

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER
İÇERİKLERİNİN TAYİNİ VE ANTI-İNFLAMATUVAR ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çisil ALİM

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

HAZİRAN 2019

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER
İÇERİKLERİNİN TAYİNİ VE ANTI-İNFLAMATUVAR ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Çisil ALİM
509151046**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia ERİM

HAZİRAN 2019

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509151046 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **ÇİSİL ALİM**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER İÇERİKLERİNİN TAYİNİ VE ANTI-İNFLAMATUVAR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. F. BEDİA ERİM BERKER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ayşegül Gölcü**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Aysen Yarat
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **02 Mayıs 2019**
Savunma Tarihi : **11 Haziran 2019**





Anneme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sürecinde tanışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum, engin bilgi ve deneyimleriyle, ilgisini, desteğini ve samimiyetini benden esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda yapmış olduğu katkılarla zor anlarımda daima yanımda olan, manevi desteğini her anlamda hissettiğim, birlikte çalışmanın ve üretmenin çok keyifli olduğu sevgili Araş. Gör. Zeynep KALAYCIOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde, attığım adımlarda maddi ve manevi desteklerini bir an olsun üzerimden çekmeyen, bu günlere gelmemde büyük emek sahibi olan, sevgiyi, saygıyı ve adil olmayı öğreten, yoluma ışık tutan, hayattaki en büyük şanslarım biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TYL-2018-41397 kodlu "PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER İÇERİKLERİNİN TAYİNİ VE ANTI-İNFLAMATUVAR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ" isimli proje, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Destekleri için BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Mayıs 2019

Çisil Alim
(Kimyager)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
SEMBOLLER.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....	5
2.1 Tarihsel Süreç.....	5
2.2 Kapiler Elektroforez Tekniğinin Çalışma Prensibi.....	6
2.3 Kapiler Elektroforezde Ayırma Terimleri.....	6
2.3.1 Elektroforetik mobilite.....	6
2.3.2 Elektroosmotik akış (EOA).....	7
2.3.2.1 Elektroosmotik akış hızına etki eden faktörler.....	10
2.3.3 Görünür mobilite ve gelme zamanı.....	11
2.3.4 Analitik parametreler.....	12
2.3.4.1 Ayırma etkinliği.....	12
2.3.4.2 Ayırma etkinliğine etki eden faktörler.....	13
2.3.5 Rezolüsyon.....	13
2.4 Kapiler Elektroforez Cihaz Kısımları.....	14
2.4.1 Kapiler kolon.....	15
2.4.2 Yüksek voltajlı güç kaynağı.....	15
2.4.3 Örnek enjeksiyonu.....	15
2.4.3.1 Hidrodinamik enjeksiyon.....	16
2.4.3.2 Elektokinetik enjeksiyon.....	16
2.4.4 Elektrotlar.....	17
2.4.5 Detektör.....	17
2.4.5.1 UV detektör.....	18
2.5 Kapiler Elektroforez Uygulamaları.....	19
2.5.1 Misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC).....	19
3. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER.....	23
3.1 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE).....	23
3.2 Literatür İncelemeleri.....	24
3.3 Anti-inflamatuar Aktivite.....	25
3.3.1 ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) testi.....	26

4. DENEYSEL KISIM.....	29
4.1 Kimyasallar.....	29
4.2 Standart CAPE Çözeltilisinin Hazırlanması.....	29
4.3 Propolis Örnekleri ve Örneklerin Analize Hazırlanması.....	29
4.4 Cihazlar.....	30
4.5 Kapiler Elektroforez Cihazının Çalışma Koşulları.....	30
4.6 Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	30
4.6.1 TNF- α enzimi inhibisyonunun saptanması.....	30
4.6.2 Rejanların hazırlanması.....	31
4.6.2.1 TNF- α standartlarının hazırlanması.....	31
4.6.2.2 Yıkama tamponunun hazırlanması.....	31
4.6.3 Analiz prosedürü.....	32
4.7 İstatiksel Değerlendirme.....	32
5. SONUÇLAR.....	33
5.1 CAPE'nin Kapiler Elektroforez ile Tayini.....	33
5.1.1 Ayırma ortamının seçilmesi.....	33
5.1.2 Method validasyonu.....	34
5.1.3 Analiz yönteminin propolis örneklerine uygulanması.....	35
5.2 Propolis Örneklerinin Anti-inflamatuvar Aktiviteleri.....	37
5.3 Tartışma.....	38
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	45

KISALTMALAR

CAPE	: Kafeik Asit Fenetil Ester
CAPS	: N-sikloheksil-3-aminopropansülfonik asit
CE	: Kapiler Elektroforez
CD	: Siklodekstrin
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CTAB	: Setiltrimetilamonyum Bromür
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EOA	: Elektroosmotik Akış
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-ESI-MS/MS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Elektrosprey İyonizasyonu-Tandem Kütle/Kütle Spektrometresi
HPLC-MS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
2-HP-β-CD	: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin
IL-1α	: Interleukin-1-alfa
IL-1β	: Interleukin-1-beta
IL-6	: Interleukin-6
IR	: Infrared
LOD	: Dedeksiyon Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi
M.Ö.	: Milattan Önce
NF-κβ	: Nükleer Faktör Kappa-beta
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

TNF- α : Tümör Nekrozu Faktörü-alfa
UV : Ultraviyole
UV-DAD : Ultraviyole-Diyot Dizisi Dedektörü



SEMBOLLER

v	: Hız
μ_{ep}	: Elektroforetik mobilite
μ_{eoa}	: Elektroosmotik mobilite
V	: Voltaj
η	: Viskozite
E	: Elektriksel alan
ϵ	: Tamponun dielektrik sabiti
σ	: Pikin standart sapması
D	: Difüzyon katsayısı
w	: Pikin taban genişliği
ΔP	: Kapiler boyunca basınç farkı
ρ	: Örneğin yoğunluğu
g	: Yerçekimi ivme katsayısı
Δh	: Örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı
A	: Absorbans
ϵ	: Molar absorptivite katsayısı
k'	: Kapasite faktörü
t_0	: EOA'ya doğru hareket eden çözünenin alıkonma zamanı
t_{mc}	: Miselin alıkonma zamanı
K	: Ayrılma katsayısı
V_s	: Misel fazın hacmi
V_m	: Hareketli fazın hacmi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kapiler elektroforez detektör türleri.....	17
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez yöntemleri.....	19
Çizelge 5.1 : Geliştirilen yöntemin analitik parametreleri.....	35
Çizelge 5.2 : Propolis numunelerine ait CAPE miktarları.....	36
Çizelge 5.3 : Propolis numunelerinin TNF- α enzim inhibitör aktiviteleri.....	37



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Elektroosmotik akış gösterimi.....	8
Şekil 2.2 : CE ve HPLC de akış ve pik profilleri: (a) Elektroosmotik Akış. (b) Parabolik Akış.....	10
Şekil 2.4 : Kapiler elektroforez cihazı.....	14
Şekil 2.5 : (a) Yüzey aktif madde monomerleri (b) Misel.....	20
Şekil 3.1 : CAPE molekül yapısı.....	23
Şekil 5.1: 25 µg/mL konsantrasyonda standart CAPE'ye ait bir elektroferogram.....	34
Şekil 5.2: (a) 1:50 seyreltilmiş Ticari 1 propolis ekstraktına ait elektroferogram, (b) Bu ekstrakta standart CAPE spike edilmesi ile alınmış elektroferogram.....	37



PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE) İÇERİKLERİNİN TAYİNİ VE ANTIİNFLAMATUVAR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Propolis, son yıllarda en az bal kadar önemli hale gelen bir arı ürünüdür. Uzun yıllardan beri geleneksel tıpta en çok antibakteriyel, anti-inflamatuvar ve rejeneratif amaçlarla çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu etkilerin çoğunun propolisin aktif bileşenlerinden biri olan kafeik asit fenetil estere (CAPE) bağlı olduğu düşünülmektedir. CAPE'nin insan sağlığı üzerine çok geniş spektrumlu etkileri bulunmakta olup, antiseptik, antibakteriyel, anti-inflamatuvar, antioksidan, antimutajenik aktiviteleri bilimsel çalışmalarda kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışmasının birincil amacı, CAPE'nin tayini için hızlı ve etkin bir analiz yöntemi geliştirilmesi ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolis örnekleri ile ticari propolis boğaz spreylelerinin CAPE miktarlarının aydınlatılmasıdır. Propolisin aktif bileşenlerinden CAPE'nin antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanserojen ve antibakteriyel özelliklerinin keşfedilmesiyle birlikte, CAPE son senelerde birçok yeni araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Dünyanın farklı bölgelerindeki propolislerin CAPE'yi de içeren kimyasal bileşenlerini ve bunların miktarlarını veren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle sıvı ve gaz kromatografisi tekniklerine başvurulmuştur. Kapiler elektroforez yöntemi yüksek ayırma etkinliğine sahip olması, kısa analiz süresi ve az miktarda örnek ve çözücü kullanılması bakımından diğer yöntemlerden üstündür. Bu tez çalışmasında CAPE'nin tayini için, bir misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC) yöntemi kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda optimum ayırma ortamı 40 mM N-sikloheksil-3-aminopropansülfonik asit (CAPS), 50 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 10 mM 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (2-HP- β -CD) (pH: 10,4) olarak belirlenmiştir. Yöntem başarılı bir şekilde valide edilmiştir. Ticari propolis spreyle örneklerinin (n=4) CAPE miktarları 16,88 – 80,45 mg CAPE/100 mL aralığında bulunmuştur. Sivas ve Zonguldak propolislerinin CAPE miktarları ise sırasıyla 330,8 – 441,7 mg CAPE/100 g propolis olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci basamağında ise CAPE miktarları tayin edilen propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri incelenmiştir. İnflamasyon, doku fonksiyonu kaybıyla sonuçlanan olayları zincirinin bütünüdür. İnflamasyon sürecinde inflamasyon aktivatörü olan tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi bir çok pro-inflamatuvar sitokinlerin makrofajlar tarafından salımı gerçekleşir. Bu çalışmada propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri, TNF- α enziminin *in-vitro* inhibitör aktivitesine dayanarak ölçülmüş, ticari propolis spreylelerinin inhibisyonu %55,35 - %83,92 aralığında bulunmuştur. Sivas ve Zonguldak propolisleri ise TNF- α 'yı sırasıyla %68,75 ve %66,07 oranında inhibe etmiştir.

Son olarak örneklerdeki CAPE miktarları ile örneklerin anti-inflamatuvar aktivitelerinin korelasyonu araştırılmış ve 0,944 olarak bulunmuştur. Bu yüksek korelasyon, propolisin anti-inflamatuvar etkisi üzerinde CAPE'nin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.



DETERMINATION OF THE CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER (CAPE) CONTENT OF THE PROPOLIS SAMPLES AND INVESTIGATION OF THEIR ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES

SUMMARY

Propolis, a product collected by bees from diverse plants, protects bee habitats from insects and microorganisms, seal cracks and sterilizes their hives. The word "propolis" is of Greek origin, "pro" meaning "defense" and the "polis" meaning "city". From here, the defense of the hive can be deduced. Propolis was discovered before the period of Christ. Aristotle who wanted to examine bees by using transparent hives realized that the transparency of the hive was closed by dark colored and viscous materials. These materials were thought to be propolis.

It has been reported that propolis, traditionally used by the public since ancient times, has been used in the treatment of skin diseases, digestive system disorders and ulcers by Hippocrates. The most known feature of propolis is its effect against microorganisms. The beneficial properties of propolis have been utilized since its discovery and are still being used today. The biological activities of propolis, such as anti-inflammatory, antitumor, antiulcer, antimicrobial and antioxidant, have also become widespread in apitherapy, medicine, food and cosmetics. It is used in food and beverages because it increases body resistance and has antibiotic effects. It also has medicinal preparations against mouth and throat infections. Commercial propolis products such as tablets, lozenges, mouth spray, shampoo, toothpaste and creams are also available.

In regards to the properties of propolis, the substances in the content of these products demonstrate differences in the construction of geographical regions and in the variety of bees. The studies are indicated that propolis contains more than 300 compounds. The chemical composition of propolis varies depending on the flora of the area it is collected in, the type of plants grown in that region, the climatic conditions of the region, the season and time of collection, the amount of resin in the bud, and the race of the bee and the content of the secreted material. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is one of the most common substance among these compounds. CAPE has a great deal of pharmacological properties such as anti-inflammatory, anticarcinogenic, antimicrobial, antiseptic, and antioxidant properties.

The research results of propolis and CAPE have shown that both properties have beneficial and extensive therapeutic effects. This discovery has increased the research of propolis and CAPE not only in Turkey, but around the world as well. Generally, chromatographic methods such as high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) were used in these studies. Capillary electrophoresis (CE) is an analytical method which has high separation efficiency and short analysis time. It separates many different compounds from small ions to large molecules using small amounts of solvent and sample. Capillary electrophoresis consists of several

different modes. In order to determine the CAPE in propolis content, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method was applied. MEKC is used for the separation of neutral compounds with high efficiency and sensitivity.

In the thesis study of CAPE content of the propolis samples, the working electrolyte composition was selected as 40 mM N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS), 50 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 mM 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2HP- β -CD) at pH 10.4. The detection was performed by a UV-DAD detector at $\lambda=230$ nm. In this condition, the migration time was 6 minutes for CAPE. Validation studies of the applied methods were performed and successful results were obtained. The calibration equation was $y = 3.478x - 11.17$ with the correlation coefficient (R^2) of 0.994. The precision of the method was performed in terms of inter-day and intra-day repeatability as RSD%. The standard CAPE solution, prepared at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$, was injected into the capillary column seven times during the day. Repeatability was obtained by injecting 25 $\mu\text{g/mL}$ CAPE solution seven times in the course of three consecutive days ($n = 7 \times 3$). The intraday and inter-day repeatability values were obtained by calculating the relative standard deviation (%) of corrected peak area and the migration time. The accuracy of the method was examined by recovery analysis. Standard CAPE was added to the two propolis samples in three different concentrations. These concentrations were added as half of the amount, its own amount, and twice of the amount of CAPE detected in the propolis samples. The limit of detection (LOD) was calculated as 1.48 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantification (LOQ) was 4.93 $\mu\text{g/mL}$.

