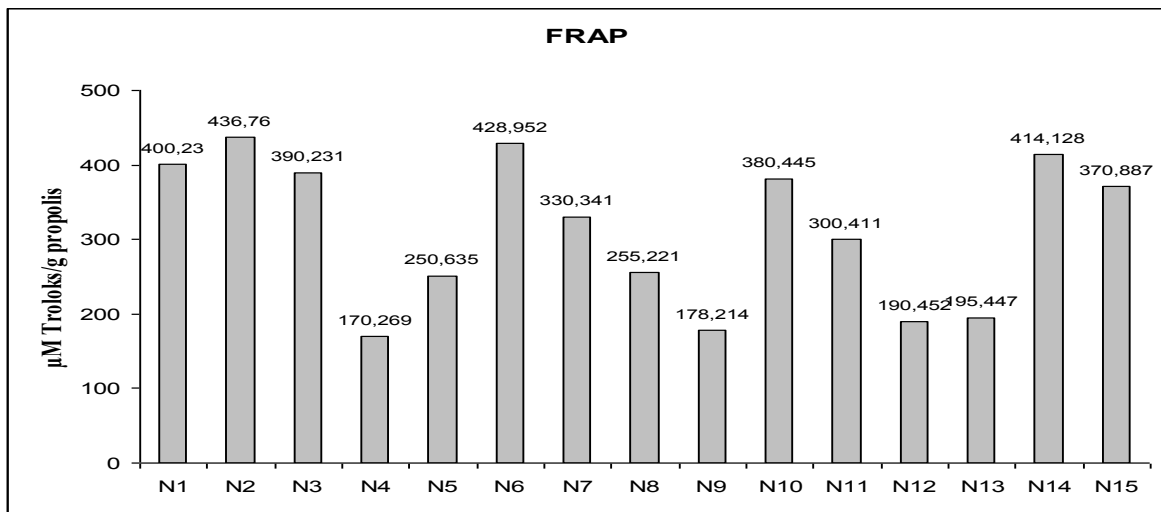
### 3.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP) Bulguları

FRAP testi olarak da adlandırılan test toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en iyi sonuç veren metottur. Demir (III) iyonunun indirgenmesi esasına dayanan yöntemde standart antioksidan olarak sentetik ve ticari olarak satın alınabilen Troloks<sup>®</sup> bileşiği kullanıldı. Kalibrasyon amacıyla hazırlanan Troloks<sup>®</sup>'un değişik konsantrasyonlarındaki çözeltilerden (50-1000  $\mu$ M) faydalanılarak 3 mL FRAP reaktifi ile 100  $\mu$ L Troloks<sup>®</sup> çözeltisi karıştırıldı. 0. dakikada ve 4 dakika sonra 593 nm'de absorbans okundu. Elde edilen standart çalışma grafiği Şekil 11.' de verilmektedir. Grafikten de görüleceği üzere artan Troloks miktarına karşın ölçülen absorbans değeri ve dolaylı olarak FRAP değeri artış göstermiştir ve ( $R^2$ :0,9992.  $p<0,05$ ) olarak bulundu. Şekil 11'deki eşitlikten ( $y=0,0007x+0.,0050$ ) faydalanılarak 15 adet propolis örneğinin Troloks eşdeğeri cinsinden FRAP aktiviteleri tespit edildi ve bulunan değerler Tablo 6'da verilmektedir. Buna göre yüksek FRAP değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir.



Şekil 11. FRAP testi için Troloks® standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma eğrisi

Ayrıca Troloks eşdeğeri cinsinden 15 adet etanolik propolis örneğine ait FRAP değerleri Şekil 12’de sütun grafik olarak gösterilmektedir. En yüksek FRAP değerine sahip örneğin Zerdap bölgesi propolisi olduğu ve değerinin 436,76 (µM Troloks/g propolis) olduğu tespit edildi. Zerdap yöresi propolisinin N6 (Qax yöresi) ve N14 (Quba-2 bölgesi) propolisleri takip etmektedir. En düşük FRAP değerine ait örneğin 178,21 µM Troloks/g propolis ile Şeki bölgesi propolis olduğu görülmektedir.

