

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ÇEŞİTLİ ÇÖZÜCÜLERDE TÜRK PROPOLİSİNİN
ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

HAZİRAN - 2010

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ÇEŞİTLİ ÇÖZÜCÜLERDE TÜRK PROPOLİSİNİN ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN
İNCELENMESİ

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08.06.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 28.06.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet AYAR

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

HAZİRAN -2010

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı, başta danışman hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER olmak üzere bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Doç Dr. Yüksel ALIYAZICIOĞLU, Doç Dr. Birgül KURAL ve özellikle HPLC çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER' e, Gümüşhane Üniversitesi öğretim üyeleri Yaşam BARLAK ve Meltem ÇOLAK' a, çalışmalarım esnasında yardımlarını aldığım değerli arkadaşlarım doktora öğrencisi İbrahim TURAN ve yüksek lisans öğrencisi Selim DEMİR' e ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca her zaman ve her koşulda yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2010

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Propolis	3
2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	4
2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	4
2.1.2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	6
2.1.2.2. Flavonoidler	7
2.1.3. Propolisin Bitkisel Kaynağı	10
2.1.4. Propolisin ve İçeriğinde Bulunan Bileşenlerin Biyolojik Aktiviteleri	12
2.1.5. Propolisin Antioksidan Aktivitesi	14
2.1.6. Propolisin Kullanım Alanları	16
2.1.7. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu	17
3. MATERYAL ve METOD	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Cihazlar ve Malzemeler	19
3.1.2. Kimyasal Maddeler	20
3.2. Metodlar	20
3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	20
3.2.2. Ekstraktlarda Toplam Polifenol İçerik Tayini	21
3.2.3. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini	23
3.2.4. Ekstraktlarda Demir (Fe ⁺³) İndirgeyici Güç Tayini	25

3.2.5. Ekstraktlarda Toplam Antioksidan Statü (Total Antioxidant Status-TAS) Tayini	27
3.2.6. Ekstraktların HPLC ile Kalitatif Analizi	29
4. BULGULAR	31
4.1. Ekstraktlarda Toplam Polifenol İçerik Tayini Sonuçları	31
4.2. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini Sonuçları	32
4.3. Ekstraktlarda Demir (Fe ⁺³) İndirgeyici Güç Tayini Sonuçları	34
4.4. Ekstraktlarda Toplam Antioksidan Statü (TAS) Tayini Sonuçları	35
4.5. Ekstraktların HPLC ile Kalitatif Analizi Sonuçları	37
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	52
6.1. Sonuçlar	52
6.2. Öneriler	53
7. ÖZET	54
8. SUMMARY	55
9. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	5
Tablo 2. Propolis içeriğinde bulunan flavonoid çeşitleri	9
Tablo 3. Propolisin içeriğinin iklim, coğrafik bölge ve bitki türüne göre değişimi	12
Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri	14
Tablo 5. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi	22
Tablo 6. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	24
Tablo 7. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında demir (Fe ⁺³) indirgeyici güç tayini	26
Tablo 8. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam antioksidan statü (TAS) tayini	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis	4
Şekil 2. Propolisin yapısında bulunan bazı flavonoidler ve fenolik asitler	6
Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı	7
Şekil 4. Flavonoidlerin sınıflandırılması	8
Şekil 5. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin ve kafeik asit fenetil esterin (CAPE) kimyasal yapıları	10
Şekil 6. Toplam polifenol içerik tayini için gallik asit standart grafiği	22
Şekil 7. Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği	24
Şekil 8. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini için troloks standart grafiği	27
Şekil 9. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik	32
Şekil 10. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik	33
Şekil 11. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini	35
Şekil 12. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam antioksidan statü (TAS)	36
Şekil 13. Propolisin sulu ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	38
Şekil 14. Propolisin etanollü ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	39
Şekil 15. Propolisin DMSO' lu ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	40
Şekil 16. Propolisin gliserollü ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	41
Şekil 17. Propolisin asetonlu ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları	42

KISALTMALAR LİSTESİ

TLC	: İnce tabaka kromatografisi
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPLC-MS	: HPLC-kütle spektrometrisi
CE	: Kapiller elektroforez
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Mg	: Magnezyum
Ca	: Kalsiyum
I	: İyot
K	: Potasyum
Na	: Sodyum
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Mn	: Mangan
Fe	: Demir
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
ROS	: Reaktif oksijen türleri
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
GSH	: Glutasyon redüktaz
RNS	: Reaktif azot türleri

PAD	: Fotodiyod array dedektör
UV	: Ultraviole
MS	: Kütle spektroskopisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
RP-HPLC	: Ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
DAD	: Diyod array dedektör
VIS	: Görünür bölge
VGSC	: Voltaj kapılı sodyum kanalları

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Propolis, bal arıları tarafından toplanan, bitki reçinelerinden türetilen ve bitki türüne bağlı olarak rengi sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişen doğal bir üründür (1,2). Propolis, arılar tarafından bal peteklerindeki delikleri kapatmak, kovanın iç duvarlarını düzgünleştirmek ve girişi yabancılara karşı korumak için kullanılır (3). Kompleks kimyasal bileşiminden dolayı halk tıbbında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (4).

Propolisin başlıca kaynağını Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın tropik olmayan bölgeleri gibi karasal iklime sahip bölgelerde kavak (*Populus spp.*) türleri oluştururken, Rusya'da huş ağaçları (*Betula verrucosa*), Brezilya'da ise *Baccharis* türleri propolis kaynağı olabilmektedir (5).

Propolisin içeriği toplandığı bitkilerin tür ve çeşitlerine göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak, ham propolisin % 50'sini reçine ve bitkisel balsam, % 30'unu balmumu, % 10'unu esansiyel ve aromatik yağlar, % 5'ini polen ve % 5'ini diğer organik maddeler oluşturmaktadır (2).

Propolisteki ana kimyasal sınıflar; flavonoidleri, fenolik bileşikleri ve çeşitli aromatik yapıları içermektedir. Bununla birlikte propolis birçok B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de bünyesinde barındırmaktadır (6).

Propolis çok eski zamanlardan beri kullanılan doğal bir ürün olmasının yanında, propolisi oluşturan reçinenin farklı tür ve çeşitteki bitkilerden toplanıyor olması, kimyasal yapısının farklılaşmasına neden olmaktadır. Bu durumda kavak ağacından elde edilen propolisin temel kimyasal bileşiklerini flavonoid aglikonlar, hidroksisinnamik asitler ve onların esterleri oluştururken, huş ağacından elde edilen propoliste flavonoid aglikonlar, *Baccharis spp.*'den elde edilen propoliste ise *p*-kumarik asitin karbon prenillenmiş türevleri önemli aktif bileşikler olarak yer almaktadır (5).

Bal arısı kovanlarından toplanan propolisin antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, lokal anestetik, antiinflammatuar, hepatoprotektif, immünohistimülant ve sitostatik aktiviteleri kapsayan birçok biyolojik özelliği mevcuttur (7). Bu özellikleri nedeniyle propolis, günümüzde popüler bir ilaç olarak halk tıbbında, apiterapide, biyokozmetikte ve ilaç sanayinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Yapılan araştırmaların çoğu propolisin kimyasal bileşimi, biyolojik aktivitesi, farmakolojik ve tedavi edici özellikleri üzerinedir (8).

Farklı kökene sahip propolis örneklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili yapılan çok sayıdaki çalışmada Brezilya propolisinin antibakteriyel, sitostatik, serbest radikal koruyucu aktivitesi belirlenirken, Bulgar propolisinin bakterisidal, antifungal, antiparaziter aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bugüne kadar, Türk propolisinin antibakteriyel, antifungal, antikarsinojenik, yara iyileştirici gibi bazı biyolojik aktiviteleri incelenmiştir (9).

Propolisin yapısında bulunan aktif bileşenlerin belirlenmesi için çeşitli çalışmalarda ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), HPLC-kütle spektrometrisi (HPLC-MS) ve kapiller elektroforez (CE) gibi değişik analitik yaklaşımlar kullanılmaktadır (10,11).

Propolis ham halde kullanılmadığı için çözücülerle yapılan ekstraksiyon ile saflaştırılmaktadır (12). Yapılan çeşitli çalışmalarda propolisin sulu, etanollü, metanollü, eter ve yağ ekstraktları hazırlanarak, suda çok az çözüldüğü, etanol ve metanolde ise daha iyi çözüldüğü belirlenmiştir. Bunun yanı sıra propolisin, eter ya da kloroformda tamamen, hidrokarbon çözücülerde ise çok az miktarda çözüldüğü tespit edilmiştir (13).

Bu çalışmada ana amaç, Trabzon ilinden toplanan ve günümüzde önemi giderek daha fazla anlaşılan propolisin su, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol ve aseton olarak seçtiğimiz beş farklı çözücü ile ekstrakte edilebilirliğini incelemek; içeriğinde bulunan, antioksidan aktivitesinden başlıca sorumlu bileşikler olan polifenoller ve flavonoidlerin hangi çözücü ile muamele edildiğinde ekstraktta en fazla bulunduğunu, dolayısıyla hangi çözücüde en iyi çözüldüğünü tespit etmektir.

Propolisin içeriğindeki bileşenler her bir çözücüde farklı oranlarda çözüneceğinden dolayı, yaptığımız çalışmaları desteklemek amacıyla, bu beş çözücüde çözülmüş olan ekstraktları HPLC ile kalitatif olarak analiz edip, elde edilen kromatogramlardaki pik sayılarıyla birlikte daha fazla hangi çözücüde çözülmüş olabileceği arasında bağlantı kurmaya çalışmak da aynı zamanda amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis

Propolis bitki tomurcuklarından, filizlerinden ve çeşitli bitki salgılarından bal arıları tarafından toplanan kimyasal olarak kompleks yapışkan, reçineli bir arı ürünüdür (4).

Propolis sözcüğü eski Yunan’ da pro- için ‘ön, giriş’ ve -polis için ‘şehir’ kelimeleri bir araya getirilerek bal arılarının kovan savunması ile ilgili olarak ‘şehrin ya da kovanın savunması’ anlamında kullanılmıştır (2).

Arılar, bitkilerden elde ettikleri reçineyi çiğneyip tükürük enzimleriyle karıştırarak kısmen sindirirler. Toplama esnasında polenle de harmanlanan reçine daha sonra balmumu ile karıştırılır (2, 14). Meydana gelen madde, arılar tarafından kovanın içindeki delikleri kapatmakta, kovanın soğuğa karşı korunmasında, dışarıdan gelen istilacılara karşı kovayı korumakta ve leşlerini mumyalamakta kullanılır (12). Giriş kapısı da dahil olmak üzere tüm kovan en küçük noktasına varıncaya kadar antiseptik bir madde olan propolis ve balmumu karışımı ile sıvanır (6). Arılar kovanda bir leşe karşılaştığı zaman, yine aynı karışımı kullanarak leşi mumyalarlar ve kovan içinde uzun süre bozulmadan muhafaza ederler (15).

Marcucci (16) propolis reçinesindeki (ham, işlenmemiş propolisteki) bileşiklerin üç kaynaktan meydana geldiğini belirtmiştir. Bunlar arılar tarafından toplanan bitki salgıları, arı metabolizmasından salgılanan maddeler ve propolisin dikkatle işlenilmesi esnasında ortaya çıkarılan maddelerdir (2).

Propolis arı kovanının yan ürünüdür. Propolis kovan aracı ile kovanın üst yapısını kazıyan arı yetiştiricileri tarafından toplanır. Bu işlem genellikle her yıl sonbahar mevsiminde balın özü çıkarıldıktan sonra yapılmaktadır. Propolis ve mum karışımı sandıklar, variller veya çuvallar yardımıyla işlenmek üzere nakledilir (2).

Propolis tabletler, kapsüller, diş macunu, ağız gargarası, yüz kremleri, merhemler, losyonlar ve solüsyonlar gibi çeşitli şekillerde piyasaya sunulmaktadır. Propolisin medikal uygulamaları kaynağının yanı sıra, kimyasal bileşimine duyulan önemin de artmasına yol açmaktadır (7).

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis aromatik hoş kokulu ve kaynağına ve yaşına bağlı olarak sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişen renktedir (14). Soğukta sert ve kırılğan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (2). Propolis 60-69 °C arasında erime noktasına sahiptir (17). Propolisin zamanla rengi koyulaşabilir ve kırılğanlaşabilir (2).

İnsan derisinin yağları ve proteinleri ile güçlü bir şekilde etkileştiğinden, propolisi deriden uzaklaştırmak zordur (2).

Propolis su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (13).



Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis (18)

2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin bileşimi bal arıları tarafından çeşitli ağaçlardan toplanan tomurcuk salgılarıyla doğrudan ilişkilidir (19).

Ham propolisin bileşimi arılar tarafından kullanılan bitki kaynağına bağlı olarak çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle % 50 reçine (flavonoidler ve fenolik asit türevlerini

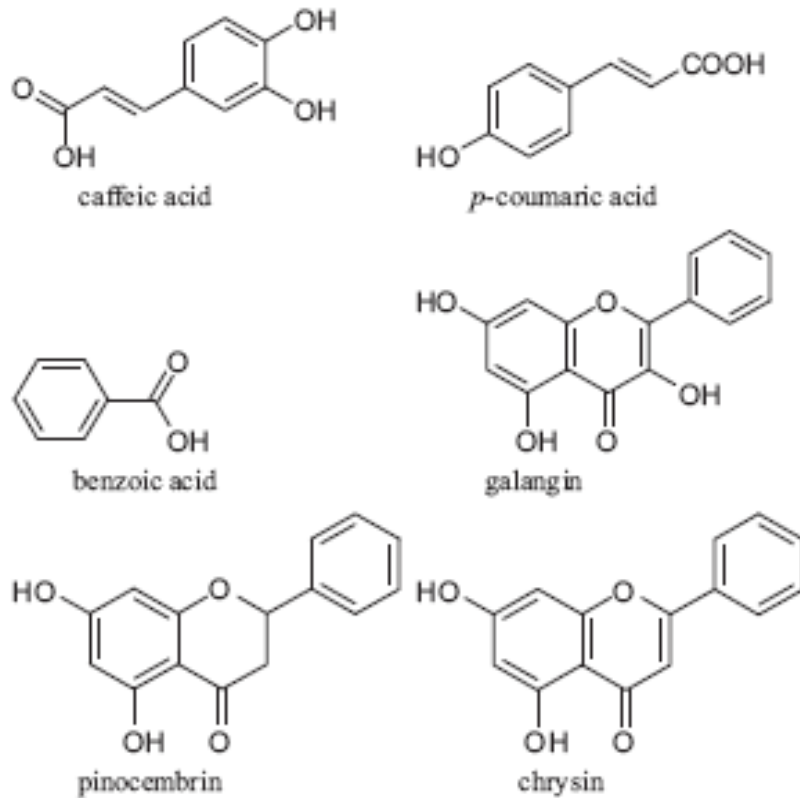
içeren) ve bitkisel balsam, % 30 balmumu, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (2,11).

Propolis polifenoller (flavonoid aglikonlar, fenolik asitler) ve onların esterleri, fenolik aldehytler, alkoller ve ketonlar, sekuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler gibi çeşitli kimyasal yapıları kapsayan 300' den fazla bileşen içermektedir (1,19). Tablo 1' de propoliste bulunan başlıca bileşenler verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (20)

Bileşenler	Ana maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler Terpenler Kumarinler Fenolik asitler ve esterleri	45-55
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden Çoklu doymamış yağ asitleri	25-35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler Serbest aminoasitler Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	5
Diğer maddeler	Eser elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs) Ketonlar Laktonlar Kinonlar Steroidler Şekerler	5

Propolisin yapısında pinosembrin, akasetin, krisin, rutin, kateşin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, apigenin, mirisetin, kuersetin gibi flavonoidlerin yanı sıra kafeik asit ve sinnamik asit gibi fenolik asitler de tespit edilmiştir. Ayrıca propolisin yapısında magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn) ve demir (Fe) gibi elementlerle B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi tanımlanmıştır. Bazı araştırmacılar propolisin süksinat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenozin trifosfataz (ATPaz) ve asit fosfataz gibi enzimler içerdiğini belirtmişlerdir (9). Şekil 2' de propolisin yapısında bulunan fenolik bileşikler arasında yer alan bazı flavonoidler ve fenolik asitler verilmiştir.



Şekil 2. Propolisin yapısında bulunan bazı flavonoidler ve fenolik asitler (21)

2.1.2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

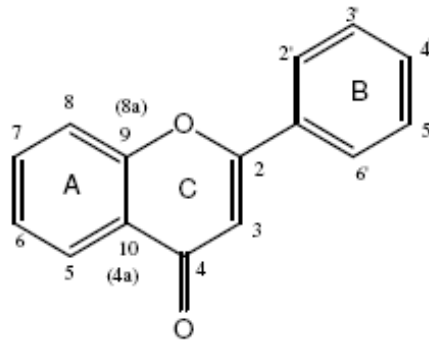
Fenolik bileşikler, farklı yapılar ve geniş bir filogenetik dağılım gösteren ikincil bitki metabolitleridir. Fenolik bileşikleri işlevsel açıdan, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaların birbirine bağlanmasıyla oluşan yapısal elementlere bağlı olarak değişik gruplar şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Bu sınıflandırma fenolik asitler (hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler), stilbenler, ligninler (nonflavonoidler) ve flavonoidler olarak yapılabilir. Flavonoidler flavanoller, antosiyaninler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar gibi çeşitli alt gruplara ayrılmıştır (22).

