

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**KESTANE BAL VE PROPOLİSİNİN FENOLİK ASİT KOMPOZİSYONU VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ali Osman SARIKAYA

**OCAK 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**KESTANE BAL VE PROPOLİSİNİN FENOLİK ASİT KOMPOZİSYONU VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Kimyager Ali Osman SARIKAYA

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 16.12.2008

Tezin Savunma Tarihi : 08.01.2008

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Edip KEHA

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

"Kestane Bal ve Propolisinin Fenolik Asit Kompozisyonu ve Antioksidan Özelliğinin Belirlenmesi" adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Başta yüksek lisans çalışmamı, maddi olarak destekleyen TÜBİTAK Hızlı Destek Programı (Proje No: 106T731) 'na teşekkür ederim.

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisansa başladığım ilk günden itibaren benim çalışmalarım da bana yol gösteren bilgisini paylaşan Öğr. Gör. Esra Ulusoy' a teşekkürü bir borç bilirim.

Gerek HPLC tekniklerinin öğretilmesinde ve gerekse de HPLC analizlerimin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden çok değerli hocalarım Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL ve Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK' e çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım da her tür desteklerinden yararlandığım başta değerli hocam Doç. Dr. Murat KÜÇÜK olmak üzere Prof. Dr. Nurettin YAYLI, Arş. Gör. Ahmet YAŞAR, Öğr. Gör. Celal DURAN, Arş. Gör. Ali GÜNDOĞDU ve diğer Biyokimya anabilim dalındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca bal ve propolis örneklerinin temin edilmesinde ZAYBİR'e (Zonguldak Arı Yetiştiricileri Birliği) ve manevi desteklerini esirgemeyen ZAYBİR başkanı Sayın Selahattin GÜNEY'e teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili babama, anneme ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ali Osman SARIKAYA

Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1 Giriş	1
1.2. Arıcılık	2
1.3. Bal	4
1.4. Propolis	5
1.5. Türkiye'nin Bal Üretimindeki Durumu	6
1.6. Türkiye de Üretilen Diğer Bal Çeşitleri	6
1.7. Biyolojik Aktivite Nedir?	7
1.8. Serbest Radikal Oluşumu ve Reaktif Oksijen Türleri	9
1.9. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları	10
1.9.1. Bazı Antioksidan Maddeler	13
1.9.2. Antioksidanlar Nasıl ve Ne Kadar Alınmalıdır?	15
1.10. Bitkilerde Bulunan Biyolojik Aktif Bileşikler	15
1.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	19
1.11.1. HPLC Sistemleri	19
1.11.2. Hareketli Faz	20
1.11.3. Sabit Faz	21
1.11.4. Pompa	22
1.11.5. Kolon	22
1.11.6. Dedektör	22
1.11.7. Sinyal Gürültüsü ve Sapma	23
1.11.8. HPLC Türleri	23
1.11.9. HPLC Kullanım Alanları	24
1.11.10. Alıkonma Parametreleri	25
1.11.11. Bant Genişliği	26
2. MATERYAL VE METODLAR	27
2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	27
2.2. Örneklerin Toplanması	27
2.3. HPLC Analizleri	28
2.3.1. HPLC Analizleri İçin Örneklerin Hazırlanması	28
2.3.2. HPLC ile Fenolik Asitlerin Analizi	28
2.4. Antioksidan Testler	29
2.4.1. Toplam Polifenol Tayini	29
2.4.2. DPPH Tayini	30
2.4.3. Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) Tayini	31
2.4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)	32
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1. HPLC ile Fenolik Asit Analizleri	33
3.2. Antioksidan Aktivite Tayinleri	35

4.	SONUÇ.....	39
5.	KAYNAKLAR.....	40
	ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÖZET

Yapılan çalışmada, Zonguldak yöresinden toplanan kestane (*Castania sativa Mill.*) bal ve propolis örneklerinin bazı kimyasal ve biyolojik analizleri gerçekleştirildi. Bal ve propolis ekstraktlarının fenolik asit içerikleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edildi. Bal ve propolisin antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik madde, demir (III) indirgenme gücü (FRAP), bakır (II) indirgeme kapasitesi (CUPRAC) ve DPPH radikal temizleme kapasitesi testleri kullanılarak tayin edildi ve elde edilen değerler standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile gallik asit standardına göre yapıldı. Antioksidan aktiviteler kateşin, BHT, ve Troloks® gibi standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Etanolik propolis ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin kestane balından yaklaşık 100 kat daha fazla olduğu ve buna bağlı olarak antioksidan aktivitenin de daha yüksek olduğu bulundu. Kestane bal ve propolis örneklerinin fotodiyot array (DAD) dedektörü kullanılarak yapılan HPLC analizlerinde ferulik, sinamik, klorojenik ve kumarik asitleri bakımından zengin olduğu bulundu.

Sonuç olarak kestane balı ve propolis örneklerinin fenolik asit içeriklerince zengin ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu, propolis ekstraktlarının çok daha yüksek biyolojik etkinliği nedeniyle gıda, tıp, ilaç, kozmetik gibi sanayiler de yararlanılabilecek, yüksek potansiyelli doğal bir ürün olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Bal, propolis, kestane, HPLC, antioksidan

SUMMARY

Determination of Antioxidant Properties and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania Sativa Mill.*) Honey and Propolis

The purpose of the present study was to investigate some chemical and biological properties chestnut (*Castania sativa Mill.*) honeys and propolis from Zonguldak region in Turkey. The phenolic constituents were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity were examined by four different methods, namely, the contents of total phenolics, scavenging of free radical DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ferric reducing/antioxidant power (FRAP), and cupric reducing/antioxidant power (CUPRAC). Total phenolic contents were determined by using Folin-Ciocalteu reagent as gallic acid equivalent. The antioxidant activities were compared with standard antioxidants catechin, BHT and Trolox[®]. The antioxidant activities were found to be related to the sample concentrations and ethanolic propolis extracts showed about 100 fold higher antioxidant activity than honeys. The major phenolic acids of the chestnut honeys and propolis identified by HPLC with photodiode array detection were coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid.

The comparative findings from antioxidant activities and phenolic acid analyses of honey and propolis samples of chestnut origin provide important criteria for considering their nutritional and nutraceutical potentials. The presence of these bee products of chestnut origin in the diet can be recommended for protection against several illnesses. Comparison of the results with literature data also ranks the chestnut honey and propolis as better sources of antioxidants among those from other floral origins.

Key Words: Honey, propolis, chestnut, HPLC, antioxidant

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituentleri.....	16
Şekil 2. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi	20
Şekil 3. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	30
Şekil 4. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	31
Şekil 5. Bazı fenolik asitlerin optimum HPLC şartlarının belirlenmesi.....	34

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri	10
Tablo 2. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler	15
Tablo 3. HPLC analizlerinde kullanılan fenolik asitler ve formülleri.....	16
Tablo 4. Kestane bal ve propolislerindeki fenolik asit dağılımları.....	34
Tablo 5. Kestane bal ve propolislerinin antioksidan aktiviteleri	36

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kromatografi, karışımlardaki bileşenleri, yük, büyüklük, çözünürlük, adsorbsiyon, elektrostatik etkileşim gibi kimyasal ve fiziksel özellikleri kullanılarak yapılan analitik ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süper kritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaşça hareket ederler. Öte yandan sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998).

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda çeşitli organik bileşiklerin serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu engelleyen veya önleyen bileşiklerdir. Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara olan ilgi bir hayli artmıştır. Bunun sebebi sentetik antioksidanların kanserojenik olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etkileri bulunmamaktadır. Doğal antioksidanlar canlı organizmalardaki savunma sisteminde olduğu kadar gıda sanayinde de önemli derecede yararlıdırlar. Bu amaçla besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü artırmak, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan antioksidanlar önemli katkı maddeleridir. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup daha çok polifenoller ve flavonoidler halinde bulunurlar (Rice-Evans, 1997).

Türkiye, bal üretimi için uygun mevsim şartları, topografik yapısı ve zengin bitki florasına sahip nadir ülkelerden biri olup, bal üretiminde dünyanın dördüncü büyük ülkesidir. Dünyada ballı bitki türlerinin dörtte üçüne sahip olmasına rağmen, bal üretimi ve tüketimi bakımından dünyada yerini tam olarak alamamıştır.

Çalışmanın amacı, Türkiye’ de tek floralı olarak en çok üretilen ve tüketilen kestane bal ve propolisinin kromatografik yöntemler kullanılarak biyo-aktif bileşenleri olan fenolik asit bileşimlerinin aydınlatılması ve bu doğal ürünlerin hastalıkları önleme ve korumadaki *in vitro* biyolojik etkilerini incelemektir.

1.2. Arıcılık

Arıcılık milattan önce 3500 yıllara kadar dayanmaktadır (Encye Americana,1993). Arılar yaklaşık olarak 20.000 türü olan bir familyaya sahiptir ve diğer canlılardan ayıran en büyük özelliği sosyal yaşamlarıdır. Arıları inceleyen bilim adamları arıların yaşam biçiminden balın depolanmasına kadar birçok konuda şaşırmışlardır. Bal arılarının diğer arı türlerinden daha farklı özellikleri vardır. Bal arıları koloniler halinde yaşarlar. Bir arı kolonisinde bir kraliçe, birkaç yüz erkek ve 10–80 bin işçi arı vardır. Bu arılar görünüş olarak birbirinden farklıdır, kraliçe arı ve işçi arılar dişidir ve her kolonide yalnız bir kraliçe arı bulunur, kraliçe arı dişi arılardan daha büyüktür. Kraliçenin esas görevi yumurtlamaktır ama koloninin büyüklüğünden ve kolondaki sisteminden de sorumludur. Kraliçe 5–7 yıl arasında değişen yaşam ömrü ile bireyler arasında en uzun yaşayan arıdır. Kraliçe arı bir günde normal koşullarda kendi ağırlığına eş ağırlıkta 2000–3000 adet çok iyi koşullarda ise 6 bin adet yumurta bırakabilir. Erkek arılar dişi arılardan iri olmasına rağmen tek görevi dişi arıyı dölemektir, çünkü kendileri için besin toplayabilecek organları ve iğneleri yoktur. İşçi arılar peteğin örülmesi, yiyeceğin toplanması, arı sütünün üretilmesi, temizlik ve savunma gibi genel anlamda her şeyden sorumludur. Yapılan araştırmalara göre bilgisayarların saniyede 16 milyon aritmetik işlem yaparken doğadaki rakiplerinin yani bal arılarının daha az enerji ile 10 trilyonluk işlem yapma kapasitesine sahip oldukları görülmüştür.