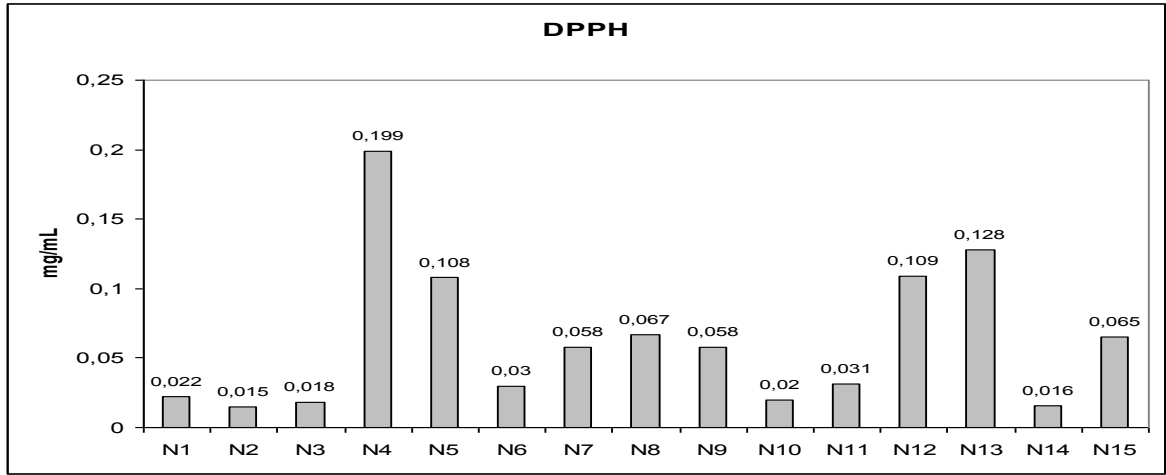


Şekil 12. Azerbaycan bölgesi propolislerinin FRAP antioksidan değerlerinin karşılaştırılması

### 3.3. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi Testi Bulguları

Ticari olarak üretilen DPPH radikali doğal ürünlerin radikal temizleme (scavenging) aktivitenin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir. Metanolik DPPH radikali 517 nm de maksimum absorbanı vermektendir ve antioksidan madde varlığından radikal temizlendiği için absorbanı azalmaktadır. Bu amaçla 5 farklı propolis örneği konsantrasyonunda radikalın temizlenme miktarları absorbanı ölçülerek tespit edildi. Radikalın %50' sini ( $SC_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ) temizleyen madde miktarları tespit edildi. Buna göre yüksek  $SC_{50}$  değeri, düşük radikal temizleme yeteneğini ve düşük  $SC_{50}$  değeri ise yüksek DPPH aktivitesini yansıtmaktadır. Elde edilen değerler Tablo 6 ve Şekil 13'de verilmektedir.

Her bir propolis için 5 farklı etanolik propolis ekstraktı için  $SC_{50}$  değeri grafik çizilmek suretiyle bulundu. Bir örnek olsun diye Şekil 14.'de  $SC_{50}$  değerinin nasıl bulunduğu gösterilmektedir.