The developed MEKC technique was applied for two propolis samples collected from Sivas and Zonguldak and four commercial propolis throat spray samples. Solid propolis samples were homogenized after collection. The sample of Sivas propolis was weighed at 10.14 g and extracted in a mixture of 140 mL of 98% ethanol - 2% water (v/v) (72.429 mg/L). 3.18 g of Zonguldak propolis was precisely weighed and extracted in a mixture of 63 mL of 98% ethanol - 2% water (v/v) (50.476 mg/L). The samples were filtered through 0.45 μm diameter microfilter. Propolis samples collected from Sivas and Zonguldak were diluted 25 times with methanol and the commercial propolis spray samples were diluted 50 times. They were then injected into the capillary column. CAPE amounts of the commercial propolis spray samples were between in the range of 16.88 – 80.45 mg CAPE/100 mL. CAPE levels of Sivas and Zonguldak propolis samples were found to be 330.8 mg and 441.7 mg CAPE/100g propolis, respectively.

In the second part of this thesis study, anti-inflammatory activities of propolis samples were investigated. Inflammation is a chain of events that results in loss of tissue function. In the inflammation process, many pro-inflammatory cytokines, such as inflammatory activator tumor necrosis factor- α (TNF- α), are released by macrophages. In this study, anti-inflammatory activities of propolis samples were measured based on the in-vitro inhibitory activity of TNF- α enzyme. For this purpose, Human TNF alpha ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used. Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) is an easy, fast and frequently used biochemical technique which detects the presence of antigen or antibody in a sample. It has four different types; sandwich (non-competitive), competitive, direct and indirect. The human TNF alpha ELISA assay performed in this thesis is based on the sandwich ELISA technique. In the study, antigen concentration in unknown samples is determined.

The kit contains a 96-well microplate with a broken and detachable lane coated with a monoclonal antibody. After the materials in the kit are prepared in accordance with the procedure given by the manufacturer, they are pipetted into this microplate together with the samples of propolis. At the last step of the analysis, the absorbance of the wells was read at 450 nm. Absorbance measurements were performed using the BioTek Power Wave XS (Winooski, VT, USA) branded microplate reader and Gen5 Data Analysis software. Inhibition values of commercial propolis sprays were found between 55.35% and 83.92%. The propolis samples collected from Sivas and Zonguldak inhibited TNF- α by 68.75% and 66.07%, respectively.

Finally, the correlation between the amount of CAPE in the samples and the anti-inflammatory activities of the samples was investigated and found to be 0.944. This high correlation indicates that CAPE has an important role on the anti-inflammatory effects of propolis.

In the literature, there is not any studies that reveal the CAPE amount in Turkish propolis. In this thesis, Turkish propolis was first evaluated in regards to their CAPE amounts. Afterwards, the propolis' anti-inflammatory activities were compared and lastly, their correlation with CAPE contents were examined. In addition, this study was the first to analyze CAPE by using the capillary electrophoresis method.



1. GİRİŞ

Propolis çam ağacı, kızılağaç, söğüt, kozalaklı ağaç, palmiye ve kavak reçinelerinden toplanarak oluşturulan, *Apis mellifera* türündeki bal arıları tarafından meydana getirilen reçineli bir üründür. Arı kovanlarındaki çatlakları onarmak ve patojenik mikroorganizmalara karşı koruyucu bir bariyer yaratmak için arılar tarafından kullanılır [1, 2]. Arı kovanının sağlıklı olması, kovanda bakteri ve virüs ürememesi arıların koloni halinde yaşamlarını sürdürebilmeleri açısından önemlidir. Propolisin kovan içindeki temel görevi arıları hastalıklara karşı korumak, kovanda mikroorganizma, virüs ve bakteri gibi patojenlerin üremesine engel olmasıdır. Arılar propolisi kovanlarını kışın soğuk havadan ve rüzgardan korumak, kovan girişine gelebilecek muhtemel tehlikelere karşı koloniyi korumak, peteklerin temizliğinde, kraliçe arının yumurtasının temiz bir ortamda gelişmesinde ve yavru arının korunmasında kullanılmaktadır. Kovan içine girip ölen böceklerin üzeri propolisle kaplanarak bunların kovana zarar vermeleri engellenir. Yine kovandaki mikroorganizma sayısının atmosferden çok daha az olmasının sebebi propolistir.

Propolis kelimesi Yunanca kökenli olup pro "savunma", polis ise "şehir" anlamındadır. Buradan şehrin veya "kovan"ın savunması anlamı çıkarmak mümkündür. Propolisin keşfi milattan önceki döneme dayanmaktadır. Arıları saydam kovan kullanarak incelemek isteyen Aristo, kovanın saydamlığının koyu renkli ve viskoz maddeler tarafından kapatıldığını farketmiştir. Bu maddenin propolis olduğu düşünülmektedir. Propolis, 15-25 °C arasında balmumu gibi sert, ısıtılınca (30-40 °C) yapışkan ve reçinemsidir. Bu özelliği nedeniyle arı yapışkanı olarak da bilinir. 80 °C'ye kadar ısıtıldığında ise kısmen erir.

Çok eski zamanlardan beri ağrı azaltıcı/kesici ve yara iyileştirici etkilerinden dolayı halk arasında geleneksel olarak kullanılan propolisin Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından deri hastalıkları, sindirim sistemi rahatsızlıkları ve ülserin tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir. Propolisin en çok bilinen özelliği ise mikroorganizmalara karşı etkisidir. Söz konusu bütün özellikler, propolisin günümüze kadar kullanımını sağlamıştır. Propolisin anti-inflamatuvar, antitümör, antiülser, antimikrobiyal ve

antioksidan gibi biyolojik aktiviteleri günümüzde de apiterapi, tıp, gıda ve kozmetik alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır. Vücut direncini artırma ve antibiyotik etki gösterme özelliklerinden dolayı yiyecek ve içeceklerde de kullanılmaktadır. Ayrıca ağız ve boğaz enfeksiyonlarına karşı tıbbi preparasyonları bulunmaktadır. Tablet, pastil, ağız spreyi, şampuan, diş macunu, krem gibi ticari propolis ürünleri de hazırlanmıştır.

Propolisin sağlık üzerine bilinen olumlu etkileri 1960'lı yıllardan beri bilim adamlarının dikkatini çekmekte olup, günümüze kadar farmakolojik, biyoaktif ve iyileştirici özellikleri ile ilgili pek çok araştırma ve bilimsel makale yayınlanmıştır. Bu makalelerde propolisin antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, immünomodülatör, rejeneratif, hepatoprotektif, antioksidan, anti-tümör ve anti-HIV gibi biyolojik aktivitelerine vurgu yapılmıştır [3-10]. Propolisin alerjik etkisinin dışında ise herhangi bir yan etkisi henüz bildirilmemiştir [2]. Propolis üzerine ilk ayrıntılı çalışma Ghisalberti ve arkadaşları tarafından 1978 yılında yayınlanmıştır [11].

Farklı propolis örnekleriyle yapılan çalışmalar, propolisin kimyasal bileşiminin son derece karmaşık olduğunu ve bileşiminde 300'den fazla madde olduğunu ortaya çıkarmıştır. Münstedt ve Zygmunt (2001) propolisin genel bileşimini %50 reçine, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik kalıntılar olarak rapor etmiştir [12]. Temel olarak kimyasal bileşiminde ise alifatik asitler, esterler, aromatik asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, aldehitler, amino asitler, ketonlar, terpenoidler, vitaminler ve inorganik maddeler bulunmaktadır [3, 13, 14]. Propolisin kimyasal bileşimi, toplandığı bölgenin florasına, o bölgede yetişen bitkilerin türüne, bölgenin iklim koşullarına, toplanma mevsimine ve zamanına, tomurcuktaki reçine miktarına, arının ırkı ve salgıladığı madde içeriğine bağlı olarak değişmektedir [14]. Bütün bu etmenler propolisin standartlaştırılıp tedavi amaçlı kullanımında bazı zorluklar ve sınırlamalar getirir. Bu nedenle dünya çapında pek çok ülke artık kendi standartını oluşturmaya başlamıştır. Ülkemizde ise Türk Standartları Enstitüsü (TSE-2003) bir standart oluşturmuştur [15]. Bu standarta göre propolis, fenolik asitleri, flavonları, flavonelleri, flavononları bulundurulmalıdır. Benzoik asit miktarı %0,6-12,0 (a/a), glikoz miktarı %0,8-7,7 (a/a) ve sakkaroz miktarı %0,1-3,4 (a/a) olmalıdır.

Propolisin uzun yıllardan beri bilinen en önemli özelliği virüslere karşı olan etkisidir. Literatüre göre bundan sorumlu temel bileşik propolis içeriğindeki kafeik asit fenetil

esterdir [16]. Kafeik asit fenetil ester (CAPE), propolis ekstraktından doğal olarak elde edilen, katekol halkası içinde hidroksil grupları içeren bir polifenoldür [16,17]. Antioksidan, anti-inflamatuvar, antikarsinojenik, antibakteriyel gibi pek çok etki gösteren biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir. Ayrıca ksantin oksidaz, siklooksijenaz (COX) ve nükleer faktör-kappa β (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonu gibi bazı enzim aktivitelerinin inhibisyonunu içeren anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu literatürde gösterilmektedir.

Günümüze kadar propolis ve CAPE'nin terapötik etkileri üzerine Türkiye'de ve dünyada pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışmalarda genellikle sıvı ve gaz kromatografisi teknikleri uygulanmıştır [18-20].

Bu tez çalışmasında ise propolis içindeki CAPE'nin tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Kapiler elektroforez, yüksek hızda küçük hacimler ile çalışılabilirlik ve yüksek verim elde edilebilirliğinden dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC)'ne karşı iyi bir alternatif olarak geliştirilmiştir. Gıdaların analizinde, kalite kontrolünde ve kimyasal bileşenlerinin tayininde kullanılarak diğer yöntemlerde uygulanması gereken ön hazırlık kısımlarını ortadan kaldırır ve injeksiyon yapabilme imkanı sağlayarak analiz zamanını minimuma indirir. Geliştirilen kapiler elektroforez tekniği Anadolu'dan toplanmış 2 adet propolis ile 4 adet ticari propolis preparatına uygulanmış, bunların CAPE içerikleri aydınlatılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci basamağında ise CAPE miktarları bulunan propolislerin anti-inflamatuvar aktiviteleri insan tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α) enzimine karşı test edilmiştir. Son olarak propolislerin anti-inflamatuvar aktiviteleri ile CAPE içerikleri arasındaki korelasyon incelenmiştir.



2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

2.1 Tarihsel Süreç

Elektroforez, elektriksel bir alan etkisi ile, yüklü iyonların itilmesi veya çekilmesi sonucunda ortaya çıkan diferansiyel hareketler olarak tanımlanmaktadır. 1937’de İsveçli Tiselius tarafından ayırma tekniği olarak ortaya atılmıştır [21]. Bir tüp içerisinde tampon çözeltilerin arasına protein karışımları yerleştirdikten sonra, elektriksel bir alan uygulanmıştır ve böylece örnek bileşenlerin, yüklerine ve mobilitelerine göre, belirli bir yönde ve oranda hareket ettiğini gözlemlemiştir. Bu çalışma sonucunda ise Tiselius, Nobel Ödülü’ne hak kazanmıştır. Günümüzde ise hızla gelişen bir ayırma tekniği olarak kullanılmaktadır.

Elektroforezde çözelti içerisindeki sorunlardan biri pik genişlemesidir. Bilim insanları böyle bir problemle karşılaşmamak adına, poliakrilamid veya jel gibi anti-konvektif ortamlar yaratarak, meydana gelebilecek sorunları önlemeye çalışmışlardır. Bu tarz çözümlerin nükleik asid ve proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin ayrılmasını sağladığı fakat ayırma zamanını uzattığı ve ayırmayı olumsuz etkilediği görülmüştür [22]. Zaman içerisinde, kolon çapının küçültülmesi ile ısı oluşumunun minimum düzeyde tutulmasını ve ısının daha verimli bir şekilde dağılmasını sağlayarak, pik genişlemesi problemini ortadan kaldırılabileceği anlaşılmıştır [23].

1967 senesinde Hjerten tarafından iyonlar, proteinler ve virüsler gibi bir çok analiti birbirinden ayırabilmek adına, 1 - 3 mm’lik kolonlar kullanmaya başlamıştır [24]. 1974’te Virtanen ve Mikkers, 200 µm çapında kolonlar kullanarak, pik genişliğinin azalmasını sağlamışlardır [25]. 1981 yılında, Jorgenson ve Lukacs yaptıkları çalışmalarda, kapiler çapını 75 µm’ye azaltarak 30 kV’a kadar varan yüksek ayırma voltajında yapılan çalışmaları mümkün kılmışlardır. Bir yandan oldukça fazla miktardaki analitlerin ayrıştırılmasını sağlarken, diğer taraftan da ısı dağılımını kontrol altına almayı başarmışlardır [26]. 1989 yılından itibaren ise, Beckman Coulter vasıtasıyla ilk kez ticari bir kapiler elektroforez sistemi kullanılmaya

başlanmıştır [23]. Bu durum, biyolojik alanda pek çok önemli gelişmenin meydana gelmesini sağlamıştır.

Tüm bu gelişmelerin sonucunda kapiler elektroforezin en büyük avantajlarından birisi olarak birden fazla uygulama alanına sahip olması söylenebilir. Yalnızca amino asitler, boyalar, vitaminler, pestisitler, inorganik iyonlar, organik asitler, sürfaktanlar, karbohidratlar gibi makromolekülleri ayırmada değil, tek seferde yapılan analizlerde birden fazla molekülü ayırmanın mümkün olabileceği anlaşılmıştır. Bunlara ek olarak ekonomik ve hızlı olması, düşük hacimde örnek ve çözücü kullanımına imkan vermesi açısından önemli ve hızla gelişen bir ayırma yöntemidir [27].