Fenolik bileşikler, pek çok bitkide renk, koku ve tattan sorumlu olarak önemli duyuşal özellikler içermekle kalmayıp, aynı zamanda oksidatif stres ile ilişkilendirilmiş çeşitli hastalıkların önlenmesinde de anahtar rol oynarlar (22).

Propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan yapılar flavonoidler gibi fenolik bileşiklerdir. Flavonoidler aynı zamanda antioksidan aktiviteden de sorumludur. Bu bileşenlerin antioksidan aktivitesi özellikle radikal temizleme etkisine dayanmaktadır (19).

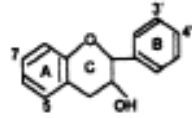
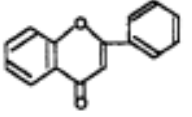
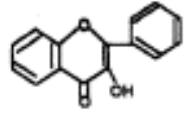
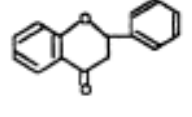
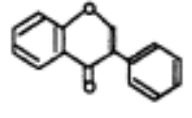
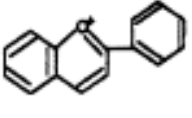
2.1.2.2. Flavonoidler

Biyosentetik olarak fenilalaninden türetilen flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan pigmentlerdir. Flavonoidler oksijen içeren heterosiklik altı üyeli halkayı çevreleyen, iki aromatik halkaya sahiptir. Aslında flavonoidler difenilpropanın türevleri olarak da nitelendirilmektedir (23). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 3' te gösterilmiştir.



Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı (24)

Besinsel flavonoidler genellikle glikozillenmiştir ve antosiyaninler, flavanoller (kateşinler), flavonlar, flavanonlar ve flavonoller olarak sınıflandırılabilir. Bunlardan son üç tanesi antoksaninler olarak adlandırılır. Flavonoidler neredeyse bütün bitkilerde bulunmaktadır. Flavanonlar ve flavonlar çoğunlukla aynı bitkide (sıklıkla turunçgillerde) bulunurken, ne flavonlar ve flavonoller ne de flavanonlar ve antosiyaninler genel olarak birlikte bulunmamaktadır. Baklagillerde kayda değer yoğunlukta bulunduğu için izoflavonlar genellikle bu beş alt gruptan ayrı olarak ele alınır (23). Şekil 4' te besinsel flavonoidlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinose 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinose
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

Şekil 4. Flavonoidlerin sınıflandırılması (25)

Flavonoidler hidrojen verici, radikal süpürücü antioksidanlardır. Demir iyonları ile kompleks oluşturan flavonoidler, hidroksil radikali oluşturan Fenton reaksiyonunu baskılar. Flavonoidler alerjiler, inflamasyon, virüsler, hipertansiyon, eklem iltihapları, mutasyonlar ve karsinojenler, kanser ve AIDS' e karşı aktivite gösterirler. Polifenoller cGMP ve cAMP fosfodiesteraz, ksantin oksidaz ve elastazı inhibe ederler (23).

Antioksidan aktiviteler, metal şelatlama ve antiproliferatif, antikarsinojenik, antibakteriyel, antiinflammatuar, antialerjik ve antiviral etkiler içeren flavonoidlerin insan sağlığı açısından bir takım faydaları vardır (26).

Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerin en büyük grubu, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan flavonoidler olarak ifade edilmektedir (2,27). Bu bileşikler ikincil bitki metabolitleridir ve insanlar tarafından sentezlenemedikleri için, insan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (27). Tablo 2' de propolisin içeriğinde bulunan flavonoid çeşitleri verilmiştir.

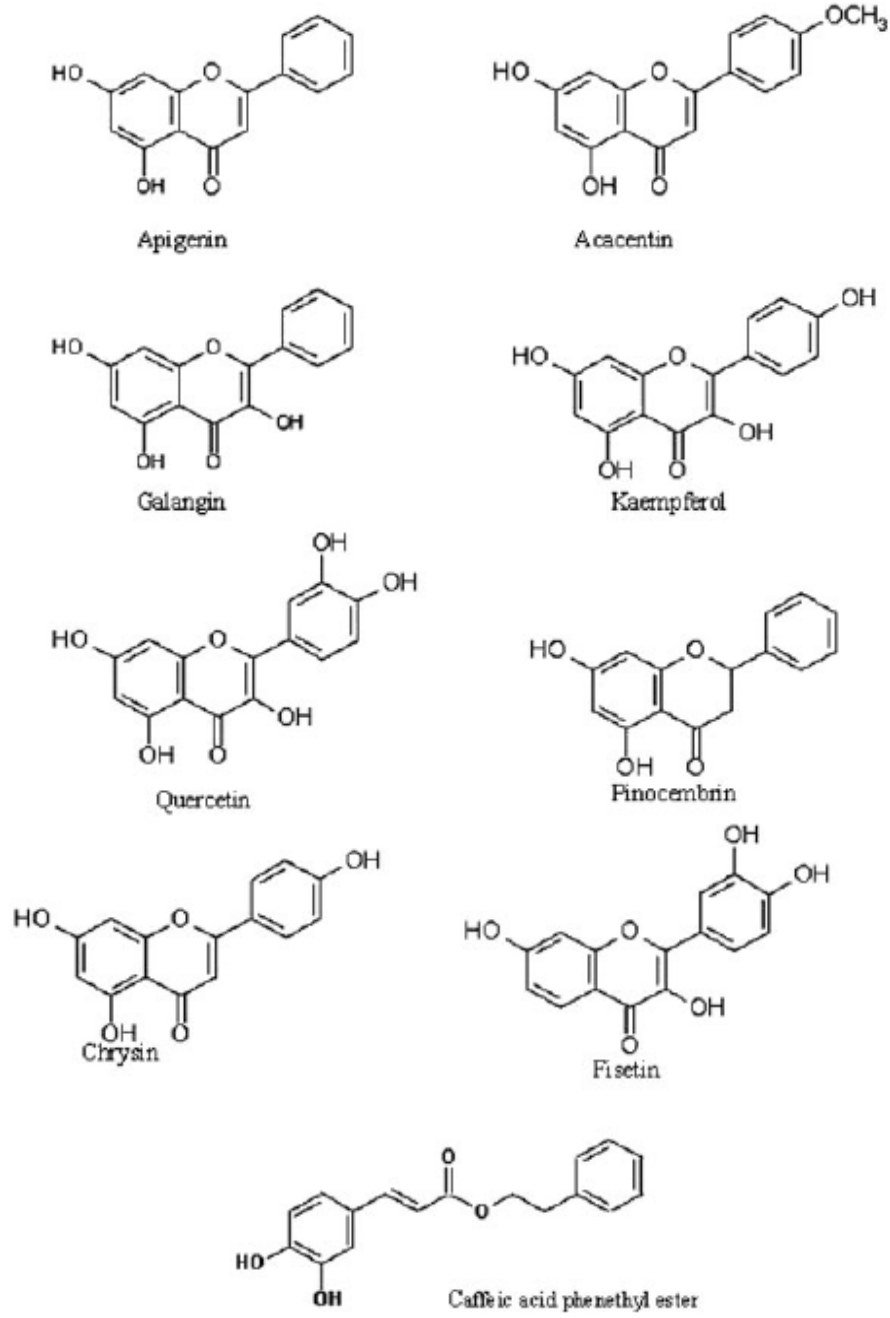
Tablo 2. Propolis içeriğinde bulunan flavonoid çeşitleri (28)

Flavonoid Çeşidi	Bileşik
Flavonoller	Kuersetin, kaempferol, galangin, fisetin
Flavononlar	Pinosembrin, naringin, hesperidin
Flavonlar	Apigenin, akasetin, krisin, luteolin

Bugüne kadar propoliste galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostrobin, pinobanksin gibi bileşikleri içeren en az 38 flavonoid tespit edilmiştir. Propolisin fenolik bileşiklerinden bazıları ise sinnamil alkol, sinnamik asit, vanillin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik ve ferulik asitlerdir (6). Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin ve kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) kimyasal yapıları Şekil 5' te gösterilmiştir.

Propolisin süperoksit anyonunun oluşumunu engellediği rapor edilmiştir. Ayrıca propolisin, karaciğerde sentezlenen ve radikal temizleme aktivitesine sahip olan glutatyon tüketimini zıt yönde etkilediği belirlenmiştir (19).

Propolisin içinde yoğun olarak bulunan flavonoidler güçlü antioksidanlardır ve serbest radikalleri temizleme kapasitesine sahip oldukları ve böylelikle hücre membranındaki lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu oldukları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Diğer faktörler ile birlikte aktif serbest radikallerin, hücresel yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklar, eklem iltihapları, kanser, diyabet, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi bu tür durumlardaki kötüleşmelerden sorumlu oldukları düşünülmektedir (6).



Şekil 5. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin ve kafeik asit fenetil esterin (CAPE) kimyasal yapıları (28)

2.1.3. Propolisin Bitkisel Kaynağı

Propolisin en önemli kaynağını kavak, kızılgaç, huş ağacı, kestane, dişbudak ağacı ve çeşitli *Pinus* (çam) ve *Salix* (söğüt) türleri gibi bitkiler oluşturmaktadır. Ham propolisin kimyasal yapısını arı mumunun içeriğindeki çeşitlilik etkiler (6).

Propolisin kimyasal bileşimi, arıların dolaştığı her bir bölgenin bitki örtüsündeki biyolojik çeşitlilikten dolayı büyük ölçüde değişken ve komplekstir. Buna rağmen, ılıman bölgelerde propolisin başlıca kaynağını *populus* olarak adlandırılan kavak türlerinin tomurcuk salgılarının oluşturduğu birkaç istisna da vardır. Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Asya’ da propolis ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde bu sonuçlara ulaşılmıştır. Bununla birlikte Avrupa propolisi örneklerinin kavak kökenli olmadığı da ifade edilmiştir (29).

Öte yandan kavağın bulunmadığı tropikal bölgelerde arılar, propolis üretmek için diğer bitki kaynaklarını kullanırlar. Sonoran Çölü’ nde propolisin bitkisel kaynağını *Ambrosia deltoidea* bitkisi oluşturmaktadır. Venezuela’ dan elde edilen propolis örneklerindeki bazı bileşiklerin, *Clusia* türlerinde (Guttiferae) ortaya çıkarılan bileşenler ile aynı olduğu belirlenmiş ve bu da bu bitki türlerinin, ilgili bölgedeki propolis üretiminin kaynağı olduğunu göstermiştir. Güneybatı Brezilya’ da *Araucaria* spp. ve *Baccharis* spp. türleri propolis için kabul edilen bitki kaynakları olarak tanımlanmıştır (29).

Bundan dolayı farklı coğrafik bölgelerdeki propolisin bileşiminin farklı olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bazı biyolojik aktivitelerin varlığı veya şiddeti de farklı olmaktadır. Bununla birlikte aynı ülke propolislerinin bileşimi de bölgeye ve toplanma zamanına göre, kalitatif ve kantitatif olarak farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, bazı yazarlar, Brezilya’ nın farklı bölgelerindeki propolisin kimyasal olarak 12 tipte sınıflandırıldığını belirtmişlerdir (29). Tablo 3’ te propolisin içeriğindeki farklılıklar, iklim, coğrafik bölge ve bitki türüne göre özetlenmiştir.

Tablo 3. Propolisin içeriğinin iklim, coğrafik bölge ve bitki türüne göre değişimi (28)

İklim Türü	Coğrafik Bölge	Yaygın Bitki Türü	Propolis İçeriği
Ilıman Bölge	Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Batı Asya	Çeşitli kavak ağacı türleri (<i>Populus</i> spp.) yaygın bitki türüdür. Kavak tomurcuğu, fenolik bileşiklerin zengin bir kaynağıdır.	Fenolik bileşikler açısından zengindir: Flavonoidler, aromatik asitler ve esterlerini içerir.
Tropikal Bölge	Avusturalya, Güney Amerika, Venezuela, Brezilya	Kavak ağacı yoktur. <i>Clusia minor</i> , <i>Clusia major</i> , <i>Araucaria heterophylla</i> , <i>Baccharis dracunculifolia</i> ve farklı türleri yaygın bitki türleridir.	di- ve tri-terpenler açısından zengindir. <i>p</i> -kumarik asit, prenilenmiş <i>p</i> -kumarik asit, dihidroksisinnamik asit içerir. Flavonoidler, bitki aleminde geniş bir şekilde yayıldığı için flavonoid de içerir, fakat az miktardadır. Artepillin C (Brezilya propolisinde)

2.1.4. Propolisin ve İçeriğinde Bulunan Bileşenlerin Biyolojik Aktiviteleri

Propolis, kompleks kimyasal bileşiminden dolayı halk tıbbında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Propolisin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikaryojenik, antiülser, immünomodülatör, antiinflammatuar, antioksidan, hepatoprotektif, anestezik, antitümöral, antikanser, radyoprotektif, nöroprotektif, antiproliferatif ve tümör indüklü anjiogeneze karşı koruyucu gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan değişik araştırmalarla gösterilmiştir (28).

Bitki kaynağı ve toplanma bölgesi propolisin biyolojik aktivitesinde büyük önem taşımaktadır (19). Flavonoidler gibi fenolik bileşikler propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan yapılardır (30). Farklı yapısal özelliklere sahip olan flavonoidler biyolojik aktivitelerinde önemli çeşitlilikler gösterir (31). Flavonoidlerin hayvan sistemlerindeki biyokimyasal etkileri; biyolojik polimerlere bağlanma eğilimi, ağır metal iyonlara bağlanma, elektron taşınmasının hızlandırılması ve serbest radikalleri yakalama yeteneği olmak üzere dört kategoriye ayrılmaktadır (2).

Flavonoidlerin antiinflammatuar, antihepatotoksik, antikanser, antiviral ve antibakteriyel aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Yaygın bir görüşe göre,

flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu yetenek göstermeleri ile ilişkilidir (32).

Propolis çeşitli enzim sistemlerinin uyarılmasında, hücre metabolizmasında, dolaşımında ve kollajen oluşumunda etki göstermekle birlikte, yanık yaralarının iyileşmesinde de etkili olmaktadır. Bütün bu etkilerin propoliste bulunan argininin varlığının bir sonucu olduğu belirlenmiştir (6). Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin, özellikle kafeatların antibakteriyel, antiviral ve antioksidan etkileri bilinmektedir (11).

Tablo 4' te propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri özetlenmiştir.

Brezilya propolisindeki önemli farmakolojik olarak aktif yapılar flavonoidler, fenolik asitler ve esterleridir. Kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve 3,5-diprenil-4-hidroksisinnamik asit (artepillin C) gibi bazı spesifik propolis bileşenlerinin kansere karşı koruyucu ajan olduğu düşünülmektedir (37).

Kujumgiev ve arkadaşlarına göre (15) tek bir propolis bileşeni toplam ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip değildir ve bundan dolayı propolisin genel biyolojik özellikleri kendi bileşenlerinin doğal karışımından ileri gelmektedir (38).

Propolisin bileşiminin çeşitlilik göstermesi, medikal uygulamaları ve standardizasyonunda problem oluşturmaktadır. Bu nedenle propolis ile yapılacak olan biyolojik çalışmalar, o propolisin bitkisel kaynaklarının ve kimyasal bileşiminin belirlenmesi ile gerçekleştirilmelidir (38).

Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (13,28, 33,34,35,36)

Bileşik	Biyolojik Aktiviteler
Galangin	Antiinflammatuar, antioksidan, antiviral, antibakteriyel, hepatoprotektif, antimikrobiyal
Kafeik asit fenil ester (CAPE)	Antiinflammatuar, antibakteriyel, antitümöral, antikanser, hepatoprotektif, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, tümör sitotoksik
Kafeik asit	Antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflammatuar, antimikrobiyal, antitümöral
Krisin	Antiinflammatuar, antiviral
İzopentil ferulat	Antiviral
Akasetin	Antiviral, antioksidan, antiinflammatuar
Sakuranetin	Antimikrobiyal, antifungal
Pigenin	Antiviral
Kaempferol	Antiviral, antiülser, antimikrobiyal
Kuersetin	Antiviral, antibakterial, antihistamin, antiülser, kapiller güçlendirici, antitümöral, yara iyileştirici
Rutin	Antiviral
Hesperitin	Antiülser
Naringin	Antiülser
Luteolin	Antiviral, antitümöral
Pinosembrin	Antibakteriyel, antifungal, lokal anestezi, antimikrobiyal
Pinostrobin	Lokal anestezi
Pinobanksin	Antimikrobiyal, antifungal
Pinobanksin 3-asetat	Antimikrobiyal
Benzil <i>p</i> -kumarat	Antitümöral
Benzil ester	Antifungal
Pterostilben	Antifungal
Ferulik asit	Antimikrobiyal
Prenillenmiş <i>p</i> -kumarik asit	Antibakteriyel, sitotoksik
Diterpenik asitler	Antibakteriyel, sitotoksik
Kafeoilkuinik asit türevleri	İmmunomodulatör, hepatoprotektif
Dikafeoilkuinik asit türevleri	Güçlü antioksidan
Artepillin C (Brezilya propolisi)	Antitümöral
Propol (Brezilya propolisi)	Güçlü antioksidan

2.1.5. Propolisin Antioksidan Aktivitesi

Antioksidanlar, membran lipidleri, protein ve DNA'ya zarar veren reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oluşturulan hasara karşı vücudumuzu korumak gibi insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler göstermektedirler ve kardiyovasküler hastalıklar, şeker hastalığı

(diabetes mellitus), kanser ve Alzheimer gibi birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadırlar (39).