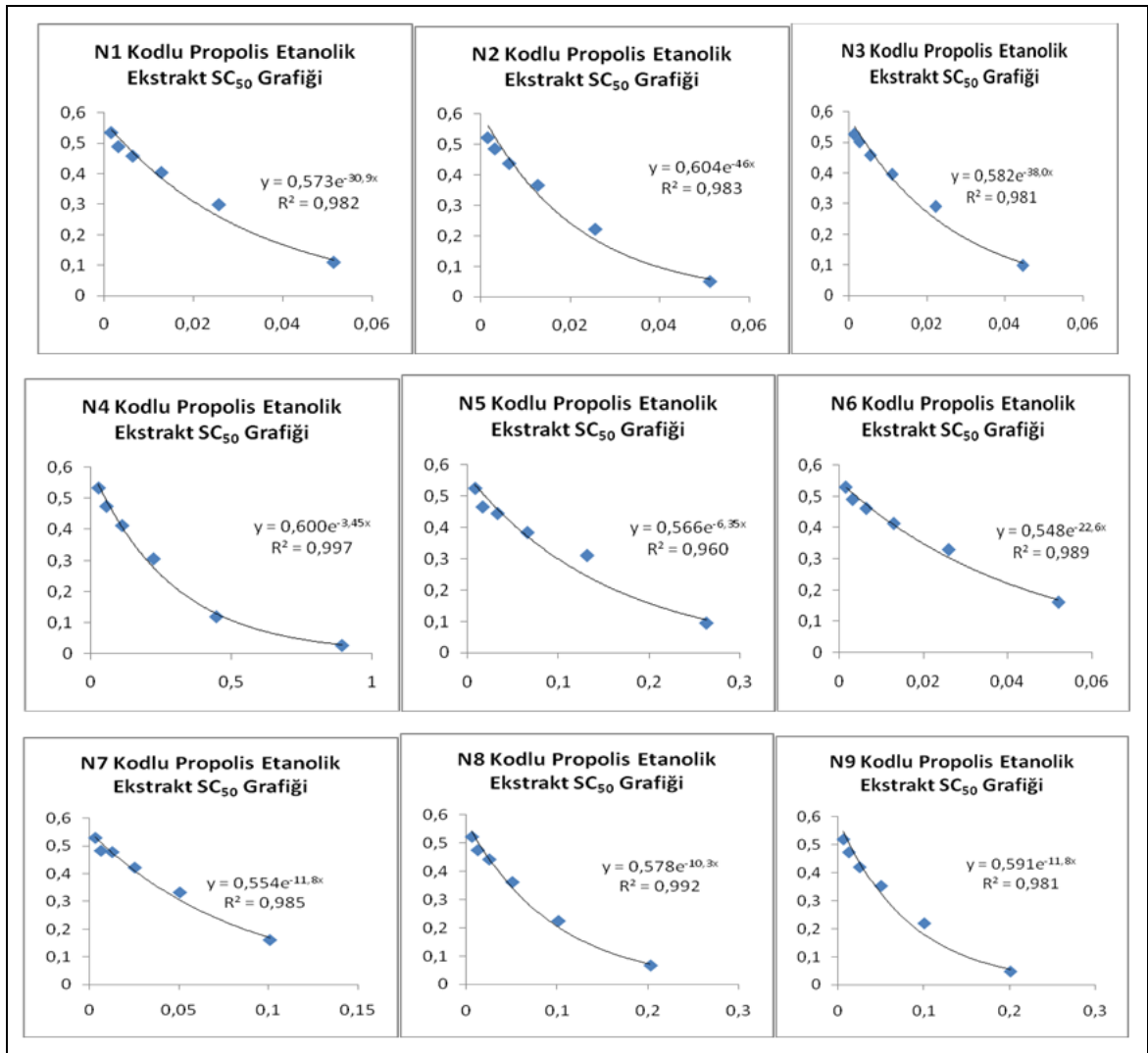


Şekil 13. Azerbaycan bölgesi propolislerinin DPPH radikal temizleme aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması

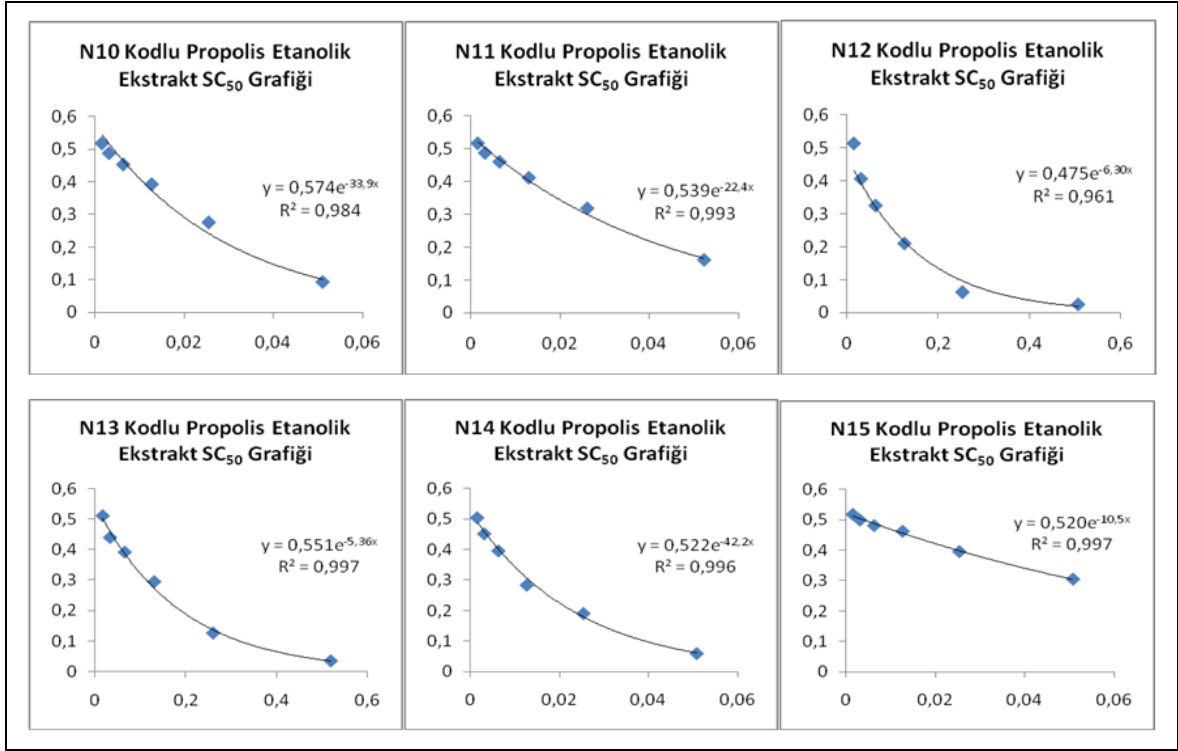
Çalışılan propolislere ait  $SC_{50}$  değerleri 15  $\mu\text{g/ml}$  ile 199  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişim göstermektedir. Buna göre en yüksek DPPH radikal temizleme yeteneğine sahip propolisin Zerdap bölgesi (N2), Aktaş (N1), İsmaili (N3) ve Quba-2 (N14) propolisleri olduğu bulundu.

