

PROPOLİSTE STANDARDİZASYON MÜMKÜN MÜ?

Standardization of Propolis, is it Possible?

Merve KESKİN, Sevgi KOLAYLI

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye
Yazışma Yazarı / Corresponding author: merveozdemirkeskin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 18.08.2018 Kabul tarihi / Accepted: 15.10.2018

DOI:

ÖZ

Propolis kompleks yapıya sahip reçinems bir karışımdır. Bileşimi, toplandığı bölgenin florası, toplanma biçimi ve zamanı, arı ırkı gibi birçok değişkene bağlı olduğu için ham propolisin standardize edilmesi oldukça zordur. Ancak, değişik çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraktlarının standardize edilmesi daha mümkündür. Yapılan bu çalışmada Anadolu'nun 13 farklı ilinden toplanan propolis örnekleri ile hazırlanan etanol ekstraktlarının temel bileşenleri araştırıldı. Ekstraktların, mum, balsam, toplam polifenolik madde miktarı (TFM), toplam flavanoid madde miktarı (TFIM), toplam tanen madde miktarı (TTM) ve fenolik madde içeriği temel parametreler olarak ölçüldü. Elde edilen değerler, çalışılan tüm parametrelerin propolisin toplandığı bölge florasına göre değiştiğini ancak, propolis ekstraktlarının standardizasyonu için toplam polifenolik madde miktarı, toplam flavanoid madde miktarı ve toplam tanen madde miktarının önemli kriterler olduğunu gösterdi. Ayrıca Anadolu propolisi ile hazırlanan ekstraktların tanımlanmasında kalitatif olarak kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit gibi fenolik asitlerin önemli kriterler olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, propolis ekstraktlarında tam bir standardizasyonun mümkün olamayacağı, ancak etanolik propolis ekstraktlarının standardizasyonu açısından TFM ve TFIM miktarlarının en önemli kriterler olduğu söylenebilir. Ayrıca Anadolu propolisi ile hazırlanan etanol ekstraktlarının kafeik asit, ferulik asit, luteolin, *t*-sinnamik asit, *p*-kumarik asit yada türevlerini içermesi gerektiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Standardizasyon, Polifenoller, Flavanoidler, Balsam, Mum

ABSTRACT

Propolis is a resinous product with a complex structure. Standardization of raw propolis is almost difficult because the composition of raw propolis depends on many factors such as flora of the area, harvesting season, collection style and bee strain. However standardization of propolis extract prepared with ethanol rather than raw propolis could be achievable. In this study, basic components of ethanol extract prepared with propolis samples collected from 13 different localities of Anatolia were investigated. Basic parameters such as wax, balsam, total polyphenol, flavonoid and tannin content of extracts were determined. Phenolic composition of the extracts was also identified by using HPLC-UV with fourteen standard phenolic compounds. Results showed that all parameters were found to differ in terms of the flora of the area propolis collected but total polyphenol, flavonoid and tannin content were found to be important criteria for the standardization of propolis extracts. Moreover, phenolic acids like caffeic acid, *p*-coumaric acid and ferulic acid were determined as characteristic compounds for qualitatively describing ethanol extracts prepared by using Anatolian propolis. As a result it can be concluded that although absolute standardization of propolis extract is not possible nevertheless total polyphenol and flavonoid contents are important criteria in terms of

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

standardization of propolis ethanol extracts. Besides ethanol extracts prepared with Anatolian propolis should contain caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, *t*-cinnamic acid and luteolin or their derivatives.

Key words: Propolis, Standardization, Polyphenols, Flavonoids, Balsam, Wax

EXTENDED ABSTRACT

Propolis is a resinous product with a complex structure. Standardization of raw propolis is almost difficult because the composition of raw propolis depends on many factors such as flora of the area, harvesting season, collection style and bee strain. However standardization of propolis extract prepared with ethanol rather than raw propolis could be achievable. In this study, raw propolis samples were collected from 13 different city in Anatolia and their ethanol extracts were prepared by using 1:10 ratio (g/v). Basic parameters such as wax, balsam, total polyphenol, flavonoid and tannin content of extracts were determined. Total polyphenol content was determined by using Folin-Ciocalteu method, Gallic acid as standard. Results were expressed as mg Gallic acid equivalents per g of sample. Total flavonoid content was determined by using AlCl₃ colorimetric method, quercetin as standard.

Results were expressed as mg quercetin equivalents per g of sample. Condensed tannin content was determined by using Vanillin-HCl method, Catechin as standard. Results were expressed as mg of catechin equivalents per g sample. Phenolic composition of the extracts were also identified by using HPLC-UV with fourteen standard phenolic compounds as Gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxyl benzoic acid, catechin, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, rutin, daidzein, *t*-cinnamic acid and luteolin.