2.2 Kapiler Elektroforez Tekniğinin Çalışma Prensibi

Kapiler elektroforez cihazında ayırma işlemi, silindirik şeklindeki kapiler kolonların her iki ucunun bir tampon çözeltiye batırılarak, içerisinden 5 – 30 kV'lık yüksek bir voltaj ve 200 – 500 V/cm'lik elektrik alan geçirilmesi ile sağlanmaktadır. Kapiler kolonun iç çapı 25 – 100 µm, uzunluğu 30 – 100 cm olacak şekilde ayarlanmalıdır. İç çapın küçük olması sonucunda hem yüksek elektrik alan uygulanabilir, hem de meydana gelen ısı etkili bir şekilde dağıtılabilmektedir. Yüksek elektrik alan uygulaması ile numunenin gelme süresi kısaltılır. Uygulama sonucunda, pozitif yüklü bileşenler negatif elektroda, negatif yüklüler ise pozitif elektroda doğru hareket ederler [22].

2.3 Kapiler Elektroforezde Ayırma Terimleri

2.3.1 Elektroforetik mobilité

Sabit hızla hareket eden iyonların veya kolloidal taneciklerin, elektrik alanlarının artırılması ile hızlarında artış görülmektedir.

Elektrik alan uygulaması sonucunda, yüklü bir iyonun hızı, aşağıda ifade edilen eşitlikte olduğu gibi tanımlanmaktadır.

$$v = \mu_{ep} \cdot E \quad (2.1)$$

$$v = \mu_{ep} \cdot V \cdot L^{-1} \quad (2.2)$$

v : İyonun hızı

μ_{ep} : Elektroforetik mobilité

E : Elektrik alan

V : Uygulanan voltaj

L : Kapiler uzunluğu

2.1 eşitliğinden, elektroforetik mobilitenin sabit olduğunu ve elektrik alanı arttırdığımızda hızın da doğru orantılı olarak arttığını anlayabiliriz. Bunlara ek olarak, çözelti içerisinde uygulanan elektrostatik kuvvetin (F_E) parçacığın yükü (q) ve elektrik alanı (E) ile bağlantılı olduğu, aşağıdaki eşitlikten anlaşılabilir.

$$F_E = q \cdot E \quad (2.3)$$

Elektrostatik kuvvet etkisi ile yüklü parçacıkların hızlandığı ve bunun sonucunda ise göç etmeye başladıkları gözlenmektedir.

Parçacıkların ayrılmaları, sürtünme kuvvetinden de etkilenir. Sürtünme kuvveti (F_F), harekete ters yönde gerçekleşen bir kuvvettir.

$$F_F = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.4)$$

Stokes eşitliği ile gösterilmektedir.

η : Çözeltinin viskozitesi

r : İyonun yarıçapı

v : İyonun hızı

Tüm bu süreç sonunda, elektrostatik kuvvet (F_E) ve sürtünme kuvveti (F_F) denge haline gelirler [28].

$$F_E = F_F \quad (2.5)$$

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot \mu_e \cdot E \quad (2.6)$$

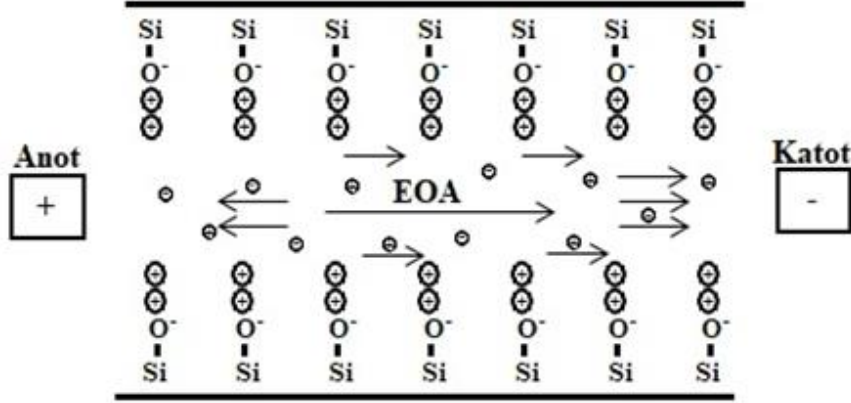
$$\mu_{ep} = q / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r) \quad (2.7)$$

2.7 eşitliğine göre eğer iyon boyutu küçük, iyon yükü büyük olursa, hareket hızının yüksek olabileceği ve böylece iyi bir ayırma meydana gelebileceği, fakat eğer iyon boyutu büyük, iyon yükü küçük olursa, hareket hızının düşük olması neticesinde madde ayırımının da zor olacağı anlaşılmaktadır.

2.3.2 Elektroosmotik akış (EOA)

Kapilerin iç duvarında oluşan serbest silanol grupları ($Si - O - H$) ile [27], çözelti yüzeyi arasında elektriksel çifte tabaka oluşmaktadır. Eğer, $pH < 2,5$ ise, serbest silanol grupları, nötr $Si - O - H$ olacak şekilde bulunurlar. Fakat eğer $pH \geq 3$ olursa, böyle bir durumda iç duvardaki silanol gruplarının protondan arındırılmış olması nedeniyle ($SiOH_{(k)} \leftrightarrow SiO^-_{(k)} + H^+_{(aq)}$), negatif yüklü (SiO^-) oluşacaktır. Kapiler duvarındaki yükün negatif olması sebebiyle, tampon çözelti içerisindeki pozitif

yükler, negatif yüklere doğru çekilmektedir. Böylece elektriksel bir çift tabaka oluştururlar. Bu durumda, kapiler üzerine yüksek bir voltaj uygulanmasıyla, pozitif iyonlar, negatif elektrota doğru yönelirler ve katyonlar solvatize oldukları için tampon çözeltinin de katota doğru hareket etmesine neden olurlar. Bu akışa da EOA denir [22]. Elektroosmotik akış gösterimi Şekil 2.1'deki gibidir.



Şekil 2.1 : Elektroosmotik akış gösterimi [29].

Uygulanan elektriksel alan altında, yüklü maddelerin elektroforetik akış hızı ile anottan katota doğru hareket ettikleri görülmektedir. Elektroforetik akış hızı, aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır.

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (2.8)$$

v_{ep} : Elektroforetik akış hızı

μ_{ep} : Elektroforetik mobilite

E : Elektriksel alan kuvveti

Şekilde gösterilen hareketli tabaka ile sabit tabaka arasında potansiyel meydana gelmektedir. Bu potansiyele, zeta potansiyeli (ξ) adı verilir ve Helmholtz eşitliği ile gösterilir.

$$\xi = 4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \mu_{eoa} / \epsilon \quad (2.9)$$

μ_{eoa} : Elektroosmotik mobilite

η : Tamponun viskozitesi

ϵ : Tamponun dielektrik sabiti

Formülleri yerine koyduğumuzda, Elektroosmotik Akış Hızı (v_{eoa})'nın;

$$v_{\text{EOA}} = \varepsilon \cdot \xi \cdot E / 4 \cdot \pi \cdot \eta \quad (2.10)$$

eşitliğinden sağlandığı görülmektedir.

Elektroosmotik akış boyunca hareketli iyon, elektroosmotik akış hızı ile elektroforetik akış hızının toplamı kadar hızlı hareket edebilmektedir. Bu nedenden yola çıkarak:

$$\text{Pozitif iyonların hızı ; } v_i : (\mu_{\text{eo}} + \mu_i) \cdot E \quad (2.11)$$

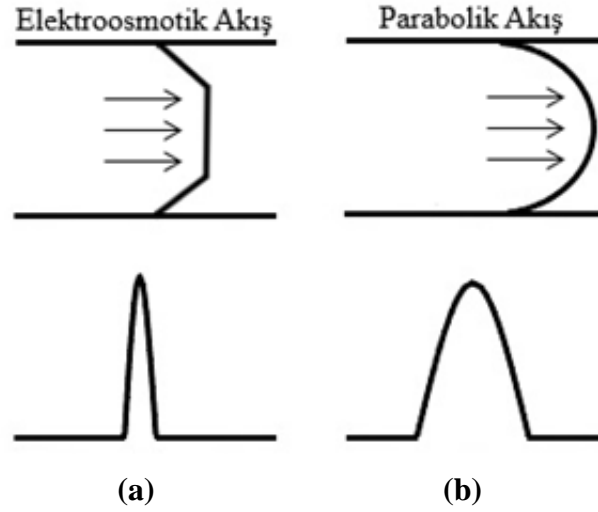
$$\text{Negatif iyonların hızı ; } v_i : (\mu_{\text{eo}} - \mu_i) \cdot E \quad (2.12)$$

$$\text{Nötral Partiküller hızı ise ; } v_i : \mu_{\text{eo}} \cdot E \quad (2.13)$$

formüllerinden hesaplanmaktadır [30].

Elektroosmotik akış, iyonların yüklerini dikkate almadan, anottan katoda doğru ilerlemelerine olanak sağlamaktadır. Katyonlar, elektroosmotik akış ile aynı yönde hareket ettiklerinden ötürü, anyon ve nötral parçacıklardan daha hızlı ilerleme kaydederler. Anyonların hareket yönü ise, elektroosmotik akışın tam tersi yönünde olmasından dolayı, diğer parçacıklardan daha yavaş hareket etmektedirler. Bu sebeple, tek seferde yapılan analizde, anyon, katyon ve nötral parçacıklar birbirlerinden bu yöntemle ayrılabilirler [22].

EOA sonucunda iyi bir ayırımın gerçekleşmesi için kapiler içerisindeki elektroosmotik akışı hareket ettirici kuvvetin dağılım şekli de önemlidir. Eğer bu kuvvet her yöne eşit ve düz bir şekilde dağılırsa, iç yüzeyde basınç farklılığı yaratmaz. Böylece, partiküller içerisinde de herhangi bir dağılım söz konusu olmaz ve detektörden, simetrik ve dik görünen pikler elde edilebilir. Diğer taraftan HPLC’de dış basınç itici güç halindedir. Böylece parabolik bir akış kuvveti meydana gelir. Bunun sonucunda ise pik genişlemesi kaçınılmaz olur. Pik genişlemesi iyi bir ayırım yapılabilmesini engellemektedir. Aksine eğer düz bir akış kuvveti varsa, iyi bir ayırım gözlenebilmektedir [22, 30]. Elektroosmotik ve parabolik akış Şekil 2.2’de karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.2 : CE ve HPLC de akış ve pik profilleri: (a) elektroosmotik akış (b) parabolik akış [22].

2.3.2.1 Elektroosmotik akış hızına etki eden faktörler

Elektroosmotik akış hızının değişmesine neden olacak birçok faktör mevcuttur ve bunların etkileri şu şekilde açıklanabilmektedir [22, 28]:

a) Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın artması ile viskozite (η) azalacağından dolayı elektroosmotik akışın hızı artacaktır.

b) İyonik şiddet ve konsantrasyon etkisi

İyonik şiddet ve konsantrasyon zeta potansiyeline (ξ) etki eder. İyonik şiddeti veya tamponun konsantrasyonu arttırıldığında zeta potansiyeli dolayısıyla elektroosmotik akış hızı azalır. Ayrıca iyonik şiddetin artması ile yüksek akım meydana gelirken, joule ısı oluşur. Eğer iyonik şiddet azaltılırsa, adsorpsiyon meydana gelir ve elektroosmotik akış hızı artar.

c) Yüzey aktif madde etkisi

Yüzey aktif madde etkisini, pozitif yüklü yüzey aktif maddeler ve negatif yüklü yüzey aktif maddeler olmak üzere iki farklı şekilde ele alabiliriz. Pozitif yüklü yüzey aktif maddeler elektroosmotik akışın hızını azaltır veya akış yönünü tersine çevirebilir. Negatif yüklü yüzey aktif maddeler ise elektroosmotik akışın hızını arttırır.

d) Organik çözücü ilavesinin akış hızına etkisi

Organik çözücülerin su ile karıştırılması ile tamponun dielektrik sabiti (ϵ) azalır. Dielektrik sabitinin azalmasının elektroosmotik mobilitesi (μ_{eoa}) üzerinde azaltıcı etkisi vardır. Ayrıca su ile karışan organik çözücüler, zeta potansiyeli (ξ) ve viskozitenin (η) değişmesine de neden olurlar ve böylece elektroosmotik mobilitiyi azaltıcı yönde etki ederler.

e) Tampon pH'nın elektroosmotik akış hızına etkisi

Tampon pH'nın değiştirilmesi sonucunda, elektroosmotik akışın hızı çok basit bir şekilde değiştirilebilir. Akış hızının değiştirilmesinde uygulanabilecek en kullanışlı yöntemdir. Düşük pH, elektroosmotik akışın hızını azaltıcı yönde etki ederken, yüksek pH akış hızını artırır. Dezavantaj olarak, çözeltinin yükünü veya yapısını değiştirebildiği söylenmektedir.

f) Elektrik alan etkisi

Elektroosmotik akış hızını etkileyen diğer bir faktör elektrik alanıdır. Elektrik alanın artması ile elektroosmotik akış hızı da artar. Ancak elektroosmotik akış hızının artması joule ısıısının oluşmasına sebep olur. Elektrik alanı azaltığımızda ise akış hızında azalma görülür.

2.3.3 Görünür mobilite ve gelme zamanı

Elektroosmotik akış varlığında ölçülen mobiliteye “görünür mobilite (μ_g)”, çözeltilerin detektöre ulaşması için gereken süreye ise “gelme zamanı (t)” denir. Her iki ifadeyi oluşturan eşitlikler aşağıda görülmektedir.

$$\mu_g = l / (tE) = IL / (tV) \quad (2.15)$$

$$\mu_g = \mu_e + \mu_{\text{EOF}} \quad (2.16)$$

V: Uygulanan voltaj

l: Kapilerin etkin uzunluğu

L: Kapilerin toplam uzunluğu

t: Gelme zamanı

E: Elektrik alan

Elektroforetik mobilite (μ_e), elektroosmotik akış hızı ölçülerek ulaşılabilen görünen mobiliteden (μ_g) elde edilmektedir.