### 3.3.1. DPPH Aktivitesi İçin SC<sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması

SC<sub>50</sub> radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonu olup bu değer bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekmektedir. Bu nedenle çalışmalarda en az 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorban ölçümleri yapıldı ve absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbanın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC<sub>50</sub> değerini vermektedir. SC<sub>50</sub> değeri µg/mL birimi cinsinden ifade edildi. Şekil 14 ve 15’de her bir propolis örneğine ait DPPH radikal temizleme yeteneğinin numune veya ekstrakt konsantrasyonu ile ilişkisi verilmektedir ve bu ilişkinin ters orantılı olarak değişim gösterdiği gösterilmektedir ( $R^2$ :0,96- ie  $R^2$ : 0,99 arasında değişim göstermiştir).



Şekil 14. DPPH radikalinin SC<sub>50</sub> değerlerinin bulunması-1



Şekil 15. DPPH radikalinin SC<sub>50</sub> değerlerinin bulunması-2

### 3.4. Antioksidan Testler Arasındaki Korelasyonlar

Antioksidan testler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığının görebilmek için Pearson korelasyonu Microsoft-Excell kullanılarak hesaplandı ve korelasyon katsayısı R<sup>2</sup> değerlerine göre sonuçlar yorumlandı. Etanolik propolis örneklerine ait toplam fenolik madde miktarları (TP) ile FRAP değerleri arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu R<sup>2</sup> değerinin oldukça yüksek (R<sup>2</sup>:0,980. p<0,05) olduğu bulundu (Tablo 3.2). Benzer şekilde toplam fenolik madde ile DPPH radikali temizleme aktivitesi arasında yüksek bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin negatif bir değere sahip olduğu (R<sup>2</sup> = - 0,792. p<0,05) bulundu. Bunun anlamı propolis örneklerindeki toplam fenolik madde miktarı arttıkça DPPH radikali temizleme yeteneği artmaktadır. Buna benzer şekilde propolis örneklerinin toplam antioksidana kapasitesini yansıtan FRAP değerleri ile DPPH radikal temizleme aktivitesi arasında negatif bir ilişki olduğu (R<sup>2</sup> = -0,813. p<0,05) bulunmuştur (Tablo 7.).



Tablo 7. Antioksidan parametreler arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson test sonuçları

		<b>TPHENOL</b>	<b>FRAP</b>	<b>DPPH</b>
Toplam fenol	Pearson Correlation	1	.980(**)	-.792(**)
	Sig. (p)(2-tailed)	.	.000	.000
	N	45	45	45
FRAP	Pearson Correlation	.980(**)	1	-.813(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000
	N	45	45	45
DPPH	Pearson Correlation	-.792(**)	-.813(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.
	N	45	45	45

#### 4. TARTIŞMA

Propolis arıların kovanlarını her türlü zararlı etkiye karşı korumak için doğadan topladıkları reçinemsî bir karışımdır. Açık kahverengiden siyaha doğru değişen çeşit ve türlere sahip propolislerin kimyasal, fiziksel ve biyoaktif özellikleri topladıkları bölgenin florasına ve coğrafik özelliklerine göre değişim göstermektedir.

Amacımız, Azerbaycan yöresi propolisleri üzerine literatüre konu olan bir çalışmaya rastlanılmadığından bu eksikliğin giderilmesidir. Bunun için Azerbaycan yöresine ait 15 farklı propolis örneğinin biyoaktif özelliklerinin incelenmesidir. Bu amaçla Haziran 2012’ de örnekler toplanmıştır.

Ekstraktların biyolojik aktif özelliklerinin büyük çoğunluğu fenolik maddelerden ileri geldiğinden, ilk olarak toplam fenolik madde miktarlarının ölçülmesi bir kural haline gelmiştir. Bu nedenle bu çalışmada da propolis örneklerinin sadece toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir.

Etanolik propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarları Folin yöntemine göre test edilmeden önce standart çalışma grafiği hazırlandı. Bu amaçla bir fenolik bileşen olan gallik asit (Tablo 3) standardı kullanılarak tayin yapıldı. Folin-Ciocalteu yönteminde (Singleton ve Rossi, 1965) kullanılan Folin reaktifî fenolik bileşiklerle renkli kompleks oluşturduğundan dolayı sulu ve etanolik çözeltide bulunan tüm fenolik bileşenlerin toplam olarak kantitatif miktarını bildirmektedir. Değişen gallik asit konsantrasyonlarına göre Folin reaktifî ile hazırlanan standart çalışma grafiğinin  $R^2$  değeri 0,997 olarak bulundu. Bu bize gallik asitin fenolik madde miktarının belirlenmesinde çok uygun bir standart olduğunu göstermektedir. Nitekim, standart çalışma grafiği doğru denklemi kullanılarak propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarları bulundu. Propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarının (10,936-79,232) mg GAE /g propolis arasında değişim gösterdiği bulundu. Yapılan istatistiksel analiz sonucu 15 adet propolis örneğinin fenolik madde miktarının hemen hemen istatistiki olarak anlamlı farklar içerdiği, sadece İsmayılı ve Qusar bölgelerine ait propolislerinin aynı miktarda (69,727 ve 69,659 mg GAE/g propolis, sırasıyla) fenolik madde miktarına sahip olduğu bulundu. En yüksek değere sahip propolis ile en düşük değere sahip propolis arasında yaklaşık 10 kat fark olduğu hesaplandı. Bu bize propolislerin kimyasal bileşiminin toplandığı bölgenin florasına bağlı olarak değişim gösterdiğini ispatlamaktadır. Qak, Zerdap ve Aktaş bölgesi propolislerinin

en yüksek fenolik madde miktarına sahipken, Astara ve Şeki bölgesi propolislerinin en düşük fenolik madde içeriğe sahip olduğu bulundu.