Statistical analyses and correlation between three parameters as balsam, total polyphenol content and total flavonoid content were carried out by using Microsoft excel program. Results showed that all parameters were found to differ in terms of the flora of the area propolis collected. Wax content of the samples was found to change between 1.40% (lowest) to 9.80% (highest). Balsam content of the samples was found to differ in the range of 23.60% to 71.10%. Total polyphenol and flavonoid content of raw propolis samples was determined in between 16.13 to 178.34 mg GAE/g and 1.24 to 51.23 mg QE/g respectively. Condensed tannin content of samples was determined in the range of 2.53 to 8.47 mg CatE/g. It was determined from the HPLC-UV analyses that all of the samples contained caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, *t*-cinnamic acid and luteolin.

Total polyphenol, flavonoid and tannin content were found to be important criteria for the standardization of propolis extracts. Moreover, phenolic acids like caffeic acid, *p*-coumaric acid and ferulic acid were determined as characteristic compounds for qualitatively describing ethanol extracts prepared by using Anatolian propolis. As a result it can be concluded that although exact standardization of propolis extract is not possible nevertheless total polyphenol and flavonoid contents are important criteria in terms of standardization of propolis ethanol extracts. Besides ethanol extracts prepared with Anatolian propolis should contain caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, *t*-cinnamic acid and luteolin or their derivatives.

GİRİŞ

Propolis, bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk gibi kısımlarından işçi arılar tarafından toplanan reçinemi bir madde olup, kovanların her türlü tehlikeye karşı korunmasında rol oynayan doğal bir karışımdır. İnsanoğlu propolisten eski çağlardan günümüze kadar pek çok alanda yararlanmış olup, mumyalamadan enfeksiyon hastalıklarının tedavisine kadar pek çok alanda kullanılmıştır (Ahn ve ark.,

2007; Li ve ark., 2008; Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013). Günümüzde ise daha çok destekleyici ve fonksiyonel bir gıda olarak kullanılan propolis, içerdiği çeşitli uçucu yağlar ve polifenollerden dolayı yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitümöral özellikler sergilemektedir.

Propolisin üretim miktarı, fiziksel, kimyasal ve biyolojik aktif özellikleri elde edildiği coğrafi bölgenin floral özellikleri, toplanma biçimi ve toplanma

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

zamanı gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Neto ve ark., 2017; Silva ve ark., 2015, Usman ve ark., 2016; Popova ve ark., 2017). Propolis üretiminin koloni başına yaklaşık 10 g ile 300 g arasında değişiklik gösterdiği ve bu durumun arı cinsi, iklim şartları, orman florası ve toplama biçimine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Neto ve ark., 2017; Usman ve ark., 2016; Popova, ve ark., 2017).

Yıllık propolis tüketimi tam olarak bilinmemekle birlikte dünya genelinde propolis tüketiminin yaklaşık 700-800 ton olduğu tahmin edilmektedir. Propolisin önemi anlaşıldıkça üretimi de artmaktadır. Türkiye zengin bitki florası ile önemli derecede propolis üretebilen potansiyeline sahip bir coğrafik konumda olup, propolisin değeri yeterince bilinmediği için yeterli derecede propolis üretimi yapılamamaktadır. Ancak son zamanlarda, arıcıların bilinçlenmesi ve arıcılık üretim tekniklerinin gelişmesine bağlı olarak, ülkemiz arıcılarının başta propolis olmak üzere, bal dışı arı ürünlerini üretim potansiyelleri artış göstermektedir.

Propolis, oldukça kompleks yapıya sahip bir doğal ürün olup, yapısında bulunan bileşenlerin kalitatif ve kantitatif oranları hem toplandığı bitki florasına ve hem de kovanların ihtiyacına göre değişim göstermektedir. Yalıtım, izolasyon ihtiyacı bulunan bir kovanda balmumu, vaks oranı yüksek propolis bulunurken, hijyen ve hastalık durumuna karşı korunmada balsam oranı yüksek propolisler bulunabilir. Ayrıca kovan cidarlarında toplanan propolisler ile tuzaklardan toplanan propolislerin bileşimleri de farklılık göstermektedir (Sarıkaya ve ark., 2009). Bu güne kadar yapılan çalışmalar, propolis ekstraktlarına yoğunlaşmıştır ve bu ekstraktlarda doğal olarak bulunan birbirinden farklı 300 civarında farklı bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin büyük bir kısmını uçucu yağlar (terpenler, terpenoidler, yağ asitler vs.) ile polifenolik (fenolik asitler, flavanoidler, kalkanlar, stilbenler) maddeler oluşturmaktadır. Ayrıca propoliste prenilenmiş p- kumarik asitler ve asetogeneren lignanlar, di ve tri terpenler, şekerler, şeker alkoller, hidrokarbonlar ve mineral elementler de bulunmaktadır (Talla ve ark., 2014; Saral, 2018).