Elektroosmotik akış hızını ölçmek için aseton, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi, bulunduğu ortamda etkileşime girmeyen nötral çözücüler kullanılmalıdır. Ayrıca, kapiler kolonun etkin uzunluğu olarak tanımlanan ifade, enjeksiyon noktasından dedeksiyon noktasına kadar olan uzaklık olarak hesaplanmalıdır [22].

2.3.4 Analitik parametreler

2.3.4.1 Ayırma etkinliği

Elektroforezde gerçekleşen ayırma etkinliği, çözünen maddelerin akışkanlıklarındaki farklılığa göre şekil almaktadır. Teorik tabaka sayısı N ile ifade edilir ve kapilerin boyu ile orantılıdır.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.17)$$

l : Kapiler uzunluğu

σ : Pikin standart sapması

Pikin standart sapması ise;

$$\sigma^2 = 2 Dt \quad (2.18)$$

D : Difüzyon katsayısı

olarak ifade edilmektedir.

Tüm bunların yanı sıra ayırma etkinliği, teorik tabaka sayısına eşdeğer bir yükseklik (HETP) ile orantılıdır.

$$H = l / N \quad (2.19)$$

Teorik tabaka sayısı ile standart sapma formüllerini kullandığımızda, meydana gelen yeni elektroforetik ifade;

$$N = \mu_{ep} VI / 2DL \quad (2.20)$$

şeklindedir.

$$E = V / L \quad (2.21)$$

formülünden,

$$N = \mu_{ep} El / 2DL \quad (2.22)$$

eşitliği elde edilebilir. Bu eşitlikten, kapiler içerisindeki moleküllerin yüksek elektrik alan altında daha kısa sürede geldiği, ayrıca düşük difüzyon katsayısına sahip büyük

moleküllerin, küçük moleküllere göre daha düşük bir ayırma etkinliğine sahip oldukları görülmektedir.

Bunlara ek olarak, teorik plaka sayısı değeri, elektroferogramdan yararlanılarak da belirlenebilir [22].

$$N = 5,54 \cdot (t / w_{1/2})^2 \quad (2.23)$$

t : Göç süresi

$w_{1/2}$: Yarı yükseklikteki pikin genişliği

2.3.4.2 Ayırma etkinliğine etki eden faktörler

a) Pik genişlemesi

b) Boylamsal difüzyon

c) Örnek İnj. Hacmi

d) Joule ısısı

e) Enjeksiyon uzunluğu

f) Elektrodispersiyon

g) Duvar adsorpsiyonu

2.3.5 Rezolüsyon

Rezolüsyon, piklerin tam olarak birbirinden ayrılmasıdır. Aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir [22].

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (2.25)$$

t : Göç Süresi

w : Pikin taban genişliği

σ : Zamana ait standart sapma

Rezolüsyon ayrıca, aşağıdaki denklemden de elde edilmektedir.

$$R = 0.177 \Delta\mu \sqrt{\frac{V}{(\mu + \mu_{eo}) \cdot D}} \quad (2.26)$$

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1 \quad (2.27)$$

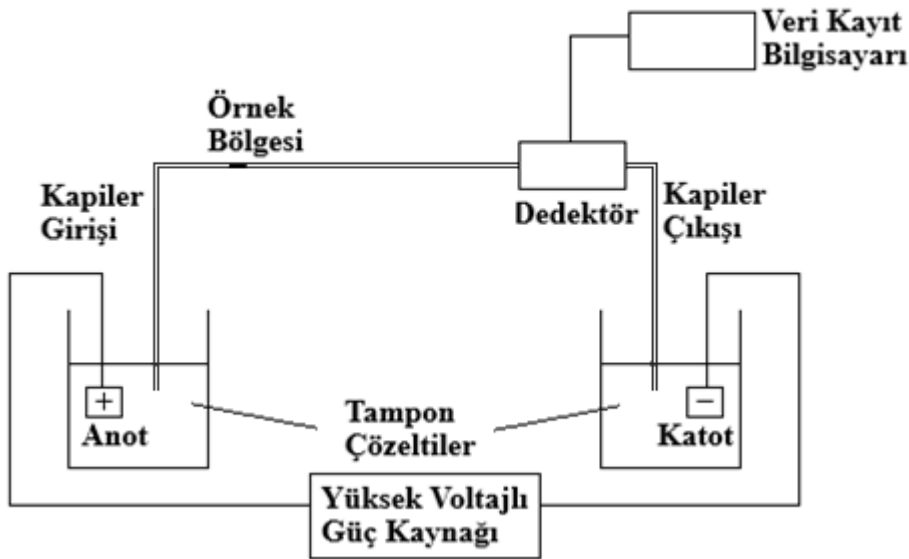
D : Analitin difüzyon katsayısı

μ_{ep} : Elektroforetik mobilite

Kapiler elektroforezde rezolüsyonu arttırmak için, elektroforetik mobiliteler arasındaki farkın maksimum hale getirilmesi gerekmektedir. Bu durum genellikle, tampon pH'nın ayarlanması sonucunda, analitte meydana gelen iyonlaşma halinin değişmesi ile gerçekleştirilebilir. Ayrıca, yüzey aktif madde eklenmesi veya jel kullanılması ile de ayırmanın etkinliği artırılabilir. Bu çözümler uygulandıktan sonra, kapiler boyunca uygulanan voltajın artırılması ile rezolüsyonun gelişmesi kaçınılmaz olacaktır [27]. Fakat yüksek voltaj, joule ısısında artışa neden olacağı için istenmeyen bir durum yaratacaktır.

2.4 Kapiler Elektroforez Cihaz Kısımları

Kapiler elektroforez cihazı genel olarak detektör, kapiler kolon, giriş ve çıkışta bulunan vialler, yüksek voltajlı güç kaynağı ve veri kayıt bilgisayarından meydana gelmektedir. Ayrıca, sistem içerisindeki kapilerin sıcaklığını kontrol altında tutmak için termostat bulunmaktadır. Cihaz kısımları Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4 : Kapiler elektroforez cihazı [31].

Elektroforezde ilk olarak kapilerin uç kısımları giriş ve çıkış vial kaplarına batırılarak 1 M NaOH ve deiyonize su ile ön yıkama çalışmaları başlatılır. Ardından bu uçların tamponla temas halinde bulunması sağlanır. Dışardan uygulanan yüksek voltaj ile, kapilerin anot kısmından enjekte edilen örnek çözelti, katoda doğru hareket etmeye başlar. Detektörde detekte edilir. Elde edilen veriler, detektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar halinde gözlemlenirler.

2.4.1 Kapiler kolon

En fazla kullanılan kapiler kolon, erimiş silika kapiler kolondur. Bu kolon dışında, cam veya plastik kapiler de bulunmaktadır. Fakat bunlar düşük dalga boylu UV bölgeleri için yeterince saydam olmadıklarından dolayı, silika kapiler daha çok tercih edilmektedir [22]. Erimiş silika kapiler kolonun dış kaplaması, dışarıdan gelecek etkenlerden dolayı zarar görüp kırılmaması adına poliimid ile korunmaktadır. Cihazdaki ışık yoluna denk gelen kısmın kapanmasını önlemek için, bu kısım yakılarak, deteksiyon alanı oluşturulmalıdır.

Kolonun türü ve boyutu, numunenin türüne, analite, yönteme ve analizin süresine göre ayarlanmaktadır. İdeal bir kolonda olması gereken özellikler elektrik iletkenliğinin olmaması, detektörle uyum içerisinde çalışması, inert bir kimyasala sahip olması, sağlam ve esnek olması şeklinde sıralanmaktadır. Kolon dış çapı 350 – 400 µm, boyu 50 – 75 cm olmalı ve iç çapı yüksek ısı açığa çıkmaması için, 25 – 75 µm arasında tercih edilmelidir. Kapiler kolonun ilk defa kullanımında, önce kolonun 1 M NaOH ve su ile yıkanması sağlanarak, tampona geçiş yapılır. Böylelikle, kapilerin iç kısımlarında oluşan silanol gruplarının iyonlaşma oranı ile elektroosmotik akış, her analizde aynı olacak şekilde sabitlenmiş olur. Son olarak da çalışma bitiminde, kolondan muhakkak su geçirilmelidir.

2.4.2 Yüksek voltajlı güç kaynağı

Güç kaynağından voltaj, akım ve güç elde edilmektedir ve bunlar elektroforez için önemli parametrelerdir. Uygulanacak voltaj maksimum 30 kV olmalıdır ve ayarlanan değer sabit tutulmalıdır. Voltajda meydana gelecek artış, doğrudan elektrik alanın artmasına neden olacaktır. Elektriksel alanın artması sonucunda ise, elektroosmotik akış hızlacaktır ve göç süresi ile alan tekrarlanırlığı değişecektir.

2.4.3 Örnek enjeksiyonu

Kapiler elektroforezde yüksek verim elde etmek için, küçük hacimlerde enjeksiyonla çalışılmaktadır. Enjeksiyon hacmi 1 – 50 nL olarak ayarlanmalıdır. Böylece az miktarda örnek harcanabilir. Ayrımı yapılacak olan örneği kapiler içerisine almak için, hidrodinamik ve elektrodinamik enjeksiyon olmak üzere iki farklı enjeksiyon sistemi uygulanmaktadır [22].

2.4.3.1 Hidrodinamik enjeksiyon

Hidrodinamik enjeksiyon, enjeksiyon yöntemleri arasında en fazla kullanılan enjeksiyon olup, üç farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Birinci yöntem, kapilerin örnek kısmına 50 mbar civarında bir kaç saniye boyunca basınç uygulamasıdır. Basınç uygulandıktan sonra voltaj uygulanmasıyla analiz devam ettirilir. İkinci yöntem, kapilerin detektör ucuna vakum uygulanmasıdır. Belirlenen miktardaki numunenin vakum sonucunda kapilere girmesiyle, vakum kesilir ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü ve son yöntem ise, kapilerin örnek kısmı, detektör ucundan daha yükseğe yerleştirilerek seviye farkı oluşturulur. Buna sifon etkisi denilmektedir. Enjeksiyon hacmi, Poiseuille denklemi ile hesaplanmaktadır.

$$V_{enj} = (\Delta P \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t_{enj}) / 8 \cdot \eta \cdot L \quad (2.28)$$

ΔP : Kapiler boyunca basınç farkı (dyn.cm^{-2})

t : Enjeksiyon süresi (s)

η : Tamponun viskozitesi (dyn.s.cm^{-2})

L : Kapilerin boyu

Sifon etkisiyle yapılan basınç farkı ise;

$$\Delta P = \rho \cdot g \cdot \Delta h \quad (2.29)$$

ρ : Örneğin yoğunluğu (kg.m^{-3})

g : Yerçekimi ivme katsayısı ($9,82 \text{ N.kg}^{-1}$)

Δh : Örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı (m)

eşitliğinden hesaplanmaktadır [28].

2.4.3.2 Elektokinetik enjeksiyon

Elektrokinetik enjeksiyonda, kapilerin ucu, örnek kap içerisine konularak, kısa süreliğine voltaj uygulanır. Elektroosmotik akış ve iyonik göç etkisi ile, örnekteki iyonların kapiler içerisine girmesi sağlanır [28]. Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlılığının, hidrodinamik enjeksiyona göre daha az olduğu ve bu enjeksiyon tekniğinin, hızlı hareket eden iyonları, yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere aldığı anlaşılmıştır [30].

$$w = [(\mu_{ep} + \mu_{eof}) \pi r^4 V_i \cdot t_i \cdot C] / L \quad (2.30)$$

μ_{ep} : Molekülün elektroforetik mobilitesi

μ_{eof} : Örnek çözeltisinin elektroosmotik mobilitesi

V_i : Enjeksiyon voltajı

t_i : Enjeksiyon zamanı

L : Kolon uzunluğu

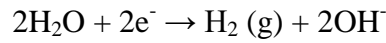
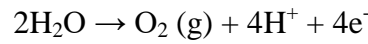
C : Örnek konsantrasyonu

w : Enjekte edilen örnek miktarı

Eşitlikten, sistemdeki örnek miktarının, enjeksiyon zamanı ve enjeksiyon voltajının değiştirilerek kontrol edilebileceği sonucuna varılmaktadır.

2.4.4 Elektrotlar

Kapiler elektroforezde, anot ve katot olarak platin elektrotlar kullanılmaktadır. Elektrotlarda meydana gelen reaksiyonlar, suyun dekompozisyonu sonucunda oluşurlar [22].



2.4.5 Detektör

Detektörler, konsantrasyon değişikliklerinden meydana gelen kimyasal sinyallerin, elektrik sinyaline dönüştürülmesinde kullanılırlar [24]. Kapiler elektroforezde kullanılan birden fazla detektör türü, tespit sınırları, avantajlar ve dezavantajlar Çizelge 2.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 : Kapiler elektroforez detektör türleri [24].

Detektör	Tespit Sınırı (mol.L ⁻¹)	Avantajlar / Dezavantajlar
UV Absorpsiyon	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁴	Kapsamlı uygulama alanları Diodarray detektörleri ile spektral dedeksiyon Hassas
Floresans	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁴	Genellikle örnek türevlendirilmesi gerektirir
İletkenlik Detektörü	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁵	Kapsamlı uygulama alanları Özel kapiler modifikasyonu gerektirir

Çizelge 2.1 (devam) : Kapiler elektroforez detektör türleri [24].