Petek gözleri en az bal mumu harcayarak maksimum ölçüde bal depolamak için en uygun şekil olan altıgen prizmadır ve derinliği 12 mm, duvar kalınlığı ise 1/500 inç tir. Arının yiyecek aramak için yapmış olduğu gezinti yaklaşık olarak 25 dakika sürer ve bu süre içerisinde 5 çiçek ziyaret eder. 450 gramlık saf balı elde edebilmek için yaklaşık olarak 17 bin bal arısının 10 milyon çiçeği ziyaret etmesi gereklidir. Bu yüzden 450 gram saf bal edebilmek için arıların bin iş saati çalışmaları gereklidir (Brackenbury, 1995). Kovanda her zaman bir

düzen mevcuttur, hangi arının ne yapacağı önceden belirlidir ve hiçbir görev aksatılmaz. Arılar sırasıyla larva ve pupa evrelerini tamamlayarak erişkin hale gelirler. Larva dönemi kraliçe arının yumurtaları bırakmasıyla başlar ve bu dönemde larvaların bırakıldığı petek gözlerine son derece özenli bakım başlar. Hücrelerdeki arı yumurtaları üç gün içinde gelişir, bu gelişme döneminde işçi arılar tarafından yaklaşık olarak 10000 kere ziyaret edilir. Üç gün sonra larvalar yumurtadan çıkar ve gelecek üç gün boyunca sadece arı sütü ile beslenirler. Arı larvaları düzenli beslenerek 6 gün sonra ilk ağırlıklarının 1500 katına kadar ulaşırlar. Larvaların yedinci gününde larva yemek yemeyi keser ve işçi arılar larvanın hücre kapağını mum ile kubbe şeklinde bir kapak ile kapatır. Larva bu durum başladıktan sonra kendi ürettiği bir madde ile bulunduğu peteği tamamen koza ile örerek kendini hapseder. Bu zamandan sonra pupa dönemi başlar. Pupa döneminde bulunduğu gözde 12 gün kalır ve arı yumurtası hücreye bırakıldıktan üç hafta sonra bal arısı uçmaya hazır olarak çıkar ve 6 haftalık ömrüne başlamış olur. Dişi olan arılar hücrenin ve kovanın işleri ile ilgilenirken diğer arılar hücrelerinden çıkarak görevlerine başlar.

İşçi arılar pupa döneminden çıkar çıkmaz kovanın temizlik işlerine başlarlar, 2 gün boyunca öncelikle kendi hücrelerini daha sonra da diğer pupa döneminden çıkan hücreleri temizler.

Larva bakıcılığı ile uğraşacak olan işçi arılar 2 gün boyunca pupa döneminden çıkan hücreleri temizledikten sonra yani üçüncü günden itibaren larvaların beslenmesiyle uğraşmaya başlar.

İşçi arılar 10. günden itibaren kovan dışına çıkarak çevreyi tanırlar. Bu sırada işçilerin karnındaki balmumu bezleri gelişmeye başlar ve 12. günlerinde olgunlaşarak balmumu üretecek hale gelirler. 12.günlük olan işçiler, arı yavrularını beslemeyi keserler ve birbirine eşit altıgenlerden oluşan peteğin inşasına koyulurlar.

Arılar bal mumu üreterek petek inşa ettikleri sırada iğne bezleri gelişir ve zehir üretmeye başlar. İşte bu dönemdeki arılar kovan kapısında nöbet tutarak davetsiz misafirlerin içeri girmesini engellerler. Gelen her canlı (arılar bile) kapıdaki nöbetçinin kontrolünden geçerek içeri girebilir. Nöbetçi arının yerinden ayrılması durumunda ise hemen başka bir işçi arı nöbeti devralır (Encye Americana, 1993).

1.3. Bal

Bal, bal arıları tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından alınarak yutulan nektarın, arıların bal midesi denilen organlarında invertaz enzimi sayesinde kimyasal değişime uğramasıyla oluşan ve kovandaki petek hücrelerine yerleştirilen, çok faydalı bir besindir. Nektar bala çevrilirken arılar sağladıkları invertaz enzimi sayesinde sakkarozu inversiyona uğratarak fruktoz ve glukoz şeklinde basit şekerlere dönüştürür ve fermantasyonun meydana gelmesini önleyecek miktarda suyunu uçururlar. Kovandaki hücrelere yerleştirilen ve üzeri mumdan bir kapakla örtülen ürün, arılar tarafından sağlanan özel havalandırma sistemi sayesinde bildiğimiz tat ve kıvama gelir (Anonim, 1990).

Balın özellikleri ve üretimiyle ilgili bilinen ilk kitap, Sir John Hill tarafından yazılmış 1759'da Londra'da basılmıştır. Arı ve balın tarihçesi incelendiğinde, nektar ve polen üreten çiçekli bitkiler ile bunlardan faydalanan böceklerin 100–150 milyon yıl önce, ilk memelilerin de mevcut olduğu Jurassic/Cretaceous devresinde ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Bal üreten arılar 10–20 milyon yıl önce görülmüştür. Bal ile ilgili ilk resmi dokümanlar Anadolu'da Çatalhöyük'te bulunmuştur. M.Ö. 5000 yıllarında Sümerlerin yazılı belgelerinde bal üzerine bilgiler mevcuttur. Benzeri bilgiler Anadolu'daki başka bir uygarlık olan Hititlerin yazıtlarında da bulunmuştur. M.Ö. 3200'de Aşağı Mısır Kralı I. Dynasty, krallık sembolü olarak arıyı seçmiş ve krallığında bununla ilgili figürlere yer vermiştir. Musevi topluluklarında ise Tevrat ve Talmut'ta yazıldığı gibi Kur'an-ı Kerimde de balın yararlarından söz edilmektedir. Roma imparatorluğuna ait bazı yazıtlarda da bal ve arıcılık üzerine çeşitli bilgiler bulunmaktadır (Lusby, 2002).

Bal, bal arıları *Apis mellifera* tarafından üretilen doğal bir ürün olup, insanlar tarafından tatlandırıcı ve besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Balların bileşimi arının nektar topladığı bitkilerin türüne, çevresel koşullara göre değişim göstermektedir (Anklam, 1998). Bileşiminde yaklaşık 200 bileşik bulunan balın şifa kaynağı olması açısından önemi ve kullanımı son yıllarda artmıştır. Balın bileşimi çeşitlilik göstermekle birlikte tipik bir bal ortalama % 20 nem, % 76 şeker, % 0.18 kül, % 1 toplam polifenol, protein gibi bileşenlerin yanı sıra koruyucu olarak α -tokoferol, askorbik asit, flavonoidler ve diğer fenolikler, glukoz oksidaz, katalaz ve peroksidaz gibi enzimleri içerir (White, 1979). TSE ye göre balın kalitesi içerdiği nem, toplam şeker, invert şeker, Hidroksimetil furfural (HMF), diastaz sayısı (DA), kül gibi

parametreler ile ticari şeker miktarları tayin edilmektedir. Bu parametreler balın gerçek kalitesinden daha çok tazeliği, kristallenme yapıp yapmadığı, arılara ticari şeker yedirilip yedirilmediği gibi işlemleri göstermektedir. Oysa balın esas kalitesini belirleyen faktör balın biyolojik değeri olup bundan sorumlu bileşikler ise balda ancak % 1–2 oranında bulunabilen, ikincil metabolit ürünler olarak adlandırılan çeşitli uçucu bileşenler ile fenolik maddelerdir. Eski çağlardan beri bal besin değerinin yanı sıra yanık, gastrointestinal bozukluk, astım, enfeksiyonlu yaralar ve deri ülserlerinin tedavisinde kullanılmıştır (Anklam, 1998; Al-Mamary, 2002; Orhan, 2003).

Kestane (*Castania sativa Mill.*) pek çok amaç için kullanılan bir bitki türü olup Avrupa da yetişen bir türdür. Kestane ağacının çiçeklerinden bal, yaprak ve kabuklarından propolis, meyvesinden nişastalı bir yemiş olan kestane, odunundan marangoz ve mobilyacılıkta ormanından ise ekosistem oluşumunda yararlanılan çok değerli bir orman ürünüdür. Türkiye de 2006 yılı verilerine göre toplam bal üretimi olan 70.000 ton balın yaklaşık 600 tonu kestane balı olduğu bildirilmektedir (Robin, 2006; Vogt, 2006). Hafif acımtırak tada sahip ve koyu kehribar renkli kestane balı önceleri fazla tercih edilmemesine rağmen son yıllarda üretimi talebi karşılayamamaktadır.

1.4. Propolis

Propolis (bazen “arı zankı” olarak da bilinir) bal arılarının bitki tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçinemsî maddenin genel ismidir. Propolis ismi yunanca savunma anlamına gelmekte olup arıların ve kovanın korunmasından görevlidir. Kovan girişinde bulunan propolis arıların ayaklarının temizlenmesinde bir çeşit dezenfektan olarak, kovan tahtalarının aralarında bulunan propolis ise kovanın ısısının korunmasında rol oynar. Ham propolisin tam bileşimi kaynağa göre değişir (Chemid, 1996). Propolis üretimi bakımından kestane ve ökaliptus ağaçları önemli yer tutar. Genelde, %50 reçine ve sebze plesenki, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik kalıntıları da içeren çeşitli diğer bileşiklerden oluşmuştur (Cisarino, 1987). Propolis tarafından iyileştirilebilen hastalıklar arasında nefes darlığı, egzema, göz enfeksiyonları, boğaz enfeksiyonları, ülser ve böbrek enfeksiyonları yer alır (Hill, 1977). Propolisin antibiyotik, antifungal, antiviral

özelliklerinin olduğu ve bol miktarda flavanoid içerdiği için antioksidan etkisinin baldan ve BHT den 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Russo, 2004). Biyolojik etkinliğinin yüksek olması nedeniyle, propolisli ürünlerin üretiminde bir hayli artış vardır. Propolisli pastiller, diş macunları, güneş koruyucuları, çiklet ve çikolatalar bunlardan bazılarıdır.

1.5. Türkiye'nin Bal Üretimindeki Durumu

Türkiye Dünya bal üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır. 2001 yılı ölçümlerine göre Dünyada 1.264.758 ton bal üretilmiştir. En büyük bal üreticisi ülke Çin olup onu ABD, Arjantin ve Türkiye izlemektedir. Türkiye de arıcılık bir sosyo-ekonomik faaliyet olup 4 milyon civarında kovan ve 70 bin ton dolayında bal üretimi yapılmaktadır. Ancak Türkiye de kovan başına düşen bal üretimi ve bal ihracatından aldığı pazar payı çok düşük ve Dünya ortalamasının altındadır. Bal ihracatındaki temel sorun sahte bal üretimi ile kötü niyetli kimselerin arılara çeşitli kimyasal katkı madde vermeleridir. Arı görmemiş veya az miktar bal ile karıştırılmış glikoz şurupları sürekli piyasaya sürülmektedir.

1.6. Türkiye de Üretilen Diğer Bal Çeşitleri

Dünyada bal üreten bitki türleri bakımından ön sıralarda yer alan ülkemizde çeşitli kır ve yayla çiçekleri, sanayi ürünleri ve orman ürünlerinden bal üretimi yapılmaktadır. Ülkemizin hemen her bölgesinde bal üretimi yapılmasına rağmen Karadeniz, Ege ve Akdeniz bölgesindeki üretim payı daha fazladır. Türkiye de üretilen balları iki sınıfta toplamak mümkün. Tek tip bitki florasından toplanan monofloralı ve karışık yayla çiçeklerinden oluşan heterofloralı ballar. Genelde monofloralı ballar daha çok sanayi ürünleri ve orman ürünlerinden elde edilen ballardır. Türkiye de üretilen bal türlerini şöyle sıralamak mümkün;

Yayla balları: İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi ile Doğu Karadeniz bölgesinin yüksek yaylalarında karışık yayla çiçeklerinden elde edilen ballardır açık sarı ve kehribar renkte olup en lezzetli ballardır.