Propolis ham olarak tüketilmesi önerilmediğinden, tüketicilere ekstraktları halinde hazır ticari ürünler olarak damlalar, spreiler, haplar ve drajeler ile çeşitli kapsüller şeklinde sunulmaktadır. Ancak tüketici bazında bunların hangi dozlarda kullanılacağı konusunda kuşku vardır. Bu noktada en önemli iki sorun kullanılan çözücülerin kaynağı ve güvenliği ile günlük kullanılacak konsantrasyonların (doz) ne düzeyde olacağı konusundadır. Bunun için kodekslerde propolis standardının oluşturulması ivedilik gerektirmektedir. Çözücü türü ile birlikte ekstraktlardaki fenolik bileşenlerin toplam madde miktarlarının bilinmesi bu kuşku bir miktar önleyecektir. Dolayısı ile propolis ekstraktlarında standardizasyon çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

Propoliste ilk standardizasyon çalışması 1970'li yıllarda başlamıştır. Bu çalışmalarda iyot testi, sabunlaşma testi, asit sayısı ve potasyum permanganat renk giderim testi gibi basit test parametreleri belirlenmiştir. Bu testlerin sonuçları ile propolisin bileşimi ve biyolojik aktivitesi arasında son derece zayıf bir ilişki vardır (Bankova, 1987). Günümüzde propoliste standardizasyon çalışmaları devam etmektedir. Bu nedenle, yapılan bu çalışma ile propolis de standardizasyon için kullanılması gereken parametrelerin neler olduğunun belirlenmesi amaçlandı. Propolisin toplanma şekli, bölgesel değişimleri gibi faktörler dikkate alınmadan toplam fenolik madde miktarları ile fenolik profilleri araştırıldı. Çalışma bulgularının ülkemiz propolis ekstraktlarının standardizasyonuna katkı sağlaması da amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Türkiye'nin değişik bölgelerinde bulunan arıcılardan (Bilecik, Kayseri, İstanbul, Rize, Kars, Sivas, Kırklareli, Zonguldak, Balıkesir, Ağrı, Yığılca, Siirt (Bittim), Ardahan ham propolis örnekleri (2016 ve 2017 yılı örnekleri) temin edildi (Tablo 1). Kullanılmayan örnekler +4 C'de buzdolabında saklandı.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1: Örneklerin temin edildiği iller, flora ve koordinat bilgileri

Table 1. Locality of the samples, flora of the areas and coordinates

İl	Bitki Florası	Koordinatlar (Enlem-Boylam)
Kayseri	Karaçam, kızılçam, köknar, ladin ve meşe	39,6533 X 37,8903
Beykoz	Orman ve fundalık, meşe ve karaçam	41,0082 X 28,9784
Bilecik	Karaçam, kızılçam, sarıçam, köknar, kayın, meşe ve kestane	40,1426 X 29,9793
Sivas	Orman ve fundalık, meşe ve karaçam	39,7505 X 37,0150
Balıkesir	Karaçam, kızılçam, köknar, ladin ve meşe	39,6533 X 27,8903
Demirköy	Meşe ormanları	41,7355 X 27,2245
Zonguldak	Köknar, karaçam, kayın ve meşe	41,4535 X 31,7894
Hemşin	Orman ve fundalık, karaçam	41,0255 X 40,5175
Kars	Çayır ve mera; çam ve meşe	40,6013 X 43,0975
Siirt	Çalı ve meşe	37,9274 X 41,9420
Yığılca	Gürgen, kayın, kestane ve meşe	40,8387 X 31,1626
Ardahan	Çam ormanları	41,1130 X 42,7023
Ağrı	Bozkır	39,7191 X 43,0506

Propolis Ekstraktının Hazırlanması

Dondurulan ham propolis örneklerinden belirli bir miktar tartıldı, güçlü bir öğütücüde öğütüldü ve yüzey alanı artırıldı. Ekstraksiyon işlemi 1:10 oranında propolis/çözücü oranına göre hazırlandı. Yaklaşık 3 g toz örneğe %98'lik etil alkol ilave edildi ve elde edilen karışım 24 saat boyunca sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen karışım Wattman 1 süzgeç kâğıdından süzüldü. Elde edilen çözeltinin hacmi mutlak etanol ile 30 mL'ye tamamlandı ve buzdolabında +4°C'de saklandı.

Kuru Madde Miktarı Tayini (%)

Kuru madde miktarı (%) Wosky ve Salantino (1997)'nin belirttiği metoda göre yapıldı. Bu amaçla sabit tartıma gelmiş tartım kapları ile 10 g ham propolis örneği tartıldı. 105°C' de 5 saat boyunca kurutuldu. 5 saatin sonunda numuneler desikatöre alındı ve soğumasının ardından tartıldı. İlk tartım ve son tartım arasındaki farktan yola çıkılarak % kuru madde miktarı hesaplandı.

Balsam Miktarı Tayini (%)

Balsam miktarı tayini etil alkol ekstraksiyon yöntemine göre yapıldı (Popova ve ark., 2017). Bu

amaçla sabit tartıma gelmiş evaporatör balonu tartılarak ağırlığı tayin edildi (boş tartım). Daha sonra balona 2 mL propolis ekstraktı ilave edildi ve etil alkol evapore edildi. Evaporasyondan sonra sabit tartıma getirilen balonun ağırlığı belirlendi (dolu tartım). Dolu ve boş kapların tartımı arasındaki fark üzerinden % balsam değeri hesaplandı.