Detektör	Tespit Sınırı (mol.L ⁻¹)	Avantajlar / Dezavantajlar
Lazer İndüklenmiş Floresans	10 ⁻¹³ - 10 ⁻⁷	Çok hassas Pahalı Genellikle örnek türevlendirilmesi gerektirir
Amperometrik Detektör	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶	Hassas Sadece elektroaktif analizlerde kullanışlıdır Özel kapiler modifikasyonu gerektirir
Potansiyometrik Detektör	10 ⁻⁸	Alkali iyonlarına uygulanabilir Hassas
Kütle Spektrometre Detektörü	10 ⁻⁸	Yapı hakkında bilgilendirme sağlar CE ve MS arayüzü karmaşıktır

2.4.5.1 UV detektör

Kapiler elektroforezde en sık kullanılan detektördür. Temel prensibi, UV ışınlarının kapiler kolon üzerine odaklanması şeklinde açıklanabilir. Analit tarafından absorblanan ışının miktarı Lambert – Beer kanunu ile tespit edilmektedir.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2.31)$$

A: Absorbans

ϵ : Analitin molar absorptivitesi

l: Işın yolunun uzunluğu

c: Konsantrasyon

Eşitlikten de görüleceği üzere, dedeksiyon konsantrasyonunu minimum miktarlarda tutabilmede ışın yolunun uzunluğu önemli bir rol oynamaktadır. Bunun için dedeksiyonun kolon üzerinde, diğer bir adıyla, detektör hücreinde yapılması gerekmektedir. Bu sebeple, öncelikle kapiler iç kısmında bulunan poliimid kaplamanın bir kısmı yakılarak optik bir pencere açılır. Bu pencere detektör hücresi olarak kullanılır. Dedeksiyon sonucu oluşan pik genişliğinin 2 ile 5 mm arasında olması gerektiğinden dolayı, açılan bu optik pencere, bu miktarın üçte biri büyüklüğünde olmalıdır [22]. Işın yolunun kısa olması pik genişlemesi ortadan kaldırır, yüksek rezolüsyon elde edilmiş olur. Fakat aynı zamanda dedeksiyon hassasiyeti azalarak, analitin gözlenebilme sınırı kısıtlanmış olur. Işın yolunun

arttırılması gerektiği durumlarda “z” veya baloncuk şekline detektör hücresine sahip bir kapiler kullanılması yeterli olacaktır. Böyle bir detektör hücresi kullanılarak, dedeksiyon hassasiyeti de arttırılmış olur [22]. Bunlara ek olarak, optik pencereden maksimum verim elde etmek ve detektöre ulaşan kaçak ışığı minimuma indirebilmek için, gelen ışının doğrudan kapiler üzerine ulaşmasını sağlayacak bir detektör dizaynı da önem arz etmektedir. Doğru bir detektör dizaynı, detektörde oluşacak hassasiyeti arttırma ve lineer dedeksiyon aralığı açısından önemlidir.

2.5 Kapiler Elektroforez Uygulamaları

Kapiler elektroforezin önemli özelliklerinden birisi gıda, ilaç, madencilik gibi bir çok farklı uygulama alanlarında kullanılabilen, büyük moleküllerden küçük iyonlara kadar pek çok yüklü molekülün ayrılmasını sağlayan bir ayırma yöntemi olmasıdır [27]. Bunların yanında, nötral bileşikler ayıran veya analitlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan yöntemler de mevcuttur [22]. Kapiler elektroforez kendi içerisinde birçok farklı moddan oluşmaktadır. Bu yöntemler ve ayırma mekanizmaları Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez yöntemleri [22]

Yöntem	Ayırma Mekanizmaları
Kapiler Zon Elektroforez	Analitlerin yük/büyüklük farklılıkları
Elektrokinetik Kromatografi	Ayırma elektrolitine eklenen katkı maddesi ile analitin kimyasal olarak etkileşmesi
Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi	Analitlerin misel ile hidrofilik – hidrofobik etkileşimleri
Kapiler Jel Elektroforez	Farklı büyüklüklerdeki analitlerin jel gözeneklerinden geçmesi
İzoelektrik Odaklanma	Analitlerin izoelektrik noktalarının farklı olması
İzotakoforez	Analit ile tamponların arasındaki mobilite farklılıkları
Elektrokromatografi	Kapiler içerisine konulan sabit faz ve hareketli fazların analitler ile farklı dağılımları

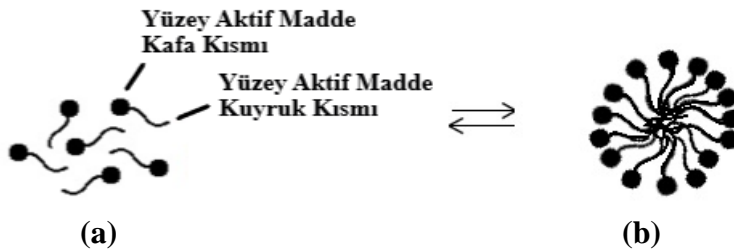
Bu tez çalışmasında misel elektrokinetik kapiler kromatografiden yararlanıldığı için sadece bu yöntem ele alınmıştır.

2.5.1 Misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)

1984 yılında Terabe ve arkadaşları elektroforez ve kromatografi kesişimi olan, CE modları arasında yaygın olarak kullanılan misel elektrokinetik kapiler kromatografisi

(MEKC) metodunu geliştirmişlerdir [32-33]. Bu yöntemin esas özelliği, yüklü analitlerin ayrılması kadar, nötral çözünenlerin de ayrımını yapabilen tek elektroforetik teknik olmasıdır [22]. Bu ayrımı yaparken, nötral ve yüklü parçacıkların aynı anda birbirlerinden ayrılmalarına olanak sağlamaktadır. Bu ayrım, çalışma tamponu içerisine yüzey aktif madde eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir [33]. Tampon çözeltiye ilave edilecek yüzey aktif maddenin konsantrasyonu, kritik misel konsantrasyonundan daha yüksek bir konsantrasyonda olmalıdır. Yüzey aktif maddenin kritik misel konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda çözünmesiyle misel olarak bilinen kümeler meydana gelmektedir. Misel, kolon içerisinde sabit faz gibi davranmaya başlar. EOA katoda doğru ilerlerken, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik yüzey aktif maddeler EOA'nın tersi yönünde, kapilerin giriş kısmındaki anoda doğru göç ederler. Fakat EOA hızı, miselin nötr veya bazik pH'daki göç etme hızından fazla olduğundan dolayı, net akış yönü EOA yönünde olup, katotta bulunan detektöre doğrudur [22]. Misel elektrokinetik kromatografide, tampon karışımının hızlı hareket eden sulu faz ile yavaş hareket eden misel fazlarından meydana geldiği söylenebilir. Böyle bir sisteme numune ilave edildiğinde, numune bileşenleri hareketli faz ve miselin iç kısmı olan hidrokarbon fazı arasında dağılırlar. Buradaki dağılıma dengesi çözünen maddenin polaritesine bağlıdır. Çözünenin polar olması durumunda sulu faz tercih edilirken, polar olmayan maddeler ise hidrokarbon faz olan miseli tercih eder [29, 30].

Misel, genellikle küresel yapıdadırlar. Bir miselde, hidrofobik kuyruklar suyla teması en aza indirmek için merkeze doğru yönelirken, hidrofilik kafa kısımlar suyla teması en üst düzeye çıkarmak için dış yüzeyde konumlanırlar [33]. Bir miselin yapısı, Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5 : (a) Yüzey aktif madde monomerleri (b) Misel [34].

Ayrım, nötral taneciklerin içeriğindeki hidrofilik ve hidrofobik grupların misel ile etkileşimi sonucu gerçekleşir. Hidrofilik moleküller solvent boyunca daha hızlı hareket ederler, hidrofobik moleküller ise misel içerisinde daha fazla kalırlar.

Hidrofobik bileşikler misel ile ne kadar güçlü bir etkileşime girerse gelme zamanları da o kadar uzar [33]. Bir analitin misel tarafından alıkonma süresi (t_r), aşağıdaki eşitliğe göre tarif edilmektedir [27].

$$t_r = t_o(1 + k') / 1 + (t_o / t_{mc}) k' \quad (2.32)$$

Ayrımın en iyi şekilde yapılabilmesi için, t_o ve t_{mc} arasındaki fark maksimum seviyelerde tutulmalıdır.

$$k' = (t_r - t_o) / t_o (1 - t_r / t_{mc}) = K (V_s / V_m) \quad (2.33)$$

k' : Kapasite faktörü

t_r : Çözünenin alıkonma zamanı

t_o : EOA'ya doğru hareket eden çözünenin alıkonma zamanı

t_{mc} : Miselin alıkonma zamanı

K : Ayrılma katsayısı

V_s : Misel fazın hacmi

V_m : Hareketli fazın hacmi

MEKC'de iki türün çözünürlüğü şu şekilde verilmektedir:

$$R = (N^{1/2} / 4) (\alpha - 1 / \alpha) (k'_2 / k'_2 + 1) [1 - (t_o / t_m) / 1 - (t_o / t_m) k_1] \quad (2.34)$$

$$\alpha = k'_2 / k'_1 \quad (2.35)$$

$(N^{1/2} / 4)$: Verim

$(\alpha - 1 / \alpha)$: Seçicilik

$(k'_2 / k'_2 + 1) [1 - (t_o / t_m) / 1 - (t_o / t_m) k_1]$: Alıkonma

Eşitliklerden anlaşılacağı üzere rezolüsyon; verim, seçicilik ve/veya kapasite faktörünün optimize edilmesi ile geliştirilebilir. Kapasite faktörü, yüzey aktif maddenin konsantrasyonu değiştirilerek kolayca ayarlanabilir. Genelde kapasite faktörü, konsantrasyonla lineer bir şekilde artar.

Yüzey aktif maddeler katyonik, anyonik, yüksüz, zwitteriyonik (çift kutuplu) veya bunların karışımı şeklinde bulunabilir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) MEKC'de en yaygın olarak kullanılan yüzey aktif maddelerdir. Oluşacak miselin büyüklük, yük, geometri gibi fiziksel özellikleri

ayarlanarak seçicilik kolayca değiştirilebilir [33]. Kromatografik yöntemlerde olduğu gibi organik çözücüler eklenerek, çözünen ile misel arasındaki etkileşim azaltılabilir [22]. Metanol, asetonitril ve 2-propanol gibi çözücüler sıkça kullanılan organik katkılardır. Çalışma tamponuna, küçük yüzdelerden başlayıp %50 (h/h) konsantrasyona kadar veya bu konsantrasyondan daha fazla ilave edilmesiyle, çözünen – misel arasındaki etkileşim bozulabilir [33]. Organik çözücüler ayrıca, miselin yapısını koruyan hidrofobik etkileşimleri de azaltıcı etkiye sahiptir.

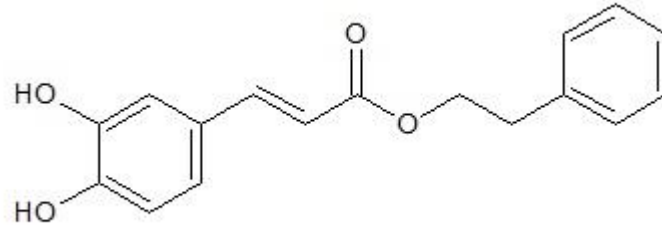


3. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

3.1 Kafeik asit fenetil ester (CAPE)

Kafeik asit fenetil ester; propolis içeriğinde bulunan ve izole edilen çok geniş spektrumlu etkileri bulunan bir maddedir [35]. CAPE'nin IUPAC adı 2-fenetil (2E)-3-(3,4- dihidroksifenil) akrilat şeklindedir. Molekül formülü $C_{17}H_{16}O_4$ 'tür. CAPE'nin kimyasal yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir. Kimyasal olarak kafeik asit ile fenetil alkollerinin reaksiyonu sonucunda sentezlenebilmektedir [36].

CAPE, ilk defa 1988 yılında Grunberger ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [36]. Bu çalışmada, CAPE bileşiği uygun şartlarda propolisten izole edilmiş, aynı zamanda kimyasal olarak da sentezlenmiştir. Propolisten izole edilen CAPE'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri, kimyasal olarak sentezlenmiş CAPE ile karşılaştırılmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir [36].



Şekil 3.1 : CAPE molekül yapısı.

CAPE ile ilgili yapılan çeşitli *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar, bu bileşiğin çok geniş spektrumlu farmakolojik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar sonucunda CAPE'nin immünomodülatör, antiproliferatif, antiviral, antikanser, anti-inflamatuvar, antikarsinojenik, kemopreventif ve nöroprotektif etkileri ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bazı araştırmalar CAPE'yi enfeksiyon, oksidatif stres, inflamasyon, kanser, diyabet, nörodejenerasyon ve anksiyete gibi pek çok patolojiye karşı etkili bir çözüm olarak göstermektedirler [37-40].

3.2 Literatür İncelemeleri

Propolisin aktif bileşenlerinden CAPE'nin antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanserojen ve antibakteriyel özelliklerinin keşfedilmesiyle birlikte, CAPE son senelerde birçok yeni çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Bu çalışmaları takiben literatürde pek çok derleme görülmeye başlanmıştır. Murtaza ve arkadaşları, CAPE'nin anti-inflamatuvar ve anti-kanserojen aktivitelerini gösteren çok sayıda çalışmayı derlemiştir [40]. Zhang ve arkadaşları, CAPE'nin antikanserojen, antioksidan ve anti-inflamatuvar aktivitelerinin incelendiği pek çok çalışmayı derlemiştir [41]. Armutçu ve arkadaşları, CAPE'nin anti-inflamatuvar ve immünomodülatör aktiviteleri üzerine bir derleme yazmış, potansiyel terapötik etkilerini değerlendirmiştir [42]. CAPE'nin antioksidan aktiviteleri ve iskemi reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkileri üzerine bir derleme de Tolba ve arkadaşları tarafından yazılmıştır [38]. Öztürk ve arkadaşları ise deri, akciğer ve prostat kanserlerine karşı CAPE'nin antikanser etkilerini derlemiştir [43].

Literatürde, dünyanın farklı bölgelerinden toplanan propolisin kimyasal bileşenlerini ve miktarlarını içeren çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar farklı kaynaklardan elde edilen propolis örneklerinin benzer kalitatif kompozisyonlara sahip olmasına rağmen CAPE miktarlarının büyük oranda farklılıklar içerdiğini göstermektedir. Huang ve arkadaşları, propolisin kimyasal karakterinin, coğrafi konum, bitki kaynakları ve arının türü ile değişkenlik gösterdiğini söylemiştir [14].

Salonen ve arkadaşları, Finlandiya propolislerinde bulunan fenolik bileşikleri tanımlamış, bu bileşiklerin miktarlarını rapor etmiştir. 24 adet fenolik bileşik içinde CAPE, en yüksek miktarda bulunmuştur [44].