Anzer Balı: Doğu Karadeniz bölgesi Rize İkizdere ilçesine bağlı Anzer yaylasında (2850 m) üretilen bal ülkemizde ve Dünyada oldukça ünlü olup, pek çok derde deva olduğuna inanılmaktadır. Balın şifa kaynağı olduğuna inanılması ve üretiminin sınırlı olması ve ayrıca, diğer ballardan farklı bir tada (lezzet) sahip olması balın oldukça yüksek fiyatla satılmasına neden olmaktadır (yaklaşık 400–500 TL). Seksen kadar endemik bitki türüne sahip Anzer yaylasından üretilen bal açık sarı renkte ve çok hoş bir aromaya sahiptir.

Erzincan ve Bayburt Yayla Balları: Erzincan ve Bayburt yaylalarından toplanan heterofloralı ve karışık yayla çiçeklerinden oluşmuş ballardır. Gezginci arıcıların uğrak yeri olan Erzincan ovası bal üretimi bakımından çok zengindir. Ayrıca Tema vakfı tarafından başlatılan bir proje ile Doğu Karadeniz bölgesinde Artvin-Borçka-Ayder ve Macelan yöresinde organik bal üretimi yapılmakta ve üretimi teşvik edilmektedir.

Kestane Balı: Koyu kahve renkte, buruk acı tadı ve kendine özgü bir aromaya sahip balın solunum yolu hastalıklarına iyi geldiğine inanılmaktadır. Doğu ve batı Karadeniz bölgesinde en fazla üretimi yapılan (600.000 ton) bal türü olup kristalleşmeyen baldır. Antiseptik ve antibakteriyal özelliği ile özellikle mide hastalıklarında tedavi edici olduğu bildirilmektedir.

Çam Balı: Çam ağaçlarında bulunan bazı canlıların, basra, salgıladıkları bal şerbetinin (basura) bal arıları tarafından toplanarak değişikliğe uğratarak elde edilir. Kristalleşmeden kalabilen tek bal olup koyu renge sahiptir. Ege ve Akdeniz yöresinin temel balı olup dünya çam üretiminin % 90 bu bölgeden yapılmaktadır. Solunum ve sindirim yolu hastalıklarına iyi geldiğine inanılmaktadır.

Korunga Balı: Bir endüstri ve yem bitkisi olan korunga (*Onobrychis sativa*) toprak verimliliğini, artırmak ve iyi bal özü olması nedeniyle tarımı destek alan tarım ürünlerindedir. En iyi ılıman iklimlerde yetişmekle birlikte kurağa ve soğuğa dayanıklı, toprak istekleri bakımından oldukça kanaatkâr, fakir, kuru ve kalkerli topraklarda yetişebilmektedir. En iyi ekim zamanı erken ilkbahar olup, ılıman bölgelerde ekim sonbaharda da yapılabilir. Erzurum ve yöresinde bolca korunga balı üretilmektedir.

Kekik Balı: Kırsal bölgelerde ve özellikle Ankara, Afyon, Çankırı, Kastamonu, bolu, Trabzon dağlarında yetişen kekik türlerinden oluşur. Kekik bileşiminde timol uçucu bileşeni içeren ve antiseptik özelliği yüksek bir bitkidir. Kekik balının soğuk algınlığı ve yaraların iyileşmesine iyi geldiğine inanılır.

Orman Gülü Balı: Doğu Karadeniz bölgesinde Trabzon, Rize ve Artvin çevresinde üretilen orman gülü balı (*Rhododendron luteum*) üretilmektedir. Deli bal olarak ta dünya literatürüne giren bu balın fazla tüketilmesiyle ani tansiyon düşüklüğü ve kalp çarpıntısı gibi hastalıklara neden olmaktadır.

Narenciye Balı: Akdeniz bölgesine özgü bal olup narenciye çiçeklerinden (portakal, mandalina, limon) üretilmektedir. Kalsiyum fosfat ve demir fosfatça zengin olduğu söylenen bu balın yüksek C-vitamini içeriğine sahip olduğu bildirilmektedir.

Diğer Sanayi ürünleri balları: Pamuk balı, Ege ve Akdeniz bölgesinde geniş pamuk tarlalarından, Ayçiçeği balı Trakya yöresinde ayçiçeği tarlalarından üretilen ballardandır.

1.7. Biyolojik Aktivite Nedir?

Kimyasal ve biyolojik açıdan herhangi bir zararlı reaksiyon ya da organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren, onu zararsızlaştıran veya yok eden etkilerin hepsine biyolojik etkinlik adı verilir. Bu etki *in vivo* ve *in vitro* olarak test edilebilir. Fakat *in vivo* çalışmalar oldukça sorumluluk gerektiren, etik kurul kararı, çalışmalar olduğundan çalışmalar önce *in vitro* olarak yürütülür ve biyolojik etki potansiyeli ölçülür. Daha sonra *in vivo* çalışmalara geçilir. Biyolojik etki gösteren maddelere biyolojik aktif maddeler adı verilir. Bitkiler diğer organizmalardan farklı olarak sınırsız sayıda biyolojik aktif madde üretebilme yeteneğine sahip canlılardır. Biyokimyasal araştırmalarda daha çok incelenen biyolojik etkinlik testleri; antioksidan aktivite (anti-aging), serbest radikal giderici aktivite, antitümoral, antikanserojen, antifungal, antibakteriyal, antiviral, antiinflamatuar, antiherbisit ve anti-insektisit etkiler gibidir (Russell, 2007; Bakkali, 2008).

1.8. Serbest Radikal Oluşumu ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanırlar. Serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmıştır. Bugün radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı artık iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücre hasarı ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlay, 1999). Serbest radikallerin başlıca oluşma nedenleri sigara, alkol ve lipid metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, ozon, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süper oksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikalidir. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen (O_2), iki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğu için kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif bir özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1–2 oranında moleküler oksijen kaçağı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar (Mccord, 1985; Bast vd., 1991; Cheeseman ve Slater, 1993).

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri

Serbest Radikalın ve Radikal Üreten Türün		
Adı	Simgesi	Kimliği
Hidrojen radikali	H^{\bullet}	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH^{\bullet}	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	HO_2^{\bullet}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	ROO^{\bullet}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil radikali	CCl_3^{\bullet}	CCl_4 metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS^{\bullet}	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO^{\bullet}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO	<i>L</i> – argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyal savunmasında gereklidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.9. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları

Oksidatif hasar ve serbest radikal mekanizmalı reaksiyonlar yaşlanma, kanser, ateroskleroz ve diyabete neden olmaktadır. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanırlar. Bugün radikallerin

pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücrel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir. Oksidatif hasarı azaltıcı veya geçiktirici olarak bilinen antioksidanlar iki kısımda incelenmektedirler. Endojen ve eksojen antioksidanlar. Sentezlendiği organizmada etki gösteren antioksidanlara endojen antioksidanlar adı verilir ve bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarakda iki kısımda incelenirler. Enzimatik antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz dibi enzimlerden oluşurlar. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama ve hapsetme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, seruloplazmin, ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur. Eksojen antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Kolaylı, 2003, Kolaylı 1999).

Antioksidan savunma mekanizmaları oldukça çeşitli olup bunlardan bazılarını şöyle özetlemek mümkündür:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (detoksifikasyon)
3. Hücre deformasyonunun onarılması
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması.

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla *oksidan-antioksidan denge* olarak tanımlayabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin özellikle oksidanlar lehine bozulması membran lipitleri, proteinler ve DNA gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında bütünlüğün bozulmasına ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açar.

Serbest radikaller, hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyona neden olurlar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişiklikdir. Yağlar vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz, harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez. Serbest radikal saldırısının devamı; hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, bitki zarının yırtılmasına ve

hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır.

Serbest radikaller pek çok hastalığın oluşmasına zemin hazırlayan ajanlar olarak düşünülmektedirler. Örneğin, aterosklerozde olduğu gibi serbest oksijen radikallerinin damarların oksidatif hasarına yol açması sonucu kolesterolün hasarlı bölgelere takılmasına yol açmaktadır. Ayrıca kötü huylu kolestrol olarak bilinen LDL nin oksitlenmesi sonucu makrofajların daha fazla ilgisine maruz kalmaktadır. Dolayısıyla tüm bu etkiler damar tıkanıklığına neden olmaktadır. Serbest radikaller sadece membran yapısının bozunmasında değil nükleik asitlerin (DNA ve RNA), proteinlerin, karbohidrat birimlerinin oksidasyonuna da neden olmaktadır. Genetik kodun değişimine ve çeşitli i mutasyonlara ve dolayısıyla kanser oluşumuna yol açabilir (Halliwell vd., 1997; Huang vd., 2005).

Son yıllarda gıda kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Doğal antioksidanlar canlı organizmalardaki savunma sisteminde olduğu kadar gıda sanayinde de önemli derecede yararlıdırlar. Bu amaçla besinlerin bozulmasını önlemek, raf ömrünü artırmak, lipitlerin ve vitaminlerin parçalanmasını engellemek ve besin rengini korumak için kullanılan antioksidanlar önemli katkı maddeleridir. Doğal kaynaklı antioksidanların çoğu bitkisel kaynaklı olup daha çok bitkilerde vitaminler (A, C, E vit.) ve polifenoller veya flavonoidler halinde bulunurlar. Bitkilerde bulunabilen biyoaktif bileşiklerin miktarı ve türü bitkinin florasına bağlı olarak değişim göstermektedir. Bunların ayrıca serbest radikallerden koruma aktiviteleri, kötü huylu kolesterol (LDL)'un oksidasyonu ve DNA hasarını onlemede rolleri ve apoptozisi indüklemedeki rolleri bulunmaktadır. Beslenmenin kanser riski açısından önemli bir etken olduğu fikri uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar meyve sebze tüketimi ve doğal ürünlerle beslenmenin ile kanser oluşumu arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bir doğal ürün olan bal ve propolisin da çeşitli biyolojik aktif bileşenler içerdiği şüphesizdir. Bu biyolojik aktif maddeler A, B, C ve E vitaminleri ile çeşitli aromatik yapıya sahip fenolik ajanlar olup özellikle de meyvelerde daha çok bulunurlar. Fenolik maddeler; bitkiler aleminde o kadar yaygındırlar ki hemen hemen her meyve ve sebzede mutlaka az veya çok miktarda bulunmaktadır. Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler; hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik

asitler ve flavonoid grubu maddelerdir (Halliwell, ve Gutteridge, 1992; Storz ve Imlay, 1999; Rice-Evans vd., 1997; Cemeroglu ve Acar, 1986; Larson, 1997).

Serbest radikaller, hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyona neden olurlar. Bu değişim bitkisel yağların acılaşmasına sebep olan küçük bir değişikliktir. Yağlar vücutta değişime uğradığında; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz, harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez. Serbest radikal saldırısının devamı; hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, bitki zarının yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır.