Mum Değeri Tayini (%)

Ham propolis vaks değeri Feas ve ark., (2014)'nin belirttiği metotta bazı değişiklikler yapılarak belirlendi. Bu amaçla derin dondurucuda bekletilen ham propolis örnekleri havanda öğütülerek yüzey alanları artırıldı. Daha sonra her bir örnekten ortalama 3 g ayrı ayrı tartıldı ve üzerlerine 15 mL mutlak metanol ilave edildi. Elde edilen karışım sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat çalkalandı. Daha sonra karışım derin dondurucuda (-18°C) bir gece boyunca bekletildi. Elde edilen çözelti sabit tartıma getirilmiş ve darası alınmış süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Süzgeç kâğıdında kalan mum miktarı tartılarak belirlendi. Son tartım ile ilk tartım arasındaki fark üzerinden % vaks (mum) değeri hesaplandı.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Folin metodu kullanılarak propolis ekstraktlarının toplam polifenol miktarı belirlendi (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton ve ark., 1999). Gallik asit (GA) standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği hazırlandı ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g propolis olarak ifade edildi.

Toplam Flavanoid Tayini

Toplam flavonoid madde miktarı tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda kuersetin (KE) standardı kullanıldı ve toplam flavanoid miktarı kuersetin eşdeğeri cinsinden mg KE/g propolis olarak ifade edildi.

Kondanse Tanen Miktarı Tayini

Kondanse tanen miktarı tayini Julkunen-Tiitto (1985)'nin belirttiği metoda göre yapıldı. Örneklerin kondanse tanen madde miktarı kateşin eş değeri cinsinden mg KatE/g propolis olarak ifade edildi.

HPLC-UV Analizi

Fenolik bileşen analizi 14 adet fenolik standart kullanılarak HPLC-UV ile analiz edildi. Kalibrasyonu daha önce Çakır ve ark., (2018)'nin valide edilen metot referans alınarak yapıldı.

İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen deneysel verilerin istatistiksel hesaplamaları Microsoft excel programı kullanılarak yapıldı. Tablo 2'de standart sapma değerleri $p < 0.01$ olduğu için standart sapma değerleri verilmemiştir.

BULGULAR

Kuru Madde Miktarı Tayini

Kuru madde miktarı nem miktarı ile orantılıdır. Yapılan analiz ile birlikte Türkiye propolislerinin nem miktarı belirlendi. Türkiye propolislerinin % kuru madde miktarının %88,42 ile %98,86 aralığında değiştiği belirlendi. Elde edilen verilere göre Anadolu propolislerinin nem miktarının %1,14 ile %11,58 aralığında değiştiği tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 2'de özetlendi.

Balsam Miktarı Tayini

Etanolik ekstrakt içerisinde çözülmüş madde miktarı olarak ifade edilen balsam miktarının %71,10 ile %23,60 arasında değiştiği tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 2'de özetlendi.

Tablo 2. Propolis ekstraktları fenolik bileşenleri

Table 2. Phenolic composition of propolis extracts

Örnek	mg (fenolik bileşen)/ g numune													
	Gallik Asit	Protokatekuik Asit	p-OH Benzoik Asit	Kateşin	Vanilik Asit	Kafeik Asit	Şiringik Asit	Epikateşin	p-Kumarik Asit	Ferulik Asit	Rutin	Daidzein	t-sinamik Asit	Luteolin
Kayseri	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	1.75	T.E.	T.E.	0.84	0.72	0.72	T.E.	1.41	11.20
Beykoz	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2.75	T.E.	T.E.	0.71	0.83	0.83	T.E.	T.E.	1.83
Bilecik	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.2	4.04	0.07	9.50	2.60	9.83	9.83	T.E.	0.26	9.06
Sivas	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	7.33	0.20	T.E.	4.30	0.45	0.45	T.E.	0.36	32.28
Balıkesir	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	5.00	T.E.	T.E.	T.E.	1.30	0.83	0.83	T.E.	1.85	12.00
Demirköy	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	8.86	0.40	T.E.	T.E.	1.08	1.31	1.31	T.E.	1.07	10.80
Zonguldak	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3.01	T.E.	T.E.	6.27	1.60	2.38	2.38	T.E.	0.28	3.53
Hemşin	0.24	0.05	T.E.	T.E.	T.E.	0.61	T.E.	T.E.	0.27	T.E.	T.E.	T.E.	0.01	1.03
Kars	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	7.00	T.E.	T.E.	1.65	0.80	0.80	T.E.	0.2	4.20
Bittim	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.61	T.E.	T.E.	0.89	0.52	0.52	T.E.	0.13	1.09
Yığılca	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	6.43	T.E.	T.E.	2.78	6.67	6.67	T.E.	1.34	13.65
Ardahan	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3.12	0.16	T.E.	1.16	1.96	1.96	T.E.	0.53	6.62
Ağrı	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2.94	0.27	T.E.	1.03	1.13	1.13	T.E.	0.32	2.47

T.E. Tayin edilemedi, her bir il için örnek sayısı 3' tür (N=3).