Castro ve arkadaşları Şili propolisindeki fenolik bileşikleri HPLC-ESI-MS/MS yöntemi ile tanımlamış ve bunların antioksidan aktivitelerini ölçmüştür [18]. 30 adet fenolik bileşik arasında CAPE ve kuersetin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşikler olarak rapor edilmiştir. Şili propolisleri üzerine bir diğer çalışmada ise propolis örneklerindeki CAPE'nin tayini yakın-IR spektroskopisi yöntemiyle yapılmış, analizi yapılan propolislerin antioksidan aktiviteleri de test edilmiştir [45].

Hernandez ve arkadaşları Meksika propolisinin kimyasal bileşenlerini HPLC-MS yöntemiyle tayin etmiş, propolislerin antiproliferatif etkilerini incelemiştir [46].

15 fenolik bileşen içinden CAPE, çalışılan kanser hücrelerine karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

Hilhorst ve arkadaşları ise propolis içerisindeki flavanoid ve fenolik bileşiklerin tanımlanmasında CZE ve MEKC yöntemleri ile çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda propolis içeriğinde chrysin, pinocembrin, galangin gibi flavanoidler ile benzoik asit, p-kumarik asit gibi fenolik bileşiklerin bulunduğu rapor edilmiştir [47].

Literatürde son yıllarda Türk propolisleri üzerine yapılan çalışmalar da hızla artmaktadır. Türk propolislerinin antibakteriyel aktiviteleri ve kimyasal bileşikleri [48], mineral içerikleri [19], akciğer, kolon, göğüs, serviks ve prostat kanserleri üzerine sitotoksik etkilerini incelenmiştir [49].

Güzelmeriç ve arkadaşları, 2018 yılında yayınlanan çalışmalarında 48 adet Türk propolisinin fenolik bileşikleri üzerine botanik ve coğrafik farklılıkları göstermek amacı ile HPTLC yöntemini kullanmışlardır [20].

Yavuz ve Ertürk, 6 farklı Türk propolisinin kimyasal bileşenlerini GC-MS tekniği ile analiz etmiş ve antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmıştır [48].

Türk propolislerinin CAPE içeriklerini rapor eden bir çalışmaya ise literatürde henüz rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle Türk propolislerinin CAPE içerikleri bir misel elektrokinetik kapiler elektroforez tekniği ile tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında ise propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri bulunmuştur. Son olarak örneklerdeki CAPE miktarları ile örneklerin anti-inflamatuvar aktivitelerinin korelasyonu araştırılmıştır.

Bu nedenle, Bölüm 3.3'de anti-inflamatuvar aktivite üzerinde durulacak, tez çalışmasında kullandığımız ölçüm yönteminden bahsedilecektir.

3.3 Anti-inflamatuvar Aktivite

Fagosit migrasyonu, nötrofil, monosit ve makrofaj birikimi nedeniyle doku fonksiyonu kaybıyla sonuçlanan olaylar zinciri bütününe inflamasyon denir. İnflamasyon sürecinde inflamasyon aktivatörü olan tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi bir çok pro-inflamatuvar sitokinlerin makrofajlar tarafından salımı gerçekleşir [50]. Kaşeksin olarak da adlandırılan TNF- α , monosit ve makrofajlar yoluyla

sentezlenen ve belirli hücrelerin üretimine yardımcı olan bir glikoprotein olarak tanımlanmaktadır. Doku hasarı ve stres sonrası kanda saptanan bir sitokindir ve inflamasyon başlangıcı ve devam ettirilmesinde önemli özellikleri bulunmaktadır [51]. TNF- α , sitokinler arasında bir 'ana regülatördür' ve inflamatuvar tepkilere ve doğal bağışıklık sistemine aracılık etmekten sorumludur. Sitokinlerin aşırı salınımı sonucunda bağışıklık hücreleri artar, büyüme faktörü salgılanır, kan damarları genişler ve pro-inflamatuvar sitokinleri üretilerek inflamatuvar medyatörleri artar ve inflamasyon devam eder.

Propolisin, çeşitli medyatörlerin salınımını engelleyerek inflamasyonu önlemede yardımcı olduğu bilinmektedir. Propolisin içeriğindeki CAPE, prostaglandin ve lökotrien sentezini azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterir. COX-1 ve COX-2'nin enzimatik aktivitelerini baskılayarak ve araşidonik asit sentezini inhibe ederek, propolisin anti-inflamatuvar aktivite göstermesinde rol alır [52,53]. CAPE, interleukin-1-alfa (IL-1- α), interleukin-1-beta (IL-1- β), interleukin-6 (IL-6), TNF- α gibi inflamatuvar sitokinleri inhibe eder [54]. Ayrıca CAPE, nükleer faktör kappa- β (NF-k β) aktivasyonunun inhibitörüdür ve inflamasyonu engellemede NF-k β 'yi bloke ederek aktivasyon göstermektedir [55]. CAPE'nin güçlü bir yara iyileştirici olmasının sebebi olarak NF-k β 'yi inhibe etmesi gösterilmiştir [56].

3.3.1 ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) Testi

ELISA, bir örnekteki antijen veya antikor varlığını tespit eden, kolay, hızlı ve sıkça kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. ELISA tekniğinde 2 adet antikor kullanılır. Bunlardan biri, antijene spesifik olan antikordur. Diğeri ise, antijen-antikor kompleksine etki eder ve bir enzime bağlıdır. Enzime bağlı olan bu ikinci antikor, sinyal üreten kromojenik veya florojenik bir substrat da oluşturabilir.

ELISA'nın; sandviç (non-kompetitif), kompetitif, direkt ve indirekt olmak üzere dört farklı tipi vardır.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen Human TNF alpha ELISA deneyi sandviç ELISA tekniğine dayanmaktadır. Bu analizde bilinmeyen örneklerdeki antijen konsantrasyonu saptanır. Bu analizi uygulamak için, saflaştırılmış bir antikor (capture antikor) tabla kuyucuklarının dibine yapıştırılmış olan katı faza bağlanır. Daha sonra antijen eklenir ve katı faza bağlı olan antikor ile bir kompleks oluşturmaları sağlanır. Bağlanmamış ürünler yıkanarak uzaklaştırılır ve işaretli ikinci bir antikor (belirleyici

antikor), antijene bağlanmak için ortama bırakılır. Bu şekilde bir sandviç modeli oluşur. Daha sonra, kolorimetrik bir substrat yardımı ile matrikse bağlanan işaretli ikinci antikorun miktarı ölçülerek analiz sonlandırılır.





4. DENEYSEL KISIM

4.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan N-sikloheksil-3-aminopropansülfonik asit (CAPS) ve 2-hidroksi propil- β -siklodekstrin (2-HP- β -CD) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), sodyum dodesil sülfat (SDS) ise Merck (Darmstadt, Almanya) markadır.

Propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktivitesi Human TNF alpha ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) kullanılarak test edilmiştir.

4.2 Standart CAPE Çözeltilisinin Hazırlanması

Stok CAPE çözeltisi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda hazırlanmış ve derin dondurucuda saklanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri ise stok çözeltilerden metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

4.3 Propolis Örnekleri Ve Örneklerin Analize Hazırlanması

Sivas ve Zonguldak bölgesi arı üreticilerinden temin edilen propolis örnekleri, Prof. Dr. Sevgi Kolaylı (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü) tarafından verilmiştir. Katı propolis örnekleri toplandıktan sonra homojenize edilmiştir. Sivas propolis örneğinden 10,14 g hassas olarak tartılmış, 140 mL %98 etanol-%2 su (h/h) karışımında ekstrakte edilmiştir (72,429 mg/L). Zonguldak propolisinden ise 3,18 g hassas olarak tartılmış, 63 mL %98 etanol-%2 su (h/h) karışımında ekstrakte edilmiştir (50,476 mg/L). Bunların dışında 4 adet ticari olarak satılan propolis boğaz sprej örneği ile çalışılmıştır.

Bütün örnekler analize kadar derin dondurucuda saklanmıştır. Örnekler 0,45 μm 'lik filtrelerden geçirilmiştir. Sivas ve Zonguldak propolis örnekleri metanol ile 25 kat seyreltilerek, ticari propolis sprej örnekleri ise 50 kat seyreltildikten sonra kapiler elektroforez cihazına injekte edilmiştir. Anti-inflamatuvar aktivite çalışması için ise

Ticari-1 örneği metanol ile 20 kat, diğer ticari örnekler ile Sivas ve Zonguldak propolisleri ise 10 kat seyreltilerek mikropalakaya pipetlenmiştir.

4.4 Cihazlar

CAPE'nin analizi Agilent marka kapiler elektroforez sisteminde (Waldbronn, Almanya) yapılmış, UV-DAD (diode array dedektör) detektör detekte edilmiştir. Ayrımlar Polymicro Technologies'den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiş silika kapiler kolonda yapılmıştır.

Propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktivitesi 96 kuyucuklu mikropalakalarda BioTek Power Wave XS (Winooski, VT, ABD) marka mikropalaka okuyucu ile yapılmıştır. Ölçümler Gen5 Data Analysis software kullanılarak yapılmıştır.

Deneysel çalışma boyunca Mettler-Toledo marka hassas terazi, BioCote marka vorteks, pH metre (Metrohm 654) ve saf su cihazı (Elga Purelab Option-Q) kullanılmıştır. Bütün çözeltiler deiyonize su ile hazırlanmıştır.

4.5 Kapiler Elektroforez Cihazının Çalışma Koşulları

Kullanılan silika kapiler kolon 50 µm iç çapa sahip, toplam uzunluğu 65 cm ve etkin uzunluğu da 50 cm'dir. Yeni silika kapiler kolon ilk kullanımdan önce 1 M NaOH ile 30 dakika ve deiyonize su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Analizden önce ise 0,1 M NaOH ile 10 dakika, deiyonize su ile 2 dakika ve daha sonra çalışma tamponu ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. İnjeksiyonlar arasında ise sırasıyla 2 dk 0,1 M NaOH, 2 dk deiyonize su ve 5 dk süreyle çalışma tamponu ile yıkama yapılmıştır. Ayrım 25 kV potansiyel uygulanarak 25 °C sıcaklıkta, injeksiyonlar ise 50 mbar basınçta 6 saniye süreyle gerçekleştirilmiş, CAPE piki 230 nm dalgaboyunda detekte edilmiştir.

4.6. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.6.1 TNF-α enzimi inhibisyonunun saptanması

Propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri, TNF-α enziminin in-vitro inhibitör aktivitesine dayanarak ölçülmüştür.

Çalışmada Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) Human TNF alpha ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) Kit (Katalog No: BMS223/4) (96 kuyucuklu) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan materyal aşağıda belirtilmiştir.

1. Bir monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu kırılıp ayrılabilen şeritli tabla
2. Koruyucu olarak % 0,1 sodyum azid içeren liyofilize TNF- α standardı (suda çözüldüğünde 1000 pg/mL konsantrasyonda olacak şekilde)
3. Koruyucu olarak 8 mM sodyum azid içeren standart seyreltme tamponu
4. Koruyucu olarak 8 mM sodyum azid içeren analiz tamponu (20X), (%1 Tween 20 ve %10 BSA içeren PBS (phosphate buffer saline) tampon çözeltisi)
5. Koruyucu olarak 8 mM sodyum azid içeren biotin bağlı anti-TNF- α poliklonal antikor
6. Yaban turpu peroksidazı (Horse radish peroxidase, HRP) bağlı streptavidin proteini (100X) (1,3 mM timol içerir)
7. Konsantre yıkama tamponu (20X), (%1'lik Tween 20 içeren PBS tampon çözeltisi)
8. Substrat çözeltisi, tetrametil-benzidin (TMB)
9. Durdurma çözeltisi (1 M fosforik asit)

4.6.2 Rejanların hazırlanması

4.6.2.1 TNF- α standartlarının hazırlanması

1000 pg/mL konsantrasyondaki TNF- α enziminin standart çözeltisi oda sıcaklığına getirilmiştir. 7 adet ependorf tüpü hazırlanmış, analiz tamponundan her bir tüpe 225 μ L konulmuştur. 1000 pg/mL konsantrasyondaki TNF- α standart çözeltisinden 1. tüpe 225 μ L ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. 1. tüpten 225 μ L çözelti alınarak 2. tüpe ilave edilmiştir. 2. tüp de vorteks ile karıştırılmıştır. Bu şekilde her defasında bir önceki tüpten 225 μ L çözelti alınarak bir sonraki tüpe ilave edilmiş ve tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Böylece tüplerdeki TNF- α konsantrasyonunun 1. tüpten 7. tüpe doğru sırasıyla 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 ve 7,8 pg/mL olması sağlanmıştır.

4.6.2.2 Yıkama tamponunun hazırlanması

Kit içerisinde bulunan konsantre yıkama tamponundan 25 mL alınarak, 475 mL deiyonize su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti 2-25 °C'de sıcaklığında 30 gün boyunca saklanabilir.

4.6.3 Analiz prosedürü

Reajanlar kullanılmadan 30 dk önce oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Tüm standart ve örnekler iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. İşlem basamakları aşağıda verildiği gibidir:

1. Örneklere ve standartlara ait kuyucukların yerleri belirlenir.
 2. Bütün kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 2 kez yıkanır. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama çözeltisi bir peçete ile uzaklaştırılır.
 3. Standart kuyucuklarına ilgili tüplerden 100'er µL standart TNF-α çözeltisi eklenir.
 4. Kör (0 pg/ml standart) kuyucuklarına 100 µL, örnek kuyucuklarına 50µL analiz tamponu ilave edilir.
 5. Uygun kuyucuklara örneklerden 50µL eklenir.
 6. Bütün kuyucuklara 50 µL biotin konjugat eklenir.
 7. Mikroplaka, oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilir.
 8. Süre sonunda bütün kuyucuklar boşatılıp, her kuyucuk 400 µL yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanır.
 9. Bütün kuyucuklara streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
 10. Mikroplaka, oda sıcaklığında 1 saat boyunca bekletilir.
 11. Süre sonunda bütün kuyucuklar boşatılıp, her kuyucuk 400 µL yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanır.
 12. Her bir kuyucuğa 100 µL TMB substrat çözeltisi eklenir ve mikroplaka oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilir
- Bu işlemlerden sonra, kör kuyucukları boş oldukları için renksiz, TNF-α kuyucukları mavi, kullanılan bütün diğer kuyucuklar ise çok açık mavi renkte olacaktır.
13. Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi ilave edilir ve kuyucukların absorbansı 450 nm'de okunur.