Serbest radikaller pek çok hastalığın oluşmasına zemin hazırlayan ajanlar olarak düşünülmektedirler. Örneğin, aterosklerozde olduğu gibi serbest oksijen radikallerinin damarların oksidatif hasarına yol açması sonucu kolesterolün hasarlı bölgelere takılmasına yol açmaktadır. Ayrıca kötü huylu kolestrol olarak bilinen LDL nin oksitlenmesi sonucu makrofajların daha fazla ilgisine maruz kalmaktadır. Dolayısıyla tüm bu etkiler damar tıkanıklığına neden olmaktadır (Huang, 2005).

1.9.1. Bazı Antioksidan Maddeler

Alfa tokoferol (E Vitamini): E vitamini içinde alfa, beta, gama ve delta tokoferolleri bulunur. Bunların içinden özellikle Alfa tokoferol önemli bir antioksidandır. Özellikle buğday, mısır, darı, pirinç gibi tahıllarda çok bulunur. Bunun dışında ayçiçek yağı, mısırözü yağı, pamukyağı gibi yağlarda, ceviz, badem ve yerfıstığı gibi kuru yemişlerde ve yeşil sebzelerde bulunur. E vitamini aynı zamanda pişirmeye ve ısıya dayanıklıdır, böylece pişirilme esnasında tahrip olmazlar. E vitamini dışında farklı maddelerde bulunan tokoferoller ise rahatça tahrip olabilir. Fakat yağda kızartma ve tahılların öğütülmesi esnasında E vitaminleri de tahrip olur ve çoğu bozunur. Bu yüzden E vitamini ihtiva eden ürünleri yağda kızartmadan pişirmek ve özellikle beyazlatılmadan geçmemiş tahıl ürünlerini (kepekli ürünler gibi) tüketmek daha akıllıca ve sağlıklı olur (Shahidi, 1997).

Askorbik Asit (C Vitamini): Turunçgiller, domates, yeşil yapraklı sebzeler (brokoli, ıspanak vb.) ve patates gibi sebze ve meyvelerde bulunuyor. Fakat C vitamini çok çabuk okside olduğu için pişirirken ve hazırlarken bulunan C vitamininin çoğu işe yaramaz hale geliyor. Bu yüzden C vitamini ihtiva eden besinlerin hafif pişirilmesi, yenilebiliyorsa çiğ yenmesi ve hazırlarken de kesildikten kısa bir süre sonra tüketilmesi önerilir (Shahidi, 1997).

Beta-caroten (A Vitamini): Vücutta depolanarak A vitaminine de dönüştürülen bu kırmızımsı-turuncu pigment çok güçlü bir antioksidandır. Güçlü bir antioksidandır ve birçok kanser türüne yakalanma riskini azaltmasıyla ünlüdür. Havuç, ıspanak ve brokoli gibi yeşil yapraklı sebzeler ile kayısı ve şeftali gibi meyvelerde fazlasıyla bulunur (Shahidi, 1997).

Fenolik maddeler: Fenoller, oksijenli aromatik bileşiklerden olup, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik ve kristal yapıda ki maddelerdir. Renksizdir ancak hava ile temas ettiklerinde kırmızı renk gösterirler. Suda orta derecede, organik çözücülerde (alkol, eter vb.) iyi çözünür. Polifenoller, flavonoidlerin çıkış maddesidir. Bitkilerde organik asit esterleri, veya glikozitleri halinde bulunan başlıca fenolik asitler; gallik asit, p-hidroksisinnamik asit, trans-sinnamik asit 3,4-dehidroksibenzoik asit, vanillik asit, syringic acid, p-kumarik asit, o- kumarik asit, kaffeik asit, ferulik asit, klorogenik asit, rosmarinik asit, absisik acid. Pozisyon ve hidrosilasyon dereceleri antioksidatif aktiviteyi belirlemede oldukça önem taşımaktadırlar (Awad ve Jager, 2003). Bitkilerdeki tüm biyolojik aktiviteden; antioksidan, antiviral, antibakteriyal, antifungal, antitumoral, antiinflamatuar gibi maddeler sorumludur. Fenolik asitlerin kronik hastalıkları (kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser çeşitleri) önlediği bilinmektedir. Bunların ayrıca kötü huylu LDL kolesterolün oksidasyonunu önlediği de bildirilmektedir. Bazı fenolik asitler, örneğin chlorogenic asit, antimutagenic ve antiglycemic etkilere sahiptirler. Fenolik asitlerin serbest radikal sonucu oluşan hastalıklardan, örneğin kanser ve diğer bazı hastalıklardan, damar tıkanıklığı ve yaşlanmaya karşı önleyici etkilerinin olduğu çok iyi bilinmektedir (Halliwell, ve Gutteridge; 1992; Storz G. , Imlay J., 1999; Rice-Evans vd., 1997)

Koenzim Q: Özellikle kanser ve belli nörolojik hastalıklara olan pozitif etkileriyle uzun süredir gündemde olan koenzim q önemli bir antioksidandır. Vücut tarafından üretilir, diyet yoluyla da alınabilir. Her ne kadar ciğer, kalp ve böbrek gibi et ürünlerinde ve balıkta yüksek oranda bulunsada, diyete takviye amaçlı alınan koenzim q hapları ile vücuda alınması daha etkilidir (Shahidi, 1997).

Likopen: Beta-caroten ve lütein ile aynı ailenin üyesi olan likopen birçok meyveye kırmızı rengi veren maddedir. Kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı etkileri ile bağışıklık sistemine olan pozitif etkileri yüzünden uzun süredir gündemde olan bir maddedir. Antioksidan özelliği kanıtlanmıştır. Özellikle domateste çok büyük miktarlarda bulunmaktadır. Prostat ve kalın bağırsak kanserlerinin risklerini büyük oranda düşürdüğü laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (Shahidi, 1997).

1.9.2. Antioksidanlar Nasıl ve Ne Kadar Alınmalıdır?

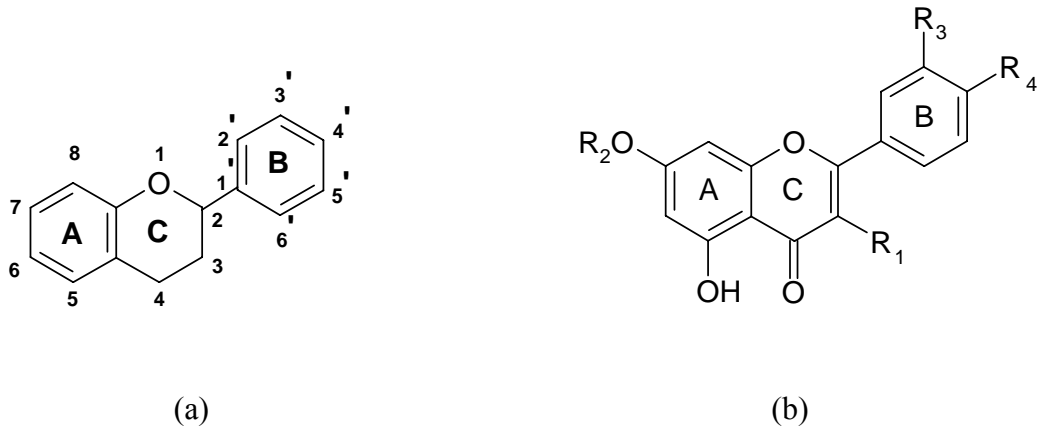
Antioksidan maddeler vitaminler gibi daha çok suda çözünen bileşikler oldukları için vücutta depo edilmezler. Bu nedenle antioksidanlar, vitaminler gibi düzenli olarak alınmalıdır. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki, vitamince zengin sebze ve meyvelerden günde en az beş öğün yemek gerekmektedir. Bu nedenle vitaminler hap olarak da alınabilmektedir. Ayrıca düzenli beslenilse bile, bazı hatalı alışkanlıklar, vücudumuzdaki vitaminleri hızla tüketmektedir. Sigara, aşırı alkol, stres bu etkilerin başında gelmektedir. İngiltere’de yapılan bir araştırmaya göre, en az iki yıl süreyle 200 ünite E vitamini alan kişilerin kalp ve damar hastalıklarına yakalanma risklerinin bu vitaminleri almayanlara oranla yüzde 41 daha az olduğu görülmüştür. Bu konuda kesin bir rakam vermek güçtür. Çalışmalar, alınan miktar arttıkça koruyucu etkinin de daha fazlaştığını ortaya koymaktadır. En son çalışmaların ışığında, günlük C vitamini ihtiyacının 250 ile 1000 mg, arasında olduğu söylenebilir. Bu doz, E vitamini için 100 ile 400 ünite, beta karoten için 6 ile 30 mg, arasında olduğu söylenebilir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bir antioksidan madde olan askorbik asidin fazla tüketilmesi halinde oksidan etkiye yol açtığı da bildirilmektedir. Bu nedenle vitaminler gibi antioksidanları da dengeli olarak tüketmeliyiz (Larson,1997).

1.10. Bitkilerde Bulunan Biyolojik Aktif Bileşikler

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı ise bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal

(mesajcı) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisitlere ve serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitue olmuş halleridir. Bitkilerde bulunan başlıca polifenolik bileşikler basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetil asitler, hidrosinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, naftakinonlar, kromonenler, ksantonlar, stilbenler, antrakionlar, flavonoidler ve ligninlerdir. Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Polifenoller, bir grup bileşik sınıfı olup çeşitli meyveler, sebzeler, kuruyemişler, tohumlar, çiçekler, kök ve gövde kısımları doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast, 2000).

Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken, bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.



Şekil 1. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substitüenleri (b)

Temel polifenol sınıflarından biri olan flavonoidler; en önemli antioksidan özelliğe sahip grup olup kendi içinde 13 alt sınıfa ayrılır. Bunlar; kalkonlar, dihidrokalkonlar, auronlar, flavonlar, flavonollar, dihidroflavonollar, flavanonlar, flavanollar, flavandiollar, antosiyaninler, izoflavonoidler, proantosiyaninler (taninler) ve biflavonoidlerdir (Bravo, 1998). Bazı flavonoidlerin genel iskelet yapısını ve taşıdıkları substitüenleri Tablo 2 de

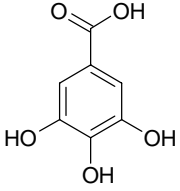
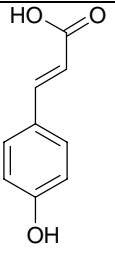
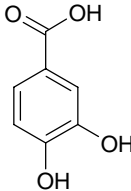
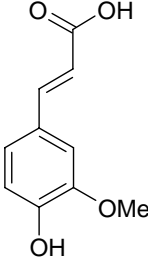
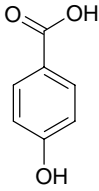
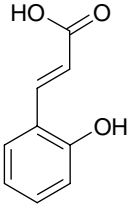
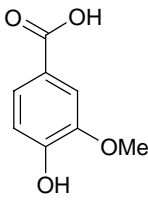
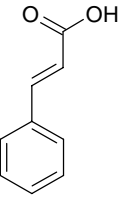
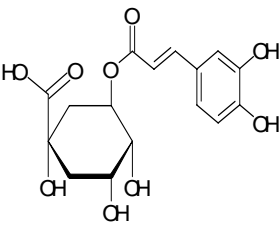
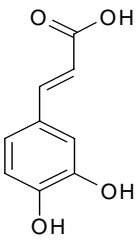
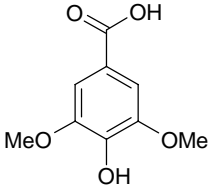
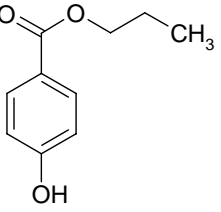
gösterilmiştir. 1990 yılına kadar 5000 tane flavonoid yapısı bildirilmiştir. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B, C halkasından ibaret difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur (Şekil 1).