Sarıkaya vd., (2009)'da yapılan çalışmaya göre Türkiye florasına ait iki adet propolis örneğinin fenolik madde içeriğinin 313-476 mg GAE/g propolis olarak belirlenmiş olduğu görülmüştür. Yazıcıoğlu vd., (2012) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan 10 adet propolis örneğinin toplam fenolik madde miktarlarının 115-210 mg GAE/g propolis olarak tespit etmişlerdir. Ahn vd. (2007) yaptıkları çalışmada ise Hindistan bölgesi propolislerinin 159-269 mg GAE/g propolis arasında değişim gösterdiğini belirlemişler. Silva Frozza vd. (2013)' ye göre toplam fenolik madde miktarını 151 mg GAE/g propolis olarak kırmızı Brezilya propolisi olduğunu rapor etmişler.

Kumazawa vd. (2004), yapılan çalışmada dünyanın 16 farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarının 31-299 mg GAE/ g propolis arasında değişim gösterdiğini ve en düşük fenolik maddenin Tayland bölgesine ait olup 31 mg GAE/g propolis olup en yüksek Çin'in Hubei yöresi propolis'in 299 mg GAE/ g propolis olarak bildirmişler. İran'ın üç değişik bölgesinden toplanan propolis örneklerinin Etanolik ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının 3,080-8,460 g/100g arasında değişim gösterdiğini ve bunun çalışmamızda kullanılan değerler cinsinden ifade edildiğinde 30,8 ile 84,60 mg GAE/g olarak dağılım gösterdiği bildirilmektedir. En yüksek fenolik madde içeriğine sahip propolisin Tahran bölgesi propolisi olduğu bildirilmektedir (Mohammadzadeh vd., 2007). Bu çalışma ile bulgularımızı karşılaştırdığımız zaman Azerbaycan propolis örneklerinin İran propolislerine benzer fenolik madde miktarlarına sahip olduğu görülmektedir.

Aynı bölgeden fakat farklı alanlardan toplanan propolis örneklerini de toplam fenolik madde miktarları arasında anlamlı olarak farklılık olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Örneğin Nahcivan, Quba ev İsmayilli bölgelerinin farklı alanlarında toplanan propolislerin farklı fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç bize propolislerin üretildikleri alanlar kadar kovanlardaki üretim ve toplanma şekillerinin de oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Propolislerin toplam fenolik madde miktarları arasında anlamlı olarak farklılık bulunmaktadır, fakat Azerbaycan bölgesine ait propolislerin ortalama toplam fenolik madde miktarları  $47,66 \pm 24,65$  mg GAE/g propolis olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma Azerbaycan yöresine ait farklı propolis örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri literatürdeki propolis çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, fenolik madde miktarı bakımından çok zengin olmadığı bulundu. Bunun pek çok sebebi bulunabilir,

bunların başında propolislerin toplandığı alanın florasının etkisinin yanısıra, kovanların içinden veya propolis tuzaklarından toplanmasıyla propolislerin daha kaliteli oldukları bildirilmektedir (Sarıkaya vd., 2009).

Propolis örneklerinin toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde FRAP yöntemi adı verilen ve antioksidan bir madde tarafından demir (III) iyonlarının demir (II)'ye indirgenmesi ve demir (II) iyonlarının TPTZ reaktifi ile renkli kompleks vermesi esasına dayanan yöntem kullanıldı. Elde edilen değerler standart bir antioksidan olan Troloks eşdeğeri cinsinden bulundu. Yüksek FRAP değeri, yüksek antioksidan kapasiteyi göstermektedir. Çalışılan propolis örneklerine ait FRAP değerlerinin oldukça farklı antioksidan aktiviteye sahip olduğu değerlerin 170-437 $\mu$ M Troloks/g propolis arasında değişim gösterdiği bulundu. En yüksek FRAP aktivitesine sahip propolis örneklerinin İsmayılı, Zerdap ve Qax bölgelerine ait örneklerin olduğu tespit edildi.