Antioksidanlar oksidanları inaktif hale getirmek için dört şekilde etki ederler. Bunlar;

- 1) *Süpürücü etki (scavenging)*; antioksidan enzimler tarafından serbest oksijen radikalleri tutar veya daha zayıf bir moleküle dönüştürür.
- 2) *Bastırıcı etki (quencher)*; vitaminler ve flavonoidler serbest oksijen radikallerine bir H⁺ ekleyip aktivitelerini azaltır veya tamamen inaktif şekle dönüştürür.
- 3) *Onarıcı etki (repair)*; DNA' da oluşan hasarları azaltır, oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarır.
- 4) *Zincir kırıcı etki (chain breaking)*; hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlar ve inaktive eder (40,41).

ROS' ların düzeyini kontrol eden ve stres koşulları altında hücreleri koruyan memeli dokuları, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GSH) gibi ROS' ları temizleyen çeşitli enzimler içerir. Propolis gibi bazı bileşikler de ROS' lardan kaynaklanan detoksifikasyon sürecine katkıda bulunur (30).

Propolisin en önemli antioksidan mekanizması serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipid peroksidasyonuna neden olan polimer zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile ROS' ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (40).

Flavonoidler, fenolik asitler ve tanninler gibi fenolik bileşikler gıdaların antioksidan potansiyeline katkı sağlayan başlıca bileşikler olarak düşünülmektedir. Polifenollerin antioksidan aktivitesi büyük ölçüde serbest radikalleri etkisizleştirici rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca antioksidanlar sinerjistik yolla birbirini etkilerler ve herhangi birinin diğerini oksidatif hasara karşı koruyabildiği ayrı ayrı etkilere sahiptirler (42).

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlara karşı propolisin koruyucu etkisinin içerdiği flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme yeteneğinden ileri geldiği belirtilmektedir (40).

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin radikal temizleme ve metal şelatlama olmak üzere iki önemli etkiye dayandığı düşünülmektedir (31). Flavonoidler antioksidan özelliklerini yapılarındaki hidroksil gruplar, O-metillenmiş gruplar, 2. ve 3. karbon arasındaki çift bağ (doymamış yapı) ve 4. karbondaki bulunan karbonil grubu (4-okso grubu), karbohidrat birimleri ve 3',4'-katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (25,31).

Flavonoidler ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşimine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki sübstitüentlerin uzaysal yerleşimi flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu antioksidan aktiviteden daha yüksek olabilmektedir. Pek çok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de hidroksil gruplarının toplam sayısının antioksidan aktiviteyi büyük ölçüde etkilediği görülmüştür (25).

B-halkasının hidroksil konfigürasyonu ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) temizlenmesinde en önemli belirleyici etkindir. B-halkasındaki hidroksil grupları, hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirir (25).

B-halkasındaki 3',4'-katekol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır. Bu yerleşim peroksil, süperoksit ve peroksinitrit radikallerini temizleyen çoğu antioksidanın en dikkat çekici özelliğidir. Örneğin peroksil radikal temizleme yeteneğine sahip luteolin, kaempferolden daha güçlü antioksidandır. Her ikisi de aynı hidroksil konfigürasyonuna sahiptir, ancak kaempferol B-halkasındaki katekol yapısından yoksundur. Katekol veya *o*-trihidroksil (pirogallol) sistemlerinden yoksun flavonlar nispeten kararsız radikaller oluşturur ve zayıf temizleyicilerdir (25).

Flavonoidlerde bulunan heterohalkanın antioksidan aktivitedeki yeri, serbest 3-OH grubunun varlığına ve aromatik halkalar arasındaki uygun konjugasyona bağlıdır. Flavonoidler tarafından serbest radikallerin temizlenmesi en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4'-katekol yapısına sahip flavonoidler radikallere karşı daha etkilidir. Kuersetin, mirisetin ve kaempferol gibi flavonollere nazaran, bir flavon olan luteolin çok zayıf DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme yeteneğine sahiptir (25).

Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri yapıya bağlanan hidroksil grubu sayısına göre artarken, bağlanan karbohidrata ve karbohidratın cinsine göre de azalmaktadır (43).

2.1.6. Propolisin Kullanım Alanları

Propolis kullanımı MÖ 300 gibi çok eski çağlara kadar dayanmaktadır ve dünyanın birçok bölgesinde hem internal hem de eksternal olarak halk tıbbında ve modern tıpta ilaç olarak kullanılmaktadır (38).

Propolis bugün de halen popüler bir ilaç olarak kullanılmaktadır ve kapsül şeklinde (katkısız (saf) ya da aloe jel ve rosa canina (kuşburnu) veya polen ile karıştırılmış her iki formda), ekstrakt olarak (hidroalkolik ve glikolik), gargara olarak (melisa (oğulotu), adaçayı, ebegümeci ve/veya biberiye ile karıştırılmış), boğaz pastili, krem ve toz şekillerde (gargara ya da suda çözündürülüp içilebilecek şekilde kullanılarak) mevcuttur. Aynı zamanda mumun uzaklaştırılmasıyla saflaştırılmış ürün şeklinde ticari olarak piyasada bulunmaktadır. Propolisin ayrıca kozmetiklerde ve sağlıklı gıdaların bir ögesi olarak faydalı olduğu iddia edilmektedir (44).

Yararlı kullanımlarına zıt olarak propolis, bazı toksik ve alerjik etkilere de sahiptir. Propolisin yapısındaki 1,1-dimetilallil kafeik asitin alerjiden sorumlu bileşen olduğu belirlenmiştir (35). Burdock' a göre propolis toksik değildir ve insanlar için güvenli konsantrasyonun 1,4 mg/kg/gün veya ortalama 70 mg/gün olabileceğini önermektedir (2).

2.1.7. Propolisin Çözücüler ile Yapılan Ekstraksiyonu

Propolis ham halde kullanılamaz. Bu nedenle çözücülerle yapılan ekstraksiyon ile saflaştırılmalıdır. Bu süreçte inert maddeler uzaklaştırılmalı, yararlı etkileri propolisin diğer bileşenlerinden çok daha fazla olan polifenolik kısımlar ise korunmalıdır (11).

Yapılan çeşitli çalışmalarda propolisin sulu, etanollü, metanollü, eter ve yağ ekstraktları hazırlanarak, suda çok az çözüldüğü, etanol ve metanolde ise daha iyi çözüldüğü belirlenmiştir. Bunun yanı sıra propolisin, eter ya da kloroformda tamamen, hidrokarbon çözücülerde ise çok az miktarda çözüldüğü tespit edilmiştir (13).

Propolisin içeriğindeki bileşiklerin çoğu lipofilik bileşiklerdir. Bu bileşikleri etanol kullanarak ekstrakte etmek kolay olduğu için propolisin etanollü ekstraktı iyi bilinmektedir ve bundan dolayı daha cazip hale gelmiştir. Buna karşılık propolisin sulu ekstraktı ile ilgili yapılan az sayıdaki yayına rağmen propolisin sulu ekstraktı ve kafeoilkuinik asitleri içeren temel bileşenlerinin, propolisin etanollü ekstraktı ve içeriğindeki bileşenlerden daha yüksek antioksidan etkilere, bazı enzimlere karşı daha yüksek inhibitör aktivitesine ve daha yüksek absorbansa sahip olduğu belirtilmiştir (45).

Farklı çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edeceği için propolis ekstraksiyon metodları, propolisin aktivitesini etkileyebilmektedir. Biyolojik ölçümlerde çok daha yaygın olarak kullanılan ekstraktlar, farklı konsantrasyonlardaki etanol, metanol ve sudur (38).

Çeşitli matrislerdeki polifenollerin analizi için ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), HPLC-kütle spektrometrisi ve kapiller elektroforez (CE) gibi çok daha etkili analitik ayırma yöntemleri geliştirilmiştir (11).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar ve Malzemeler

Etüv (Gallenkamp Plus Oven), çalkalayıcı inkübatör (Biolab SHEL Lab Shaking Incubator), hassas terazi (METTLER TOLEDO AB204-S), buzdolabı (+4 °C, -80 °C), santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5804 R), mikrosantrifüj (Thermo Electron Corporation IEC Micromax Microcentrifuge), liyofilizatör (TELSTAR Cryodos), mikropleyt okuyucu (Molecular Devices Versa max microplate reader), pH metre (Hanna Instruments), termomikser (Eppendorf 1,5 ml Thermomixer Comfort), manyetik karıştırıcı (TERMAL), vorteks (IKA® VORTEX GENIUS 3), otomatik pipetler (Socorex Acura 825 autoclavable 100-1000 µL, 10-100µL, 1-10 µL), çoklu otomatik pipetler (Socorex Acura 855 autoclavable 40-350 µL, 5-50 µL), mavi pipet ucu (200-1000 µL), sarı pipet ucu (0-200 µL), beher, balon joje, mezür, cam pipet, adi balon, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, piset, ependorf tüpler (1.5 ml), falkon tüpler (50 ml), 0.45 µm' lik membran filtre (Agilent Technologies), ultrasonik banyo (GEN-PROBE), HPLC (Agilent 1100 Series), C₁₈ kolon (HICHROM LICHROSPHERE RP18-5 25 cm × 4.0 mm id LISPRP18-5-250AF), HPLC cihazı (Agilent 1100 Series), kolon (Agilent 1100 Series, G1316A COLCOM), enjektör (Agilent 1100 Series, G1313A ALS), pompa (Agilent 1100 Series, G1311A QuatPump), degasser (Agilent 1100 Series, G1379A DEGASSER), dedektör (Agilent 1100 Series, G1365B MWD).

3.1.2. Kimyasal Maddeler

HPLC grade su, Etanol (Riedel-de Haën, 32221), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Carlo Erba, 445103), Gliserol (Merck, K10920193), Aseton (Merck, K39156414), Gallik asit (Sigma, G7384), Kuersetin dihidrat (Fluka, 83370), Troloks ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) (Fluka, 56510), Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Lancaster, 13098), Folin & Ciocalteu's fenol reaktifi (Sigma, F9252), Aluminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (Fluka, 06274), Potasyum asetat (KCH_3COO) (Merck, K32043020), Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, K1305445), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, K16290176), Potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (Lancaster, 13746-66-2), Trikloroasetik asit (ABCR, AB119247), Demir (III) klorür (Sigma, F7134), TAS kiti (Rel Assay Diagnostics, RL011), Hidroklorik asit (Sigma-Aldrich, 07102).

3.2. Metodlar

3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

S. S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifi tarafından, Trabzon ilinin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelenip tekrar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de donduruldu. Rendelenen propolis blendırda toz haline getirilerek, hassas terazide 0,5' er g tartılıp 50 ml' lik beş ayrı falkon tüpüne aktarıldı. Herbir falkon tüpüne 20' şer ml saf haldeki su, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, aseton ilave edilerek beş ayrı çözücü ile muamele edilmiş propolis örnekleri vortekslendi ve çalkalayıcı inkübatörde $60\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 150 rpm' de 24 saat süreyle çözünmesi için sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası propolis ekstraktları 4000 rpm' de 10 dakika santrifüjlendi ve süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Böylece 25 mg/ml' lik sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu stok propolis ekstraktları hazırlanmış oldu ve gerekli denemelerde kullanılmak üzere buzdolabında $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ' de, karanlıkta saklandı. Daha sonra hazırlanan sulu, etanollü ve DMSO' lu ekstraktlardan 5' er ml alınarak küçük adı balonlara konuldu ve $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda propolis ekstraktlarından liyofilize örneklerin hazırlanması için liyofilizatöre konuldu ve 6 saat sonra cihazdan alındı. Liyofilize örneklere tekrar 5' er ml kendi çözücülerinden eklenerek

karıştırıldı ve +4 °C' de, karanlıkta saklandı. Bu şekilde normal ve liyofilize ekstraktlar hazırlanmış oldu.

3.2.2. Ekstraktlarda Toplam Polifenol İçerik Tayini

Ekstraktların toplam polifenol içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metod, fosfotungstik asitin ($H_3P[W_3O_{10}]_4$) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan fosfotungstik mavisinin absorpsiyonu, aromatik fenolik grupların sayısı ile orantılıdır ve toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanılır (46).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- % 20' lik Na_2CO_3 Çözeltisi : 10 g Na_2CO_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 ml' ye tamamlandı.
- 1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi : 1 ml 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 ml saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltilti. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.
- Standartlar : 0.01 g gallik asit 1 ml saf su ile çözülerek 10 000 $\mu g/ml$ ' lik gallik asit standardı elde edildi. Bundan 1000 $\mu g/ml$ ' lik standart hazırlanarak saf su ile çözülmüş 150, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 $\mu g/ml$ ' lik gallik asit standartları meydana getirildi.

Deneyin Yapılışı

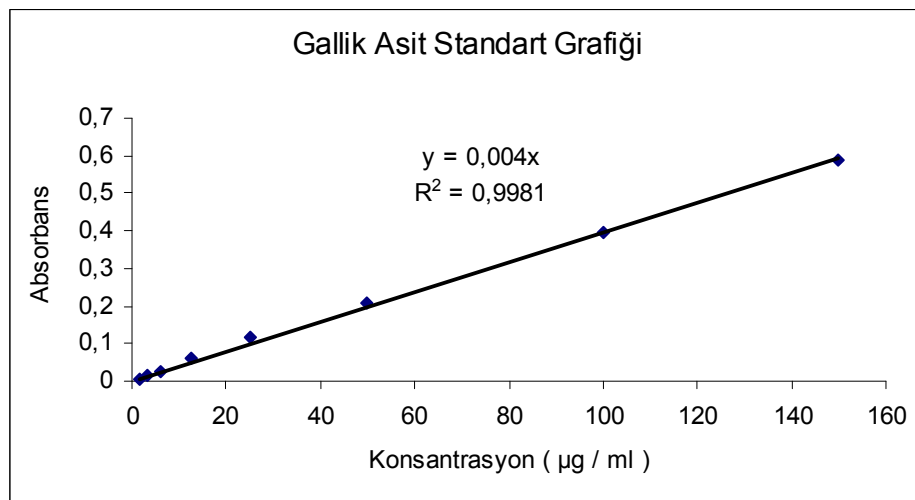
Ekstraktlar ve körler 1:50 oranında saf su ile seyreltilti.

Tablo 5' teki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroplyette yapıldı (47).

Tablo 5. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su / Etanol / DMSO / Gliserol / Aseton	12.5 µl	-	-
Ekstrakt	-	12.5 µl	-
Standart	-	-	12.5 µl
1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi	62.5 µl	62.5 µl	62.5 µl
% 20' lik Na ₂ CO ₃	125 µl	125 µl	125 µl
Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.			
700 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.			

Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak µg/ml olarak hesaplandı. mg Gallik asit / g propolis şekline aşağıdaki hesaplamayla dönüştürüldü. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n = 3).



Şekil 6. Toplam polifenol içerik tayini için gallik asit standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – Kör absorbansı

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki } x' \text{ in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (50)}}{25}$$

Çalışmamızda standart grafiğindeki x' in katsayısı Şekil 6' ya göre 0,004 olarak bulundu. Buradaki 25 rakamı 25 mg/ml' lik propolis ekstraktından dolayıdır.

3.2.3. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini

Ekstraktların toplam flavonoid içeriği, Alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir. Metodun prensibi, $AlCl_3$ ' ün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak, $AlCl_3$, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile kompleks oluşturur (48). Bu metoda göre standart olarak kuersetin kullanılır (49).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- % 80' lik Etanol Çözeltisi : 80 ml' lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- % 10' luk $Al(NO_3)_3$ Çözeltisi : 2.5 g $Al(NO_3)_3$ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 ml' ye tamamlandı.
- 1 M KCH_3COO Çözeltisi : 2.454 g KCH_3COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 ml' ye tamamlandı.
- Standartlar : 0.01 g kuersetin 802 μ l saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 μ l' ye tamamlandı. 10 000 μ g/ml' lik kuersetin standardı elde edildi. Bundan 1000 μ g/ml' lik standart hazırlanarak % 80' lik etanol ile çözülmüş 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 μ g/ml' lik kuersetin standartları meydana getirildi.

Deneyin Yapılışı

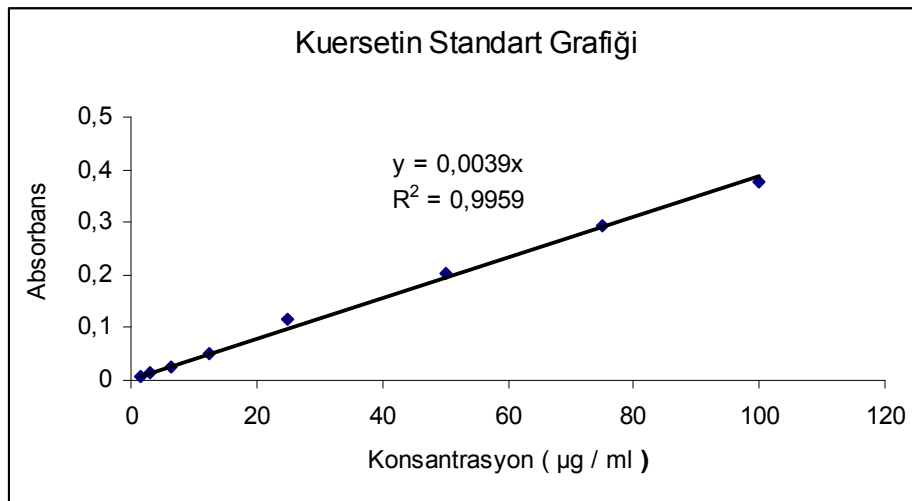
Ekstraktlar ve körler 1:20 oranında saf su ile seyreltildi.