Tablo 2. Flavonoidlerin genel karbon iskeletleri ve taşıdıkları substituentler

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Luteonil	H	H	OH	OH
Luteonil-7-O-glukozit	H	glc	OH	OH
Kamferol-3-O-soforozit	O-soph	H	H	OH
Küersetin-3-O-galokozit	O-gal	H	OH	OH
Galaegin	OH	H	H	H
Küersetin-4'-O-glukozit	OH	H	OH	O-glc
Kamferol	OH	H	H	OH
Küersetin	OH	H	OH	OH

Basit fenoller ve fenolik bileşikler, tek bir fenolik halka içeren biyoaktif bileşikler olup sinnamik ve kafeik asitler bu gruptandır. Katekol ve piragallol ise hidroksillenmiş fenollerdir. Tablo 3'de bu çalışmada analiz edilen fenolik asitlerin formülleri verilmektedir.

Tablo 3. HPLC analizlerinde kullanılan fenolik asitler ve formülleri

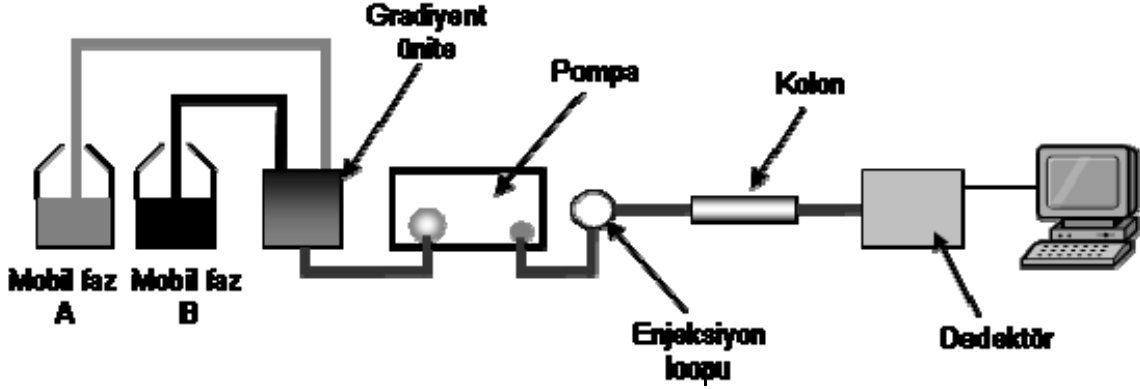
Fenolik Asidin İsmi	Formülü	Fenolik Asidin İsmi	Formülü
Gallik asit		<i>p</i> -Kumarik asit	
Protokateşik asit		Ferulik asit	
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit		<i>o</i> -Kumarik asit	
Vanillik asit		<i>trans</i> -Sinnamik asit	
Klorojenik asit		Kafeik asit	
Şiringik Asit		Propil Paraben	

1.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. Bu yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lu yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sıvı fazda çözünebilen bir kimyasalın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir yöntemdir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi (resolution parameter), analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve hareketli fazlar arasında istenilen etkileşim hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir (Tomruk, 2005),

1.11.1. HPLC Sistemleri

HPLC sistemi, Şekil 2'de de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır.



Şekil 2. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

1.11.2. Hareketli Faz

HPLC uygulamalarında hareketli faz (eluent) türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde birçok hareketli faz kullanılmasına rağmen, bunların bazı ortak özellikleri şunlardır:

- Yüksek derecede saflık
- Dedektör ile uyumluluk
- Düşük viskozite
- Örneği çözebilme
- Kimyasal acıdan inert olması
- Uygun fiyat

Her bir HPLC türünde kullanılan hareketli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücüler hareketli faz olarak kullanılır. Büyüklükçe ayırma kromatografisinde (Size-exclusion Chromatography, SEC) ise kullanılan çözücü polimer örneğini çözebilmeli ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir (Tomruk, 2005).

1.11.3. Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır 3–10 µm partikül boyutu

- ❖ Olabildiğince eşboyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı
- ❖ 70–300 Å gözenek boyutu
- ❖ 50–250 m²/g yüzey alanı

Yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C8, C18, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da katyon (-COO-) değiştirici yapıda olabilir (Tomruk, 2005).

1.11.4. Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve hareketli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da artırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Kararlı akış hızı pompalarda aranan bir özelliktir. Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- 0.01–10 ml/dk arasında akış hızı
- % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı. Bu akış hızı kararlılığı büyüklükçe ayırma kromatografisinde % 0,2'den az olmalıdır.
- 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değeri

1.11.5. Kolon

Tipik HPLC kolonları 10, 15, 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3, 5 veya 10 μm) ve iç çapı 4, 4.6 ya da 7.8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, hareketli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu HPLC kullanıcısına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir (Tomruk, 2005).

1.11.6. Dedektör

Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorpsiyonundan, floresans emisyonundan ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır.

Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190 nm'den 460–600 nm'ye kadar olan dalga boylarında örneğin analizinin yapılması mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometrik (mass-spectrometric, MS) dedektörler bulunmaktadır. RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI' ya göre daha hassas, ancak daha seçici dedektörlerdir. MS dedektörleri ise çok hassas, güçlü ancak pahalı ve karmaşık sistemlerdir.

İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek duyarlılık
- Hızlı tepki
- Düşük sinyal gürültüsü
- Minimum pik yayılması
- Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı
- Çalışma kolaylığı ve genişliği

1.11.7. Sinyal Gürültüsü ve Sapma

Sinyal gürültüsü, elektrik sinyalindeki düzensizlik, dedektör lambasındaki kararsızlık ve sıcaklıktaki değişimlerden dolayı, izlenen kromatogramın temel çizgisinde kısa zamanlı küçük piklerin oluşmasıdır. Bu pikler özellikle eser miktar analizi yapılıyorsa örneğin verdiği pikler ile karıştırılmamalıdır. Dedektör sinyalindeki düzensizlik de aynı zamanda temel çizgide sapmaya neden olur. Bu nedenle hareketli faz, dedektör yukarıdaki etkilerden kaynaklanan sinyalleri vermeyene kadar kolondan geçirilmeye devam edilir. Diğer bir değişle analizde kullanılacak hareketli faz, kolondan geçirilerek temel çizginin oturtulması sağlanır. Böylece analiz sırasında yalnızca örnekten kaynaklanan sinyaller bilgisayara iletilir (Tomruk, 2005).

1.11.8. HPLC Türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma prosesine göre yapılırsa, HPLC dört farklı türde incelenebilir.

- Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), hareketli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

- Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):

Normal faz kromatografisinin tam tersidir. Sabit faz apolar (hidrofobik), hareketli faz ise su ve asetonitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar.

- Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):

Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler molekül büyüklüklerine göre kolondan filtre edilirler. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller

partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntemde jel geçirgenlik Kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

- İyon Değişim kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şeklinde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Mobil faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik şiddet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır. HPLC’de kullanılan hareketli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar.

İki farklı elusyon tipi vardır:

- İzokratik Elusyon: Kolona sabit bileşimdeki hareketli faz pompalanır. Hareketli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elusyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elusyon türü ile gerçekleşir.
- Gradient Elusyonu: Hareketli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki eluentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır (Tomruk, 2005).

1.11.9. HPLC Kullanım Alanları

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım amaçları kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

Kimyasal Ayırma: HPLC’de kimyasal ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan kimyasal ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.

Saflaştırma: Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar

belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir, bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresi herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.

Tanımlama: Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir.

Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metot kullanılmalıdır.

Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur.

1.11.10. Alıkonma Parametreleri

Kromatografik alıkonmayı öğrenmenin en kolay yolu, örneğin kolona enjekte edildiği noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşiğin dedektörde verdiği maksimum cevap arasındaki zamanı ölçmektir. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time, tR) denir. Alıkonma zamanı hareketli faz akış hızı ile ters orantılıdır. Diğeri bir parametre alıkonma hacmidir (VR). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan eluent miktarıdır. Alıkonma süresi ve hareketli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağlı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağlıdır (Tomruk, 2005).

1.11.11. Bant Genişliği

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliği, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayırışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliği kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

1. Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait molekül veya iyonların farklı yollar izlemesi: Bu parametre hareketli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.

2. Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa, hareketli fazdaki örnek sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir. Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.

3. Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örnek konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örnek kolon merkezinden dışarıya doğru difüzlenir. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek örneğin kolonda daha az zaman harcamasına neden olur bu da difüzyonunun artması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürülmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup, gallik asit (GA), protokateşinik asit (protoCA), *p*-hidroksi benzoik asit (*p*-hydBA), vanillik asit (VA), kaffeik asit (CA), klorogenik asit (ChA), şiringik asit (SA), *p*-kumarik asit (*p*-COU), ferulik asit (FA), *o*-kumarik asit(*o*-COU), *trans*-sinnamik asit (*trans*-CIN), propylparaben iç standart (IS), metanol, asetik asit, formik asit, hegzan, neokuproine Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve Trolox[®] (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit) Applichem (Darmstadt, Germany) firmasından, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu's phenol reaktifi ve 2,4,6-tri (2-*pridil*)-S-triazin (TPTZ) Fluka Chemie GmbH (Switzerland) dan Sodium asetate, ferrik klorür, glasiyal asetik asit Merck (Darmstadt, Germany). Amberlite XAD-2 reçine (Bellefonte, PA, USA)'dan satın alınmıştır.

HPLC analizlerinde 600 E HPLC pompası, 717 plus otosampler ve 996 photodiode array dedektörle (PAD) içeren bir HPLC sistemi ile Millennium 32 veri işlemcisi (Waters Corp. Massachusetts, USA) kullanıldı. HPLC analizleri Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde yapılmıştır.

2.2. Örneklerin Toplanması

Kestane bal ve propolis örnekleri Mayıs 2007 de Zonguldak bölgesi bal üreticisinden temin edilmiştir. Numune toplamak için daha önce işbirliği içinde olduğumuz ve Zonguldak İli Arı Yetiştiricileri Birliği başkanı Sayın Selahattin GÜNEY tarafından temin edilmiştir. Propolis örnekleri kovanların iki ayrı yerinden toplandı. Birinci propolis numunesi 3–4 kovandan ve kovanın giriş kısmına ait olup diğeri ise kovanların iç kısımlarından kazınarak elde edildi. Kovan girişine ait olan propolis (Pr1) ve kovan içinden kazınarak elde edilen

propolis ise (Pr2) olarak adlandırıldı. Bal örnekleri ise üç ayrı kovandan elde edildi ve H1, H2 ve H3 olarak kodlandılar. Numuneler analiz edilene kadar buzdolabında muhafaza edildi.