*Analiz sonuçları üç tekrarlı olarak elde edilmiş, standart sapma $< 0,01$ olduğu için tablo değerlerine yansıtılmamıştır.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Mum Değeri Tayini

Propolis örneklerinin toplam mum miktarları değerleri Tablo 1'de özetlenmiş olup, analiz sonucu vaks değerlerinin %1,40 ile %9,80 arasında değişim gösterdiği tespit edildi.

Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Etanolik ekstraktların toplam fenolik madde miktarının (TFM) 178,34 mg GAE/g ile 16,13 mg GAE/g arasında değiştiği tespit edildi ve elde edilen veriler Tablo 2'de özetlendi.

Toplam Flavanoid Tayini

Etanolik propolis ekstraktlarının toplam flavanoid miktarının (TFIM) 51,23 mg KE/g ile 1,24 mg KE/g arasında değiştiği tespit edildi ve elde edilen veriler Tablo 2'de özetlendi.

Kondanse Tanen Miktarı Tayini

Etanolik ekstraktların kondanse tanen madde miktarının 8,47 mg KatE/g ile 2,53 mg KatE/g arasında değiştiği belirlendi. Elde edilen veriler Tablo 2'de verildi.

HPLC- UV Analizi

HPLC-UV analizleri (280 ve 315 nm) UV-Vis dedektör donanımlı Elite LaChrom Hitachi, Japan HPLC ile 14 standart kullanılarak yapıldı ve örneklerde kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, t-sinamik asit ve luteolinin her numunede olduğu; bu standartlar içerisinde luteolinin en yüksek miktarda bulunduğu tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 3'te özetlendi.

Tablo 3. Veriler arasındaki korelasyon

Table 3. Correlation of data's

	Balsam	TPM	TFM
Balsam	1		
TPM	0.797735	1	
TFM	0.662649	0.759211	1

TARTIŞMA

Ham propolisin doğrudan kullanımı söz konusu olmadığı için, ekstraktları halinde kullanılmaktadır. Alkol ve su bazlı değişik propolis ekstraktları halindeki ticari ürünler tüketiciye ulaşmaktadır. Ham

propolisin bitki florasına göre değişen kimyasal bileşimi ve biyolojik aktif özellikleri ekstraktlarının da kompozisyonunun değişimine neden olmaktadır. Ekstraktların standardize edilerek tüketiciye arz edilmesi, yani aynı özelliklere sahip propolislerin ekstraktlarının üretilmesi de kolay değildir ancak bu imkânsız da değildir.

Yapılan bu çalışma ile Anadolu propolislerinin etanolik ekstraktlarının bileşimleri analiz edilerek, standardize edilmeleri için ortak özellikleri ortaya çıkarılması amaçlandı. Bu amaçla, çalışmamızda önce ham olarak elde edilen propolis örneklerinin % kuru madde miktarı, % balsam değerleri ve % vaks değerleri ile birlikte etken madde miktarları değişik testler ile tayin edildi. Bunun için, ham propolis örnekleri toplam polifenol miktarları, toplam flavanoid madde miktarları ve fenolik bileşen içerikleri tespit edilerek standart oluşturulması amaçlandı. Elde edilen veriler değerlendirilerek korelasyonlar araştırıldı (Tablo 4).

Analizler ekstraktlar üzerinden yapılmış olup sonuçlar g propolis olarak ifade edilmiştir. Böylece ham propolislerin kaba standardizasyonu için ortalama kalite parametreleri de açığa çıkarılmıştır. (Şekil 1). Ayrıca bu bulguların, toplam polifenol ve flavanoid konsantrasyonu açısından belirli standartta propolis ekstraktlarının hazırlanmasına da katkı sağlayacağı söylenebilir.

Tablo 4. Ham propolis ortalama kalite parametreleri

Table 4. Mean quality parameters of raw propolis

Kalite Parametresi	Ortalama Değer	Örnek Cinsi
% Kuru madde miktarı	% 94 ± 3.8	Ham Propolis
% Nem Miktarı	% 6 ± 3.8	Ham Propolis
% Balsam Miktarı	% 45 ± 14.6	Ham Propolis
% Mum Miktarı	% 5 ± 2.8	Ham Propolis
Toplam Polifenol Miktarı	% 10 ± 5.7	Ham Propolis
Toplam Flavanoid Miktarı	% 2 ± 1.4	Ham Propolis
Kondanse Tanen Miktarı	% 1 ± 0.5	Ham Propolis
Kafeik Asit Fenil Ester Miktarı	% 1 ± 0.5	Ham Propolis
Kafeik asit, ferulik asit, luteolin, t-sinamik asit, p-kumarik asit türevlerinden en az üçünü	% 2 ± 1.0	Ham Propolis