Tablo 6' daki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroplyette yapıldı (50).

Tablo 6. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su / Etanol / DMSO / Gliserol / Aseton / % 80' lik Etanol	20 µl	-	-
Ekstrakt	-	20 µl	-
Standart	-	-	20 µl
% 80' lik Etanol	172 µl	172 µl	172 µl
% 10' luk Al(NO ₃) ₃	4 µl	4 µl	4 µl
1 M KCH ₃ COO	4 µl	4 µl	4 µl
Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi.			
415 nm' de mikropleyt okuyucuda absorpsiyon ölçüldü.			

Sonuçlar kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak µg/ml olarak hesaplandı. mg Kuersetin / g propolis şekline aşağıdaki hesaplamayla dönüştürüldü. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n = 3).



Şekil 7. Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – K r absorbans

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki } x' \text{ in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (20)}}{25}$$

Çalışmamızda standart grafiğindeki x' in katsayısı Şekil 7' ye göre 0,0039 olarak bulundu. Buradaki 25 rakamı 25 mg/ml' lik propolis ekstraktından dolaydır.

3.2.4. Ekstraktlarda Demir (Fe^{+3}) İndirgeyici Güç Tayini

Antioksidanlar gibi indirgen maddelerin varlığı Fe^{+3} -ferrisiyanür kompleksinin Fe^{+2} ye indirgenmesine neden olmaktadır. Bu metodda, test edilen örneğin indirgenme gücüne bağlı olarak test  zeltisinin rengi sarıdan yeşile döner. Oluşan yeşil renk 700 nm' de maksimum absorbans verir ve artan absorbans artan indirgenme kuvvetini gösterir (51). Bu metoda göre standart antioksidan bileşik olarak troloks kullanılır (52).

Kullanılan  zeltilerin Hazırlanışı

- 0.2 M pH:6.6 Fosfat Tamponu : 2.137 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.121 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak karıştırıldı. Saf su eklenerek 90 ml' ye kadar üzüldü. Daha sonra pH' sı 6.6' ya ayarlanarak hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- % 1' lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  zeltisi : 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartıldı, saf su ile üzülüp hacmi 100 ml' ye tamamlandı.
- % 10' luk TCA  zeltisi : 5 g TCA tartıldı, saf su ile üzülüp hacmi 50 ml' ye tamamlandı.
- % 0.1' lik FeCl_3  zeltisi : 0.1 g FeCl_3 tartıldı, saf su ile üzülüp hacmi 100 ml' ye tamamlandı.
- Standartlar : 0.001 g troloks 1 ml saf etanol ile üzülerek 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ' lik troloks standardı elde edildi. 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ' lik standarttan saf etanol ile  z lm ş 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953 ve 0.977 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ' lik troloks standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

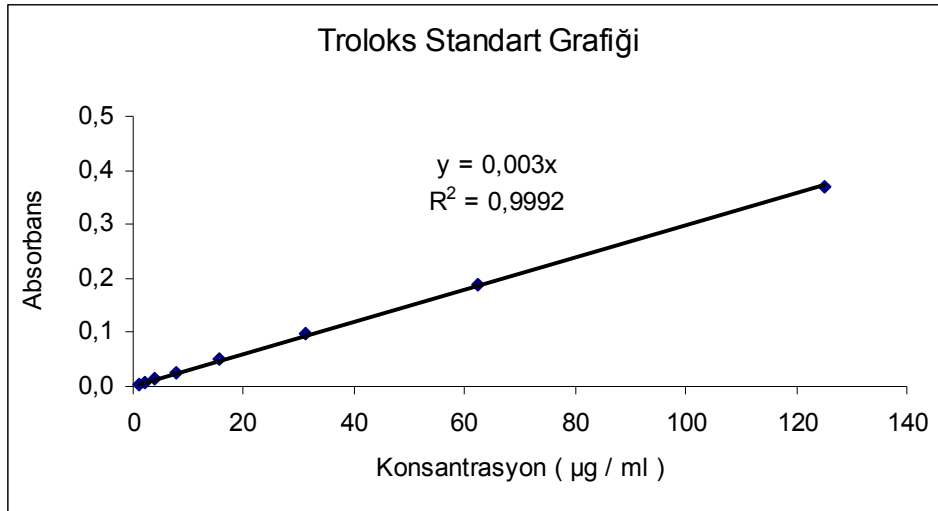
Ekstraktlar ve körler 1:100 oranında saf su ile seyreltildi.

Deney modifiye edilerek spektrofotometrik küvetler yerine Tablo 7' deki pipetlemelerin ilk altı aşaması 1,5 ml' lik ependorflarda, sonraki aşamalar ise 96 kuyucuklu mikroplyette yapıldı (53).

Tablo 7. Propolisin sulu, etanolü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini

	Kör	Numune	Standart
Su / Etanol / DMSO / Gliserol / Aseton / % 80' lik Etanol	40 µl	-	-
Ekstrakt	-	40 µl	-
Standart	-	-	40 µl
0.2 M pH:6.6 Fosfat Tamponu	100 µl	100 µl	100 µl
% 1' lik $K_3Fe(CN)_6$	100 µl	100 µl	100 µl
50 °C' de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
% 10' luk TCA	100 µl	100 µl	100 µl
3000 g' de 10 dakika santrifüj edildi.			
Üstteki fazlardan 100' er µl alınarak 96 kuyucuklu mikroplyette aktarıldı.			
Saf su	100 µl	100 µl	100 µl
% 0.1' lik $FeCl_3$	20 µl	20 µl	20 µl
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.			
700 nm' de mikroplyet okuyucuda absorbans ölçüldü.			

Sonuçlar troloks standart grafiğinden yararlanılarak µg/ml olarak hesaplandı. mg Troloks / g propolis şekline aşağıdaki hesaplamayla dönüştürüldü. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n = 3).



Şekil 8. Demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini için troloks standart grafiği

Net absorbans = Ortalama absorbans – K r absorbansı

$$\frac{\text{Net absorbans}}{\text{Standart grafiğindeki } x' \text{ in katsayısı}} \times \frac{\text{Dilüsyon katsayısı (100)}}{25}$$

Çalışmamızda standart grafiğindeki x' in katsayısı Şekil 8' e göre 0,003 olarak bulundu. Buradaki 25 rakamı 25 mg/ml' lik propolis ekstraktından dolayıdır.

3.2.5. Ekstraktlarda Toplam Antioksidan Statü (Total Antioxidant Status-TAS) Tayini

Toplam antioksidan statüyü belirlemek amacıyla Rel Assay Diagnostics tarafından üretilen ticari kit (LOT: RL011) kullanıldı. Bu metoda göre, örnekteki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikal şeklinden, renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgenir. 660 nm' de absorbansın değişimi örneğin toplam antioksidan kapasitesi ile ilişkilidir. Tayin, vitamin E analogu olan ve Troloks eşdeğeri (Troloks Equivalent) olarak adlandırılan kararlı standart antioksidan  ozelti olarak kullanılan referans madde ile kalibre edilir.

Kullanılan Reaktifler

- Reaktif 1 : Analiz tamponu
- Reaktif 2 : Renkli ABTS radikal çözeltisi
- Standartlar : Standart 1 (0,0 mmol Troloks Equiv. / L)
Standart 2 (1,5 mmol Troloks Equiv. / L)

Deneyin Yapılışı

Ekstraktlar ve körler 1:20 oranında saf su ile seyreltildi.

Tablo 8' deki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı.

Tablo 8. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam antioksidan statü (TAS) tayini

	Numune	Standart
Ekstrakt	10 µl	-
Standart	-	10 µl
Reaktif 1	160 µl	160 µl
660 nm' de mikropleyt okuyucuda ilk absorbands (A1) ölçüldü.		
Reaktif 2	25 µl	25 µl
Oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.		
660 nm' de mikropleyt okuyucuda ikinci absorbands (A2) ölçüldü.		

A1 değerleri A2 değerlerinden çıkarılarak bu absorbands değerlerine karşılık gelen toplam antioksidan statü değerleri belirlendi. Sonuçlar mmol Troloks / 100 g propolis şekline aşağıdaki hesaplamayla dönüştürüldü. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n = 3).

Δ Absorbans Std 1 = Std 1' in 2. Absorbansı – Std 1' in 1. Absorbansı

Δ Absorbans Std 2 = Std 2' nin 2. Absorbansı – Std 2' nin 1. Absorbansı

Δ Absorbans Örnek = Örneğin 2. Absorbansı – Örneğin 1. Absorbansı

Sonuç = $(\Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Örnek}) / (\Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Std 2}) \times 1,5 \times \text{Dilüsyon katsayısı (20)} / 25 \times 100$

Buradaki 1,5 standart 2' nin konsantrasyonudur, 25 rakamı 25 mg/ml' lik propolis ekstraktından dolayıdır.

3.2.6. Ekstraktların HPLC ile Kalitatif Analizi

Çok sayıda çalışmaya konu olan polifenolik bileşiklerin karakterizasyonunda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) halen en popüler ve güvenilir analitik teknik olarak gösterilmektedir (54).

C₁₈ kolonlar ile birlikte kullanılan ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ve özellikle diyod array dedektör (DAD) ile birlikte kullanılan HPLC fenolik bileşiklerin tanımlanmasında çok yönlü, hassas ve nispeten düşük maliyetli olması açısından çok önemli ve güvenilir bir tekniktir (22).

Deneyin Yapılışı

Buzdolabında +4 °C' de saklanan sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu 25 mg/ml' lik propolis ekstraktları 0,45 µm' lik membran filtreden süzüldü. Mobil fazlar hazırlanarak aynı şekilde 0,45 µm' lik membran filtreden geçirildi. Daha sonra mobil fazların tam çözünmesini sağlamak ve çözücüleri degaz etmek amacıyla 30 dakika boyunca ultrasonik banyo kullanılarak aşağıda belirlenen kromatografik koşullara göre HPLC cihazına verildi. Kromatografik analiz koşulları Pietta ve arkadaşlarının (12) uyguladıkları metoda göre belirlendi.

Kolon : Hichrom, Lichrosphere RP18-5 (25 cm × 4.0 mm)

Mobil faz : pH' sı HCl ile 3' e ayarlanmış 30 mM NaH₂PO₄ (çözücü A)

Asetonitril (çözücü B)

Kolon sıcaklığı : 25 °C

Dalga boyu : 265 nm, 290 nm, 360 nm

Enjeksiyon hacmi : 50 µl

Akış hızı : 1.5 ml / dak (Gradient elüsyon programı)

Çalışma süresi : 56 dakika

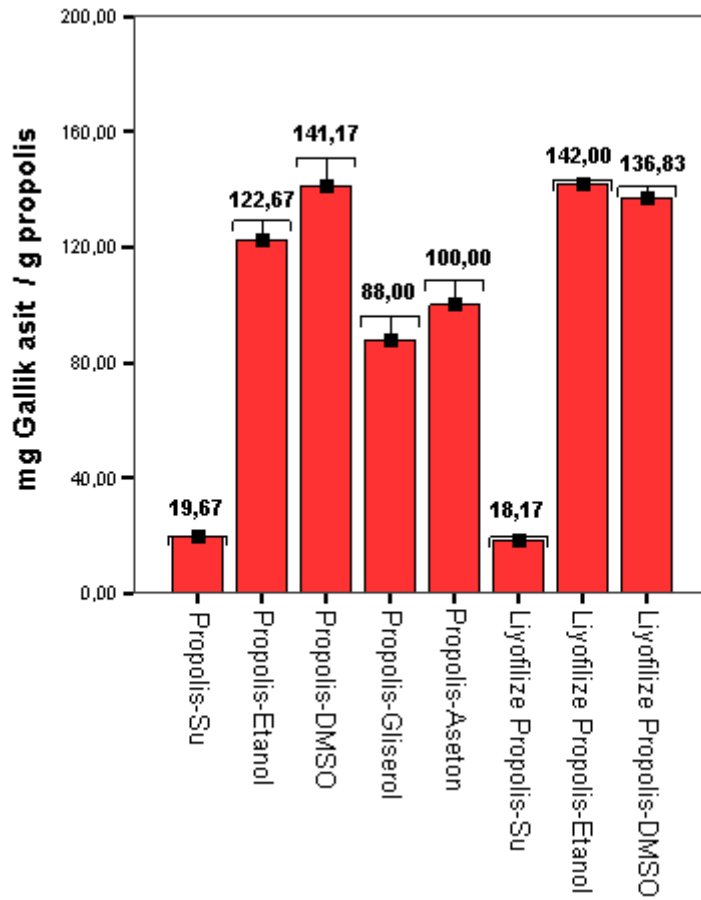
Zaman	Çözücü A	Çözücü B
0. dakika	% 90	% 10
40. dakika	% 60	% 40
50. dakika	% 45	% 55

Gradient elüsyon programından sonra bir sonraki analiz için kolonu dengeye getirmek amacıyla, kolondan 10 dakika sıvı geçirilerek kolonun temizlenmesi sağlandı. Analiz işlemi her bir örnek için iki kere tekrarlandı (n = 2).

4. BULGULAR

4.1. Ekstraktlarda Toplam Polifenol İçerik Tayini Sonuçları

Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam polifenol içeriği ($141,17 \pm 9,99$ mg GA / g propolis), etanollü ($122,67 \pm 6,37$ mg GA / g propolis), asetonlu ($100,00 \pm 8,49$ mg GA / g propolis), gliserollü ($88,00 \pm 7,75$ mg GA / g propolis) ve sulu ($19,67 \pm 0,29$ mg GA / g propolis) ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriğinden daha fazla bulundu. Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam polifenol içeriği ($141,17 \pm 9,99$ mg GA / g propolis) sulu ekstraktındaki toplam polifenol içeriğinin ($19,67 \pm 0,29$ mg GA / g propolis) yaklaşık 7,2 katı olarak hesaplandı. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlardan etanollü ekstraktın toplam polifenol içeriği ($142,00 \pm 1,41$ mg GA / g propolis), DMSO' lu ($136,83 \pm 4,04$ mg GA / g propolis) ve sulu ($18,17 \pm 1,15$ mg GA / g propolis) ekstraktlardaki toplam polifenol içeriğinden daha fazlaydı. Liyofilize edilerek hazırlanan etanollü ekstrakttaki toplam polifenol içeriği ($142,00 \pm 1,41$ mg GA / g propolis) sulu ekstrakttaki toplam polifenol içeriğinin ($18,17 \pm 1,15$ mg GA / g propolis) yaklaşık 7,8 katı olarak hesaplandı. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları ile liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları arasında toplam polifenol içeriği bakımından büyük farklar bulunmamaktadır. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların toplam polifenol içerikleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Ekstraktlarda toplam polifenol içerik tayini sonuçları Şekil 9' da verilmiştir. Grafikte verilen değerler, ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.

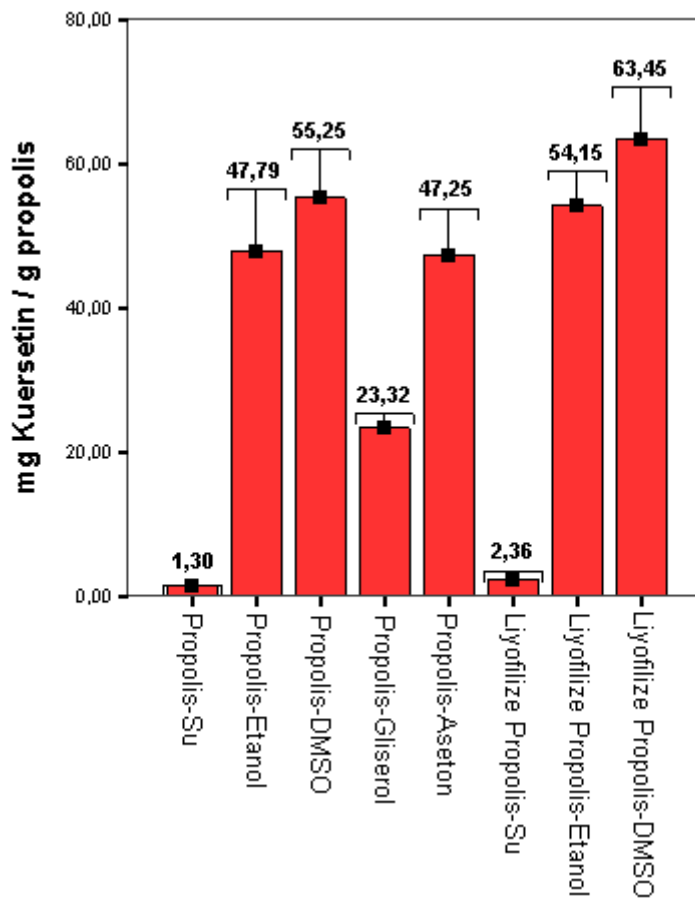


Şekil 9. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam polifenol içerik (Ortalama \pm SD mg GA / g propolis)

4.2. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini Sonuçları

Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam flavonoid içeriği ($55,25 \pm 6,63$ mg K / g propolis), etanollü ($47,79 \pm 8,66$ mg K / g propolis), asetonlu ($47,25 \pm 6,43$ mg K / g propolis), gliserollü ($23,32 \pm 1,91$ mg K / g propolis) ve sulu ($1,30 \pm 0,12$ mg K / g propolis) ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinden daha fazla bulundu. Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam flavonoid içeriği ($55,25 \pm 6,63$ mg K / g propolis) sulu ekstraktındaki toplam flavonoid içeriğinin ($1,30 \pm 0,12$ mg K / g propolis) 42,5 katı olarak hesaplandı. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlardan DMSO' lu ekstraktın toplam flavonoid içeriği ($63,45 \pm 7,07$ mg K / g propolis), etanollü ($54,15 \pm 4,86$ mg K / g propolis) ve sulu ($2,36 \pm 1,02$ mg K / g propolis) ekstraktlardaki toplam flavonoid içeriğinden daha fazlaydı. Liyofilize