2.3. HPLC Analizleri

2.3.1. HPLC Analizleri İçin Örneklerin Hazırlanması

Bal örneklerinden flavonoid ekstraksiyonu daha önceden uygulanmış metotlara göre yapıldı (Martos ve ark, 1997; Martos ve ark, 2000). Bal örnekleri (her birinden 100 g) 5 keredede pH 2.0 olan 500 ml su ile tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Katı partiküllerin uzaklaştırılması için süzüldü. Süzüntüye 150 g Amberlit XAD-2 reçinesi eklendi ve 10 dakika karıştırıldı. Bu esnada fenolik bileşiklerin % 80 'i Amberlit tarafından emildi. Amberlit cam kolona yerleştirildi (42x3.2 cm) ve önce 100 ml su (pH 2.0) ile yıkandı ve 400 ml su ile durulandı. Böylece bütün şekerler ve polar bileşenler uzaklaştırıldı. Kolonda tutulan Fenolik bileşikler 400 ml metanolle yıkanarak kolondan alındı. Metanol evaporatörde 40°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 5 ml distile su ile çözüldü ve 3 defa 5 ml dietileterle ekstraksiyon yapıldı. Birleştirilen dietileter çözeltileri azot atmosferinde kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 0.5 ml HPLC grade metonelde çözüldü ve 0.45 µm'lik filtreden süzülerek HPLC'de analiz edildi.

Propolis numuneleri ise etanolik ve metanolik olmak üzere iki ayrı çözücü ile ekstrakte edildi ve rotary evaporatörü ile çözücü uçurularak elde edilen ekstraktlar HPLC ile fenolik asit analizi için saklandı.

2.3.2. HPLC ile Fenolik Asitlerin Analizi

HPLC analizlerinde Öztürk vd., (2007)'nin metodu modifiye edilerek kullanıldı. Hareketli faz olarak su: formik asit: metanol karışımı kullanıldı ve analizler ikili çözücü sistemiyle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi. Kullanılan hareketli faz içerikleri şöyledir: A; metanol: su: formik asit (10:88:2 v/v), B; metanol: su: formik asit (90:8:2 v/v).

Ayrımlar bir ters faz kolonu olan C18 (LiChoCART RP-18, 10 cm x 4.6 mm iç çap, 3 µm partikül büyüklüğü) kolonu ile yapıldı. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak kullanıldı. Standart fenolik asitler metanol: su (50: 50 v/v) çözücü karışımında hazırlandı. Analizlerde tekrar edilebilirliği artırmak amacıyla iç standart (IS) tekniği kullanıldı ve kullanılan iç standart propil Paraben kullanıldı. Sinyaller 280 nm'de izlendi.

2.4. Antioksidan Testler

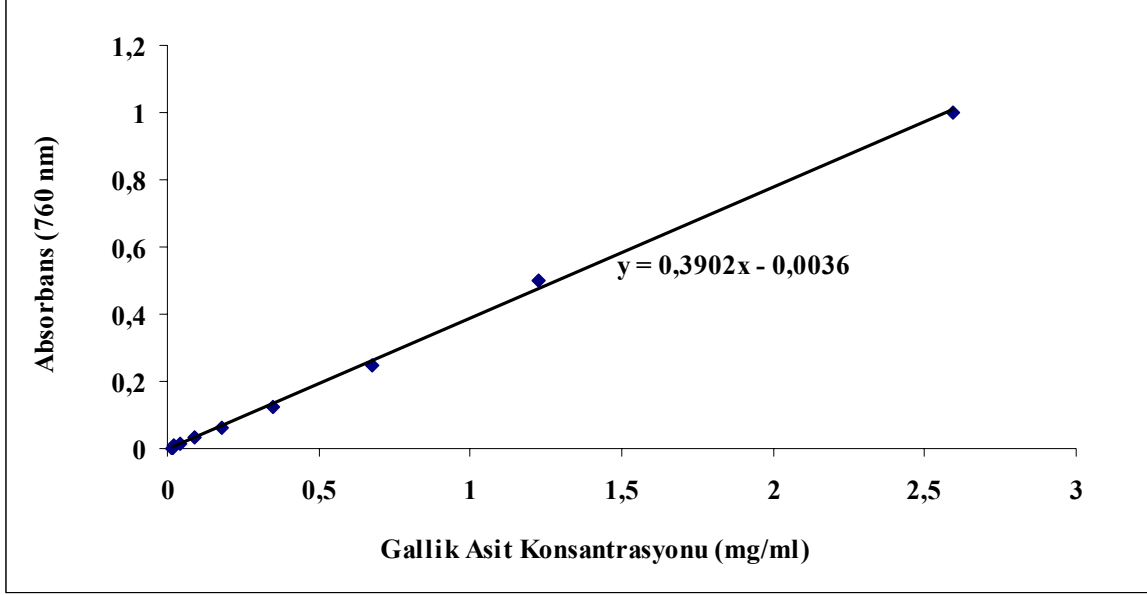
2.4.1. Toplam Polifenol Tayini

Toplam fenolik madde tayini suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 760 nm absorbans verir. Standart garfiğin hazırlanmasında bir fenolik madde olan gallik asit standardı kullanıldı (Slinkard vd., 1977). Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0.0195–0.625 mg/mL) hazırlandı. 760 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans (Şekil 3) konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 0.3902x - 0.0036$ olarak tespit edildi Standart grafiğe göre bal ve propolis ekstraktlarındaki toplam fenolik madde mg polifenol/g bal (propolis) olarak hesaplandı.

Hazırlanan metanolik ve sulu bal ve etanolik propolis ekstraktlarında gerekli olan seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bal veya propolisin içerdiği mg cinsinden polifenol miktarı, 760 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlendi.

Çözülmüş olan fenolik bileşikler folin reaktifi ile alkali ortamda mor menekşe kompleks oluşturur ve bu renkli kompleks 760 nm absorbans verir. Standart fenolik bileşik olarak gallik

asit kullanıldı. Standart grafiğe göre bal ve propolis ekstraktlarındaki toplam fenolik madde mg polifenol/g bal (propolis) olarak hesaplandı (Slinkard, 1977).



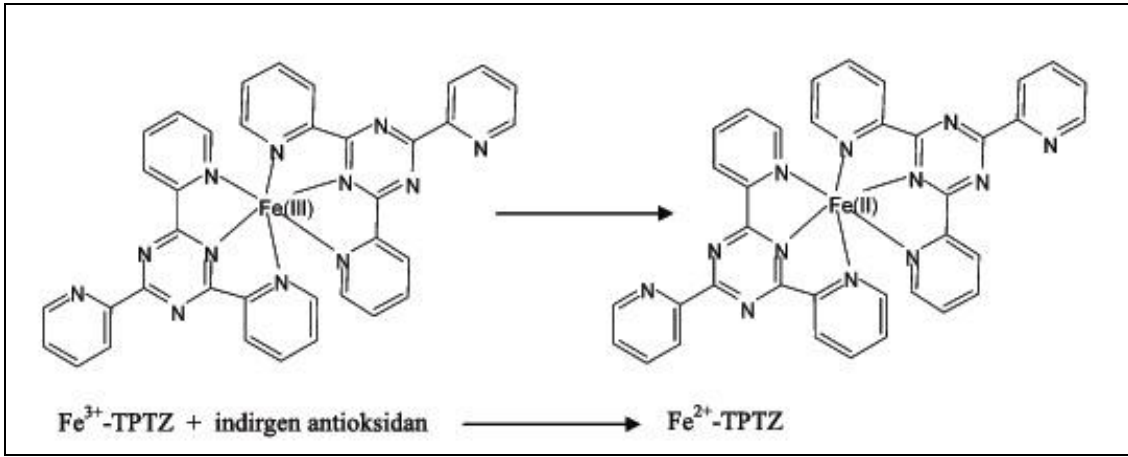
Şekil 3. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan Standart çalışma grafiği

2.4.2 DPPH Tayini

DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik olarak üretilen ticari bir radikaldir. Deneylede (Yu vd., 2002) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı. 750 µL değişen konsantrasyonlardaki ekstraktlar ve 750 µL 50 µM etanolik DPPH çözeltilisine eklendi ve 517 nm'de absorbans ölçüldü. Sonuçları karşılaştırmak amacıyla sentetik antioksidanlar olarak BHT ve Troloks® doğal antioksidan olarak ise kateşin ve kuersetin kullanıldı. 517 nm'deki absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir ve % 50 DPPH miktarını scavenge (temizleyen) eden madde miktarı (SC50) belirlendi. SC50 değeri ne kadar düşük ise DPPH temizleme değeri o kadar yüksektir.

2.4.3. Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) Tayini

Metodun prensibi ferrik 2,4,6-tripiryridyl-s-triazin kompleksinin (Fe^{+3} -TPTZ) antioksidanların varlığında renkli (mavi) ferrous formuna (Fe^{+2} -TPTZ) indirgenmesi (Şekil 4) esasına dayanır (Benzie ve Strain, 1999). Bu renkli kompleks 593 nm'de maksimum absorbands verir.



Şekil 4. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

Kalibrasyon için Troloks[®]'un değişen konsantrasyonları (100–1000 μM) kullanılır. Bu amaçla 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl_3 (10: 1: 1)] ile 100 μL numune karıştırılır ve 4 dakika sonra 593 nm'de absorbands okundu.

Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart Troloks[®]'la karşılaştırmalı olarak bulunur. Sonuçlar 1000 μM Troloks[®] eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (TEAP).