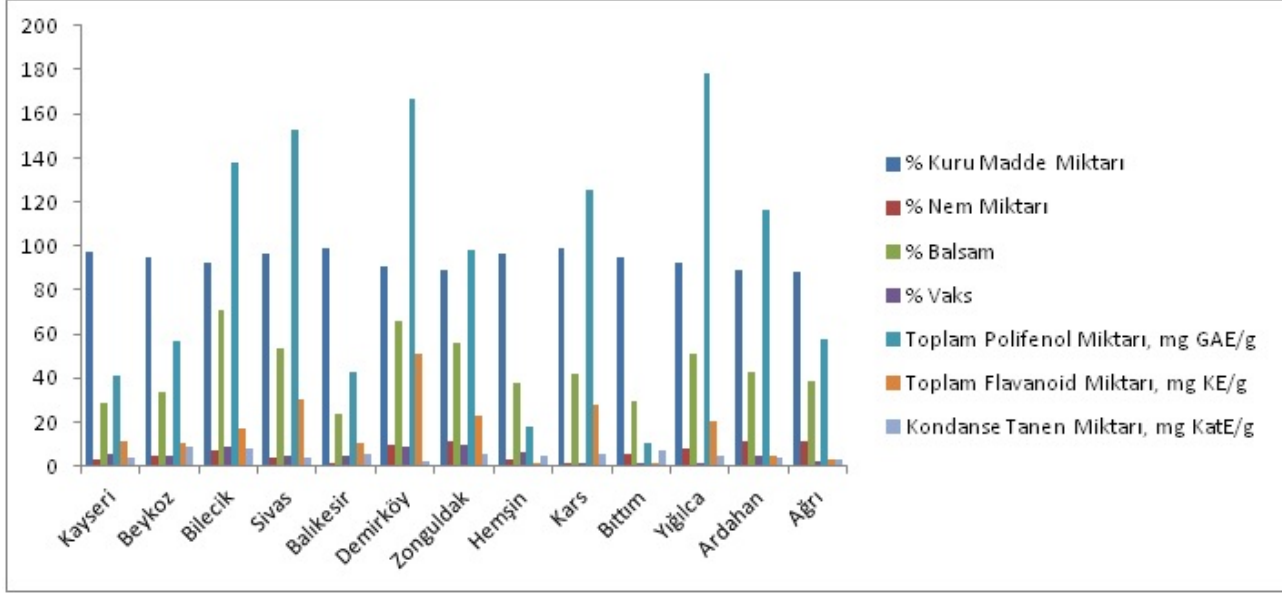
* Tablodaki değerler analiz edilen örneklere ait verilerin ortalama değerlerini ifade etmektedir.

*The values in the table represent the mean values of the data from the analyzed samples.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Şekil 1. Ham propolis örneklerine ait elde edilen veriler

Figure 1. Obtained data for raw propolis samples



*Her bir il için örnek sayısı 3' tür (N=3).

Uçucu maddelerden arındırılmış kuru kalıntı olarak ifade edilen kuru madde miktarı tayini ile birlikte Anadolu'nun değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin nem miktarları ve kuru madde miktarları belirlendi. Ham propolis örneklerinin kuru madde miktarının %88,43 ile %98,86 arasında değiştiği tespit edildi. Nem miktarlarının ise %1,14 ile %11,57 arasında değiştiği belirlendi. Woisky ve Salatino (1997) yaptıkları bir çalışmada propolis örneklerinin kuru madde miktarının %90,2-94,2 arasında değiştiğini ve nem miktarının %10'nun üstünde olamayacağını vurgulamışlardır. Anadolu propolislerinde çok az örnekte nem miktarı %10'un üzerinde bulunurken, büyük bir kısmında nem miktarı düşük bulundu.

Anadolu'nun 13 farklı bölgesinden toplanan ham propolis örneklerinin vaks miktarlarının %1,4 ile %9,8 arasında değiştiği tespit edildi. Propolis kalitesi açısından vaks miktarının düşük, balsam miktarının yüksek olması önemli bir kriterdir (Feas ve ark., 2014; Popova ve ark., 2017). Brezilya, Çin ve Uruguay'dan toplanan ham propolis örneklerinin etanolik ekstraktları ile ilgili araştırmada Uruguay propolis ekstraktında vaks'a hiç rastlanmazken, diğer bölgeler için %2,40 ile %30,60 arasında vaks miktarının değiştiği belirtilmiştir (Bonvehi ve ark., 1994). Anadolu propolislerinde tayin edilen balsam

miktarlarının %23,60 ile %71,10 arasında değişim gösterdiği tespit edildi. Yüksek balsam miktarı yüksek fenolik bileşenleri ve düşük vaksları ifade ettiği bildirilmektedir (Popova ve ark., 2017; Bankova ve ark., 2000). Nitekim Bankova ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada ham propolis'in %40 ile %60 arasında balsam içerdiği ifade edilmektedir. Anadolu propolislerinde ortalama değerin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 1). İspanyadan toplanan propolis örneklerinin ham propolislerdeki balsam miktarlarının %52,5-76,2 arasında değiştiği ve vaks değerinin ise %1,8 ile 27,7 arasında olduğu bildirilmektedir (Bonvehi ve Gutierrez, 2011). Farklı Portekiz propolis örneklerinde yapılan çalışmada ham propolislerdeki mum miktarını %4,8-%16,0 aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Dias ve ark., 2012).