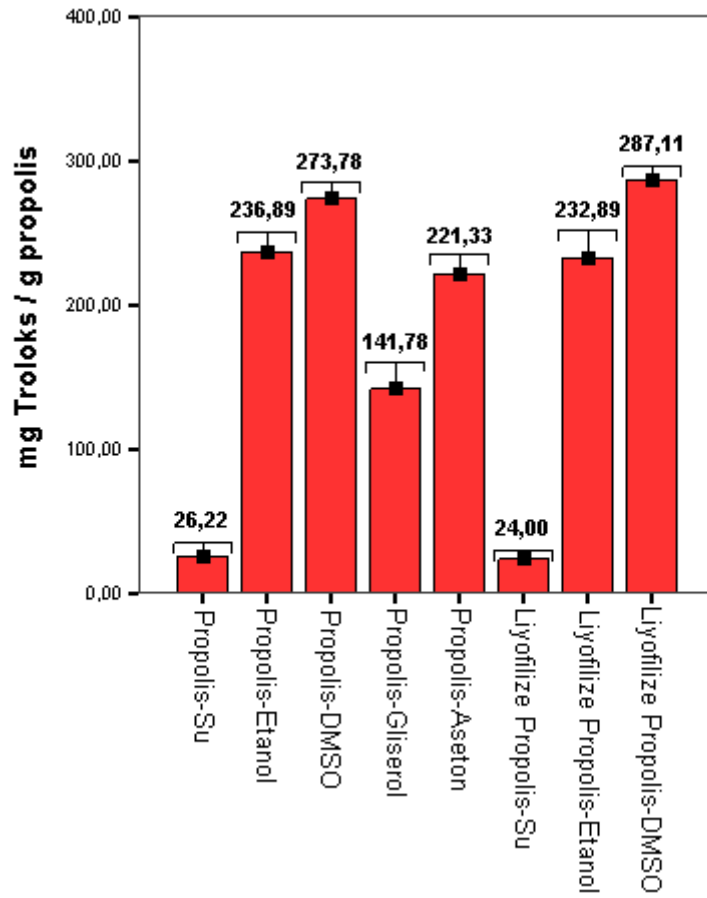
edilerek hazırlanan DMSO' lu ekstrakttaki toplam flavonoid içeriği ($63,45 \pm 7,07$ mg K / g propolis) sulu ($2,36 \pm 1,02$ mg K / g propolis) ekstrakttaki toplam flavonoid içeriğinin yaklaşık 26,9 katı olarak hesaplandı. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları ile liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları arasında toplam flavonoid içeriği bakımından büyük farklar bulunmamaktadır. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların toplam flavonoid içerikleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Ekstraktlarda toplam flavonoid içerik tayini sonuçları Şekil 10' da verilmiştir. Grafikte verilen değerler, ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.



Şekil 10. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik (Ortalama \pm SD mg K / g propolis)

4.3. Ekstraktlarda Demir (Fe^{+3}) İndirgeyici Güç Tayini Sonuçları

Propolisin DMSO' lu ekstraktının demir indirgeyici gücü ($273,78 \pm 11,62$ mg T / g propolis), etanollü ($236,89 \pm 13,92$ mg T / g propolis), asetonlu ($221,33 \pm 14,11$ mg T / g propolis), gliserollü ($141,78 \pm 18,97$ mg T / g propolis) ve sulu ($26,22 \pm 8,57$ mg T / g propolis) ekstraktlarındaki demir indirgeyici güçten daha yüksek bulundu. Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki demir indirgeyici güç ($273,78 \pm 11,62$ mg T / g propolis) sulu ekstraktındaki demir indirgeyici gücün ($26,22 \pm 8,57$ mg T / g propolis) yaklaşık 10,4 katı olarak hesaplandı. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlardan DMSO' lu ekstraktın demir indirgeyici gücü ($287,11 \pm 8,74$ mg T / g propolis), etanollü ($232,89 \pm 19,23$ mg T / g propolis) ve sulu ($24,00 \pm 5,55$ mg T / g propolis) ekstraktlarındaki demir indirgeyici güçten daha yüksekti. Liyofilize edilerek hazırlanan DMSO' lu ekstrakttaki demir indirgeyici güç ($287,11 \pm 8,74$ mg T / g propolis) sulu ekstrakttaki ($24,00 \pm 5,55$ mg T / g propolis) demir indirgeyici gücün yaklaşık 12 katı olarak hesaplandı. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları ile liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları arasında demir indirgeyici güç bakımından büyük farklar bulunmamaktadır ve sonuçlar birbiri ile örtüşmektedir. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların demir indirgeyici güçleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Ekstraktlarda demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayini sonuçları Şekil 11' de verilmiştir. Grafikte verilen değerler, ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.

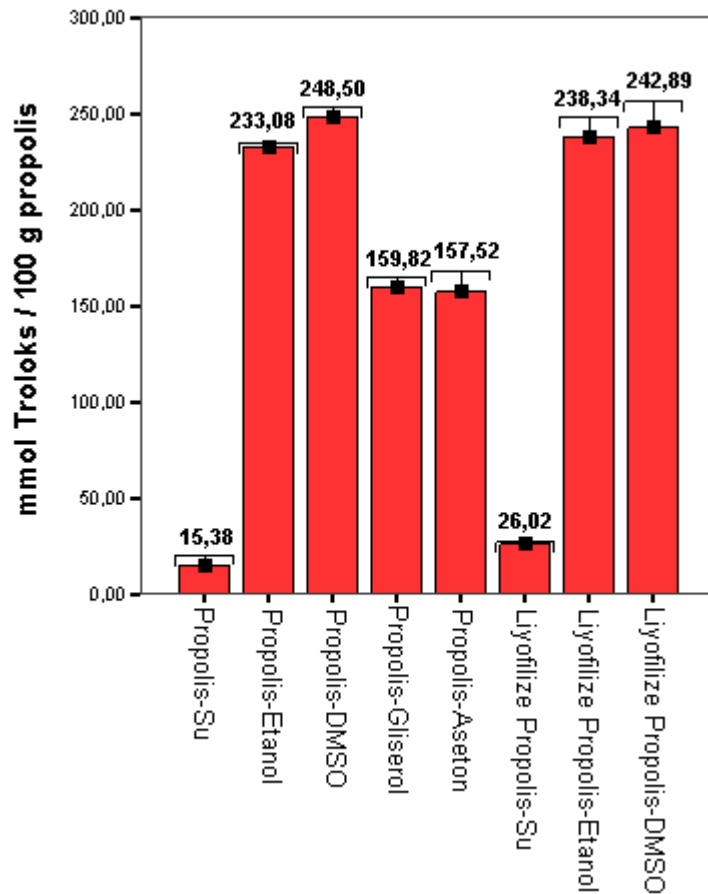


Şekil 11. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç (Ortalama \pm SD mg T / g propolis)

4.4. Ekstraktlarda Toplam Antioksidan Statü (TAS) Tayini Sonuçları

Propolisin DMSO' lu ekstraktının toplam antioksidan statüsü ($248,50 \pm 5,10$ mmol T / 100 g propolis), etanollü ($233,08 \pm 1,99$ mmol T / 100 g propolis), gliserollü ($159,82 \pm 5,73$ mmol T / 100 g propolis), asetonlu ($157,52 \pm 11,06$ mmol T / 100 g propolis) ve sulu ($15,38 \pm 5,39$ mmol T / 100 g propolis) ekstraktlarındaki toplam antioksidan statüden daha yüksek bulundu. Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam antioksidan statü ($248,50 \pm 5,10$ mmol T / 100 g propolis) sulu ekstraktındaki toplam antioksidan statününün ($15,38 \pm 5,39$ mmol T / 100 g propolis) yaklaşık 16,2 katı olarak hesaplandı. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlardan DMSO' lu ekstraktın toplam antioksidan statüsü ($242,89 \pm 13,48$ mmol T / 100 g propolis), etanollü ($238,34 \pm 10,10$ mmol T / 100 g propolis) ve sulu ($26,02 \pm 1,12$ mmol T /

100 g propolis) ekstraktlardaki toplam antioksidan statüden daha fazlaydı. Liyofilize edilerek hazırlanan DMSO' lu ekstrakttaki toplam antioksidan statü ($242,89 \pm 13,48$ mmol T / 100 g propolis) sulu ekstrakttaki ($26,02 \pm 1,12$ mmol T / 100 g propolis) toplam antioksidan statünün yaklaşık 9,3 katı olarak bulundu. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları ile liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktları arasında toplam antioksidan statü bakımından büyük farklar bulunmamaktadır ve sonuçlar birbiri ile örtüşmektedir. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların toplam antioksidan statüleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Ekstraktlarda toplam antioksidan statü tayini sonuçları Şekil 12' de verilmiştir. Grafikte verilen değerler, ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.



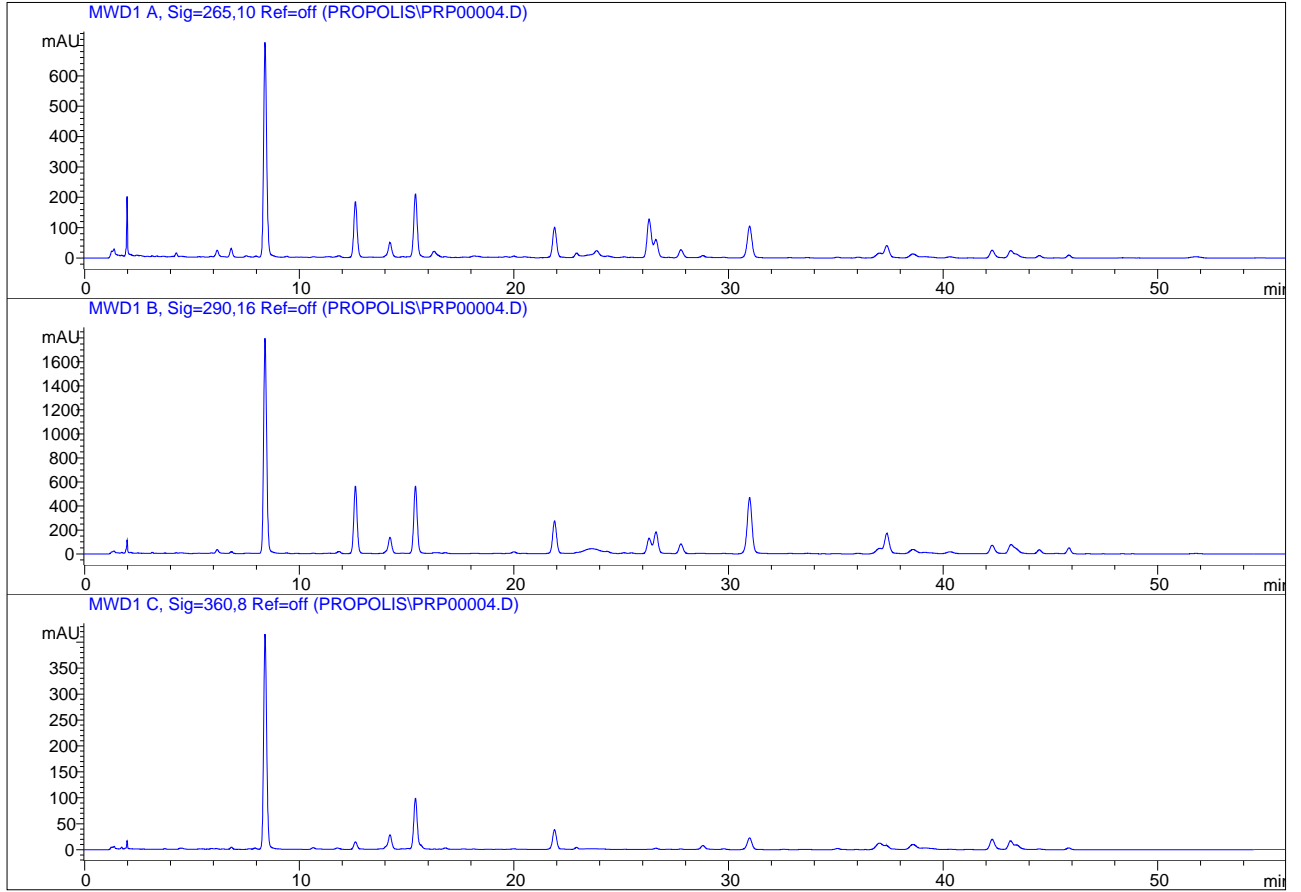
Şekil 12. Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü, asetonlu ve liyofilize edilerek hazırlanmış sulu, etanollü, DMSO' lu ekstraktlarındaki toplam antioksidan statü (TAS) (Ortalama \pm SD mmol T / 100 g propolis)

4.5. Ekstraktların HPLC ile Kalitatif Analizi Sonuçları

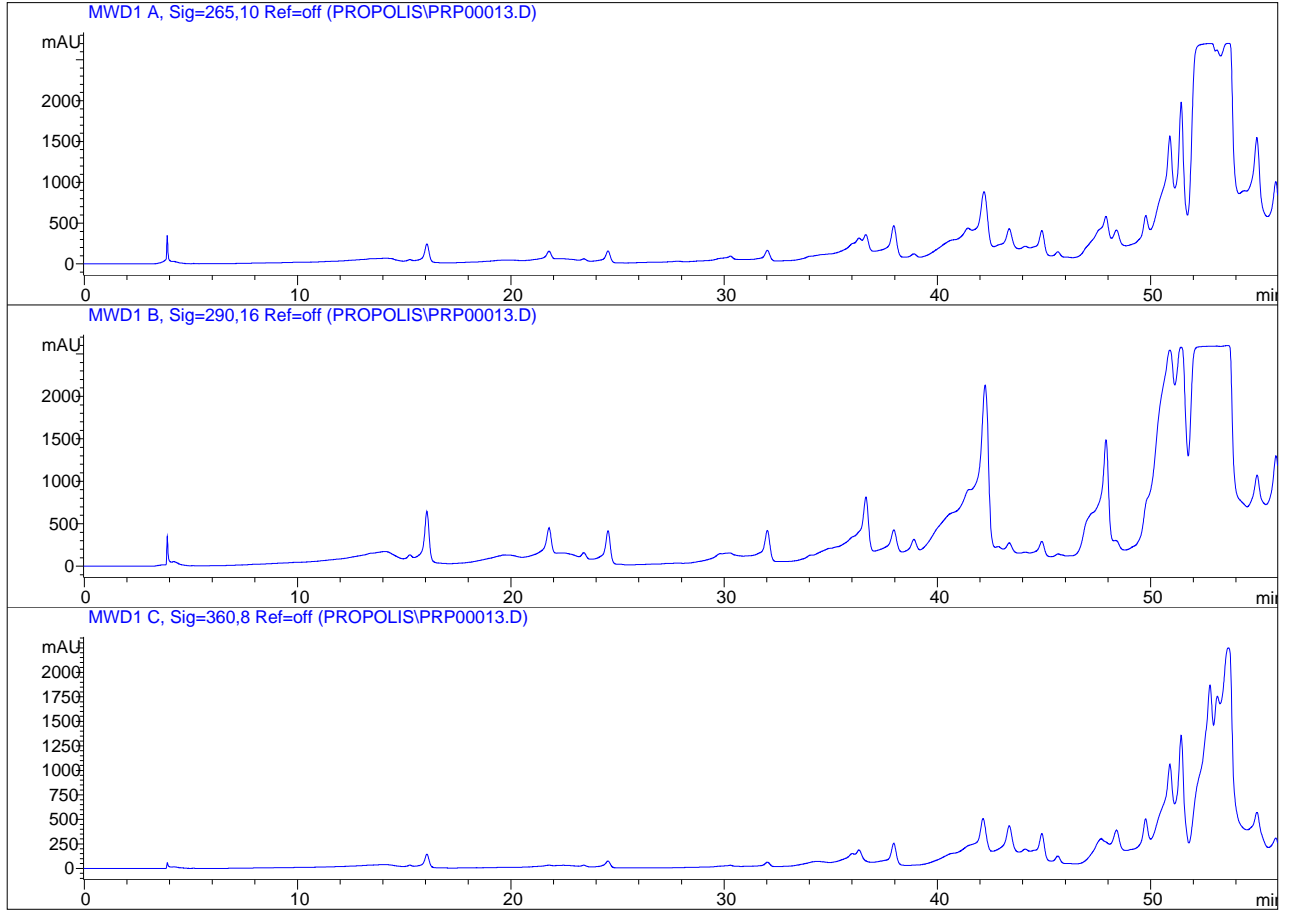
Farklı fenolik bileşiklerin ultraviyole (UV) ve görünür bölge (VIS) spektrumlarını elde edebilmek için kromatogramlar 265 nm, 290 nm ve 360 nm' de izlenmiştir. Çünkü fenolik asitler ve flavonoidlerin çoğunluğu bu üç dalga boyunun civarında maksimum absorbans göstermektedir.