FRAP değeri : $\Delta A_{593 \text{ nm}} \text{ test numunesi} / A_{593 \text{ nm}} \text{ standart} \times \text{Standartın FRAP değeri (1000 } \mu\text{M)}$

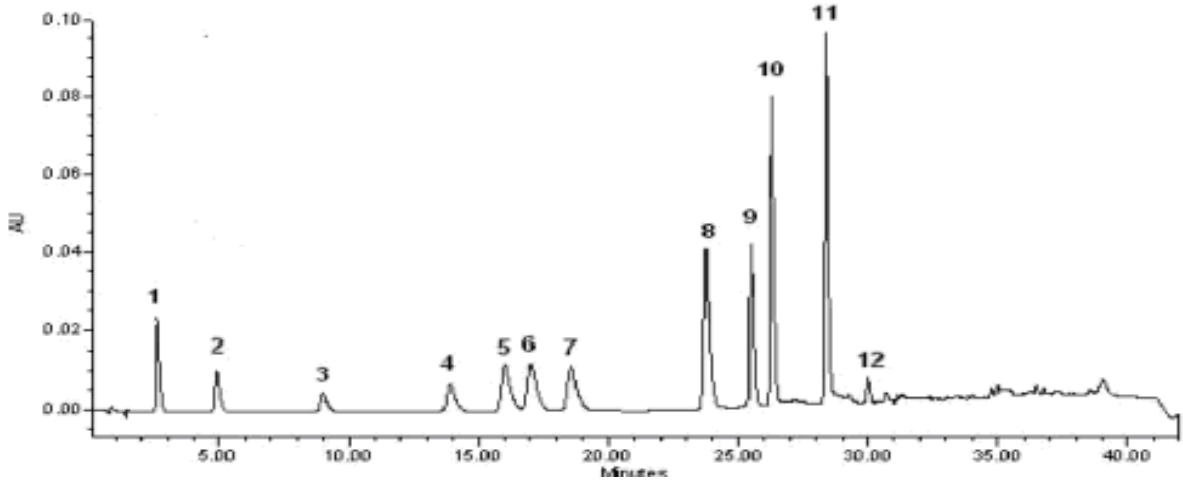
2.4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Metod; bakır(II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözültisi ilave edilmesi sonucunda bakır(I)-neokuproin'e indirgenmesi esasına dayanır ve sonuçlar içinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorban değerlerinin ölçülmesiyle elde edilir (Apak vd., 2004). Elde edilen test sonuçları Troloks[®] eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden verilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. HPLC ile Fenolik Asit Analizleri

HPLC analizinde ayırmalar bir ters faz kolonu olan LiChoCART RP-18 ile yapıldı. Şekil 5 de fenolik asit standartlarının HPLC ile optimizasyonu gösterilmektedir. HPLC' ye enjekte edilen örnek ekstraktları için 280 nm kromatogramlar incelendi. Çoğu fenolik asitler bu dalga boyunda maksimum UV absorbans yaparlar (Öztürk, 2007). Fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı. HPLC de iç standart olarak propilparaben eklenerek yapılan çalışmada 11 adet fenolik asit standardı kullanıldı. Kestane bal ve propolisinde fenolik asit dağılımı Tablo 4'de verilmektedir. Kovanların iki farklı bölümünden alınan propolis örneklerinden metanolik ve etanolik olmak üzere iki ayrı ekstrakt hazırlanarak HPLC ile fenolik asit bileşimine bakıldı. Fenolik asit dağılımları her iki ekstraktta da gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit ve vanillik asit yönünden fakir fakat kafeik, şiringik, ferulik, o-kumarik, p-kumarik ve *trans*-sinnamik asit yönünden zengin olduğu bulundu. Etanolik propolis numunelerinin fenolik asit içeriklerinin metanolik ekstraktlara göre daha yüksek olduğu bulundu. Aynı yöreye ait üç ayrı kestane bal numunelerinin sulu ekstraktlarının fenolik asit içeriklerinin hemen hemen aynı türden olduğu fakat bileşimleri arasındaki dağılımın farklı olduğu bulundu.



Şekil 5. Bazı fenolik asitlerin optimum HPLC şartlarının belirlenmesi. 1: Gallik asit 2: protokatekuik asit, 3: p-hidroksi benzoik asit, 4: klorojenik asit, 5: vanillik asit, 6: kafeik asit, 7: şiringik asit, 8:ferulik asit, 9: o-kumaric asit, 10: p-kumarik asit, 11: trans-sinnamic asit, 12: propilparaben (iç standart)

İkincil metabolit ürün olarak bilinen fenolik asitler bitkilerin savunmasında önemli role sahip olup bitkilerin renk, koku ve tadından sorumlu moleküllerdir. Yapılan çalışmalarda fenolik asit içeriği yüksek olan ekstraktların yüksek antioksidan, antibakteriyal, anti-inflamatuar, antitumoral, antiviral özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Chitindingu, 2006; Kumazawa, 2004; Ahn, 2007; Marguele, 2006). Yapılan çalışma sonucu kestane bal ve propolis ekstraktlarının fenolik asit bileşimi bakımından zengin olduğu bulundu fakat etanolik propolis ekstraktları ile kovan girişlerinde toplanan propolislerin fenolik asit bakımından daha zengin olduğu tespit edildi.

Tablo 4. Kestane bal ve propolislerindeki fenolik asit dağılımları

Fenolik asit	H1 µg/g bal	H2 µg/g bal	H3 µg/g bal	Pr1M (Kovan önü) µg/g propolis	Pr2M (Kovan içi) µg/g propolis	Pr1E (Kovan önü) µg/g propolis	Pr2E (Kovan içi) µg/g propolis
GA	124.74	932.88	129.78	-	-	-	-
protoCA	-	-	-	-	-	-	-
p-hydBA	1514.73	-	2127.43	-	-	-	-
VA	2429.04	-	27375.60	-	-	-	-
CA	11092.05	250.70	509.73	1828.70	413.84	4235.38	4564.27
ChA	-	16424.28	23100.60	967.78	-	1601.19	1234.93
SA	758.5	285.13	409.10	-	-	-	-
p-COU	1519.15	1021.68	3653.02	340.60	476.72	6381.46	4089.87
FA	222.58	-	924.72	15276.39	280.19	7025.50	1558.88
o-COU	261.28	747.28	113.41	2159.07	310.72	2957.60	2041.17
Tr-CIN	-	-	548.43	1234.73	362.18	2456.86	1542.95

3.2. Antioksidan Aktivite Tayinleri

Kestane bal ve propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit standardına göre verdikleri reaksiyona göre tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 5 de verilmektedir. Balların Fenolik asit miktarı (2,57–2,79 mg/g numune) arasında ve propolis örneklerinin (313–476 mg/g numune) olarak değişim göstermektedir. Buna göre propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarları yaklaşık 100 kat yüksek olduğu bulundu. Ahh vd., (2007) ve Kumazawa vd., (2004) de yaptıkları çalışmada etanolik Avrupa ve Çin de üretilen propolis ekstraktlarının yaklaşık 200-300 mg/g numune olarak belirlemişler. Bu değer bizim bulduğumuz değerden daha düşüktür. Dolayısıyla kestane bal ve propolisnin polifenol yönünden diğer bal ve propolislere göre çok daha zengin olduğu görülmektedir. Nitekim kestane balında yapılan bilimsel araştırmalarda polifenolik bileşiklerin

diğer ballardan daha yüksek konsantrasyonda olduğu bildirilmektedir (Al-Mamary vd., 2002; Aljadi vd., 2004; Küçük vd., 2007).

Bitkiler sınırsız sayıda bileşik sentezleme yeteneğine sahiplerdir. Bu bileşiklerin bir kısmı, özellikle fenolik bileşikler, bitkinin savunmasından sorumlu olup, reaktif oksijen türlerini (SOR) temizleme yeteneğine sahiplerdir (Havsteen, 2002; Peterson ve Dwyer, 1998). Doğal  r nlerin toplam fenolik içeriği, örneğin bitkiler ve bal, polen, propolis, bir anlamda bitkinin toplam antioksidan kapasitesini göstermektedir.  nk  bu moleküllerin, SOR scaveng etme (süpürme) yetenekleri yanında, pek çok antioksidan mekanizmayı sağlama (quenching, chain-braking) yetenekleri olduğu artık aydınlatılmıştır (Huang, 2002; Rice-Evans, 1997). Bal ve propolisin antioksidan kapasitesinden sorumlu bileşiklerin başında fenolik maddeler gelmektedir. Dolayısıyla fenolik madde içeriği yüksek doğal ürünlerin antioksidan kapasiteleri de yüksek olduğu yine yapılan pek çok bilimsel çalışmada bildirilmektedir (Al-Mamary vd., 2002; Küçük vd., 2007; Kolayli vd., 2008)

Tablo 5 de kestane bal ve propolis numunelerinin dört ayrı yönteme göre çalışılmış antioksidan kapasitelerini gösteren test sonuçları verilmektedir. Sulu bal ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarları yaklaşık 2,27–2,81 mg/ g bal arasında değişim gösterdiği ve bu değerin metanolik bal ekstraktları hemen hemen aynı değerlere sahip olduğu bulundu. Etanolik propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerinin ballara göre 100 kat fazla bulundu. Ayrıca fenolik madde miktarları kovan girişlerinden toplanan propolis numunelerinde kovan i erilerinden toplananlarda çok daha yüksek olduğu tespit edildi.

Toplam antioksidan kapasiteyi gösteren pek çok metot bulunmaktadır. Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)  ok çalışılan ve kabul gören bir metot olarak bilinir (Huang, 2005) ve Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) son yıllarda kullanılmaya başlanılan Apak vd., (2004) tarafından geliştirilen bir metodudur. Yapılan çalışmada toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için her iki metodu da kullanmamızın sebebi hem birbirlerini desteklemeleri ve çalışmaların doğruluğundan emin olmaktır.

Tablo 5. Kestane bal ve propolislerinin antioksidan aktiviteleri

Numune adı	FRAP Standart 1000µMTrolox ekivalent/ g numune	DPPH SC ₅₀ mg/ml	CUPRAC (1000 µM Trolox ekivalent /mg numune	Toplam Polifenol	
				mg polifenol/g bal	mg polifenol /g propolis
H1 (sulu)	94.27 ± 0.91	5.7± 0,4	7.7 ± 0,4	2.79±0.09	-
H2 (sulu)	104.42 ± 1,0	9.05± 0,7	6.5 ± 0,4	2.57±0.087	-
H3 (sulu)	63.81 ± 0,6	9.97± 0,7	12.3 ± 0.11	2.27±0.07	-
H1(MeOH)	85.57 ± 0,8	8.99± 0,5	12.7± 1,3	2.81±0.039	-
H2(MeOH)	79.77 ± 0,8	10.15±1,0	10.3 ± 1,3	2.56±0.08	-
H3(MeOH)	75,41 ± 0,73	10,6	0,0129 ± 0,001	2,4 ± 0,13	-
PR1(EtOH) (Kovan içi)	327.76 ± 3,2	0.035±0.002	692 ± 108	-	313±9,5
PR2(EtOH) (Kovan girişi)	659.88 ± 6,4	0.015±0.001	1410 ± 120	-	476±4,8
Kateşin	-	0.0026±0.00 1	1998 ± 110	-	-
BHT	-	0.0015±0.00 1	1476 ± 95	-	-

H1: Kestane bal1, H2: kestane bal2, H3: Kestane bal3, Pr1:Kestane propolis1, PR2: Kestane propolis2 MeOH: Metanolik ekstrakt, TEOH: etanolik ekstrakt

Her iki yöntemde de yüksek FRAP veya CUPRAC değerleri (1000 mM Trolox eşdeğeri olarak) yüksek antioksidan kapasiteyi göstermektedir. Her iki metoda göre çalışılan numunelerde elde edilen sonuçlar arasında paralellik bulundu (Tablo 5). CUPRAC metoduna göre çalışılan testlerde propolis numunelerinin ballardan yaklaşık yüz kat yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca kovan girişinden toplanma propolis numunelerinin kovan içindeki numunelere göre yaklaşık iki kat yüksek aktiviteye sahip olduğu bulundu.

DPPH radikali temizleme testi, çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal temizleme yeteneğinin ölçülmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir metottur (Ahn vd., 2007).