4.7 İstatiksel Değerlendirme

Kapiler elektroforez çalışmalarında bütün analizler 3'er tekrarlı, biyoaktivite çalışmasında ise 2'şer tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen veriler "ortalama ± standart sapma" olarak verilmiştir. Analiz sonuçları Microsoft Office Excel 2010 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

5. SONUÇLAR

5.1 CAPE'nin Kapiler Elektroferez ile Tayini

5.1.1 Ayırma ortamının seçilmesi

Ayırma ortamının seçiminde CAPE'nin propolisteki diğer bileşenlerden ayrımını sağlayacak yüzey aktif maddenin belirlenmesi ve CAPE'nin duyarlılığını arttıracak tampon ilave maddelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

CAPE'nin pKa değeri 9,32 olduğundan dolayı ayırma tamponu olarak ön denemelerde borat (pKa=9,6) ve TRIS (pKa=8,07) tamponları denenmiş ancak sonuç alınamamıştır.

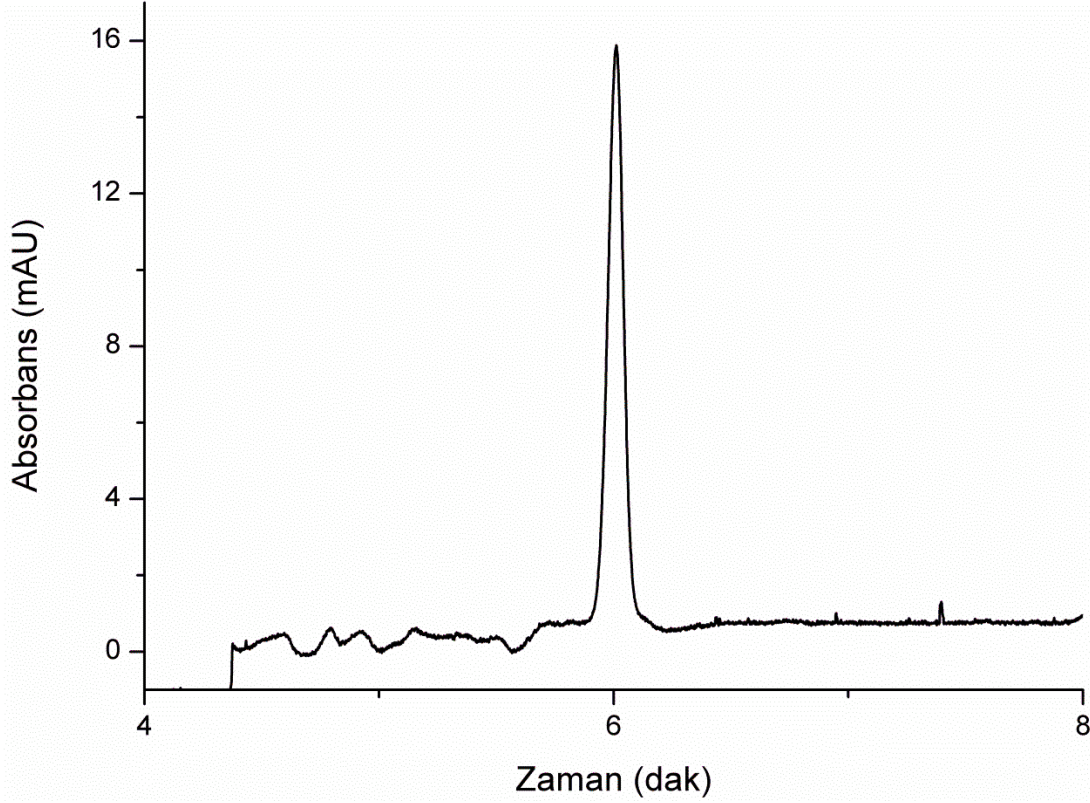
Tampon çözelti olarak CAPS (pKa:10,4) seçilerek tampon pH değeri 10,4'e ayarlanmıştır. Yüzey aktif madde olarak tampon çözeltiye sodyum dodesil sülfat (SDS) ilavesi denenmiştir. Konsantrasyonu 40 mM da sabit tutulan CAPS tamponuna 20-60 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda SDS ilave edilerek CAPE için en uygun ayırma ortamı bulunmaya çalışılmıştır. CAPE'nin diğer propolis bileşenlerinden ayrımının en iyi 50 mM SDS ile gerçekleştiği tespit edilerek, tampon çözeltide bu konsantrasyonda kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak bu tampon bileşimiyle de net bir ayırım gözlenememiştir.

CAPS ve SDS içeren ayırma ortamına organik çözücü ve sikodekstrin ilave maddeler katılımı ile CAPE'nin ayrılma etkinliğinin artırılması beklenmiştir. Bu amaçla organik çözücü olarak metanol, asetonitril %5 olarak denenmiştir. Ancak ayırmaya bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ayırma tamponuna siklodekstrin (CD) ilavesi kapiler elektroforetik ayrımalarda çok kullanılan bir yoldur. Bu sayede kiral ayrımlar veya birbirinden ayrılması zor moleküllerin ayrılması sağlanır. Bu amaçla suda çözünen farklı CD türevlerinin, seçilen tampon sistemine ilavesi ile en iyi ayrımı sağlamak için bir seri ön deneme yapılmıştır. CD türevinin seçimi için 3 farklı CD molekülü (β -CD, γ -CD, 2-hidroksipropil- β -CD (2-HP- β -CD) 5-20 mM arasında değişen konsantrasyonlarda 40 mM CAPS+50 mM SDS ayırma ortamına ilave

edilerek, CAPE'nin ayırımına etkisi incelenmiştir. En iyi ayırımın 10 mM 2-HP- β -CD ilavesi ile gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak CAPE molekülü için en uygun ayırma ortamı 40 mM CAPS, 50 mM SDS ve 10 mM 2HP- β -CD (pH: 10,4) optimize edilmiştir.

Bu şartlar altında alınan bir standart CAPE elektroferogramı Şekil 5.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 5.1: 25 μ g/mL konsantrasyonda standart CAPE'ye ait bir elektroferogram
Tampon: 40 mM CAPS, 50 mM SDS ve 10 mM 2HP- β -CD (pH: 10,4). Voltaj:25 kV, Sıcaklık: 25°C, İnjektion süresi: 6 s, Deteksiyon: λ =230 nm.

5.1.2 Metod validasyonu

Geliştirilen yöntemin analitik parametreleri Çizelge 5.1'de gösterildiği gibidir.

Kalibrasyon çözeltileri, 1000 μ g/mL konsantrasyonda hazırlanan stok CAPE çözeltilerinden 5; 10; 12,5; 25 ve 50 μ g/mL konsantrasyonda olacak şekilde uygun hacimler alınıp metanolle seyreltilerek hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon denklemi $y = 3,478x - 11,17$ olup, kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) 0,994'tür.

Yöntemin kesinliği gün içi ve günler arası alan ve zaman tekrarlanırlığı ile ölçülmüştür. 25 μ g/mL konsantrasyonda hazırlanan standart CAPE çözeltileri kapiler kolona gün içerisinde ardarda 7 kez injekte edilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik

ise, 25 µg/mL CAPE çözeltisinin 3 gün boyunca ardarda 7 kez injekte edilmesi ile elde edilmiştir (n=7x3). Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri düzeltilmiş pik alanının ve pikin gelme zamanının %bağıl standart sapması (%BSS) hesaplanarak bulunmuştur.

Yöntemin dedeksiyon sınırı (LOD), standart CAPE elektroferogramının farklı bölgelerinden hesaplanan taban çizginin ortalama gürültü miktarının 3 katı konsantrasyon, kantitatif tayin sınırı (LOQ) ise 10 katı konsantrasyon değerlerine eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Buna göre CAPE için LOD 1,48 µg/mL ve LOQ 4,93 µg/mL olarak saptanmıştır.

Yöntemin doğruluğu geri kazanım analizleri ile kontrol edilmiştir. Bir propolis ekstraktına, örnekte saptanan CAPE miktarının yarısı kadar, kendisi kadar ve iki katı kadar olmak üzere üç farklı konsantrasyonda standart CAPE ilavesi yapılmıştır. Geri kazanım Eşitlik 5.1 ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Geri kazanım} = [(C_2 - C_1) / C_3] \times 100 \quad (5.1)$$

C₁ : Örnek konsantrasyonu

C₂ : “Spike yapılmış örnek” konsantrasyonu

C₃ : Spike yapılan konsantrasyon

Çizelge 5.1 : Geliştirilen yöntemin analitik parametreleri

Analitik Parametreler	
Çalışma aralığı	5 - 50 µg/mL
Kalibrasyon denklemi	y=3,478x-11,17
Lineerlik, R ²	0,994
Tekrarlanırlık	
<u>Alan tekrarlanırlığı</u>	
Gün içi (n=7)	2,9
Günler arası (n=21)	4,8
<u>Zaman tekrarlanırlığı</u>	
Gün içi (n=7)	3,6
Günler arası (n=21)	5,7
LOD	1,48 µg/mL
LOQ	4,93 µg/mL
Geri kazanım	%97,03 ± 2,16 - %103 ± 4,25

5.1.3 Analiz yönteminin propolis örneklerine uygulanması

CAPE analiz yöntemi 4 adet ticari propolis boğaz spreyi ile Zonguldak ve Sivas’tan toplanan propolis örneklerine uygulanmıştır. Propolis tüm dünyada en az bal kadar sıkça tüketilen bir arı ürünüdür. Farklı kullanım şekilleriyle tıptan kozmetiğe kadar

pek çok alanda son yıllarda tüketime sunulmuştur. CAPE, propolisin önemli bir biyoaktif bileşenlerinden olup, propolis içindeki miktarının bulunması, bu önemli arı ürününün standardize edilmesine katkıda bulunacaktır.

Şekil 5.2’de ticari propolis spreye (Ticari-1) ve bu numuneye bilinen miktarda standart CAPE ilavesi ile elde edilen bir elektroferogram verilmiştir.

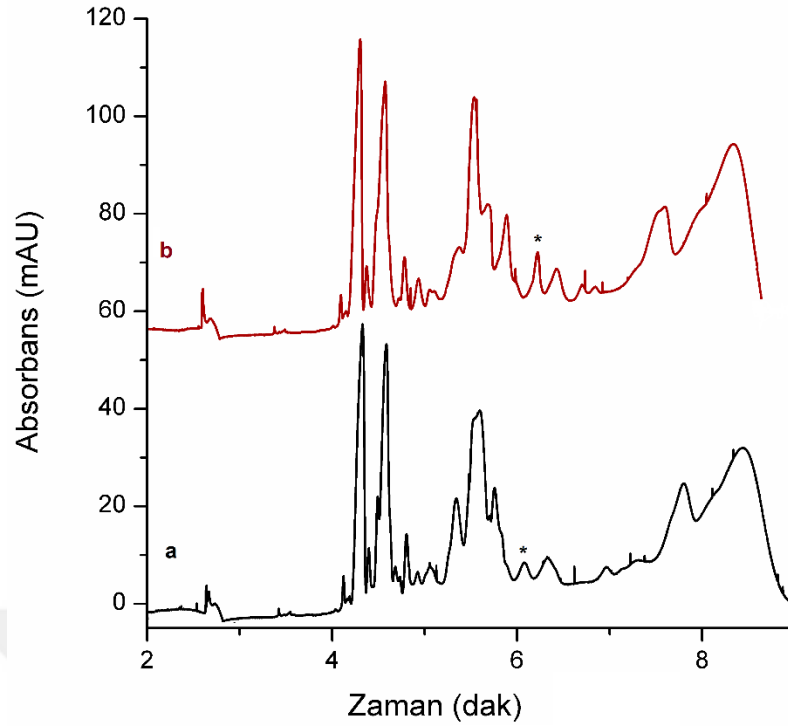
Analiz edilen propolis numunelerinde saptanan CAPE miktarları Çizelge 5.2’de verilmektedir.

Çizelge 5.2 : Propolis numunelerine ait CAPE miktarları

Ticari Propolis Sprey Örnekleri	mg CAPE/100mL propolis ± SS
Ticari-1	80,45 ± 3,64
Ticari-2	16,88 ± 0,44
Ticari-3	18,73 ± 3,88
Ticari-4	72,75 ± 1,49
Propolis Örnekleri	mg CAPE/100g propolis ± SS
Zonguldak	441,7 ± 28,9
Sivas	330,8 ± 65,9

SS : Standart sapma
n=3

Ticari propolisler sıvı olarak temin edildiklerinden dolayı mg CAPE/100 mL propolis olarak, Zonguldak ve Sivas propolisleri ise katı olarak temin edildiğinden mg CAPE/100 g propolis olarak hesaplanmıştır. Ticari propolisler arasında en yüksek CAPE miktarına sahip olan propolis 80,45 ± 3,64 ile Ticari-1 propolisidir. En düşük CAPE miktarına sahip olan propolis ise 16,88 ± 0,44 ile Ticari-2 propolisi olarak bulunmuştur. Zonguldak ve Sivas propolislerindeki CAPE miktarları ise birbirine çok yakın olup, Zonguldak propolisindeki CAPE miktarı daha fazla bulunmuştur.



Şekil 5.2: (a) 1:50 seyreltilmiş Ticari 1 propolis ekstraktına ait elektroferogram, (b) Bu ekstrakta standart CAPE spike edilmesi ile alınmış elektroferogram. Şartlar Şekil 5.1’de verildiği gibidir. *:CAPE piki

5.2 Propolis Örneklerinin Anti-inflamatuvar Aktiviteleri

Propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) Human TNF alpha ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) Kit kullanılarak yapılmış, deneyin yapılışı Bölüm 4.6’da anlatılmıştır. Propolis örneklerinin TNF- α enzim inhibitör aktiviteleri Çizelge 5.3’de verilmiştir.