Doğal ürünlerin ve arı ürünlerinin tüm biyolojik etkinliklerinden sorumlu ajanların başında fenolik yapıya sahip çeşitli polifenoller olduğu bugün artık iyi bilinmektedir. Bu nedenle yapılan araştırmalarda fenolik madde miktarına paralel olarak hem antioksidan kapasitenin hem de diğer bütün biyolojik etkinliklerin, antimikrobiyal, anti-tümoral, anti-inflamatuar, antiviral, anti-fungal vs, de arttığı bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur (Huang vd., 2005; Küçük vd., 2007; Sarıkaya vd., 2009; Kolaylı vd., 2010; Tezcan vd., 2011). Nitekim toplam fenolik madde miktarı ile FRAP aktivitesi arasındaki ilişki istatistiki olarak test edildiğinde pozitif bir korelasyon katsayısının ( $R^2= 0,980$ ,  $p<0,05$ ) değerinde olduğu bulundu. Bu değer Azerbaycan propolislerinde antioksidan kapasiteden sorumlu ajanların fenolik maddeler olduğunu göstermektedir. Genel olarak sonuçlara bakıldığında yüksek FRAP aktivitesine sahip propolislerin yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu bulundu. Fakat Büyük Kafkas bölgesinin İsmayılı I ilinden toplanan propolisin toplam fenolik madde miktarı Qax ilinden daha düşük bulunmasına rağmen FRAP değerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde aynı propolis örneğinde serbest radikal temizleme aktivitesinin diğer propolislere göre oldukça yüksek olduğu bulundu. Bu durum ancak İsmayılı bölgesinden toplanan propolisin yapısında bulunan bir fenolik veya daha fazla sayıda bazı fenolik ajanların yüksek antioksidan kapasitelerinden ileri geldiği yani fenolik bileşenlerin hidroksil gruplarındaki yapısal farklılıklardan ileri geldiği veya propolis de non-fenolik fakat antioksidan etkili farklı bileşiğin/bileşiklerin bulunabilmesinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü fenolik bileşenlerden özellikle flavonoidlerin antioksidan kapasitesinin, taşıdığı hidroksil gruplarının birbirlerine göre

orto- veya para- pozisyonlarında olmasına göre değişiklik göstermesi, yani bir sterik etki söz konusudur (Cai vd., 2006). Dolayısıyla böyle spesifik bir flavonoidin varlığı toplam fenolik madde miktarını artırmış olabilir ve bu da toplam antioksidan kapasiteyi artırabilir.

Ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir ve oksijen içeren tüm radikallere de serbest oksijen radikalleri adı verilmektedir. Radikaller ve radikalik reaksiyonlar oldukça kısa ömürlü olup tespit edilmeleri oldukça iyi bir donanımı ve tecrübeyi gerektirmektedir. Serbest radikalleri ortandan kaldıran veya oluşumunu engelleyen her tür molekül antioksidan olarak tanımlandığından radikal temizleme aktivitesi dolaylı olarak antioksidan aktiviteyi de yansıtır. DPPH radikali, nispeten uzun ömürlü ve ticari olarak satın alınabilen bir serbest oksijen radikali olduğu için radikal temizleme (scavenging) aktivitesi tayininde sıkça kullanılmaktadır. Her bir propolis örneği için 5 farklı etanolik propolis ekstraktı için SC<sub>50</sub> değeri grafik çizilmek suretiyle bulundu. Yüksek SC<sub>50</sub> değeri düşük aktiviteyi gösterdiğinden dolayı en yüksek radikalik aktiviteye sahip örneğin 15 µg/ml olarak Zerdap Quba-2 ve İsmayılı' da olduğu bulundu. Buna karşın Astara, Quba 1 ve Şemkir bölgelerine ait propolislerin en düşük DPPH aktivitesine sahip örnekler olduğu tespit edildi.

DPPH radikal aktivitesi ile toplam fenolik madde ve FRAP aktiviteleri arasındaki ilişki incelendiğinde her iki parametre ile negatif bir ilişki (korelasyon) olduğu görülmüştür. Yani etanolik ekstraktaki propolis miktarının az olması antioksidan aktivitenin o kadar fazla olması anlamına gelmektedir. Ayrıca, Pearson korelasyon testine göre DPPH ve toplam fenolik madde miktarı arasında bulunan korelasyon katsayısı  $R^2 = -0,792$  ( $p < 0,05$ ) ve DPPH ile FRAP arasındaki korelasyonun  $R^2 = 0,813$ ,  $p < 0,05$  olduğu bulunmuştur. Kısaca DPPH radikal temizleme aktivitesinin de fenolik madde miktarı ile doğru orantılı olmasının yanında, fenolik maddenin türünün de bu durumda etkili olduğu görülmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Çalışmada Azerbaycan'ın 15 farklı noktasından toplanan ham propolis örneklerinin Etanolik ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan kapasitesi ve DPPH radikali temizleme aktivitesi tespit edildi. Elde edilen değerler maddeler halinde aşağıda sıralanmaktadır;