DPPH stabil ve ticari olarak satın alınan bir radikal olup bir elektron veya hidrojen aldığıında (DPPH*) 517 nm de absorbans verir (Huang vd., 2005). DPPH* radikalının % 50 sini oluşumunu engelleyen madde miktarı SC_{50} olarak tanımlanır ve doğal ürünün (bal, propolis) SC_{50} miktarı arasında ters ilişki vardır. Metanolik ve sulu bal numuneleri arasında DPPH radikal temizleme yönünden anlamlı bir farklılık bulunmamışken, propolis numunelerin radikal temizleme yeteneği 100–1000 kat yüksek bulundu. Ayrıca kovan girişinden alınan propolisin DPPH temizleme yönünden diğer propolisten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu da bulundu. Bunun sebebi de yine kovan girişinde ki propolis örneğinin yüksek fenolik madde içeriğine sahip olmasından ileri gelmektedir. Arıcılık yönünden bakıldığında ise kovan girişinde bulunan propolisin kovanın sterilizasyonu vs gibi kovanın savunmasından sorumlu olduğu için bunun da yüksek fenolik madde konsantrasyonuna sahip olarak gerçekleştirdiğidir. Kovan aralarından kazınan propolis ise daha çok kovanın sıcaklığını ayarlamada etkili olduğu düşünülmektedir. Propolis örneklerinin DPPH radikal temizleme aktivitesinin çok yüksek olmasının sebebi, propolis örneklerindeki toplam fenolik madde miktarının çok yüksek olmasından ileri gelmektedir. Nitekim yapılan pek çok çalışmada DPPH temizleme yeteneği ile fenolik madde miktarı arasında pozitif ilişki olduğu bildirilmektedir (Huang vd, 2005; Gülçin vd., 2003; Chen vd.. 2000; Frankel vd. 1998).

4. SONUÇ

Kestane bal propolisinin toplam fenolik madde yönünden zengin olduğu fakat etanolik propolis ekstraktlarının baldan yaklaşık 100 kat yüksek fenolik madde içerdiği bulundu.

Kestane bal ve propolisinin ferulik, klorojenik ve kumarik asitlerce zengin olduğu, fakat kestane balının gallik, protokateşinik asit, p-hidroksibenzoik ve vanilik asit bakımından daha zengin olduğu belirlendi.

Kovanların iki farklı yerinden toplanan propolis örneklerinin toplam fenolik madde yönünden aralarında yaklaşık iki kat fark olduğu ve kovan girişinden toplanan propolisin toplam fenolik madde yönünden daha zengin olduğu tespit edildi.

Kestane bal ve propolisinin toplam antioksidan kapasiteleri ve serbest radikal temizleme aktivitelerinin toplam fenolik madde miktarlarına paralel olarak değişim gösterdiği, propolis ekstraktlarının bal ekstraktlarından yaklaşık 100 kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulundu.

Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesinde kullanılan iki ayrı demir (II) ve bakır(II) indirgenme testlerinin birbirleriyle paralel olduğu ve kestane bal ve propolis numunelerinin indirgen yapıya sahip olduğu, oksidan veya pro-oksidan etkiye sahip olmadığı tespit edildi.

Etanolik propolis ekstraktlarının, metanolik ekstraktlardan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulundu.

Kestane balının uçucu yağ bileşenlerinin asit hidrolizli ortamda elde edilen piklerinin ve bileşik sayısının daha fazla olduğu bulundu.

Sonuç olarak, kestane bal ve propolisi biyoaktif bileşiklerce zengin birer doğal ürün olup, içerdikleri fitokimyasal bileşiklerin oksidatif strese yol açan radikallik ajanların temizlenmesinde etkili olduğu ve buldukları gıda maddesine indirgen özellik kazandırdıkları ortaya çıkartıldı. Bu nedenle de yüksek antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahip, kanser, kardiovaskular bozukluklar gibi hastalıklardan korunmada etkili doğal ürünler olduğu bulundu.

5. KAYNAKLAR

- Ahn R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M, Zhu F. ve Nakayama, T., 2007. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China, Food Chemistry, 101, 1383-1392.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A. ve Al-Habori, M., 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types Of Honey, Nutrition Research, 22, 1041-1047.
- Americana 1993, USA, Vol 3 int Headqurtes Danbury Connetticult. 444
- Anonim 1990. Bal Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anklam, E., 1998. A Review of The Analytical Methods to Determine The Geographical and Botanical Origin of Honey, Food Chemistry, 63,4, 549-562.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52,7970–7981
- Awad, M.A. de Jager, A. 2003. Postharves Biology and Technology, 27, 53-58.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils- a Review, Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.
- Bast, A., Haenen, G,R,M,M. ve Doelman C,J,A., 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art, The American Journal of The Medical Sciences, 91, 3625-3635.
- Benzie, I.F. ve Szeto, Y.T., 1999. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing /Antioxidant Power Assay, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 633-636.
- Brackenbury, J., 1995. İncet and Flowers . UK . 12 s
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutrition Review, 56,11 317-333.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Ankara.
- Chemid, 1996. A Chemical Database Sponsored by The National Library of Medicine, Bethesda, ND.

- Cheeseman, K. H. ve Slater, T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry, British Medical Bulletin 49,3, 479-480.
- Cisarino, L., Pisati, A. ve Fasani, F., 1987. Contact Dermatitis From Propolis, Contact Dermatitis, 16, 110-111.
- Chitindingu, K., Ndhala, A.R., Chapano, C., Benhura, M.A. ve Muchuweti, M., 2007. Phenolic Compound Content, Profiles and Antioxidant Activities of *Amaranthus Hybridus* (*Pigwee*), *Brachiaria brizantha* (*Upright brachiaria*) and *Panicum Maximum* (*Guinea grass*), Journal of Food Biochemistry, 31, 206-216.
- Encyclopaedia, 1968. Grolier of Canada, USA, s 473
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. Oxygen Radicals and Singlet Oxygen, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon. 93-109.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. ve Cross, C.E., 1993. Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Where are We Now?, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119,6, 598-613.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L., 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53, 1841-1856.
- Hill, R., 1977. Propolis: The Natural Antibiotic, Thorsons Publish Ltd., Wellingborough, UK.
- Larson R. A., 1997. Naturally Occuring Antioxidants, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Lusby, P. E., Coombes, A. ve Wilkinson, J. M., 2002. Honey: A Potent Agent for Wound Healing?, Journal of Wound Care, 29,6, 295-300.
- Kolaylı, S. ve Keha E., 1999. A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities in Freshwater and Seawater Adapted Rainbow Trout, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13,6, 334-337.
- Kolayli, S., Kucuk M., Duran C., Candan F. ve Dinçer B., 2003. Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (*Cherry Laurel*) Fruit Grown in the Black Sea Region, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7489-7494.
- Kumawaza, H.T. ve Nakayama, T., 2004. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins, Food Chemistry, 84, 329-339.
- Mann, C.M. ve Markham, J.L., 1998. A New Method for Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils, Journal of Applied Microbiology, 84, 538-544.

- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer Disease, Free Radical Biology And Medicine, 23,1, 134-147.
- Marquele, F.D., Oliveira, A.R.M., Bonato, P.S., Lara, M. ve Fonseca, M.J.V., 2006. Propolis Extracts Release Evaluation from Topical Formulation by Chemiluminescence and HPLC, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 461-458.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. ve Tomas-Barberan, F. A., 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 2824-2829.
- Martos, I., Ferreres, F. ve Tomas-Barberan, F. A., 2000. Identification of Flavonoid Markers Fort he Botanical Origin of Eucalyptus Honeys from Australia, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 1498-1502.
- Martos, I., Ferreres, F., Yao, L. H., D'Arcy, B. R., Caffin, N. ve Tomas-Barberan, F. A., 2000. Flavonoids in Monospecific of Eucalyptus Honeys from Australia, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 4744-4748
- Mccord, J.M. ve Day, E.D., 1978. Superoxide- Depent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron EDTA complex, FEBS Letters, 86,1, 139-142.
- Orhan, F., Sekerel, B. E., Kocabas, C. N. Sackesen, C., Adalioğlu, G. ve Tuncer, A., 2003. Complementary and Alternative Medicine in Children with Asthma, Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 90, 611-615.
- Öztürk, N., Tuncel M. ve Tuncel N.B., 2007. Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 30, 587-596.
- Radovis, B. S. Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M. ve Anklam, E., 2001. Contribution of Dynamic Headspace GC-MS Analysis of Aroma Compounds to Authenticity Testing of Honey, Food Chemistry, 72, 511-520.
- Reiter, R.J., 1998. Oxidative Damage in the Central Nervous System: Protection by Melatonin. Progress in Neurobiology, 56, 359-384.
- Rice-Evans, C.A. ve Miller, N.J., 1997. Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, Trends Plant Science, 2,4, 152-159.
- Robin, C., Morel, O., Vettraino, A., Perlerou, C., Diamandis, S. ve Vannini, A., 2006. Genetic Variation in Susceptively to Phytophthora Cambivora in European Chestnut (*Castania sativa*), Forest Ecology and Management, 226, 199-207.

- Russell, J. M., Stephen, T. L., Dale, R. G., Kip, E. P. ve Lynn, F. J., 2007. Phytochemicals: The Good, the Bad and the Ugly, Phytochemistry, 68, 2973-2985.
- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Toroncoso, N., Vanella, A. ve Garbarino, J.A., 2004. Chilean Propolis: Antioxidant Activity and Antiproliferative Action in Human Tumor Cell Lines, Life Science, 76,5, 545-558
- Shahidi F., 1997. Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, Champaign.
- Simonian, N,A. ve Coyle, J,T., 1996. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases, Annual Review of Pharnacology and Toxicology, 36, 83-106.
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Southwell, I.A., Hayes, A.J., Markham, J. ve Leach, D.N., 1993. The Search for Optimally Bioactive Australian Tea Tree Oil, Acta Horticulturae 334, 256-265.
- Storz, G. ve Imlay, J., 1999. Oxidative Stres, Current Opinion in Microbiology, 2, 188-194.
- Temiz, A., 1999. Gıdalarda Mikrobiyal Gelişmeyi Etkileyen Faktörler (Gıda mikrobiyolojisi editörler Ünlütürk, A., Turantaş F., Acar J., Karapınar, M., Temiz, A., Aktuğ Gönül, Ş., Tunçel, G.), İzmir, 53-84 s.
- Tomruk, E., 2005. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi için Hidrofilik Destek Materyal_Sentez ve Kromatografik Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Weiss, S,J., 1986. Oxygen, Ischemia and Inflammation, Acta Physiol Scand, 548,9-13.
- White, J.W., 1979. Composition of Honey. In: Crane. E. (Ed.) *Honey: A Comprehensive Survey*. Heinemann, London, pp. 157-158.
- Wollgast, J. ve Anklam, E., 2000. Review on Polphemols in Theobroma Cacao, Changes in Composition During the Manufacture of Choconate and Methodology for İdentication and Quantification, Food Research International, 33, 423-447.
- Vogt, J., Fonti, P., Conedera, M. ve Schroder, B., 2006. Temporal and Spatial Dynamic of Stool Uprooting in Abandoned Chestnut Copice Forests, Forest Ecology and Management, 235, 88-95.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. ve Qian M. 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1619-1624.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Gaziantep'te doğdu. 1999 yılında Gaziantep'te Bahattin Bayraktar Lisesinden mezun oldu. 2001 yılında KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2006 yılında bu bölümden Kimyager unvanıyla mezun oldu. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde Yüksek Lisans Programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.