Bitkisel özütlerin fenolik içeriklerini tam olarak aydınlatmak mümkün olmadığı için toplam fenolik madde miktarı cinsinden fenolik içerik ifade edilmektedir. Folin-Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanan spektrofotometrik yöntemde total fenolik bileşenler ölçülür. Yüksek fenolik içerik miktarı yüksek antioksidan aktiviteyi ifade ederken, aynı zamanda da yüksek biyolojik aktivite anlamına

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

gelmektedir. Anadolu propolislerinin etanolik ekstraktlarının toplam polifenol miktarlarının ham propolis için 16,13-178,34 mg/g arasında yani %1,6 ile %17,80 arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 1). Benzer şekilde toplam flavanoid madde miktarlarının 1,24 mg KE/g ile 51,23 mg KE/g arasında değiştiği tespit edildi. Bu değer %0,12 ile %5 arasında ham propolislerin flavanoid içerdiğini ifade etmektedir. Yapılan bir araştırmada Brezilya'dan temin edilen ham propolis örneklerinin toplam polifenol miktarı %8,8 ile 13,7 arasında değiştiği, flavonoid miktarının ise minimum %0,35 maksimum %2,7 olduğu bildirilmektedir (Woisky ve Salatino, 1997). Bulgaristan propolisinin kimyasal bileşenlerini belirlemek ve basit bir standardizasyon çalışması yapmak amacıyla Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin toplam polifenol ve flavonoid miktarı belirlenmiş ve toplam polifenol miktarının %11,2 ile %41,9 aralığında ve toplam flavonoid miktarının ise %2,9 ile %13,5 aralığında değiştiği bildirilmiştir (Bankova, 1987).

Ham Anadolu propolislerindeki kondanse tanen miktarları en düşük 2,70 ile en yüksek 8,47 mg KatE/g olarak tespit edilirken bu değerlerin %0,27 ile %0,85 arasında olduğu görülmektedir. Tanenler polifenollerin bir alt sınıfını oluşturan fenolik moleküller olup kendi aralarında ellagitanenler, gallotanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenler olmak üzere dört sınıfa ayrılırlar (Mayworm ve ark. 2014; Khanbabae ve Ree, 2001). Kondanse tanenler (proantosiyanidinler) bir grup polihidroksi flavan-3-ol oligomeri veya polimerinin flavanol grupları ile C-C bağı yapması ile oluşur ve fazla sayıda taşıdıkları -OH gruplarıyla proteinlerle, metal iyonlarıyla ve polisakkarit gibi diğer makromoleküller ile bağ yapma eğilimindedirler Schofield ve ark., 2001). Bu makromoleküller ilaç, gıda, mobilya ve tekstil sektöründe önemli ölçüde kullanılırlar. Ham propolisteki tanen miktarları ile ilgili çalışmaya rastlanmadığı için, bulgularımız literatür ile karşılaştırılmadı. Bu nedenle ilk kez ham propolisde kondanse tanen çalışması bu çalışma ile literature kazandırılmaktadır.

Ham propolis örneklerinin etanolik ekstraktlarının fenolik kompozisyonları 14 standarda karşı HPLCUV de analiz edildi. Bu değerlere göre çalışılan 13 adet Anadolu propolis örneğinde kafeik asit, ferulik asit, kumarik asit, t-sinnamik asit ve luteolin ortak fenolik bileşen olarak tespit edildi. Fenolik içeriği belirlenen numunelerin sadece bir tanesinde gallik asit tayin edildiği belirtilirken vanilin, ferulik asit, rutin ve kuersetine neredeyse tüm

numunelerde rastlanılmıştır. Kateşin ve daidzein hiç bir örnekte tespit edilmedi. Sınırlı sayıda fenolik bileşen ile yapılan bu çalışmada, tespit edilen ortak bileşenlerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Gajger ve ark., 2017; Uzel ve ark., 2005; Socha ve ark., 2015; Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013). Tespit edilemeyen fenolik bileşenlerin büyük ölçüde bölgelerin floral farklılığından kaynaklandığı, ancak kullanılan analitik metodun tayin sınırları altında kalabileceği de düşünülmektedir. Kafeik asit fenil ester (CAPE) bu çalışmada araştırılmadı, ancak CAPE'in propolis için iyi bir marker olduğu ifade edilmektedir (Bankova, 1987). Bu değerinde tespit edilerek sonuçların ona göre yorumlanması daha faydalı olacaktır. Devam eden çalışma ile CAPE ve diğer bazı önemli flavanoidler de propolis örneklerinde araştırılmaktadır.

Sonuç olarak ham propolis bileşiminin bitki florasından çok etkilendiği ve coğrafik özelliklere bağlı olduğu, ancak propolis özütlerinin hazırlanması esnasında toplam fenolik madde miktarları ve toplam flavanoid madde miktarlarının çözelti konsantrasyonu ile ayarlanabilecek birer parametre oldukları tespit edildi. Buna göre kaliteli propolis örneklerinin yüksek TFM ve TFIM miktarları ile yüksek balsam içerdiği sonucunu çıkarmak mümkündür.