1. Toplam fenolik madde miktarları en düşük değer 10,94 mg GAE/g propolis Astara bölgesi propolisi olup, en yüksek fenolik madde Qak bölgesi 79,23 mg GAE/g propolisi olarak tespit edildi ve ortalama toplam fenolik madde miktarı  $47,67 \pm 24,65$  mg GAE/g propolisi olarak belirlendi.
2. Her bir propolis örneğinin farklı değerlerde fenolik madde içeriğine sahip olduğu tespit edildi.
3. Bitkisel ekstraktlarda ve doğal ürünlerde toplam antioksidan kapasiteyi en iyi şekilde temsil eden FRAP testi (demir (III) indirgenme/antioksidan kapasite) testine göre propolislerin FRAP değerleri 170,269 ile 437,897  $\mu$ M Troloks/g propolis değerleri arasında dağılım gösterdiği ve ortalama 312,84  $\mu$ M Troloks/g propolis değerine sahip olduğu bulundu.
4. Propolislerin her birinin DPPH radikale karşı etkili olduğu ve 16 ile 198  $\mu$ g/mL arasında  $SC_{50}$  değerlerine sahip oldukları bulundu. Astara bölgesi propolisinin düşük FRAP ve DPPH temizleme yeteneğine sahip olduğu tespit edildi.
5. Çalışılan üç antioksidan testin kendi arındaki korelasyonlarının oldukça yüksek olduğu, bulunan yüksek ilişki ( $R^2$  değeri 1.0 yakın) katsayılarından, Pearson korelasyon testinden belirlendi. Yani ekstraktlardaki fenolik madde miktarlarına paralel olarak antioksidan olarak demir indirgeme kapasitesi ile radikal temizleme yeteneği (DPPH) arasında direkt olarak bağlantı bulunmaktadır.

## 6. ÖNERİLER

1. Her bir propolis örneğinin toplam mum, vaks, uçucu bileşen, diğer tüm kimyasal ve fiziksel analizleri yapılmış olsaydı, sonuçların yorumlanmasında kolaylık sağlayabilirdi.
2. Her bir propolisin antioksidan özelliğinden sorumlu fenolik ajanların HPLC veya GC-MS ile analizleri yapılmış olsaydı daha detaylı olarak sonuçlar yorumlanırdı.
3. Antioksidan parametrenin yanında antimikrobiyal aktivitede incelenmiş olsaydı propolislerin biyolojik etkinliği daha belirgin olarak ortaya çıkmış olurdu.
4. Her bir propolisin toplandığı bölgenin florası hakkında yeterli bilgi sahibi olunmuş olsaydı sonuçların yorumlanmasında yardımcı olurdu.

## 7. KAYNAKLAR

- Abd El Hady, F., K. ve Hegazi, A.G., 2002. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta propolis, Z Naturforsch, 57, 386–394.
- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. ve Nakayama, T., 2007. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China, Food Chem., 101,4, 1383-1392.
- 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.A., Al-Meerri A. ve Al-Habori, M., 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey, Nutrition Res., 22, 1041–1047.
- Almaraz, N., Campos, M.G., Avila, J.A., Naranjo, N., Herrera, J. ve Gonzalez, L.S., 2007. Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract of Monofloral Honeybee Collected Pollen From Mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae), J Food Compos Anal., 20,2, 24-119.
- 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.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L. ve Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, Apidologie 31, 3–15.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y. ve Kadota S., 2001. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis, Phy. Res., 15, 561–571.
- Basım, E., Basım, H. ve Özcan, M., 2006. “Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens”. J. Food Engin., 77, 992-996.
- Benzie, J.F., F. ve Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Meth. Enzymology, 299, 15-27.
- Beratta, 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, Anal. Chim. Acta, 533, 185-191.