Şekil 13, 14, 15, 16, 17' deki propolisin su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton ile hazırlanmış olan ekstraktlarına ait kromatogramlar incelendiğinde DMSO' lu ekstraktına ait kromatogramların sulu, etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarına ait kromatogramlara göre daha fazla sayıda pike sahip olduğu, dolayısıyla DMSO' lu ekstraktın içinde çözünen madde miktarının daha fazla olduğu söylenebilir. 265, 290 ve 360 nm dalga boylarında yapılan ölçümlere göre her üç dalga boyunda da DMSO' lu ekstrakta ait piklerin fazlalığı dikkat çekmektedir. Sulu ekstrakta ait kromatogramlarda etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktların kromatogramlarına göre daha az sayıda pik, dolayısıyla daha sade kromatogramlar elde edilmiştir. Her bir ekstrakt içinde bulunan propolisin bileşenlerinin farklı çözücülerde farklı miktarlarda çözünmesinden dolayı bu beş ekstraktın karşılaştırması yapıldığında piklerin birbirine çok fazla benzemediği görülmektedir. Ancak DMSO'lu ve asetonlu ekstraktlara ait kromatogramlarda 40. dakikadan sonra, etanollü ve gliserollü ekstraktlara ait kromatogramlarda ise 50. dakikadan sonra piklerin sayısındaki artış göze çarpmaktadır. Sulu ekstrakt ise diğerlerinin aksine en büyük piki 8. dakikadan sonra vermiştir.

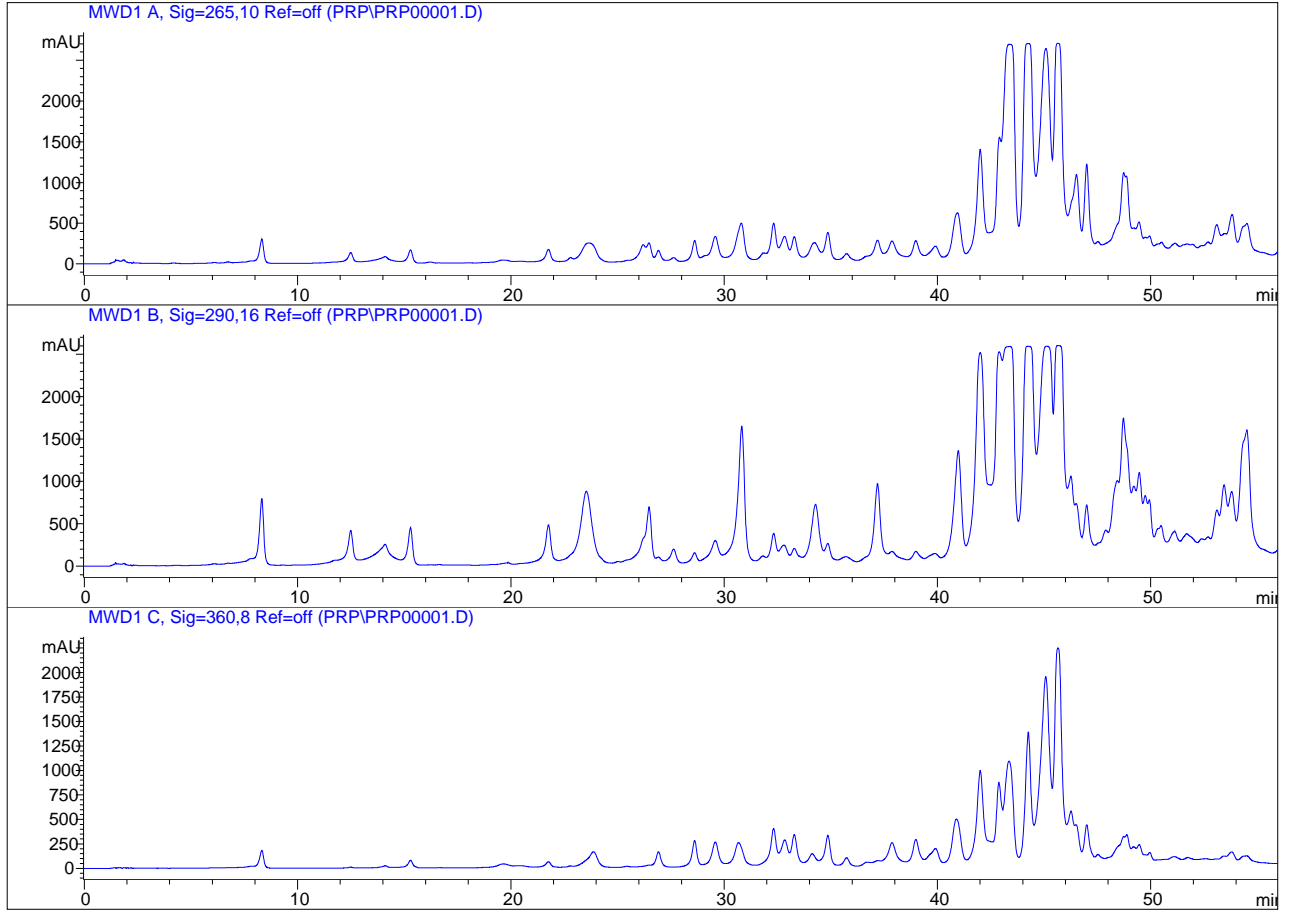
Propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarına ait kromatogramların pik sayısındaki fazlalığa göre bir sıralama yapacak olursak en fazla pikin DMSO' lu ekstrakta, en az pikin ise sulu ekstrakta gözlemlendiğini söylemek mümkündür. Ancak piklerin birbirinden tam olarak ayrılmamış olması ve kuyruklanmaların meydana gelmesinden dolayı etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktlar arasında bir sıralama yapmak zordur.



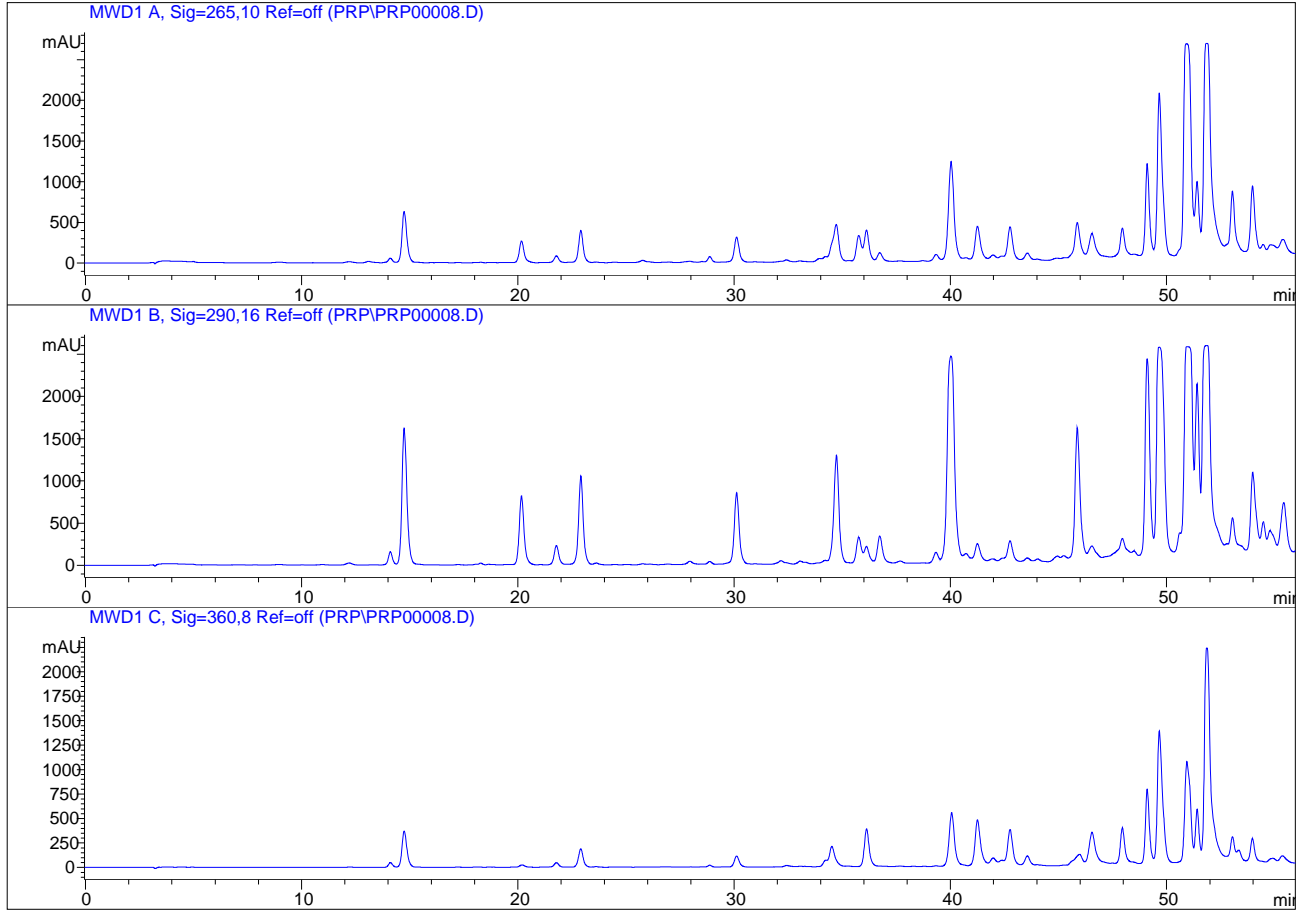
Şekil 13. Propolisin sulu ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları



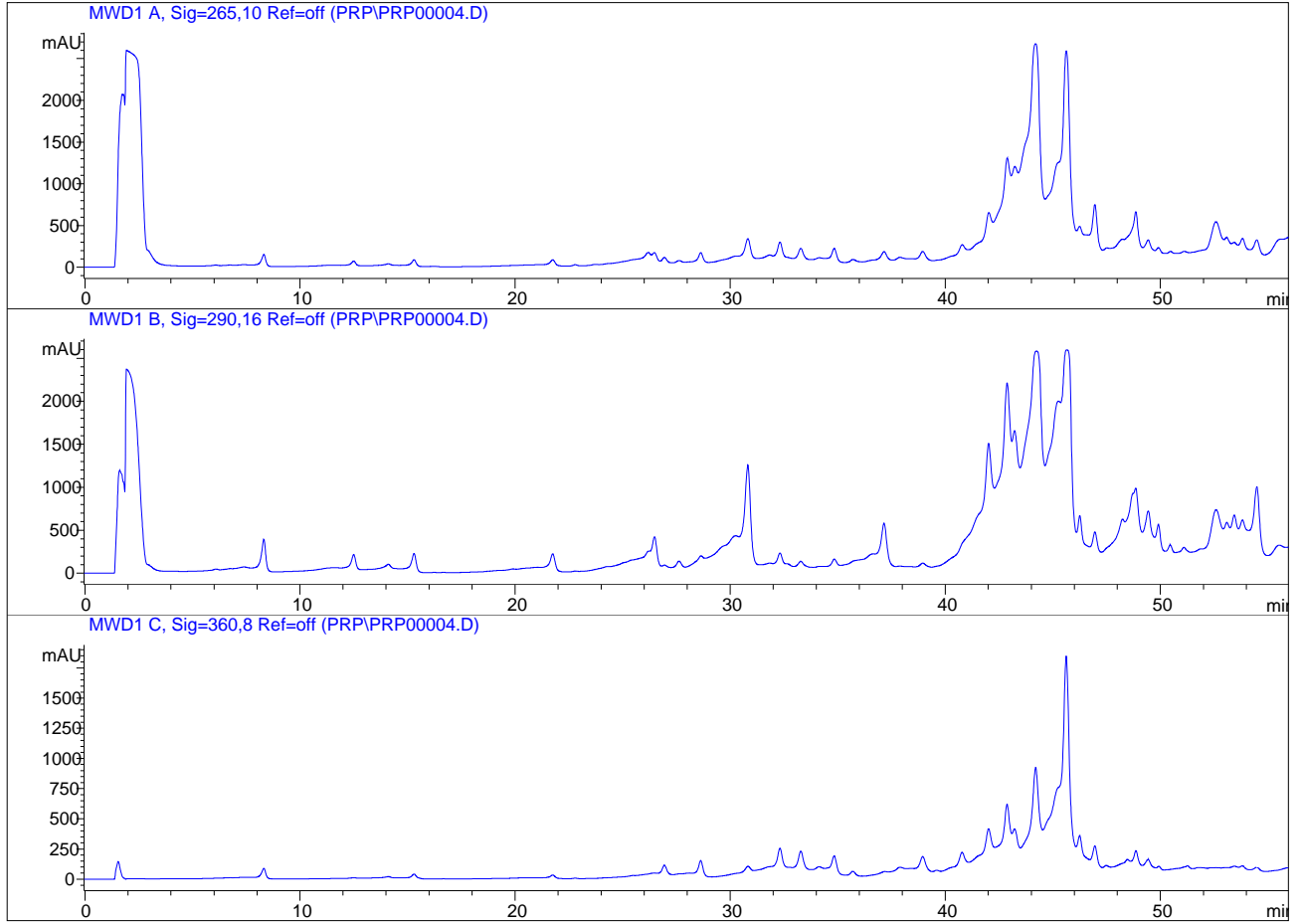
Şekil 14. Propolisin etanollü ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 15. Propolisin DMSO' lu ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 16. Propolisin gliserollü ekstraktının HPLC ile belirlenen kromatogramları



Şekil 17. Propolisin asetonlu ekstraktının HPLC ile belirlenen pik kromatogramları

5. TARTIŞMA

Propolis bitki tomurcuklarından, filizlerinden ve çeşitli bitki salgılarından bal arıları tarafından toplanan kimyasal olarak kompleks yapışkan, reçineli bir arı ürünüdür. Bal arılarının propolisi, kovanın iç duvarlarını güçlendirmek için yapı maddesi olarak, bunun da ötesinde patojen mikroorganizmalara karşı ‘kimyasal silah’ olarak kullandıkları kabul edilmiştir (4). Propolis, kompleks kimyasal bileşiminden dolayı halk tıbbında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Propolisin antibakteriyel, antiviral, antitümör, antiinflammatuar, antikanser, immünomodülatör ve buna benzer değişik birçok tedavi edici özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (4).

Propolis fenolik aldehitler, polifenoller, sekuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşikler kapsayan 300’ den fazla bileşen içermektedir (30).

Bitki kaynağı ve toplanma bölgesi propolisin biyolojik aktivitesinde büyük önem taşımaktadır. Propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan yapılar flavonoidler gibi fenolik bileşiklerdir. Flavonoidler aynı zamanda antioksidan aktiviteden de sorumludur. Bu bileşenlerin antioksidan aktivitesi özellikle radikal temizleme etkisine dayanmaktadır (19).

Biyoflavonoidler, dejeneratif kalp hastalıkları, ateroskleroz, yaşlanma ve zehirli maddelerin etkileri gibi rahatsızlıkları meydana getiren serbest radikallerin temizlenmesinde çok önemli rol oynayan antioksidan moleküllerdir (55).

Propolisin süperoksit anyonunun oluşumunu engellediği rapor edilmiştir. Ayrıca propolisin, karaciğerde sentezlenen ve radikal temizleme aktivitesine sahip olan glutatyon tüketimini zıt yönde etkilediği belirlenmiştir (19).

Propolis tabletler, kapsüller, diş macunu, ağız gargarası, yüz kremleri, merhemler, losyonlar ve solüsyonlar gibi çeşitli şekillerde piyasaya sunulmaktadır. Kökeninin yanı sıra, kimyasal bileşimi üzerine sürekli artan merak propolis ile ilgili tıbbi uygulamaların yaygınlaşmasına da neden olmaktadır (7).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis ve polen örnekleri ile daha önce çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Gerigelmez ve Çolak yaptıkları çalışmalar ile polenin sulu ve PBS' lu, propolisin ise DMSO' lu ekstraktlarının HL-60 miyeloid hücre serilerinde kaspaz-3 aktivitesini farklı oranlarda arttırarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği flowsitometrik analizler sonucu ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda 0,25-0,50 mg/ml' lik DMSO' lu propolis ekstraktlarının HL-60 kanser hücrelerinde hem apoptoza hem de differansiasyona sebep olduğu bildirilmiştir (56,57). Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının KML-562 kanser hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada ise polen ve propolisin DMSO' lu ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak solunumsal patlamayı inhibe ettiği flowsitometrik analizlerle ortaya konularak, polen ve propolis ekstraktlarının bu etkiyi antioksidan özellikleri ile gerçekleştirdiği savunulmuştur (3). Barlak tarafından yapılan bir başka çalışmada ise solunumsal patlama sonrası propolisin DMSO' lu ekstraktlarının PMN lökositlerinden PMN elastaz salınımına etkisi incelenerek, solunumsal patlamanın uyarıldığı PMA' lı örneklerde propolis konsantrasyonu arttıkça hem PMN elastaz salınımı hem de solunumsal patlamanın azaldığı, PMA' sız örneklerde ise PMN elastaz salınımının propolis ekstraktı ilave edilmeyenlere göre bir miktar azaldığı, ancak solunumsal patlamada bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bu sayede propolisin antiinflammatuar aktiviteye sahip olduğu teyit edilmiştir (58).