Teşekkür

Bu çalışma Merve KESKİN' in doktora tezinden türetilmiştir. Bu çalışmanın bütçesi ve örneklerin bir kısmı 114Z370 numaralı TÜBİTAK Projesinden sağlanmıştır. Ayrıca analizlerde katkı sağlayan Dr. Zehra CAN'a, Esra BİRİNCİ ve Ceren BİRİNCİ'ye teşekkürü borç biliriz.

KAYNAKLAR

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. ve Nakayama, T. (2007). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China, *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.
- Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. ve Kolaylı, S. (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey, *International Journal of Food Properties*, 16, 277-287.
- Bonvehı, J.S., Coll, F.V. and Jorda, R.E. (1994). The Composition Active Components and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics, *JAACS*, 71, 5, 18-25.
- Bonvehi, J. S. ve Gutierrez, A. L. (2011). Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain), *Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 1387–1395.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. ve Marekov, N., 1987. A GC/MS Study of the Propolis Phenolic Constituents, *Z. Naturforsch*, 42, 147–151.
- Bankova, V., De Castro, S. ve Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie, Springer Verlag*, 31 (1), pp.3-15.
- Çakır, E.H. Şirin.Y. Kolaylı, S. Can, Z. (2018). Validation Methods for Phenolic Components with RP-HPLC-UV in Various Bee Products. *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi*, 1 (1), 13-19.
- Dias, L.G., Pereira, A.P. ve Estevinho, L. M. (2012). Comparative Study of Different Portuguese Samples of Propolis: Pollinic, Sensorial, Physicochemical, Microbiological Characterization and Antibacterial Activity, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4246–4253.
- Feás, X., Pacheco, L., Iglesias, A. and Estevinho, L.M. (2014). Use of Propolis in the Sanitization of Lettuce., *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 12243-12257.
- Fukumoto L. R. and Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Gajger, I.T., Pavlović, I., Bojić, M., Kosalec, I., Srećec S., Vlai nić, T. ve Vlai nić, J., (2017). The Components Responsible for the Antimicrobial Activity of Propolis from Continental and Mediterranean Regions in Croatia, *Czech J. Food Sci.*, 35, (5): 376–385.
- Julkunen-Titto R., (1985). Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 213–217.
- Khanbabaee, K. and Ree, T., (2001). Tannins: Classification and Definition, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 641–649.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. ve Kadota, S., (2008). Cytotoxic Constituents From Brazilian Red Propolis and Their Structure–Activity Relationship, *Bioorg., Med., Chem.*, 16, 5434–5440.
- Mayworm, M. A. S., Lima, C. A., Tomba, A. C. B., Fernandes-Silva, C. C., Salatino, M. L. F. ve Salatino, A., (2014). Does Propolis Contain Tannins?, *Complementary and Alternative Medicine*, 4.
- Neto, M.S. R., Tintino, S.R., da Silva, A.R.P., Costa, M.S., Boligon, A.A., Matias, E.F.F., Balbino, V.Q., Irwin R.A. Menezes, Coutinho, H.D.M. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572-580.
- Usman, Z. U., Bakar, A. B. A. and Mohamed, M., (2016). Phytochemical Screening and Comparison of Antioxidant Activity of Water and Ethanol Extract Propolis From Malaysia, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(5), 413-415.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., Kalofonos, H., Sivolapenko, G., Gawel-Beben, K., Antosiewicz, B. ve Chinou, I., (2017). Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland, *Molecules*, 22, 1159.
- Saral, Ö. (2018). Determination of Antioxidant Activities of the Chestnut and Flower Honeys Collected from Eastern Black Sea Region in Turkey. *Journal of Apitherapy and Nature*, 1, 1 28-32.
- Sarikaya A. O. Ulusoy E, Öztürk N, Tunçel M, Kolayli S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania sativa* mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*. 33, 470-481.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. and Pell, A. N., (2001). Analysis of Condensed Tannins: a Review, *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21-40.
- Silva, R.O., Andrade, V.M., Bulle Rego, E.S., Azevedo Doria, G.A., Santos Lima, B., Silva, F.A., Araújo, A.A.S., et al. (2015). Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 66-71.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Singleton V. L. and Rossi J. A., (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M., (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Socha, R., Galkowska, D., Bugaj, M. and Juszczyk, L., (2015). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Propolis from Various Regions of Poland, *Natural Product Research*, 29 (5), 416-422.
- Talla, E., Tamfu, A., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F., Mbafor, J., Tchuengem, N. F. ve Ndjouenkeu, R., (2014). Phytochemical Screening, Antioxidant Activity, Total Polyphenols and Flavonoids Content of Different Extracts of Propolis From Tekel (Ngaoundal, Adamawa Region, Cameroon), *The Journal of Phytopharmacology*, 3, 5, 321-329.
- Uzel, A., Sorkun, K., Öçağ, Ö., Coğulu, D., Gencay, Ö. ve Salih, B., (2005). Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Four Different Anatolian Propolis Samples, *Microbiological Research*, 160, 189-195.
- Woisky, R. G. and Salatino, A., (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal of Apicultural Research*, 37(2): 99-105.