- Cai, Y.Z., Sun, M., Xingc, J., Luo, Q. ve Corke, H., 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants, Life Sci., 78, 2872 – 2888.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, 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, J. Agric. Food. Chem. 51, 742–745.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M. ve Kim, J.M., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea, LWT-Food Sci.Tech., 39, 756–761.
- Cisarino, L., Pisati, A. ve Fasani, F., 1987. Contact dermatitis from propolis, Contact Dermatitis, 16, 110-111.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.ve Dyatmiko W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimica Acta, 80, 4, 1144–1152.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A. ve Linssen, P. H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, J. Sci. Food Agric., 77, 140–146.
- Erdogan, Y. ve Dodolođlu, A., 2005. Bal Arısı (*Apis Mellifera* L.) Kolonilerinin yaşamında polenin önemi, Uludag Bee Journal, 5.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, D.E. ve Quetin-Leclercq, J., 2001Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 707-715.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. ve Fernandez-Gutierrez, A., 2006. Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived From Bees, J Pharmac Bio Anal., 41, 1220–34.
- Gülcin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, M.H., Bilsel, M. ve Gören, A.C., 2010. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey, Food and Chemical Toxicology, 48, 2227–2238.
- Guo, C., J. Yang, J. W., Li, Y., Xu, J. ve Jiang, Y., 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, Nutr. Res., 23, 1719–1726.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. ve Cross, E. C., 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? J. Lab. Clin. Med., 119, 598-620.
- Havsteen, B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharma. Therap., 96, 67-202.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. ve Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, J. Nut. Biochem., 13, 572–584.
- Hill, R., 1977. Propolis: The natural antibiotic, Thorsons Publishers Ltd., Wellingborough, UK, I, 2, 1-66.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R.L., 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem., 53, 1841-1856.
- Kolaylı, S., Kara, M., Tezcan, F., Erim, F.B., Sahin, H, Ulusoy, E. ve Aliyazıcıoğlu, R., 2010. Comparative study of chemical and biochemical properties of different melon cultivars: standard, hybrid, and grafted melons. J. Agric. Food Chem., 58, 9764-9769.
- Kroyer, G. ve Hegedus, N., 2001. Evaluation of Bioactive Properties of Pollen Extracts A Functional Dietary Food Supplement, Innov. Food Sci. Emerg., 2, 171-174.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. ve Nakayama, T., 2004. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins, Food Chem., 84, 329–339.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, Ş., Ulusoy., E., Baltacı, C. ve Candan, F., 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, Food Chem., 100, 526-534.
- Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N. ve Begum, N.A., 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents, Food Chem., 122, 233–237.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLuca, A. ve Deeby, T., 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen, Food Chem., 115, 1299–1305.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. ve Salunkhe, D.K., 1996. Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives., Markel Dekker, Newyork.
- Marcucci, M. C., 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity, Apidologie, 26, 83–99.
- Mihara, M. ve Uchiyama, M., 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, Ann. Biochem., 86, 271- 278.

- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. ve Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, Clin. Sci., 84, 407–412.
- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N. ve Ostad, S.N., 2007. Chemical Composition, Oral Toxicity and Antimicrobial Activity of Iranian Propolis, Food Chemistry, 103, 1097–1103.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A. ve Estevinho, L., 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal, Food and Chemical Toxicology, 46, 3482–3485
- Nagaoka, T., Banskota, A. H. ve Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. ve Kadota, S., 2003. Caffeic Acid phenethyl ester (CAPE) analogues: Potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26, 487–491.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Ötles, S., 1995. Bal ve bal teknolojisi (Kimyası ve Analizleri). Alaşehir Meslek Yüksek Okulu Yayınları No:2, İzmir, 89.
- Peterson, J. ve Dwyer, M., 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, Nutr. Res, 18, 1995–2018.
- Pietta, P.G., Gardana, C. ve Pietta, A.M., 2002. Analytical methods for quality control of propolis, Fitoterapia, 73, 7-20.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. ve Jacob, R., 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of Plasma and other Biological and Food Samples, J. Agric. Food Chem., 51, 3273-3279.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic Compounds, Trends Plant Sci., 2, 152-159.
- Russo, C., Sanchez, V., Toroncoso, F., Vanella, N. ve Garbarino, J.A., 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines, Life Sci., 76, 5, 545-558 .
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tunçel M. ve Kolaylı S., 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania Sativa* Mill.) Honey And Propolis, J. Food Biochem., 33,4, 470–481.
- Silva Frozza, C.A., Celi Garcia, C.S., Gambato, G., Souza, M.D.O., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T. ve Borsuk, S., 2013. Chemical

Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Brazilian Red Propolis, Food Chem.Toxic., 52, 137-142.

- Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R. ve Vidal, F.V.N., 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities, Food Chemistry, 99, 431–435.
- Singleton, V.L. ve Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Amer J Enol Viticult., 16, 144-158.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.
- Sorkun, K., Doğan, C. ve Başoğlu, N., 2001. Physicochemical Characteristics and composition of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. honey produced in Turkey Apiacta, 36, 182-189.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietryzk, S. ve Fortuna, T., 2009. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoney, Food Chem., 103, 568-574.
- Storz, G. ve Imlay, J., 1999. Oxidative stres, Cur. Opin. Microbiol., 2, 188-194.
- Tezcan F, Kolaylı S, Sahin H, Ulusoy E. ve Erim B.F., 2011. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys, J. Food Nut. Res., 50, 33-40.
- 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, Innov. Food Sci. Emerg. Tech., 7, 140-146.
- Resmi Gazete, 2000. Türk Gıda Kodeksi, Başbakanlık Basımevi, 24208, 39.
- Uchiyama, M. ve Mihara, M., 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, Anal. Biochem, 86, 271–327.
- Ulusoy, E. 2010. Anzer Balı Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Weston, R.J., Mitchell, K.R. ve Allen, K.L., 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey, Food Chem., 64, 295-301.
- Winston, G.W., 1991. Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals, Com. Biochem.Physiol. Part C: Comp. Pharm., 100, 173-176.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında Trabzon'da doğdu. 1996 yılında Trabzon İmam Hatip Lisesinden mezun oldu. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdi. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesinden tezsiz yüksek lisans'ının tamamladı. 2005 yılından beri Trabzon'da dersane öğretmenliği yapmaktadır. Evli ve bir bebek beklemektedir.