Çolak tarafından yapılan başka bir çalışmada polen ve propolisin DMSO' lu ve sulu ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) Na_v 1,5 ve Na_v 1,7 α izoformlarının mRNA ekspresyonlarını değişik oranlarda baskıladığı ve antimetastatik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, en yüksek baskılanmanın 150 μ g/ml' lik polenin DMSO' lu ekstraktları ile (% 55,98 ve % 53,31 oranında), en düşük baskılanmanın ise 20 μ g/ml' lik propolisin sulu ekstraktları ile (% 18,01 ve % 22,58 oranında) olduğu saptanmıştır (59). Barlak tarafından propolis ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomisine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise propolisin DMSO' lu ekstraktının sulu ekstraktına göre polifenol, flavonoid içeriği ve antioksidan potansiyeli açısından daha zengin olduğu belirlenerek, propolisin 20 μ g/ml konsantrasyondaki DMSO' lu ve sulu ekstraktı ile yapılan MTT testi sonucu hücre canlılığını sırasıyla % 50 ile 24,5 ve % 33,3 ile 17,7 arasında düşürdüğü ve dolayısıyla antioksidan potansiyeli daha düşük olan sulu ekstraktın daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçta propolisin DMSO' lu ve sulu ekstraktlarının antioksidan aktivite beraberinde PC-3 hücrelerinin proteomunda

değişikliğe sebep olarak, prostat kanseri hücre serileri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (28).

Propolisin bileşiminin çeşitlilik göstermesi, medikal uygulamaları ve standardizasyonunda problem oluşturmaktadır. Bu nedenle propolis ile yapılacak olan biyolojik çalışmalar, o propolisin bitkisel kaynaklarının ve kimyasal bileşiminin belirlenmesi ile gerçekleştirilmelidir (38).

Kanbur ve arkadaşları Kayseri civarından toplanan kavak cinsi propolisin etanollü ekstraktını hazırlayarak yaptıkları bir çalışmada, propolisin kimyasal içeriğini GC-MS ile tayin etmişlerdir. Propolisin yağ asitleri ve aromatik asitler, fenolik bileşikler, esterler, alkoller, ketonlar, kinonlar ve terpenler ve diğer bileşenlerden oluştuğunu belirlemişlerdir. Kayseri civarından toplanan kavak cinsi propolisin fenolik bileşiklerden pinobanksin, flavon 3',5,6-trietoksi-3,4' flavon, flavon asetik asit ve 2,4-di-t-butil-6-nitrofenol içerdiği tespit edilmiştir (19).

Propolisin içeriğinde bulunan ve flavonoid grubuna ait olduğu bilinen pinobanksinin, mitokondriyal membrandaki lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan aktivite gösterdiği Santos ve arkadaşları (60) tarafından rapor edilmiştir (19). Ayrıca flavon asetik asitin süperoksit radikali oluşturan ksantin oksidaz, siklooksijenaz, poli-ADP-riboz polimeraz, ribonükleotid redüktaz gibi enzimler üzerinde inhibitör etki sergilediği Harris ve arkadaşları (61) tarafından bildirilmiştir (19). Genel olarak, propolisin içeriğinde bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidlerin antiradikal aktivite sergilediği bazı yazarlar (44,62) tarafından rapor edilmiştir (19).

Kolankaya ve arkadaşları Türk *Castanea sativa* propolisinin % 95' lik etanollü ekstraktını hazırlayarak GC-MS analizi ile yaptıkları çalışmada flavanon ve flavonlardan oluşan flavonoid içeriğinin % 31,8, bu flavonoidlerin galangin, kuersetin, kaempferol, apigenin, pinobanksin, pinosembrin, pinostrobin ve % 2,69' unun diğer flavonoidler olduğunu belirlemişlerdir (6).

Antioksidanlar, membran lipidleri, proteinler, DNA' ya saldıran ve kardiyovasküler hastalıklar, şeker hastalığı, kanser, Alzheimer gibi birçok hastalıkta önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oluşturulan hasara karşı vücudu koruyarak insan sağlığında pozitif etki göstermektedirler (63).

Propoliste bulunan flavonoidlerin antioksidan aktivitesi serbest radikalleri temizleme yeteneğiyle, dolayısıyla hücre membranındaki lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki göstermesiyle olabilmektedir (62).

Kanbur ve arkadaşları (19) tarafından organik bir fosfor pestisiti olan propetamphosa maruz bırakılan ratlar üzerinde propolisin antioksidan etkisinin incelendiği bir çalışmada plazma ve doku (karaciğer, böbrek, beyin) MDA düzeyleri ve eritrosit ve doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ölçülmüş, propolis uygulanması sonucunda da bu doğal maddenin antiradikal ve antioksidan etki sergileyerek oksidatif stresi azalttığı sonucuna varılmıştır. Jasprica ve arkadaşları (27) propolisin, MDA düzeyinin azalmasına ve SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin artmasına sebep olduğunu rapor etmişlerdir (19).

Russo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada propolis ekstraktlarının aktif bileşeni olan CAPE (kafeik asit fenetil ester) ve galanginin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE)' den arındırılmış propolis ekstraktlarının reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve CAPE' nin galangine oranla daha fazla olmakla birlikte her ikisinin de antioksidan özellikte olduğu, CAPE' li ve CAPE' siz propolis ekstraktlarının doza bağımlı olarak serbest radikal temizleme etkisinin olduğunu, ksantin oksidaz aktivitesini ve antilipoperoksidatif kapasiteyi önemli bir şekilde inhibe ederek serbest radikal oluşumunu önlediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada CAPE' li ekstraktın CAPE' siz olana göre daha aktif olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda CAPE' nin propolisin antioksidan etkinliğinde çok önemli bir role sahip olduğu ifade edilmiştir (32).

Propolisin antimikrobiyal aktivitesinin mekanizmasının kompleks olduğu ve reçinedeki fenolik ve diğer bileşenlerin arasındaki sinerjistik etkiye atfedebileceği belirtilmiştir (64). Tek bir propolis bileşeninin toplam ekstraktından daha fazla aktiviteye sahip olmadığı, bu nedenle propolisin genel biyolojik özelliklerinin kendi bileşenlerinin doğal karışımından ileri geldiği öne sürülmüştür (38). Dolayısıyla çalışmamızda, kullandığımız ekstraktların bileşenlerini tek tek izole edip her birinin ayrı ayrı etkisini incelemek yerine, toplam ekstraktı kullanmayı tercih ettik.

Propolisin DMSO' lu ekstraktındaki toplam polifenol ve flavonoid içeriği, demir indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü, propolisin etanollü, asetonlu, gliserollü ve sulu ekstraktlarındaki toplam polifenol ve flavonoid içeriğinden, demir indirgeyici güçten ve toplam antioksidan statüden daha fazla bulunmuştur.

Propolisin liyofilize edilerek hazırlanmış etanollü ekstraktındaki toplam polifenol içeriği, liyofilize edilerek hazırlanmış DMSO' lu ve sulu ekstraktlarındaki toplam polifenol içeriğinden daha fazla bulunmuştur. Propolisin liyofilize edilerek hazırlanmış DMSO' lu ekstraktındaki toplam flavonoid içeriği, demir indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü,

propolisin liyofilize edilerek hazırlanmış etanollü ve sulu ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinden, demir indirgeyici güçten ve toplam antioksidan statüden daha fazla bulunmuştur.

Propolisi liyofilize ederek kullanılmaktaki amacımız içeriğinde bulunan reçineden organik bileşikleri ayırmak ve liyofilize örnekle normal örnek arasındaki farkı görmektir. Ancak yaptığımız içerik tayinleri ve antioksidan testler sonucunda normal örnekler ile liyofilize edilerek hazırlanmış örnekler arasında içerik ve antioksidan kapasite bakımından büyük farklılıkların bulunmadığı görülmüştür. Ekstraktların toplam antioksidan statüleri ve demir indirgeyici güçleri, içeriklerindeki polifenol ve flavonoid miktarları ile doğru orantılı olarak bulunmuştur.

Bu çalışmalar için yaptığımız seyreltme işlemlerinde, her bir ekstraktı kendi çözücüsüyle seyreltmek yerine su ile seyreltmeyi tercih etmemizin sebebi özellikle gliserol ve DMSO' nun yoğunluklarının yüksek oluşu ve bunların absorbanlarının ilave edilen kimyasallar neticesinde çok yüksek çıkması, hatta okunamayacak değerlerde olması, asetonun tek başına kör olarak kullanıldığında kimyasal özelliklerinden dolayı mikropleyt ile temas ettiğinde beyaz bir renk alarak pleyte yapışması, gliserolün viskoz bir sıvı olması nedeniyle özellikle demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç tayininde bir takım sorunlara yol açmış olmasıdır.

Değişik çözücüler propolisin içindeki farklı bileşenleri, farklı miktarlarda çözeceği için propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarının kalitatif ve/veya kantitatif içerikleri farklı olacaktır.

Etil alkol, saf alkol ya da içilebilir alkol olarak adlandırılan etanol uçucu, yanıcı ve renksiz bir sıvıdır. Etanol, düz zincirli bir alkoldür ve moleküler formülü C_2H_5OH , amprik formülü ise C_2H_6O şeklindedir. Kaynama noktası $78.4\text{ }^{\circ}C$ ' dir ve suda tamamen çözünür. Yoğunluğu 0.789 g/cm^3 olan sıvı fazda bir bileşiktir (65,66).

Kaynama noktası $189\text{ }^{\circ}C$, yoğunluğu 1.1004 g/cm^3 ve renksiz bir sıvı olan DMSO [$(CH_3)_2SO$] çok önemli polar amfipatik bir moleküldür ve hem sulu hem de organik ortamda çözünebilir (67,68). Bu fizikokimyasal özelliklerinden dolayı DMSO, suda çözünmeyen bileşikler için oldukça etkili bir çözücüdür (67).

Gliserol, sıvı halde bulunan polar organik bir trihidroksi alkoldür ve $C_3H_5(OH)_3$ moleküler formülüne sahiptir. Hafif tatlı, zehirli olmayan ve kaynama noktası $290\text{ }^{\circ}C$, yoğunluğu ise 1.261 g/cm^3 olan bir sıvıdır. Bu renksiz, kokusuz ve viskoz sıvı suda çözünebilmektedir (69,70).

Aseton, moleküler formülü C_3H_6O olan organik bir bileşiktir. Bu renksiz, yanıcı sıvı ketonların en basit üyesidir. Kaynama noktası $56.53\text{ }^\circ\text{C}$, yoğunluğu 0.7925 g/cm^3 olan aseton bu özelliğinden dolayı suda iyi çözünür (71).

Propolisin içeriğindeki bileşiklerin çoğu lipofilik bileşiklerdir. Bu bileşikleri etanol kullanarak ekstrakte etmek kolay olduğu için propolisin etanollü ekstraktı iyi bilinmektedir ve bundan dolayı daha cazip hale gelmiştir. Buna karşılık propolisin sulu ekstraktı ile ilgili yapılan az sayıdaki yayına rağmen propolisin sulu ekstraktı ve kafeoilkuinik asitleri içeren temel bileşenlerinin, propolisin etanollü ekstraktı ve içeriğindeki bileşenlerden daha yüksek antioksidan etkilere, bazı enzimlere karşı daha yüksek inhibitör aktivitesine ve daha yüksek absorbanza sahip olduğu belirtilmiştir (45).

Literatürde propolisin değişik çözücülerdeki çözünürlüğünün incelenmesi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar direkt olarak herhangi bir literatür ile karşılaştırılmadı.

Propolisin etanollü ekstraktı hazırlanarak Arjantin, Avusturalya, Brezilya, Bulgaristan, Şili, Çin, Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika ve Özbekistan gibi değişik coğrafik bölgelerin propolislerinin antioksidan aktiviteleri Kumazawa ve arkadaşları tarafından karşılaştırılmıştır. Bu ekstraktlarda β -karoten ağartma ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal yakalama aktivitesi yöntemleriyle antioksidan aktiviteler ölçülmüştür. Etanollü ekstraktlarda propolisin fotodiyod array (PDA) ve kütle spektrometrik (MS) dedeksiyon yardımıyla HPLC' de ana bileşenleri tanımlanmış ve miktar tayinleri yapılmıştır. Arjantin, Avusturalya, Çin, Macaristan ve Yeni Zelanda propolisinin etanollü ekstraktlarındaki antioksidan aktivitenin diğerlerine nazaran daha güçlü olduğu ve toplam polifenol ve flavonoid içeriğiyle korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Propolisin kaempferol ve fenetil kafeat gibi antioksidatif bileşikler içerdiği için güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (72).

Kumazawa ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada Güney Afrika ($99,5 \pm 4,4\text{ mg GA/g propolis}$), Tayland ($31,2 \pm 0,7\text{ mg GA/g propolis}$), Özbekistan ($174 \pm 6,7\text{ mg GA/g propolis}$) propolisinin etanollü ekstraktının toplam polifenol içerikleri düşük bulunmuştur. Brezilya propolisinin toplam polifenol içeriği ($120 \pm 5,6\text{ mg GA/g propolis}$) Avrupa ve Çin propolislerine göre daha düşük çıkmıştır. Bunun nedeni Brezilya propolisinin ana bileşenlerinin farklı olmasıdır. Brezilya propolisinde ana bileşenler *p*-kumarik asitin prenilenmiş türevleridir. Flavonoid içeriği Brezilya ($51,9 \pm 2,4\text{ mg K/g propolis}$) propolisinin etanollü ekstraktında düşük bulunmuştur. Öte yandan Ukrayna propolisinin toplam polifenol

içeriği ($255 \pm 7,4$ mg GA/g propolis) yüksekken, flavonoid içeriği ($63,7 \pm 3,2$ mg K/g propolis) yüksek değildir. Bu da Ukrayna propolisi non-flavonoid fenolikler içermektedir şeklinde yorumlanmaktadır. Toplam polifenol ve flavonoid içeriği bakımından bütün etanollü propolis ekstraktları arasında Tayland propolisinin en düşük değerlere sahip olduğu bulunmuştur (72).

Kumazawa ve arkadaşları tarafından değişik bölgelerden toplanan bu propolis örneklerinin etanollü ekstraktları, PDA ve MS dedeksiyon yardımıyla HPLC ile analiz edilerek ana bileşenleri tanımlanmıştır. Bu bileşikler kafeik asit, *p*-kumarik asit, 3,4-dimetoksi sinnamik asit, kuersetin, pinobanksin 5-metileter, apigenin, kaempferol, pinobanksin, sinnamiliden asetik asit, krisin, pinosembrin, galangin, pinobanksin 3-asetat, fenetil kafeat, sinnamil kafeat, tektokrisin, artepillin C' dir. Güney Afrika propolisinin etanolik ekstraktının HPLC kromatogramı diğer ülkelerin propolislerinin HPLC kromatogramlarından çok az farklı olmakla birlikte, Brezilya ve Tayland propolisinin HPLC kromatogramları diğerlerinden çok farklıdır. Brezilya propolisinin karakteristik kimyasal bileşiminin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika propolislerinden farklı olduğu rapor edilmiştir. Bütün bu etanollü propolis örneklerinin kantitatif analizleri yapıldığında kafeik asit ve *p*-kumarik asit Tayland propolisi hariç diğer bütün örneklerde belirlenmiştir. Tayland propolisinde bu 17 bileşikten hiçbiri bulunmamakla birlikte, artepillin C ise sadece Brezilya propolisinde belirlenmiştir. Pinosembrin, galangin, pinobanksin 3-asetat ve tektokrisin gibi flavonoidler Brezilya ve Tayland propolisi haricinde diğer bütün etanollü propolis örneklerinde bol miktarda bulunmuştur (72).

Nakajima ve arkadaşları tarafından Brezilya yeşil propolisinin sulu ekstraktı ve ana bileşenleri olan kaffeoilkuinik asit türevleri (3,4-di-*O*-kaffeoilkuinik asit, 3,5-di-*O*-kaffeoilkuinik asit, klorojenik asit) ve sinnamik asit türevleri (*p*-kumarik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin) kullanılarak oksidatif stres tarafından indüklenen retinal hasara karşı nöroprotektif etkilerinin olup olmadığı incelenmiş ve ayrıca nöroprotektif etkileri antioksidan etkileri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak propolisin sulu ekstraktının ve kaffeoilkuinik asit türevlerinin *in vitro* retinal hasara karşı nöroprotektif etkiler gösterdiği ve bu etkilerin de dolaylı olarak antioksidan özelliği sayesinde olduğu belirlenmiştir (45).

Hayashi ve arkadaşları (73) propolisin bileşiminde bulunan 12 fenolik bileşiğin linoleik asitin peroksidasyonunu önlediğini belirlemişlerdir. Ayrıca Banskota ve arkadaşları tarafından (74) Brezilya, Peru, Hollanda ve Çin propolisinin sulu ve metanollü ekstraktlarının DPPH' e karşı güçlü antioksidan aktivite sergilediği bildirilmiştir (19).

Nakajima ve arkadaşlarının Brezilya yeşil propolisinin sulu ve etanollü, arı sütünün sulu, polenin ise etanollü ekstraktını hazırlayarak, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (HO^{\cdot}) radikali temizleme kapasitesini değişik antioksidan kapasite yöntemleriyle ölçerek kıyasladıkları bir başka araştırmada, antioksidan potansiyelinin sırasıyla propolisin sulu ekstraktında, daha sonra propolisin etanollü ekstraktında ve polenin etanollü ekstraktında olduğu, fakat arı sütünde herhangi bir etkinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca propolisin sulu ekstraktındaki temel bileşenler olan kafeik asit, artepillin C, drupanin, bakkarin ve kumarik asitin antioksidan etkileri, kafeik asit, artepillin C ve drupanin şeklinde belirtilen sırada bulunmuştur. Bakkarin ve kumarik asitin herhangi bir antioksidan etkisi bulunamamıştır. Kafeik asitin radikal temizleme etkisinin troloks kadar kuvvetli olduğu, bunun yanısıra N-asetil sistein (NAC) ve vitamin C' den daha güçlü olduğu tespit edilmiştir (75).