Çizelge 5.3 : Propolis numunelerinin TNF- α enzim inhibitör aktiviteleri.

Propolis numunesi	% İnhibisyon \pm SS
Ticari-1	83,92 \pm 2,52
Ticari-2	55,35 \pm 2,52
Ticari-3	66,07 \pm 2,52
Ticari-4	79,46 \pm 3,79
Zonguldak	65,70 \pm 4,41
Sivas	68,75 \pm 3,31

SS: Standart sapma
n=2

Çizelge 5.3’de görüldüğü üzere, Ticari-1 ismiyle kodlanmış propolis spreynin TNF- α ’yı inhibe etme gücü (%83,92) diğer örneklere göre fazladır. Ticari 1’in ardından Ticari-4 (%79,46) olarak kodlanmış örnek gelmektedir. Bu sırayı Ticari-3 (%66,07)

ve Ticari-2 (%55,35) takip etmektedir. Zonguldak (%65,70) ve Sivas (%68,75) propolislerinin %inhibisyon değerleri ise birbirine çok yakın bulunmuştur.

5.3 Tartışma

Bu yüksek lisans tez çalışması ile Türk propolislerinin ve ticari propolis rneklerinin CAPE miktarlarının kapiler elektroforez ile tayini ilk kez literatüre kazandırılmıştır. CAPE'nin tayini misel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle yapılmış, yüzey aktif madde olarak SDS kullanılmıştır. Ayırma ortamına 2-HP-β-CD katılarak ayırma etkinliği arttırılmıştır. Son yıllarda özellikle eczacılık, tıp ve gıda konularında güncel bir ilgi odağı olan propolisin biyoaktif bileşenlerinden olan CAPE'nin miktarının tayin edilmesi ile literatüre önemli katkılar sağlanması beklenmektedir. Böylece araştırma ve kalite kontrol laboratuvarlarında CAPE'nin hızlı ve doğru bir şekilde tayini mümkün olacaktır. Ayrıca, Türk propolisinin CAPE içeriklerini kapsayan bir standart oluşturularak, arıcılık alanında faaliyet gösteren kuruluşlara ve tüketicilere yönelik bilgilendirilme konusunda da bu yüksek lisans tezi önemli katkılarda bulunabilir.

Çalışmanın ikinci basamağında, CAPE miktarları bulunan propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri incelenmiştir. Literatürde CAPE'nin TNF-α gibi inflamatuvar sitokinleri inhibe ettiği bildirilmiştir [54]. Propolisin anti-inflamatuvar özelliği ise uzun yıllardan beri bilinmekte ve bu özelliğinden kaynaklanan yara iyileştirici etkisi geleneksel tıpta da kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında propolis örneklerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri, örneklerin TNF-α enzimini inhibe etme gücünü ölçerek test edilmiştir. Bütün rnekler TNF-α'yı %55 gibi yüksek bir inhibisyon oranının üzerinde inhibe etmiştir. CAPE'nin, propolisin anti-inflamatuvar aktivitesine katkısını değerlendirmek amacıyla propolis rneklerinin CAPE miktarlarının, % TNF-α inhibisyon değerleri ile korelasyonu incelenmiştir. Sonuç olarak; 0,94 gibi yüksek bir pozitif korelasyon elde edilmiştir. Bu sonuç, propolisin anti-inflamatuvar aktivitesinin CAPE'den kaynaklı olabileceğinin göstergesi niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Bankova, V. S.; de Castro, S. L.; Marcucci, M. C.** (2000). "Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, 31, 3–15.
- [2] **Burdock, G.** (1998). "Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)," *Food Chem. Toxicol.*, 36, 347–363.
- [3] **Marcucci M. C.** (1995). "Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity," *Apidologie*, 23:86–99.
- [4] **Dziedzic, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Kabala-Dzik, A., Tanasiewicz, M., Morawiec, T.** (2013). "The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva," *Evid. - Based Complement. Alternat. Med.*, 681891–681902.
- [5] **Hu, F. L., Hepburn, H. R., Li, Y. H., Chen, M., Radloff, S. E., Daya, S.** (2005). "Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models," *J. Ethnopharmacol.*, 100, 276–283.
- [6] **Búfalo, M. C., Bordon-Graciani, A. P., Conti, B. J., de Assis Golim, M., Sforcin, J. M.** (2014). "The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes," *J. Pharm. Pharmacol.*, 66, 1497–1504.
- [7] **Su, K. Y., Hsieh, C. Y., Chen, Y. W., Chuang, C. T., Chen, C. T., Chen, Y. L.** (2014). "Taiwanese green propolis and propolin G protect the liver from the pathogenesis of fibrosis via eliminating TGF- β -induced smad2/3 phosphorylation," *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3192–3201.
- [8] **Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., Juszczak, L.** (2014). "Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland," *Nat. Prod. Res.*, 29, 416–422.

- [9] **Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., Wang, Y., Hu, F.** (2014). “Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells,” *Evid. -Based Complement. Altern. Med.*
- [10] **Ito, J., Chang, F. R., Wang, H. K., Park, Y. K., Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K. H.** (2001). “Anti-AIDS agents. 48. 1 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis,” *J. Nat. Prod.* 64, 1278–1281.
- [11] **Ghisalberti, E. L., Jefferies, P. R., Lanteri, R., Matisons, J.** (1978). “Constituents of propolis,” *Experientia*, 34, 157-158.
- [12] **Münstedt, K., Zygmunt, M.** (2001). “Propolis-Current and Future Medical Uses,” *Am. Bee J.*, 141 (7), 507-510.
- [13] **Bankova, V. S., De Castro, S. L., Marcucci, M.C.** (2000). “Propolis: recent advances in chemistry and plant origin,” *Apidologie*, 31, 3–15.
- [14] **Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., Hu, F. L.** (2014). “Recent advances in the chemical composition of propolis molecules,” *Molecules* 19:19610-19632.
- [15] **TSE Standardı** (2003). “Arıcılık – Arı Tutkalı (Propolis),” TS12910.
- [16] **Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R. Jr., Grunberger, D., Aggarwal, B. B.** (1996). “Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B,” *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9090-9095.
- [17] **Sud'ina, G. F., Mirzoeva, O. K., Pushkareva, M. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan N. V. and Varfolomeev S. D.** (1993). “Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties,” *FEBS Lett* 329: 21-24.
- [18] **Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zuniga, M. C. et al.** (2014). “Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis,” *Food Research International* 64:873–879.
- [19] **Silici, S., Kutluca, S.** (2005). “Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region,” *J. Ethnopharmacol.*, 99, 69–73.
- [20] **Güzelmeriç, E., Ristivojevi, P., Trifkovi, J., Daştan, T., Yılmaz, Ö., Cengiz, Ö., Yeşilada, E.** (2018). “Authentication of Turkish propolis through HPTLC

- fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity,” *LWT- Food Science and Technology*.
- [21] **Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın, İ.** (2004). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
- [22] **Heiger, D.** (2000). “High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction,” Agilent Technologies, Germany.
- [23] **Lee, I. S. L.** (2012). “Development of Capillary Electrophoresis for the Analysis of Phenolics and Glucoraphanin in Brassica oleracea,” Doktora Tezi, Edith Cowan University, Faculty of Computing, Health and Science School of Natural Sciences, Australia.
- [24] **Hijerten, S.** (1967). “Chromatographic Reviews,” 9, 122-219. 41.
- [25] **Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M.** (1979). “High Performance Zone electrophoresis,” *Journal of Chromatography*, 169, 11-20.
- [26] **Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D.** (1981). “Analytical Chemistry,” 53, 1298-1302.
- [27] **Lunte, S. M., Radzik, D. M.** (1996). “Eds. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis,” 1st ed.; Pergamon: Oxford, U.K.
- [28] **Kok, W.** (2000). “Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation,” Wiesbaden : Vieweg, Germany.
- [29] **Uzaşçı, S.** (2011). “Misel Elektrokinetik Kromatografi-LIF Yöntemiyle şarap ve Nar Eksisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini,” Yüksek Lisans Tezi
- [30] **Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.** (1998). “Principles of Instrumental Analysis,” Harcourt Brace & Company, Orlando, FL, 5th edn.
- [31] **Glynn, J., Belongia, B., Arnold, R., Ogden, K., Baygents, J.** (1998). “Appl. Environ. Microbiol.,” 64, 2572-2577
- [32] **Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T.** (1984). “Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries,” *Anal. Chem.*, 56, 111-113.
- [33] **Terabe, S.** (1989). “Electrokinetic chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography,” *Trends Analytical Chemistry*, 8, 129-134.
- [34] **Liu, C. L., Nikas, Y. J., and Blankschtein, D.** (1996). “Novel Bioseparations Using Two-Phase Aqueous Micellar Systems,” *Biotechnol. Bioeng.*, 52:185-192

- [35] **Wang, J., Gu, S.S., Cui, H.S., Wu, X.Y. and Wu, F.A.** (2014). "A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor," *Bioresource technology*, 158, 39- 47.
- [36] **Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V., Nakanishi, K.** (1988). "Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis," *Experientia*, 44, 230–232.
- [37] **Aviello, A., Scalisi, C., Fileccia, R., Capasso, R., Romano, B., Izzo, A. A., Borrelli, F.** (2010). "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility," *Eur J Pharmacol* 640:163 – 167.
- [38] **Tolba, M. F., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Abdel-Rahman, S. Z., Abdel-Naim, A.B.** (2013). "Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective hepatoprotective, and cardioprotective effects," *IUBMB Life*; 65:699–709.
- [39] **Tolba, M. F., Omar, H. A., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Raman, S. Z.** (2016). "Caffeic acid phenethyl ester: a review of its antioxidant activity, protective effects against is chemia-reperfusion injury and drug adverse reactions," *CriticalReviewsinFoodScience and Nutrition* 56:2183-2190.
- [40] **Murtaza, G., Sajjad, A., Mehmood, Z., et al.** (2015). "Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer," *J Food Drug Anal*; 23:11–18.
- [41] **Zhang, P., Tang, Y., Li, N.G., Zhu Y., Duan, J.A.** (2014). "Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives," *Molecules*19:16458-16476.
- [42] **Armutçu, F., Akyol, S., Üstünsoy, S., Turan Filiz, F.** (2015). "Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review)," *Experimental and Therapeutic Medicine*9:1582-1588.
- [43] **Öztürk, G., Giniş, Z., Akyol, S., Erden, G., Gürel, A., Akyol, O.** (2012). "The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of

melanomas, lung and prostate cancers,” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*16:2064-8.

- [44] **Salonen, A., Saarnio, S., Julkunen-Tiitto, R.** (2012). “Phenolic compounds of propolis from the boreal coniferous zone,” *Journal of Apicultural Science* 56:13-22.
- [45] **Venegas, Y., Pena, C., Pastene, E., Contresas, D.** (2016). “A new near-infrared method for simultaneous determination of caffeic acid phenethyl ester and antioxidant activity of propolis samples,” *Journal of Apicultural Research*55:8-18.
- [46] **Hernandez, J., Goycoolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velazquez, E. F., Astiazaran, H., Lugo, E., Velazquez, C.** (2007). “Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines,” *Planta Medica*73:1469-1474.
- [47] **Hilhorst, M. J., Somsen, G. W., de Jong, G. J.** (1998). “Potential of Capillary Electrophoresis for the Profiling of Propolis” *J. High Resolut. Chromatogr.* 1998, 21, 608-612.
- [48] **Yavuz, C., Ertürk, O.** (2017). “Chemical compositions and antimicrobial activities of six different Turkish propolis samples,” *Microbiological Research*26:2930-2935.
- [49] **Turan, İ., Demir, S., Mısır, S., Kılınç, K., Menteşe, A., Aliyazıcıoğlu, Y., Değer, O.** (2015). “Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines,” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*14:777-782.
- [50] **Armutcu, F., Akyol, S., Ustunsoy, S., Turan, F. F.** (2015). “Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review),” *Exp Ther Med.*, 9, 1582–8.
- [51] **Vilcek, J.** (2008). “First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease,” *J Immunol*; 181(1):5-6
- [52] **Jung, W. K., Choi, I., Lee, D. Y., Yea, S. S., Choi, Y. H., Kim, M. M., Park, S. G., Seo, S. K., Lee, S. W., Lee, C. M., Park, Y. M., Choi, I. W.** (2008). “Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric

oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF-kappaB pathways,” *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2572-2582, 2008.

- [53] **Lee, K. W., Chun, K. S., Lee, J. S., Kang, K. S., Surh, Y. J., Lee, H. J.** (2004). “Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester,” *Ann NY Acad Sci* 1030: 501-507.
- [54] **Chen, M. F., Keng, P. C., Lin, P. Y., Yang, C. T., Liao, S. K., Chen, W. C.** (2005) “Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo.” *BMC Cancer* 5: 158.
- [55] **Araujo, M. A. R., Liberio, S. A., Guerra, R. N. M., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, R. F. R.** (2012). “Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review,” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 1, p. 208-219.
- [56] **Armutcu, F., Gürel, A., Hoşnüter, M., Pabuçcu, O., Altnyazar, C.** (2004). “Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative erythrocyte damage in a rat model of thermal injury,” *J Burn Care Rehabil* 25: 171-178, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Çisil ALİM
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.11.1990 , İstanbul
E-posta : cisilalim@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : İstanbul Üniversitesi, Kimya, Haziran 2015
- **Yüksek Lisans** : İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya, Haziran 2019

MESLEKİ DENEYİM VE SUNUMLAR:

Intertek Test Hizmetleri, Gıda Laboratuvarı & Analitik Laboratuvarı – Laboratuvar Stajı (Haziran,2013 – Ağustos,2013)

June 4 – 8, 2017, St. Petersburg, Russia : 13th International Conference On Organic Electronics (ICOE-2017) – Poster Presentation

October 30, 2017, Bogazici University, Istanbul, Turkey : International Symposium on Chemistry via Computation, Applications on Molecular Nanoscience – Poster Presentation