Çalışmalarda propolisin etanollü ekstraktı çok yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sulu ekstraktı ile ilgili yapılan çalışmalar da giderek artmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında propolisin DMSO' lu ekstraktı da çok fazla olmamakla birlikte kullanılmaktadır. Ancak propolisin gliserollü ve asetonlu ekstraktı ile ilgili bir çalışma ilk kez yapılmıştır. Gliserol insan vücudunda sentezlenen ve yağ asitleri ile birlikte nötral yağlar olarak bilinen mono-, di- ve tri-açıl gliserol esterlerinin oluşumunda görev alan organik bir bileşik olması nedeniyle bu çalışma ayrı bir önem arz etmektedir.

Propolisteki aktif bileşiklerin analizi için son zamanlarda TLC, HPLC, GC-MS ve LC-MS' i de kapsayan metodlar rapor edilmiştir. Toplam flavonoidler yaygın olarak kolorimetrik UV-VIS spektrofotometri kullanılarak ölçülür (76). HPLC en çok tercih edilen analitik yöntem haline gelmiştir ve bu teknik ile ilgili olarak kapsamlı yayınlar yapılmıştır. Gıdalardaki değişik flavonoid aglikon ailelerinin (flavanoller, flavonoller, flavanonlar ve flavonlar gibi) eşzamanlı ölçümü için geliştirilen pek çok kromatografik yöntem uzun analiz süreleri gerektirmektedir ve hatta bazı çalışmalarda bu bileşiklerin ayrımı için iki farklı kromatografik protokol kullanılmaktadır (77).

Farklı araştırmacılar değişik bölgelerden toplanan propolisin polifenolik bileşiklerini değişik ekstraksiyon sistemlerini ve farklı dedektör sistemleri ile bağlantılı olan çeşitli HPLC metodlarını kullanarak analiz etmişlerdir (54).

Çalışmamızda propolisin su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton ile hazırlanan ekstraktları elde edilen verileri desteklemek amacıyla HPLC ile kalitatif olarak analiz edilmiştir ve elde edilen pik kromatogramlarına göre en fazla pikin DMSO' lu ekstraktta, en

az pikin ise sulu ekstraktta olduğu, dolayısıyla propolisin en fazla DMSO' da, en az suda çözüdüğü sonucuna varılmıştır. Elde edilen kromatogramlardan propolisin etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktları için bir sıralama yapmak gerektiğinde, piklerinin birbirine benzemediğı ve aralarında sıralama yapmanın mümkün olamayacağı anlaşılmıştır. Ancak DMSO' lu ve asetonlu ekstraktlara ait kromatogramlarda 40. dakikadan sonra, etanollü ve gliserollü ekstraktlara ait kromatogramlarda ise 50. dakikadan sonra piklerin sayısındaki artışa bakıldığında DMSO' lu ve asetonlu ekstraktlar ile etanollü ve gliserollü ekstraktların kromatogramlarının benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bunun sebebinin bu bileşiklerin kimyasal yapılarının birbirine benzerliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sulu ekstrakt ise diğerlerinin aksine en büyük piki 8. dakikadan sonra vermiştir.

Flavonoidler sulu ekstraktta diğerlerine nazaran en düşük bulunmasına rağmen, diğer ekstraktların hazırlandığı çözücüler de saf olarak kullanıldığı için; su ile çözülen propolis örneklerinin canlılar açısından zararlı olmaması, ancak diğer örneklerin saf halde kullanılmasının zararlı oluşu nedeniyle sağlık üzerine yürütülen çalışmaların sulu ekstraktla yapılmasının daha doğru olacağı açıktır.

Sonuç olarak propolisin su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton olarak belirlenen beş çözücü ile ekstrakte edilmesinden sonra toplam polifenol ve flavonoid içerik ve antioksidan yöntemler beraberinde en iyi DMSO' da, daha sonra sırasıyla etanol, aseton ve gliserolde, en az suda çözüdüğüne kanaat getirilmiştir. Yapılan HPLC analizleriyle de bu sonuçlar desteklenmiştir.

Daha sonraki çalışmalarda hücre serileriyle birlikte DMSO' lu ekstraktların kullanılması uygun iken hayvan ve insanlara ise gliserollü ve sulu ekstraktların verilmesinin daha uygun olabileceği kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Trabzon' un çeşitli yörelerinden toplanan propolisin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarında toplam polifenol, toplam flavonoid, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü tayinleri yapıldı. Aynı tayinler liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü ve DMSO' lu ekstraktlarda da yapıldı. Propolisin DMSO' lu ekstraktı sulu, etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktlarına göre polifenol, flavonoid içeriği ve antioksidan potansiyeli bakımından daha zengin olarak bulundu. Ekstraktların antioksidan potansiyeli, polifenol ve flavonoid içerikleri ile orantılı olarak bulundu.
2. Ekstraktların polifenol, flavonoid, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü tayinlerinden yola çıkarak hangi çözücünde en iyi çözüldüğü konusunda bir sıralama yapmak gerektiğinde; en iyi DMSO' da, daha sonra sırasıyla etanol, aseton ve gliserolde, son olarak da suda çözüldüğü belirlendi.
3. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlar ile normal ekstraktlar arasında miktar bakımından çok fazla farklılık gözlenmedi. Liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktlarda da en iyi çözünmenin DMSO' da, daha sonra etanolde ve son olarak da suda gerçekleştiği belirlendi. Dolayısıyla propolisi bu üç çözücünde normal şekilde çözmek ile liyofilize ettikten sonra çözmek arasında çok büyük fark olmadığı sonucuna varıldı.
4. Sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktların HPLC ile yapılan kalitatif analizi sonucunda DMSO' lu ekstraktın sulu, etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktlara göre daha fazla sayıda pike, sulu ekstraktın ise diğer ekstraktlara göre çok daha az sayıda pike sahip olduğu belirlendi. Dolayısıyla pik sayılarına göre propolisin en fazla DMSO' da, en az suda çözüldüğü belirlendi. Piklerin birbirinden tam olarak ayrılmamış olması ve kuyruklanmaların meydana gelmesinden dolayı etanollü, gliserollü ve asetonlu ekstraktlar

arasında propolisin hangi çözücüde daha iyi çözüldüğü konusunda bir sıralama yapılamadı. Buna rağmen yapılan HPLC çalışmaları ile diğer kolorimetrik çalışmaların birbirini büyük ölçüde desteklediği bulundu.

5. Her bir ekstrakt içinde bulunan propolisin bileşenlerinin farklı çözücülerde farklı miktarlarda çözünmesinden dolayı sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktlar karşılaştırıldığında piklerin birbirine çok fazla benzemediği belirlendi. Ancak etanollü ile gliserollü ve DMSO' lu ile asetonlu ekstraktların kromatogramlarının çözücülerin kimyasal yapılarındaki benzerlikten dolayı birbirine belirli dakikalardan sonra benzediği tespit edildi.

6.2. Öneriler

1. Propolisi ekstrakte etmek için kullanılan farklı çözücüler, içeriğinde bulunan farklı bileşiklerin çözünmesini sağlayacağı için kullanılan ekstraktların kalitatif ve kantitatif içeriği HPLC, GC-MS gibi yöntemler ile belirlenebilir.
2. Propolisin kimyasal içeriğinin belirlenmesi, yapılacak olan çeşitli çalışmalarda propolisin standardizasyonunu sağlayacaktır. Bu sayede propolisin içerdiği özel bileşikler ve bunlarla ilişkili olan biyolojik aktiviteler de tespit edilebilecektir.
3. Propolisin gliserol, su gibi toksik olmayan çözücülerle elde edilen ekstraktları *in vivo* çalışmalarda kullanılarak, pek çok farklı çalışmanın devamlılığı sağlanabilir.

7. ÖZET

Propolis bal arıları tarafından çeşitli bitki kaynaklarından toplanan yapışkan, reçineli doğal bir üründür. Propolisin biyolojik aktivitesinden başlıca sorumlu olan yapılar flavonoidler gibi fenolik bileşiklerdir. Flavonoidler aynı zamanda antioksidan aktiviteden de sorumludur ve bu da özellikle flavonoidlerin radikal temizleme etkisine dayanmaktadır. Bu çalışmada, Trabzon ilinden toplanan Türk propolisinin sulu, etanollü, DMSO' lu, gliserollü ve asetonlu ekstraktları hazırlanarak toplam polifenol ve flavonoid içerik, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güç ve toplam antioksidan statü tayinleri yapılarak, hangi çözücü içinde en fazla çözünebileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca propolisin liyofilize edilerek hazırlanan sulu, etanollü ve DMSO' lu ekstraktları da aynı yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçları desteklemek amacıyla her bir ekstrakt HPLC ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Normal ekstraktlar ile liyofilize edilerek hazırlanan ekstraktların toplam polifenol ve flavonoid içerikleri, demir (Fe^{+3}) indirgeyici güçleri ve toplam antioksidan statüleri birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. HPLC analizlerinde DMSO' lu ve asetonlu ekstraktlar ile etanollü ve gliserollü ekstraktların piklerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sulu ekstraktta ise temel olarak bir pik gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar neticesinde propolisin en iyi DMSO içinde, daha sonra sırasıyla etanol, aseton, gliserol ve suda çözüldüğü sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Propolis, flavonoid, ekstrakt, çözücü, HPLC

8. SUMMARY

Investigation of Solubility of Turkish Propolis in Different Solvents

Propolis is a sticky, resinous natural product collected by honeybees from various plant sources. Phenolic compounds such as flavonoids are mainly responsible for the biological activity of propolis. Flavonoids are also responsible for antioxidant activity which is principally based on their radical scavenging effects. In this study, a major aim is to investigate which solvent is the best for the solubility of the propolis by using concentrations of total polyphenols and flavonoids, assays of ferric reducing power and total antioxidant status in extracts of Turkish propolis prepared with water, ethanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol and acetone. In addition, propolis samples were lyophilized in same solvents except that glycerol and acetone. Same analyses were carried out in lyophilized propolis samples. Each extract of propolis was also analysed qualitatively by HPLC method. Total concentrations of polyphenols and flavonoids, ferric reducing power and total antioxidant status of both normal and lyophilized extracts were found to be agree with each other. In HPLC analysis, peaks seen with DMSO and acetone were similar, and those of with ethanol and glycerol were also similar. In water extract of propolis, principally one peak was observed. It was concluded that propolis solubility was found to be greatest in DMSO, and ethanol, acetone, glycerol and water, respectively.

Anahtar Kelimeler: Propolis, flavonoid, extract, solvent, HPLC

9. KAYNAKLAR

1. Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Sakthisekaran, D.: Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 349-354, 2006.
2. Burdock, G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363, 1998.
3. Aliyazicioglu, Y., Deger, O., Ovali, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., Karahan, S.C.: Effects of Turkish polen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology*, 5: 1652-1657, 2005.
4. Zhou, J., Xue, X., Li, Y., Zhang, J., Chen, F., Wu, L., Chen, L., Zhao, J.: Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry*, 115: 1074-1080, 2009.
5. Bankova, V. and Marcucci, M.C.: Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World*, 81: 182-188, 2000.
6. Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B.: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213-217, 2002.

7. Vatansever, H.S., Sorkun, K., S., Gurhan, I.D., Kurt, F.O., Turkoz, E., Gencay, O., Salih, B.: Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica*, (in press).
8. Silici, S. and Kutluca, S.: Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 69-73, 2005.
9. Engür, T.: Kayseri propolisinin kimyasal yapısı ve standardizasyonu, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2007.
10. Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C.: Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15, 2000.
11. Volpi, N. and Bergonzini, G.: Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42: 354-361, 2006.
12. Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta A.M.: Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1: 7-20, 2002.
13. Schmidt, J.O.: Bee products Chemical composition and application by Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Pres, New York, 1997, pp. 15-26.
14. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73, 2002.
15. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankava, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235-240, 1999.

16. Marcucci, M.C.: Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26: 83-99, 1995.
17. Woo, K.S. and Park, J.S.: Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects by Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Press, New York, 1997, pp. 125-128.
18. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Propolis>; 19/05/2010.
19. Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S.: Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 909-915, 2009.
20. Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.: *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 71-80, 2005.
21. Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K.H., Schnitzler, P.: Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*, 17: 132-138, 2010.
22. Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huaman, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., Campos, D.: HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113: 1243-1251, 2009.
23. Merken, H.M. and Beecher, G.R.: Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3), 2000.
24. Demirkıran, Ö.: *Hypericum Montbretii* Spach. bitkisindeki fenolik bileşiklerin izolasyonu ve tanımlanması, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne, 2005.

25. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584, 2002.
26. Merken, H.M. and Beecher, G.R.: Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897: 177-184, 2000.
27. Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V.: *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 548-554, 2007.
28. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomisine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
29. Liberio, S.A., Pereira, A.L.A., Araujo, M.J.A.M., Dutra, R.P., Nascimento, F.R.F., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M.N.S., Goncalves, A.G., Guerra, R.N.M.: The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 125: 1-9, 2009.
30. Yousef, M.I. and Salama, A.F.: Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1168-1175, 2009.
31. Heo, M.Y., Sohn, S.J., Au, W.W.: Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, 488: 135-150, 2001.
32. Russo, A., Longo, R., Vanella, A.: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73: S21-S29, 2002.
33. Özcan, F.: Propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Sivas, 2006.

34. Santos, V.R., Pimenta, F.J.G.S., Aguiar, M.C.F., Carmo, M.A.V., Naves, M.D., Mesquita, R. A.: Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytotherapy Research*, 19: 652-654, 2005.
35. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15: 561-571, 2001.
36. Aksoy, Z. ve Dığrak, M.: Bingöl yoresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal etkisi üzerinde *in vitro* araştırmalar. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 18 (4): 471-478, 2006.
37. Said, R.A., Grassi, T.F., Scolastici, C., Lima, R.O.A., Darros, B.R., Barbisan, L.F., Camargo J.L.V.: Absence of chemopreventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. *Experimental and Toxicologic Pathology*, (in press).
38. Sforcin, J.M.: Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1-14, 2007.
39. Vercruyse, L., Smaghe, G., Beckers, T., Camp, J.V.: Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry*, 114: 38-43, 2009.
40. Yılmaz, Z.: Öğrenme ve hafızanın şekillendiği beyin bölgelerinde alkolün oluşturduğu hasarlarda propolisin etkileri, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Malatya, 2006.
41. Şenel, N.: Sıçanların periodontal dokularında radyoterapi ile oluşan serbest radikal ve siyalik asit düzeylerinin belirlenmesi ile bioflavonoid ve polifenollerin (Enoant[®]) koruyucu etkisinin araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.

42. Marghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D.S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M.G.: *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115: 878-883, 2009.
43. Karademir, S.E.: Bazı polifenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin tayini, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2005.
44. Castaldo, S. and Capasso, F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: S1-S6, 2002.
45. Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H.: Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. *Life Sciences*, 80: 370-377, 2007.
46. Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D., Karlovic, D.: The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115: 441-448, 2009.
47. Lotito, S.B. and Frei, B.: Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (2): 201-211, 2004.
48. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C.: Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3): 178-182, 2002.
49. Lin, J.Y., Tang, C.Y.: Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101: 140-147, 2007.
50. Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 109-114, 2000.

51. Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L.: Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3482-3485, 2008.
52. Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamedi, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N.: Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103: 729-733, 2007.
53. Singh, R., Singh, S., Kumar, S., Arora, S.: Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry*, 103: 505-511, 2007.
54. Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.: Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234, 2006.
55. Talas, Z.S., Gulhan, M.F.: Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1994-1998, 2009.
56. Gerigelmez, A.Y.: Miyeloid kanser hücre serilerinde polen ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
57. Çolak, M.: Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
58. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.

59. Çolak, M.: Arı poleni ve propolisinin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
60. Santos, A.C., Uyemura, S.A., J.L.C., Bazon, J.N., Mingatto, F.E., Curti, C.: Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 24 (9): 1455-1461, 1998.
61. Harris, S.R., Panaro, N.J., Thorgeirsson, U.P.: Oxidative stress contributes to the anti-proliferative effects of flavone acetic acid on endothelial cells. *Anticancer Research*, 20, 2249-2254, 2000.
62. Mani, F., Damasceno, H.C.R., Novelli, E.L.B., Martins, E.A.M., Sforcin, J.M.: Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 95-98, 2006.
63. Vercruyssen, L., Smagghe, G., Beckers, T., Camp, J.V.: Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry*, 114: 38-43, 2009.
64. Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N.: Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 105-112, 2001.
65. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol>; 24/05/2010.
66. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Etanol>; 24/05/2010.
67. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C.: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65: 1035-1041, 2003.

68. http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide; 24/05/2010.
69. <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>; 24/05/2010.
70. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Gliserin>; 24/05/2010.
71. <http://en.wikipedia.org/wiki/Acetone>; 24/05/2010.
72. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T.: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-339, 2004.
73. Hayashi, K., Komura, S., Isaji, N., Ohishi, N., Yagi, K.: Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chem. Pharm. Bull.*, 47 (11): 1521-1524, 1999.
74. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S.: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 239-246, 2000.
75. Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H.: Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9: 4, 2009.
76. Chen, C.R., Lee, Y.N., Chang, C.M.J., Lee, M.R., Wei, I.C.: Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay *in vitro*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 38: 191-196, 2007.
77. Repolles, C., Herrero-Martinez, J.M., Rafols, C.: Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 1131: 51-57, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

08.05.1983 tarihinde Trabzon' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon' da tamamladı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU