



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE, KARADENİZ BÖLGESİ YAYLALARI
(ORDU, GİRESUN, TRABZON), MOR ORMAN GÜLÜ
(*RHODODENDRON PONTICUM*) ARI POLENİNİN
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

HİHAL ATMACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE, KARADENİZ BÖLGESİ YAYLALARI (ORDU, GİRESUN,
TRABZON), MOR ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON PONTICUM*) ARI
POLENİNİN ANTIÖKSİDAN ÖZELLİKLERİ**

HİLAL ATMACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Hilal ATMACA tarafından hazırlanan “TÜRKİYE, KARADENİZ BÖLGESİ YAYLALARI (ORDU, GİRESUN, TRABZON), MOR ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON PONTICUM*) ARI POLENİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 31.07.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Emine BAĞDATLI

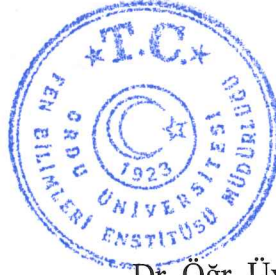
Jüri Üyeleri

Danışman
Doç. Dr. Emine BAĞDATLI
Kimya Bölümü, Ordu Üniversitesi
Üye
Doç. Dr. Melek GÜL
Kimya Bölümü, Amasya Üniversitesi
Üye
Dr. Öğr. Üyesi Aliye GEDİZ ERTÜRK
Kimya Bölümü, Ordu Üniversitesi

İmza

.....
.....
.....

02/09/2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/09/2019 tarih ve 2019 / 579 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



.....

Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

HİLAL ATMACA

15.

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün AR-1648 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TÜRKİYE, KARADENİZ BÖLGESİ YAYLALARI (ORDU, GİRESUN, TRABZON), MOR ORMAN GÜLÜ (*RHODODENDRON PONTICUM*) ARI POLENİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

HİLAL ATMACA

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ 85 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. EMİNE BAĞDATLI)

Beslenmemizde önemli bir rolü bulunan bal dünyada farklı coğrafyalarda pek çok çeşitte üretilmektedir. Ülkemize baktığımızda bal üreticiliği dünyada önemli bir yer edinmiştir. Arıcılık kırsal kalkınmanın sağlanması ve ülke ekonomisinin iyileştirilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple arı ürünlerinin kimyası ve biyoetkinliklerinin araştırılması, bölgesel farklılıklarının ortaya konması ve besin değerlerinin, ticari kullanımlarının bilimsel olarak kanıtlanması önemlidir.

Bu araştırmanın çalışma materyali ülkemiz Karadeniz bölgesi yaylalarında deli bal üreticilerinden temin edilen ve dört bölgeye ait olan (Ordu, Giresun, Trabzon ve Sinop) deli bal arı polenidir.

Bu çalışma başlıca dört aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada temin edilen arı polenleri mikroskop altında ayıklanmış ve uygun işlemlerle kurutulmuştur. Ardından su ve etanolde maserasyon tekniğiyle özütleri elde edilen örneklerin, üçüncü aşamada antioksidan aktivite çalışmaları beş farklı yöntemle, antioksidan aktivitesi yüksek uygun standart kimyasallar ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise örneklerin fitokimyasal analizi, toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak tüm ekstraların farklı yöntemlerle elde edilen sonuçlara göre yüksek antioksidan özellik gösterdiği anlaşılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid içerik sırasıyla gallik asit eşdeğeri ve kuersetin eşdeğeri olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar için, birbiriyle ilişkili antioksidan aktivite ve fitokimyasal bileşen tayin metotları arası korelasyonlar araştırılmış ve uygun korelasyon grafikleri yüksek R² değerleri ile elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Aktivite, Arı Poleni, Deli Bal, Deli Bal Arı Poleni, Fitokimyasal Bileşen.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PURPLE *RHODODENDRON (R. PONTICUM)* BEE POLLEN FROM THE BLACK SEA REGION'S PLATEAUS (ORDU, GİRESUN, TRABZON), TURKEY

HİLAL ATMACA

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

CHEMISTRY

MASTER'S THESIS, 85 NUMBER OF PAGE

Doç. Dr. EMİNE BAĞDATLI

Honey, which has an important role in our nutrition, is produced with many varieties in different geographies around the world. When we look at our country, honey production has gained an important place in the world. Beekeeping is also of great importance in terms of ensuring rural development and improving the national economy. For this reason, it is important to investigate the chemistry and bioactivity of bee products, to reveal regional differences and to scientifically prove their nutritional values and commercial uses.

The working material of this research is the mad honey bee pollen obtained from mad honey producers in the highlands of the Black Sea region of Turkey and belonging to four regions (Ordu, Giresun, Trabzon and Sinop).

This study consists of four main stages. The bee pollen provided was examined under a microscope in the first stage and dried by suitable procedures. Subsequently, antioxidant activity studies of the samples obtained by maceration technique in water and ethanol were carried out using five different methods using suitable standard chemicals with high antioxidant activity. In the last stage, phytochemical analyses of samples, total phenolic component and total flavonoid component determination were performed.

As a result, it was understood that all extracts showed high antioxidant properties using different antioxidant activity determination methods. Total phenolic and flavonoid contents were determined as gallic acid equivalent and quercetin equivalent, respectively. For the results obtained, correlations between related antioxidant activity and phytochemical component determination methods were investigated and appropriate correlation graphs were obtained with high R^2 values.

Keywords: Antioxidant Activity, Bee Pollen, Mad Honey, Mad Honey Bee Pollen, Phytochemical Component.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın yürütölmesi ve tez yazımı esnasında bana bilgi ve tecrübesiyle her daim yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen çok kıymetli tez danıőmanım Sayın Doç. Dr. Emine BAĞDATLI'ya, tüm katkılarından dolayı Ordu Üniversitesi Kimya Bölümü hocalarına, özellikle Ordu Üniversitesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Latif KELEBEKLİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Aliye GEDİZ ERTÜRK'e saygılarımı sunar ve teşekkür ederim.

Antioksidan aktivite ve fitokimyasal analiz yöntemlerinde danıőmanlığını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Melek GÜL'e yardımları için çok teşekkür ederiz.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim annem ve babama, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan çok değerli eşim Ömer Faruk ATMACA'ya bana gösterdikleri sevgi ve sabır için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	IX
ÇİZELGE LİSTESİ	XI
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Bal.....	2
2.1.1 Balın Kompozisyonu.....	2
2.1.2 Balın Tarihi.....	2
2.1.3 Ülkemizde ve Türk Tarihinde Bal.....	3
2.1.4 Balın Faydaları.....	4
2.2 Deli Bal.....	4
2.2.1 Deli Balın Toksik Özellikleri.....	6
2.2.2 Deli Balın Tarihi.....	7
2.2.3 Deli Balın Faydaları.....	7
2.3 Arı Poleni.....	8
2.3.1 Arı Poleninin Kompozisyonu.....	9
2.3.2 Polenin Hasat Edilmesi.....	10
2.3.3 Polenin Kurutma, Saflaştırma ve Depolama.....	10
2.3.4 Polenin Kalite Kontrolü.....	11
2.3.5 Polen Tüketimi.....	12
2.3.6 Polenin Faydaları.....	12
2.4 Antioksidanlar.....	13
2.4.1 Doğal Antioksidanlar.....	14
2.4.1.1 Enzimatik Antioksidanlar.....	14
2.4.1.1.1 Katalaz.....	14
2.4.1.1.2 Süperoksit Dismutaz (SOD).....	14
2.4.1.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	15
2.4.1.1.4 Glutasyon Redüktaz.....	15
2.4.1.1.5 Glutasyon S Transferaz (GST).....	15
2.4.1.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	15
2.4.1.2.1 Endojen Antioksidanlar.....	15
- Glutasyon.....	15
- Ürik Asit.....	15
- Albümin.....	15
2.4.1.2.2 Eksojen Antioksidanlar.....	16
- E Vitamini.....	16
- C Vitamini.....	16

- β -karoten	16
- Polifenoller.....	16
2.4.2 Yapay Antioksidanlar.....	19
2.5. Antioksidan Yöntemler ve Prensipleri	20
2.5.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite.....	20
2.5.2 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	21
2.5.3 Metal Şelatlama Aktivitesi.....	23
2.5.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi	23
2.5.5 Ferrik Tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemi ..	24
2.5.6 Fitokimyasal Yöntemler.....	25
2.5.6.1 Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Tayini (Folin Ciocalteu) Yöntemi	25
2.5.6.2 Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Yöntemi	25
2.6 Önceki Çalışmalar	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler.....	32
3.3 Polen Materyalinin Temini	33
3.4 Polenlerin Tanımlanması, Ayıklanması ve Kurutulması	33
3.5 Polenlerin Ekstraksiyon Çalışmaları	33
3.6 Verim Tablosu.....	35
3.7 Antioksidan Aktivite Tayin Çalışmaları	35
3.7.1 Çözelti Hazırlama.....	35
3.7.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Çözeltileri.....	35
-0.25 mM DPPH Çözeltisinin Hazırlanması.....	35
3.7.1.2 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	35
-Çözeltileri.....	35
-0.01 M Bakır(II) klorür Çözeltisi Hazırlanması	35
- 7.5×10^{-3} M Neocuproin Çözeltisi Hazırlanması	35
-1 M Amonyum asetat Tamponu Hazırlanması	35
3.7.1.3 Metal Şelatlama Aktivitesi Çözeltileri.....	36
-2 mM Demir(II) klorür Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
-5 mM Ferrozin Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.7.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi Çözeltileri	36
-0.2 M pH 6.6 Fosfat Tamponu Hazırlanması	36
-%0.1'lik Demir(III) klorür Çözeltisinin Hazırlanması	36
-%1'lik Potasyum ferrisiyanür Çözeltisinin Hazırlanması	36
-%10'luk Trikloroasetik asit Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.7.1.5 Toplam Fenolik Bileşen Tayini Çözeltileri.....	36
-Folin-Ciocalteu Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
-%7.5'luk Sodyum karbonat Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
3.7.1.6 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Çözeltileri.....	37
-%5'lik Sodyum nitrit Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
-%10'luk Alüminyum(III) klorür Çözeltisinin Hazırlanması	37
-1 M Sodyum hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
3.7.1.7 Ferrik Tiyosiyanat ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Çözeltileri.....	37
-0.04 M pH 7.4 Fosfat Tamponunun Hazırlanması	37
-Linoleik Asit Çözeltisinin Hazırlanması.....	37

-20 mM Demir(II) klorür Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
-%30'luk Amonyum Tiyosiyanat Çözeltisinin Hazırlanması.....	38
3.7.2 Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Uygulanması	38
3.7.2.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.7.2.2 Çalışılacak Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi	38
3.7.2.3 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Analizinin Yapılışı.....	39
3.7.2.4 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini Analizinin Yapılışı	39
3.7.2.5 Metal Şelatlama Aktivitesi Analizinin Yapılışı	39
3.7.2.6 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Analizinin Yapılışı.....	40
3.7.2.7 Ferrik tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Analizinin Yapılışı	41
3.7.3 Fitokimyasal Yöntemler.....	42
3.7.3.1 Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) Toplam Fenolik Bileşen Tayini Analizinin Yapılışı	42
3.7.3.2 Kuersetin Eşdeğeri (QE) Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Analizinin Yapılışı	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1 Antioksidan Aktivitenin Tayini.....	44
4.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite.....	44
4.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi.....	45
4.1.3 Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	46
4.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi	47
4.1.5 Ferrik Tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini	48
4.2. Fitokimyasal Analizler	50
4.2.1 Toplam Fenolik Bileşen Tayini.....	50
4.2.2 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini.....	50
4.3 Antioksidan Metotlar Arası Korelasyonlar	51
4.3.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml).....	51
4.3.2 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini (1000 µg/ml).....	51
4.3.3 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml)..	52
4.3.4 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini (1000 µg/ml)	52
4.3.5 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç (PFRAP) Yöntemi (1000 µg/ml)	53
4.3.6 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Toplam Fenolik Bileşen tayini (1000 µg/ml).....	53
4.4 Arı Poleni Ekstrelerinin FTIR ve UV-Vis Spektrumları	54
4.4.1 P1 Örneği	54
4.4.2 P2 Örneği	55
4.4.3 P3 Örneği	56
4.4.4 P4 Örneği	57
4.4.5 P5 Örneği	58
4.4.6 P6 Örneği	59
4.4.7 P7 Örneği	60
4.4.8 P8 Örneği	61

4.4.9 UV-Vis Bulguları.....	62
4.4.10 FTIR Bulguları.....	62
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
5.1 Antioksidan Aktivitenin Tayini	64
5.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite.....	64
5.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi.....	65
5.1.3 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	66
5.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi	67
5.1.5 FTC (Ferrik Tiyosiyanat) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini	68
5.2. Fitokimyasal Analizler	70
5.2.1 Toplam Fenolik Bileşen Tayini.....	70
5.2.2 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini.....	71
5.3 FTIR ve UV-Vis Çalışması.....	73
5.4 Öneriler	74
6. KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Bal ve Üretim Süreci (Anonim, 2018a; Anonim, 2019).....	2
Şekil 2.2 <i>Rhododendron Ponticum</i> 'un Çiçeği (1. Resim: Anonim, 2013a; 2. Resim: Emine Bağdatlı, Giresun, 04.06.2019).....	5
Şekil 2.3 <i>Rhododendron Ponticum</i> Arı Polen Mikroskop Görüntüsü	5
Şekil 2.4 <i>Rhododendron Luteum</i> 'un Çiçeği (Anonim, 2010a)	6
Şekil 2.5 <i>Rhododendron Luteum</i> Arı Polen Mikroskop Görüntüsü	6
Şekil 2.6 Grayanatoksin ve Türevleri (Gündüz ve ark., 2011)	6
Şekil 2.7 Polen (Anonim, 2018c).....	8
Şekil 2.8 Polen Tuzağı (Anonim, 2015)	10
Şekil 2.9 Antioksidanların Sınıflandırılması (Ulusoy, 2010)	14
Şekil 2.10 Hidrojen Peroksitin Katalaz Enzimi ile Su ve Oksijene Parçalanma Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016).....	14
Şekil 2.11 SOD ile Süperoksit Radikalinin Hidrojen Peroksit ve Moleküler Oksijene Katalizlenme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016).....	14
Şekil 2.12 GSH-Px ile Hidroperoksitlerin İndirgenme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016).....	15
Şekil 2.13 Yükseltgenmiş Glutasyonun, Glutasyon Redüktaz Enzimi Varlığında Glutatyona Dönüşme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016).....	15
Şekil 2.14 GST'nin Lipid Peroksitlerine Karşı Bağımsız GSH-Px Aktivitesi Gösterme Reaksiyonu (Yavaşer, 2011)	15
Şekil 2.15 Polifenollerin Sınıflandırılması (Yavaşer, 2011).....	17
Şekil 2.16 Fenolik Asitlerin Temel Yapısı (Ulusoy, 2010)	18
Şekil 2.17 Flavonoid Molekülü Genel Yapısı (Ulusoy, 2010)	18
Şekil 2.18 Flavonoid Çeşitleri ve Bulunduğu Gıdalar (Kolaç ve ark., 2017; Rice Evans ve ark., 1996; Yavaşer, 2011)	19
Şekil 2.19 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil ve 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazinin.....	20
Moleküler Yapıları.....	20
Şekil 2.20 DPPH Radikalinin Kimyasal Yapısı ve A-H ile Reaksiyonu (Albayrak ve ark., 2010)	20
Şekil 2.21 CUPRAC Yönteminin Kromojenik Oksidasyon Aracı Olan Cu(II)-Nc Reaktifinin Antioksidanlarla (Ar(OH)N) Reaksiyonu Sonucu Cu(I)-Nc Renkli Şelatının Oluşumu (Apak ve ark., 2004).....	22
Şekil 2.22 Bis (Neokuproin)-Cu (II) Klorür İle Antioksidan Arasındaki Reaksiyon (Apak ve ark., 2004).....	22
Şekil 2.23 Fenton Reaksiyonu (Gülçin, 2005).....	23
Şekil 2.24 Fe ³⁺ İyonlarının Fe ²⁺ İyonlarına İndirgenme Reaksiyonu (Jayanthi ve Lalitha, 2011)	24
Şekil 2.25 Peroksit ile Demir(II) Klorür Reaksiyonu (Yavaşer, 2011)	24
Şekil 2.26 Oluşan Fe ³⁺ İyonlarının NH ₄ SCN ile Reaksiyona Girerek FeSCN ²⁺ Oluşturması (Yavaşer, 2011).....	24
Şekil 4.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)	51
Şekil 4.2 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)	51

Şekil 4.3 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml).....	52
Şekil 4.4 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)	52
Şekil 4.5 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç Yöntemi (PFRAP) Korelasyonu (1000 µg/ml).....	53
Şekil 4.6 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml) Korelasyonu	53
Şekil 4.7 P1 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	54
Şekil 4.8 P1 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	54
Şekil 4.9 P2 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	55
Şekil 4.10 P2 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	55
Şekil 4.11 P3 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	56
Şekil 4.12 P3 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	56
Şekil 4.13 P4 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	57
Şekil 4.14 P4 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	57
Şekil 4.15 P5 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	58
Şekil 4.16 P5 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (0.75 mg ekstre/3 ml metanol).....	58
Şekil 4.17 P6 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	59
Şekil 4.18 P6 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	59
Şekil 4.19 P7 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	60
Şekil 4.20 P7 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	60
Şekil 4.21 P8 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu.....	61
Şekil 4.22 P8 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol).....	61
Şekil 5.1 Polen Ekstrelerinin DPPH Radikali Süpürücü % Aktiviteleri Grafikselsel Gösterimi	64
Şekil 5.2 Polen Ekstrelerinin Metal Şelatlama % Aktiviteleri Grafikselsel Gösterimi..	65
Şekil 5.3 Polen Ekstrelerinin Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitelerinin (Absorbans) Grafikselsel Gösterimi	66
Şekil 5.4 Bis(Neokuproin)-Cu (II) Klorür ile Antioksidan Arasındaki Reaksiyon (Apak ve ark., 2004).....	66
Şekil 5.5 Polen Ekstrelerinin Toplam İndirgeme Gücü Aktiviteleri (Absorbans) Grafikselsel Gösterimi	67
Şekil 5.6 Polen Ekstrelerinin 4 Saat Aralıklarla Ölçülen Absorbans Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi (500 µg/ml).....	68
Şekil 5.7 Polen Ekstrelerinin Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu Gücüyle İfade Edilen Toplam Antioksidan % Aktiviteleri'nin Grafikselsel Gösterimi.....	69
Şekil 5.8 Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği (c: 25, 50,100, 200, 300, 400 ve 500 µg/ml)	70
Şekil 5.9 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre) Grafikselsel Gösterimi	71
Şekil 5.10 Kuersetin Kalibrasyon Grafiği (c: 25, 50,100, 200, 300, 400 ve 500 µg/ml)	72
Şekil 5.11 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre) Grafikselsel Gösterimi	72

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Polen Kompozisyonu (Bogdanov, 2004).....	10
Çizelge 2.2 Polenin Kalite Kontrol Analizleri (Bogdanov, 2004).....	11
Çizelge 3.1 Polen Ekstrelerinin Kodlanması	34
Çizelge 3.2 Polen Örneklerinin % Verim Hesapları	35
Çizelge 4.1 Polen Ekstrelerinin DPPH Radikali Süpürücü % Aktiviteleri.....	44
Çizelge 4.2 Polen Ekstrelerinin Metal Şelatlama % Aktiviteleri.....	45
Çizelge 4.3 Polen Ekstrelerinin Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasiteleri (Absorbans)	46
Çizelge 4.4 Polen Ekstrelerinin Toplam İndirgeme Gücü Aktiviteleri (Absorbans). 47	
Çizelge 4.5 Polen Ekstrelerinin Dört Saat Aralıklarla Ölçülen Absorbans Değerleri (500 µg/ml konsantrasyon için).....	48
Çizelge 4.6 Polen Ekstrelerinin Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu Gücüyle İfade Edilen Toplam Antioksidan % Aktiviteleri.....	49
Çizelge 4.7 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre)	50
Çizelge 4.8 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre)	50
Çizelge 4.9 Delibal Arı Poleni Özütlerinin UV-Vis Bulguları	62
Çizelge 4.10 Delibal Arı Poleni Özütlerinin FTIR (ATR) Bulguları	62

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AAE	: Askorbik Asit Eşdeğeri
ABTS	: 2, 2-Azinobis (3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit)
ATR	: Attenuated Total Reflectance
BHA	: Bütil hidroksianisol
BHT	: Bütil hidroksitoluen
c	: Konsantrasyon
CAE	: Kateşin Eşdeğeri
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EC₅₀	: Ortamdaki DPPH radikalının %50'sini inhibe eden konsantrasyon
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeyici güç
PFRAP	: Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç
FTC	: Ferrik Tiyosiyanat
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GSH	: İndirgenmiş formdaki Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Glutasyon Disülfid
GST	: Glutasyon S Transferaz
GTX I	: Grayanatoksin I
GTX III	: Grayanatoksin III
HMF	: Hidroksimetil furfural
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IC₅₀	: %50 İnhibisyon Değeri
kg	: Kilogram
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometre Sistemi
m	: Metre
mg	: Miligram
mM	: Milimol
ml	: Mililitre
M	: Molar
NADPH	: İndirgenmiş formdaki Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	: Nanometre
QE	: Kuersetin Eşdeğeri
rpm	: 1 dakika içindeki devir sayısı
SC₅₀	: DPPH radikali süpürme aktivitesi değeri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TEAC	: Trolox® eşdeğeri antioksidan kapasite
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol

1. GİRİŞ

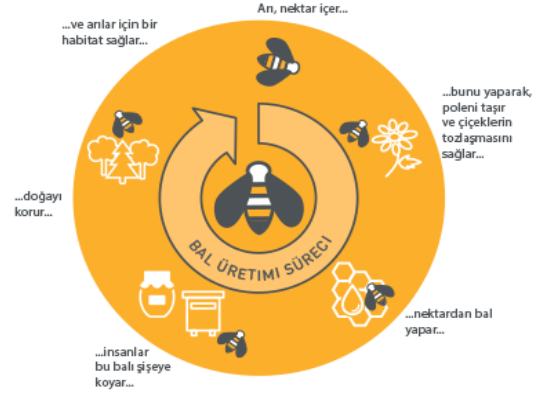
Bu tez çalışması insan beslenmesinde büyük bir öneme sahip bal arısı ürünlerinden polen üzerine yapılan bir araştırmayı içermektedir. Bal ve bal arısı ürünleri (polen, propolis, arı zehiri, bal mumu, arı sütü, arı iğnesi) bugün hem beslenme hem de çeşitli hastalıkları önleyici, tedavi edici ya da rahatlatıcı etkileriyle kullanılmaktadır. Apiterapi, arı ürünlerinin hastalıkları önleyici ya da iyileştirici olarak kullanılmasıdır. Ülkemizde de bir apiterapi derneği vardır ve bu dernek kanıta dayalı çalışmalar ile bu tedavi yöntemini modernleştirecek hizmetler vermek amacıyla kurulmuştur.

Türkiye, 2015 yılında bal üretiminde Cumhuriyet tarihi rekorunu kırmıştır. Çalışmamızda, ülkemiz ve Karadeniz Bölgesi için önemli bir ihracat kaynağı olan balın yan ürünlerinden polen çalışılmıştır. Polen, bal üretimi esnasında, arının bacaklarında biriktirip kendi bal özü ve bazı özel enzimlerle karıştırarak hazırladığı ürünüdür ve arıların ihtiyacından fazla olan miktarın polen tuzaklarıyla biriktirilmesi sonucu toplanabilir. Yapılan kapsamlı literatür araştırmalarımıza göre, deli bal arı polenin antioksidatif özelliği ve pek çok biyoaktivite parametresi ne ülkemizde ne de dünyada çalışılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, ülkemiz Karadeniz Bölgesi yaylalarında belirlediğimiz üç bölgeden (Ordu, Giresun, Trabzon) toplanan deli bal arı polenin antioksidan özelliklerinin araştırılması, toplam fenolik bileşen ve flavonoid bileşen tayinlerinin gerçekleştirilmesidir. Sinop bölgesinden de örnek temin edilmiş ve örnek bu tez çalışmasına dahil edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bal



Şekil 2.1 Bal ve Üretim Süreci (Anonim, 2018a; Anonim, 2019)

Bal, bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların veya bitkilerin canlı kısımlarıyla bazı eş kanatlı böceklerin salgıladıkları tatlı maddelerin bal arıları tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür (Anonim, 1990) (Şekil 2.2).

2.1.1 Balın Kompozisyonu

Balın bileşimi üretildiği flora ve iklim özelliklerine göre değişim göstermekle birlikte bal, %17-18 nem, %72 monosakkaritler (glukoz ve fruktoz), %2.5 sukroz, %0.1 diğer karbohidratlar ve son olarak %7.9'luk kısmı da asitler, laktonlar, mineraller, proteinler, aminoasitler, vitaminler, aromatik bileşikler ve hidroksimetilfurfural gibi diğer bileşiklerden oluşur. Balın mineral içeriği ise balın çeşidine bağlı olarak %0.1-0.2 arasında değişebilir. Balın toplam mineral içeriğinin %45-85'ini oluşturan başlıca mineral potasyumdur. Baldaki diğer inorganik türler: Na, Ca ve Mg'dur. Balda daha az miktarda Cu, Fe, Zn, Mn ve çok düşük seviyelerde de iz elementler bulunmaktadır (Di Bella ve ark., 2015).

2.1.2 Balın Tarihi

İnsanoğlundan çok daha eski bir tarihi olan arılar bal, polen, propolis ve arı sütü üretmeleri, tozlaşmayı sağlayarak bitkilerin üremesini sağlamaları sebebiyle insanlık için çok önemlidir. Arıların önemini Albert Einstein tek bir cümleyle özetlemektedir:

“Arılar yeryüzünden silinip giderse, insanoğlu yalnızca dört yıl yaşayabilir. Arılar

olmazsa döllenne olmaz, hiçbir bitki, hiçbir hayvan, hiçbir insan olmaz” (Albert Einstein, 1949).

Paleolitik ve Mezolitik dönemdeki mağara resimleri bal avcılığını ispat etse de bal tüketiminin daha eski dönemlere dayandığı düşünülmektedir. Eski insanlar bal tüketebilmek için yabani arıları evcilleştirme yöntemlerini aramış, topraktan kovanları kullanmışlardır. Modern arıcılığın temelleri bu sayede atılmıştır. Prehistorik dönemlerden itibaren insanoğlu için önemli bir yeri olan bal tıp, eczacılık gibi dallarda çok uzun süredir kullanılmaktadır. Antik Mısır tanrısı Ra'nın gözyaşı olarak nitelendirilen balın dini ritüellerin bir parçası olduğu, Mezopotamya'da tapınakların temelinde bereket olması açısından ve kutsallık amacıyla bal döktürüldüğü, Perslerin tanrılara yapılan kurban törenlerinde balı kullandığı, Roma mutfağında etlerin bozulmaması için balla kaplandığı gözlemlenmiştir. Hippokrates, Dioskorides gibi hekim ve yazarlar balın tedavi edici özelliklerini bildirmişlerdir. Hippokrates (MÖ 460-370) yara ve ülser tedavisinde balın kullanıldığını ayrıca balın öksürüğe de iyi geldiğini belirtmiştir. Mısır'da ölümlerin mumyalanması yaygın olsa bile, ölümlerin içi bal dolu küplere konulduğu bilinmektedir. Heredotos, Babillilerin kefenlenmeyi bal ile yaptıklarını bildirmiştir (Bulut ve Lenger, 2015). Yazıtlar, resimler ve diğer tarihi kayıtlar arı yetiştiriciliğinin eski Mısır'da başladığını, Mezopotamya, Anadolu ve Avrupa'nın da gelişiminde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

2.1.3 Ülkemizde ve Türk Tarihinde Bal

Arı ve bal sözcükleri 11. yy'da Türklere ait 'Divanu Lugati't-Türk' adlı eserde görülmüştür. Evliya Çelebi Seyahatname'de bal çeşitlerinden ve özelliklerinden bahseder. Türk sözlü kültüründe birçok atasözü ve deyimde bal kelimesi kullanılmakta ve Türk mutfağında da birçok ballı tarif bulunmaktadır. Çok eski tarihlerden bugüne kadar hem yazılı kaynaklarda hem de masal, atasözü gibi kültürel öğelerde rastlandığı üzere bal her zaman Türklerin hayatında olmuştur. Son yıllarda arı ve arı ürünlerine verilen önemin artmasıyla birlikte en çok bilinen ve kullanılan arı ürünü olan balın ve polenin üretimi de artış göstermiştir (Fedakar, 2015).

TÜİK 2017 verilerine göre Türkiye'de arıcılık yapan işletme sayısı 83210, Türkiye'de yıllık bal üretimi 114471 ton, Türkiye'de arı kovana sayısı 7991072 olarak belirlenmiştir (Anonim, 2018b).

2.1.4 Balın Faydaları

Balın hastaların çabuk iyileşmesine yardımcı olduğu (Şahinler, 2000), bağırsak, mide ve sindirim sistemi üzerinde iyileştirici etkileri olduğu (Al Somai ve ark., 1994), yara ve yanıkların tedavisinde kullanıldığı (Maghsoudi ve ark., 2011), eritrositlerde hücre fonksiyonlarını teşvik ettiği (Alvarez-Suarez, 2012), kan basıncını düşürdüğü (Erejuwa ve ark., 2012) ve karaciğer hastalıkları tedavisine yardımcı olabileceği (El Denshary ve ark., 2011) bildirilmiştir. Bal, antibakteriyel özelliği sebebi ile ağız ve boğaz enfeksiyonlarına karşı da kullanılmaktadır (Krell, 1996).

Balın antifungal aktivitesinin de bulunduğu bildirilmektedir. Bu aktivitesi sebebiyle hamilelik süresince bal ve yoğurt karışımı ile mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılabilmesi belirtilmiştir (Abdelmonem, 2012).

Bal, antikanser aktiviteyle ilgili birçok çalışmada öne çıkan bir arı ürünüdür. Balın içindeki çeşitli polifenolik bileşiklerin prostat kanserine, renal hücre, böbrek (Samarghandian, 2011), göğüs kanserine ve servikal kanser hücrelerine (Fauzi, 2011), kolon kanserine (Jaganathan ve Mandal, 2010; Jaganathan, 2011), göğüs, rahim ağzı, ağız kanserlerine (Othman, 2012) ve akciğer kanserine (Pasupuleti, 2016) karşı antikanser etki gösterebileceği belirtilmiştir.

Bal ve diğer arı ürünlerinin karıştırılmasıyla oluşturulan karışımın çocuk sahibi olma açısından çiftlere faydalı olduğu ve yapılan bir çalışmada sperm sayısında artış sağladığı gözlemlenmiştir (Mohamed ve ark., 2010).

2.2 Deli Bal

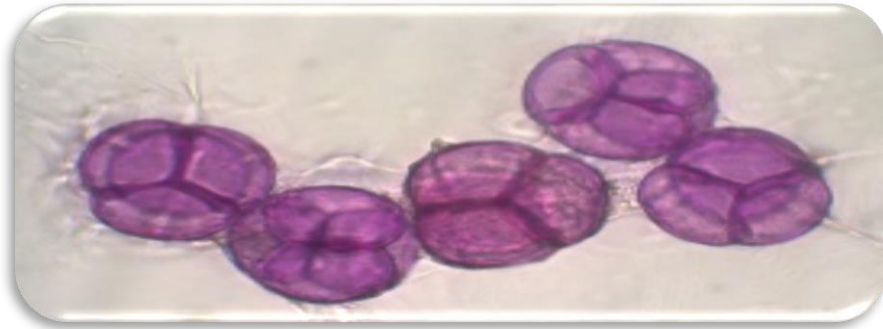
Deli bal, yüksek oranda grayanotoksin içeren *Sapindaceae* familyası ve *Ericaceae* familyasının *Rhododendron ponticum* ve *Rhododendron luteum* türlerinin nektarının bal arıları tarafından toplanması sonucu elde edilen doğal bir üründür. Çalı veya ağaç formunda bulunan orman gülü; Çin, Tibet, Burma, Nepal, Yeni Gine, Tropik Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da, Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nde dağılım göstermektedir (Çeter ve Güney, 2011).

Karadeniz bölgesinde özellikle bazı türleri çok yaygın olan orman gülleri halk arasında 'komar' adıyla bilinmektedir. Orman güllerinin nemli, organik maddece zengin, drenajlı ve asitli topraklarda iyi geliştikleri bildirilmektedir (Avcı, 2004). Orman güllerinin pek çok çeşidi olmasına rağmen deli balı oluşturan orman gülü çeşidi

içeriğindeki grayanatoksin sebebiyle mor çiçekli ve sarı çiçekli orman gülleridir. Mart-Mayıs aylarında açan mor çiçekli orman gülü, nektar, yaprak ve polenlerinde toksin içermektedir (Şekil 2.2). Ülkemizde; Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Kastamonu, Zonguldak, Ordu, Giresun, Sinop, Rize, Trabzon ve Artvin illerinde görülmektedir (Çeter ve Güney, 2011) (Şekil 2.3).



Şekil 2.2 *Rhododendron Ponticum*'un Çiçeği (1. Resim: Anonim, 2013a; 2. Resim: Emine Bağdatlı, Giresun, 04.06.2019)



Şekil 2.3 *Rhododendron Ponticum* Arı Poleni Mikroskop Görüntüsü

Eylül-Ekim ayları arasında açan sarı çiçekli orman gülü, yaprak, nektar ve polenlerinde toksin içermektedir (Şekil 2.4). Ülkemizde; Çanakkale, Kastamonu, Sinop, Amasya, Samsun, Trabzon, Rize ve Balıkesir illerinde görülmektedir (Çeter ve Güney, 2011) (Şekil 2.5).



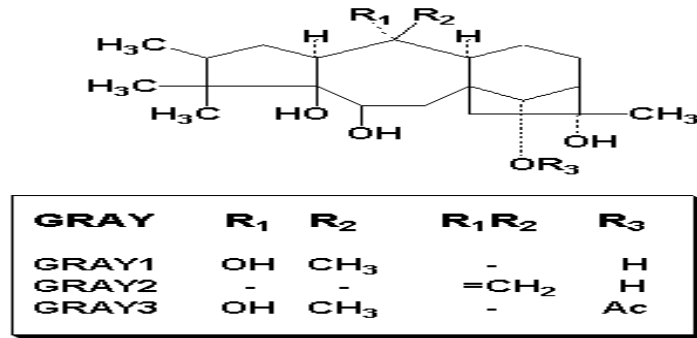
Şekil 2.4 *Rhododendron Luteum*'un Çiçeği (Anonim, 2010a)



Şekil 2.5 *Rhododendron Luteum* Arı Polen Mikroskop Görüntüsü

2.2.1 Deli Balın Toksik Özellikleri

Deli balın toksik etkisinin nedeni *R. luteum* ve *R. ponticum* nektar, polen ve yaprak kısımlarında bulunan toksik diterpenlerin bir grubu olan grayanotoksinlerdir. Grayanotoksinler grayanotoksin I'den türevlenirler (Gündüz ve ark, 2011) (Şekil 2.6). Grayanotoksinler, hücre membranlarındaki sodyum kanallarına bağlanırlar. Bu kanallara bağlanan toksin, iskelet kası ve kalp kası hücrelerinde, merkezi sinir sisteminde yoğunluğa bağlı olarak kişiden kişiye değişen cevaplara neden olur (Özyurt, 2006).



Şekil 2.6 Grayanotoksin ve Türevleri (Gündüz ve ark., 2011)

Halk arasında tutar bal veya acı bal olarak da adlandırılan deli bal, belli miktarın üzerinde alındığında zehirlenme belirtileri göstermektedir. Balı dozundan fazla tüketen kişilerde cilt ve boğazda yanma hissi, ağız ve burunda kaşınma, deride ve gözlerde kızarıklık, vertigo ve baş ağrısı, bulantı, kusma, salivasyon, kramp tarzı karın ağrısı, idrar ve gaita kaçırma, halsizlik, görme bulanıklığı veya geçici körlük nöbetleri, bradikardi (nabız düşüklüğü), hipotansiyon ve koma gibi belirtiler gözlenebilir (Çeter ve Güney, 2011).

2.2.2 Deli Balın Tarihi

Deli bal zehirlenmelerinin geçmişi milattan öncesine dayanmaktadır. Ksenophon (M.Ö. 434-354), Perslerden kaçan Yunan ordusunun Karadeniz’de konakladıkları köylerde bal yiyen askerlerin kusma, ishal, halsizlik ve sarhoşluk gibi belirtiler gösterdiklerini, belirtilerin birkaç gün sonra geçtiğini fakat askerlerin ölmediğini bildirmiştir. Strabon da, Romalı komutan Pompeius’un askerlerinin, M.Ö. 67 yıllarında Karadeniz’in dağlık alanından geçerken Heptakometlerin yol kenarına bıraktıkları deli balı yiyerek öldüğünü belirtmiştir (Avcı, 2004).

Karadeniz’de son zamanlarda da deli baldan zehirlenme vakaları mevcuttur. 2010 yılında Bartın İl Sağlık Müdürlüğü tarafından 70 tane deli bal zehirlenme vakası ile karşılaştığı Anonim, (2010b), 2010 yılında Zonguldak İl Sağlık Müdürlüğü tarafından 128 kişinin zehirlendiği Anonim, (2010c), 2013 yılında Karadeniz’den tedavi için getirilen deli balın İzmir’de 1 kişinin ölümüne sebep olduğu Anonim, (2013b), 2016 yılında Sinop’ta aynı aileden üç kişinin deli bal zehirlenmesi Anonim, (2016) teşhisiyle tedavi altına alındığı bildirilmiştir.

2.2.3 Deli Balın Faydaları

Türkiye’de üretilen deli bal, yapısında Karadeniz coğrafyasına ve iklim karakteristiğine bağlı olarak değişen fenolik bileşikler içermektedir. Buna bağlı olarak deli balın iyi bir antiradikal ve antioksidan etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu etkileriyle deli balın kanserin, kalp rahatsızlıklarının, iltihaplı hastalıkların iyileşme sürecine katkı sağlayabildiği ve yaşlanma karşıtı etki gösterebildiği belirtilmiştir (Silici ve ark., 2010).

Ayrıca Silici ve arkadaşlarının (2008) bir başka çalışmasında Karadeniz Bölgesi'nden temin edilen deli bal numunelerinde deli balın çiçek balından daha fazla oranda Cu, Co, Cr, Ni, Se, Zn, Ca ve Mg minerallerini içerdiği belirtilmiştir.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde yapılan bir çalışmada sarı orman gülünün kanser hücrelerine karşı muhteşem bir doğal antioksidan ve antitümör ajanı olabileceğinin üzerinde durulmuştur (Demir ve ark., 2016). Başka bir çalışmada deli balın ve orman gülü çiçekleri ve yapraklarının ham özütlerinin antifungal ve antibakteriyal etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre örneklerin hepsinin orta veya ileri derecede antifungal ve antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Ertürk ve ark., 2009). Deli balın içeriğindeki grayanotoksinlerin parasempatik sinir sistemini uyarmasıyla antihipertansif etki gösterdiği (Öztaşan ve Songur, 2007), pankreas hücrelerinde insülin salınımı gerçekleştirdiği ve kandaki glukoz ve lipid seviyelerinde anlamlı bir düşüşe sebep olduğu (Öztaşan ve ark., 2005), normal bala oranla kemik kırığını daha hızlı bir şekilde iyileştirdiği (Aynacı ve ark., 2014) tespit edilmiştir. Karadeniz yöresi halkı balın seksüel gücü arttırdığına inanmakta ve geleneksel-tamamlayıcı tedavi olarak iktidarsızlıkta kullanmaktadır (Çeter ve Güney, 2011).

2.3 Arı Poleni



Şekil 2.7 Polen (Anonim, 2018c)

Arı poleni; çiçekli bitkilerde, çiçeklerin erkek organlarının (stamen) üst kısmında bulunan anterlerin içindeki polen kesecikleri içerisinde yer alan, buruşuk, dikenli, yağlı ve yapışkan yapıdaki maddenin bal arısı tarafından toplanarak biriktirilen kurutulmuş çiçek tozları olup bitki polenlerinden önemli farklılıklar gösterir (Anonim, 1989) (Şekil 2.7). Bal arıları, nektardan aldıkları şekeri polen taneciklerini birarada tutmak için polene eklerler ve poleni arka ayaklarına götürerek koloniye transfer ederler. Polen koloni için çok önemli bir rol oynar. Arılar poleni kendi diyetlerinde ve

larvaları beslemek için kullanırlar (LeBlanc ve ark., 2009). Tarlacı işçi arılar tarafından toplanan polen arının kendi salgıları ile birleştirilir. Polen sepetine doldurulan polen, arılar tarafından ince bir tabaka bal ve balmumu ile kaplanır (Silici, 2014).

Toplandığı çiçeğin çeşitliliği, iklim şartları, coğrafya, bitki türünün genetiği, farklı arıcılık tekniklerinin uygulanması faktörlerine bağlı olarak arı polenin besin değeri değişim göstermektedir (Bonhevi,1997; Feas, 2012). Bu sebeplerden dolayı tüm bitki türlerini içeren klasik bir polen şeklinden ve kompozisyonundan bahsetmek mümkün değildir. Farklı türlere ait polenlerin farklı yapılarda olması, bitkilerde tür tanımlamasında ve balın orjininin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Öztürk ve Akçiçek, 2015).

2.3.1 Arı Poleninin Kompozisyonu

Poleni oluşturan asıl içerik karbohidratlardır ve bu karbohidratlar çözünmeyen polisakkaritler, nişasta, fruktoz, glukoz ve sukrozdan oluşur (Çizelge 2.1). Polen, protein ve aminoasit içerir ve arı beslenmesinde başlıca protein kaynağıdır. Ayrıca polenin yapısında yağ içeriği olarak lipitler, yağ asitleri, steroller bulunurken, eser olarak mineral, vitamin ve flavonoidler de mevcuttur.



Çizelge 2.1 Polen Kompozisyonu (Bogdanov, 2004)

Bileşik	İçerik (min.-max.)
Ana bileşenler	g/100 g
Karbohidratlar	13-55
Protein	10-40
Yağ	1-10
Besinsel Lif	0.3-20
Minör Bileşikler	mg /100 g
Mineral	500-3000
Vitamin	20-100
Flavonoid glikozitler	40-3000

2.3.2 Polenin Hasat Edilmesi



Şekil 2.8 Polen Tuzağı (Anonim, 2015)

Polen, özel polen tuzakları ile toplanır (Şekil 2.8). Taze arı poleni, 100 gramında 20-30 gram su içerir. Bu yüksek nem, maya ve bakteri gibi mikroorganizmalar için ideal bir kültür ortamıdır. Bozulmaların önlenmesi ve maksimum kaliteyi korumak için polen günlük olarak hasat edilmeli ve bu işlemten sonra derhal dondurucuya yerleştirilmelidir. Dondurucuda iki gün muhafaza edildikten sonra böcekler ölecektir. Çözüldükten sonra birkaç saat muhafaza edilip, mümkün olduğu kadar çabuk işleme alınmalıdır.

2.3.3 Polenin Kurutma, Saflaştırma ve Depolama

Taze ve saf arı poleni, optimum biyolojik ve besleyici özelliklerini korumak amacıyla tüketilene kadar dondurularak ya da azot altında depolanabilir. Böylece çözündükten

sonra oksidasyona uğramayarak bağırsak florasındaki yararlı besleyici etkiler için gerekli optimum enzim aktivitesi muhafaza edilebilir.

Polen için en iyi kurutma yöntemi nemini devamlı uzaklaştıran elektrikli fırındır. Kurutma işlemi esnasında en fazla 40 °C'ye çıkılmalıdır ve uçucu bileşiklerin kaybını önlemek için mümkün olduğu kadar kısa sürede nem miktarı %6 ve daha azına inene dek kurutulmalıdır. Böylece polen içeriği 15 ay boyunca sabit kalır. Polen %6'dan fazla su içerirse fermente olacaktır. Bir yıl ve daha uzun süreli depolamada polenin radikal süpürücü aktivitesi düşecektir. Polen peletlerinin içerdiği safsızlıklar, özel üretilen saflaştırıcılar kullanılarak hava yardımıyla uzaklaştırılmalıdır. Kullanılan hava, tozdan ve bakterilerden arındırılmış olmalıdır. Saf polen, kuru ve serin bir ortamda ağzı iyi kapanan cam veya plastik kaplarda depolanmalıdır.

2.3.4 Polenin Kalite Kontrolü

Mikrobiyolojik güvenlik temel kalite kriteridir (Çizelge 2.2). Polenin mikrobiyolojik kalitesinin kontrolü patojenik mikrop ve mantar olup olmadığının tespiti açısından önemlidir. Işın, ozon tedavisi ve kimyasal fumiganlar ile bakterilerin tahribatına gerek yoktur, bu yöntemler zehirli kalıntılara yol açar. Biyoaktif bileşiklerin özel kullanımı ve vitamin içeriği değerlendirilmelidir.

Çizelge 2.2 Polenin Kalite Kontrol Analizleri (Bogdanov, 2004)

Analiz	Kalite Kriteri
Duyusal Analiz	Klasik tat ve koku, görünür kontaminant olmaması
Mikroskopik Analiz	Botanik ve Coğrafi Orijin Testi
Mikrobiyolojik Test	Bakteri yoğunluğu yasal hijyenik limitlerde olmalı
Kimyasal Analiz	Nem içeriği: maksimum 6 g/100 g polen Etikette var ise karbohidrat, protein ve yağ içeriği
Kontaminasyon	Pestisit, ağır metal

Polen kontaminantlardan en az etkilenen arı ürünü olmasına karşın, havanın kontaminasyonu ile pestisit ve ağır metal bakımından kirlenebilir. Optimum kalitede bir polen, kontaminasyon kaynaklarından (trafik ve pestisit kullanılan tarım alanları gibi) en az 3 km uzakta bir bölgeden toplanmalıdır (Bogdanov, 2004).

2.3.5 Polen Tüketimi

Polen tüketimi, normal beslenmeye geçilmiş çocuklarda ileri yaşlara kadar tavsiye edilmektedir (Doğaroğlu, 2015). Polen sade olarak çiğnenerek, ılık süt veya yoğurt ile de tüketilebilir (Öztürk ve Akçiçek, 2015). Küçük çocuklarda polen tüketimine günde iki çay kaşığıyla başlanması gerekmekte fakat ilerleyen dönemlerde zamanla arttırarak yetişkinlerde günlük 20 grama kadar çıkartılabilmektedir. Polen alerjisi olan insanlar bile, vücuduna değdirip koklamadan polen tüketebilirler. Ancak alerjik yapıda bünyesi olanlar, çok düşük miktarlarda tüketmeye başlayıp zamanla arttırabilir. Polenin çiğnenmesinden dolayı bir alerji meydana gelmiş ise, polen 15-20 dakika boyunca suyun içinde oda sıcaklığında bekletilerek, ezilerek veya meyve suyu ile beraber içilebilmektedir (Doğaroğlu, 2015).

2.3.6 Polenin Faydaları

Besin değeri zengin bir gıda olan polen, vücut direncini arttırmak, dengeli beslenmeyi sağlamak, zihinsel ve bedensel yorgunluğu gidermek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca sporcuların ve yarış hayvanlarının performanslarını da arttırmaktadır (Ulusoy, 2010). Genellikle çocuklarda iştah kaybı ve kötü beslenmenin önüne geçmek için kullanılır. Ayrıca çalışmalarla antioksidan, antienflamatuar, antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin mevcut olduğu bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda, karaciğer fonksiyonlarını güçlendirdiği ve ağır metal, pestisit zehirlenmelerinde polen kullanımının detoks etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Denisow ve Denisow-Pietrzyk, 2016). Kan plazmasındaki lipid seviyesini düşürdüğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Ayrıca bağışıklık sistemini kuvvetlendirmek ve yanık yaralarını iyileştirmek için de kullanılmaktadır (Komosinska Vassev ve ark., 2015). Çalışmalarda polenin anemi tedavisinde kullanıldığı ve demir, kalsiyum, fosfor ve magnezyumun sindirimine yardımcı olduğu belirtilmiştir (Haro ve ark., 2000). Polen, kemoterapi ile birlikte alındığında kanserin yan etkilerini tedavi edebilmektedir (Uçar ve ark., 2016). Polen tüketiminin ileri seviyedeki prostat kanserinin tedavisinde kullanılabileceği raporlanmıştır (Wu ve Lou, 2007). Kolon kanserine karşı önemli etkileri gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2013).

2.4 Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROS: Reaktif Oksijen Species) oluşumunu engellemek ve ROS kaynaklı tahribatları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidanlar denir (Şekil 2.9). Antioksidanlar, radikallerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini önlerler (haber ve Gülay, 2016) ve çeşitli mekanizmalarla etkilerini gösterirler (Gökpınar ve ark., 2006).

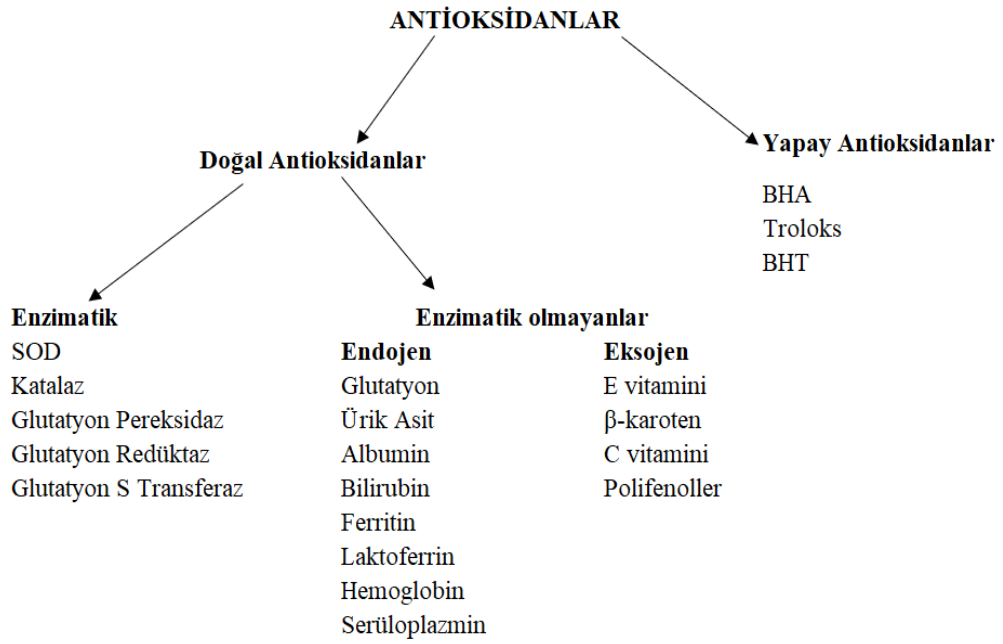
1) Temizleme (scavenging) Etkisi: Oksidanların zayıf bir moleküle çevrilip, daha az zararlı hale getirilmesidir.

2) Giderici (quencher) Etki: Serbest radikallere bir hidrojen aktararak olası etkilerinin ortadan kaldırılmasıdır.

3) Onarıcı (tamir edici) Etki: Oksidanların oluşturduğu hücre deformasyonlarının onarılmasıdır.

4) Zincir Kırıcı (chain breaking) Etki: Zincirleme devam eden tepkimeleri kırarak oksidanların fonksiyonlarının engellenmesidir. Hemoglobin ve vitaminler zincir kırıcı etki gösterirler.

Canlılarda oksijen hayatta kalmak için gereklidir. Kullandığımız oksijenin %5'i oksijen türevli serbest radikallere indirgenirler. ROS, yüksek derecede reaktif oksijen içeren moleküllerdir. ROS bileşikleri; membran lipitleri, nükleik asitler, proteinler, enzimler ve diğer küçük moleküller ile etkileşerek hücrede hasara sebep olurlar. Serbest radikaller, tek veya ortaklanmamış elektron içeren kimyasallar olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller vücuttaki sağlıklı hücrelere saldırarak, onların yapısını ve fonksiyonlarını kaybetmelerine sebep olurlar. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre hasarı vücutta birçok soruna neden olur. Antioksidanlar; lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonunu önleyerek, vücuttaki doku ve bileşiklerin serbest radikaller ve oksijen tarafından zarar görmesini engeller (Mohan ve ark., 2012.)



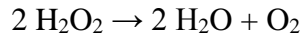
Şekil 2.9 Antioksidanların Sınıflandırılması (Ulusoy, 2010)

2.4.1 Doğal Antioksidanlar

2.4.1.1 Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1.1 Katalaz

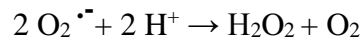
Hidrojen peroksitin dismutasyonundan sorumlu enzimatik bir antioksidandır. Hidroksil radikali oluşumunu, peroksiti su ve oksijene parçalayarak engeller (Kasapçopur Özel ve Birdane, 2014) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Hidrojen Peroksitin Katalaz Enzimi ile Su ve Oksijene Parçalanma Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.4.1.1.2 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizleyen bir antioksidandır. SOD antioksidanı, vücutta fazla oksijen kullanan dokularda daha aktif rol oynar (Kasapçopur Özel ve Birdane, 2014) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 SOD ile Süperoksit Radikalinin Hidrojen Peroksit ve Moleküler Oksijene Katalizlenme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.4.1.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

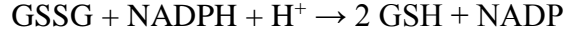
GSH-Px, H₂O₂'nin sebep olduğu oksidatif tahribata karşı hücreyi korur. Antioksidan dört selenyum atomu ihtiva eder (Sen ve Chakraborty, 2011) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 GSH-Px ile Hidroperoksitlerin İndirgenme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.4.1.1.4 Glutasyon Redüktaz

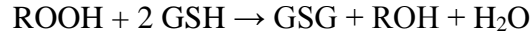
NADPH varlığında ortamdaki yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG), GSH'ye dönüştürür (Karabulut ve Gülay, 2016) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Yükseltgenmiş Glutasyonun, Glutasyon Redüktaz Enzimi Varlığında Glutasyona Dönüşme Reaksiyonu (Karabulut ve Gülay, 2016)

2.4.1.1.5 Glutasyon S Transferaz (GST)

Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler. Hücre içi detoksifikasyon sağlayan önemli bir enzimdir (Kasapçopur Özel ve Birdane, 2014) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 GST'nin Lipid Peroksitlerine Karşı Bağımsız GSH-Px Aktivitesi Gösterme Reaksiyonu (Yavaşer, 2011)

2.4.1.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.4.1.2.1 Endojen Antioksidanlar

- Glutasyon

Vücutta sistein, glisin ve glutamat tarafından en çok karaciğerde sentezlenmektedir. Serbest radikalleri direkt temizler ve glutasyon peroksidaz ile birlikte enzimatik etkisi vardır (Maher ve ark., 2008).

- Ürik Asit

Pürin metabolizmasının son ürünüdür. Vücutta çok güçlü bir şekilde serbest radikal temizleyicisi olarak görev alır (Karabulut ve Gülay, 2016).

- Albümin

Bakır sıklıkla bir şekilde bağlayarak metal yüzeyinde kalır. Albüminde meydana gelen tahribat, vücutta çok üretilmesi sebebiyle pek önemli değildir (Soriani ve ark., 1994).

2.4.1.2.2 Eksojen Antioksidanlar

- E Vitamini

Yağda çözünebilen bir antioksidan olan E vitamini, sekiz farklı stereoizomere sahiptir. Bu izomerlerden en biyoaktif olanı α -tokoferol, hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korur (Pham-Huy ve ark., 2008). α -tokoferol yağlarda, fındıkta ve tahıllarda bulunur. Glutasyon peroksidaz ve α -tokoferol, serbest radikallere karşı tamamlayıcı etki gösterirler. α -Tokoferol peroksitlerin sentezini engellerken, glutasyon peroksidaz peroksitleri ortadan kaldırarak α -tokoferolü tamamlayıcı etkisini bu şekilde gösterir (Masella ve ark., 2005).

- C Vitamini

Suda çözünebilen bir vitamindir. Askorbik asit adıyla da bilinmektedir (Li ve Schelhorn, 2007). Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerini temizleyerek oksidanların yarattığı hasarlara karşı etkili bir koruma sağlamaktadır (Carr ve Frei, 1999). İdeal özellikteki antioksidanların serbest radikal tahribatını önleyebilmesi için, hem suda hem de yağda çözünebilmesi gerekmektedir. E vitamini ile birlikte verilen askorbik asit, hem yağ ortamında hem de sulu ortamda etki gösterdiğinden, serbest oksijen radikallerini çok kuvvetli bir şekilde temizleyebilmektedir (Kasapçopur Özel ve Birdane, 2014).

- β -karoten

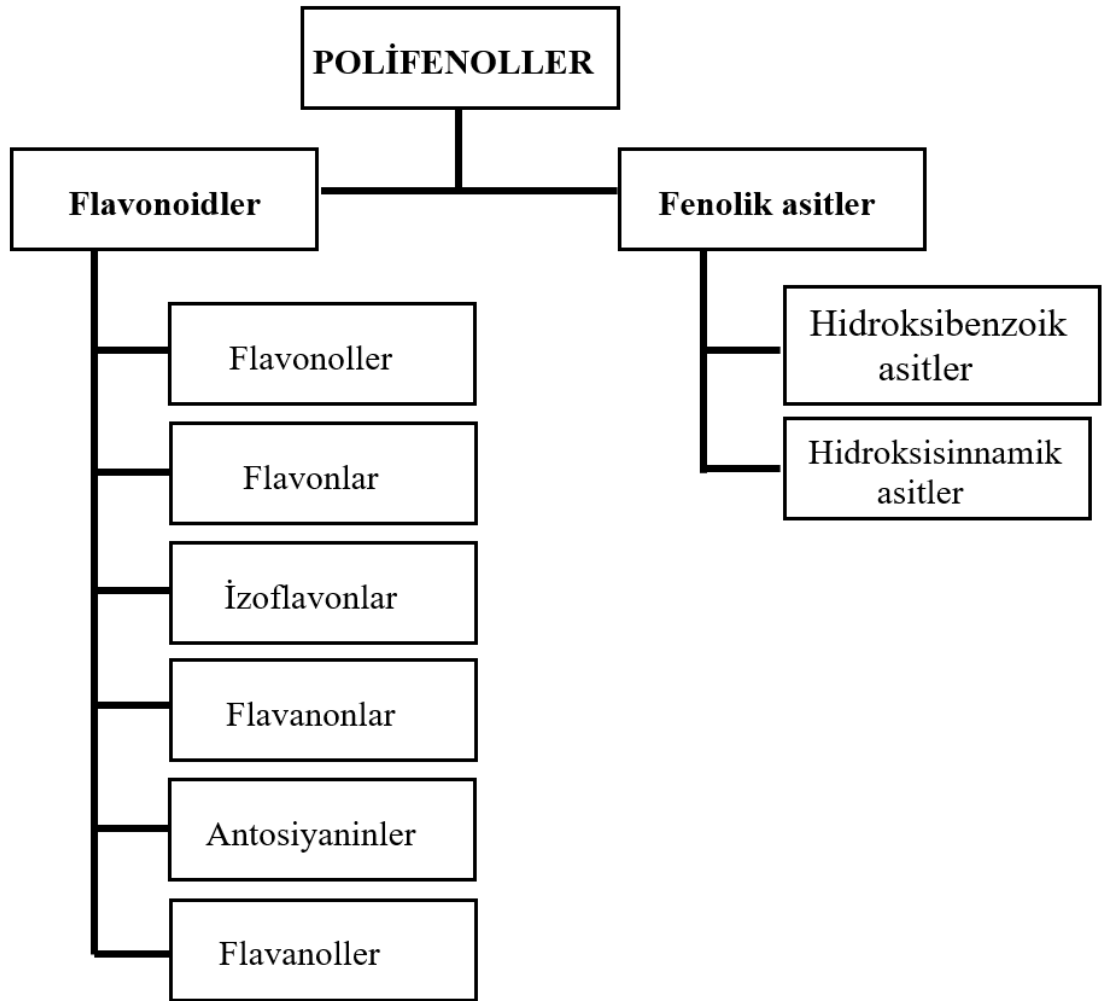
Karotenoidlerin yağda çözünebilen bir alt grubudur. A vitamininin ön maddesi olduğu için 'provitamin' şeklinde isimlendirilir (Pham-Huy ve ark., 2008). β -karoten, singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipidlerini oksidatif dejenerasyona karşı koruması sebebiyle antioksidan olarak nitelendirilmektedir (Çaylak, 2011).

- Polifenoller

Fenolik bileşikler ve polifenoller, bitkilerin sekonder metabolit ürünleri olmakla birlikte savunma mekanizmaları için çok önemlidir (Bravo, 1998). Serbest radikaller protein, karbohidrat, lipid ve DNA gibi moleküllerde oksidatif hasar meydana getirerek çeşitli rahatsızlıklara sebep olmaktadır (Alvarez-Suarez ve ark., 2012). Bu sebeple biyoaktif bileşiklerin, özellikle polifenollerin kalp-damar hastalıkları, kanser, diyabet ve obezite hastalıklarına pozitif etkileri araştırılmaktadır (Carocho ve Ferreira,

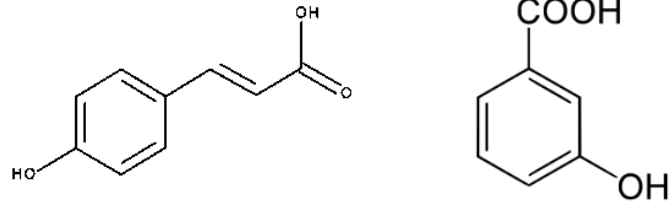
2013; Irondi ve ark, 2015). Ayrıca antimikrobiyal, antienflamatuar, antitümör ve insan sağlığına diğer yararlı etkilerini saptamak amaçlı polifenollerle ilgili pek çok çalışma vardır (Keckes ve ark., 2013).

8000'den fazla fenolik madde yapısı bilinmektedir. Flavonoidler ve fenolik asitler (benzoik ve sinnamik asit türevleri) polifenollerin en önemli grubunu oluştururlar (Robards ve ark., 1999) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Polifenollerin Sınıflandırılması (Yavaşer, 2011)

Fenolik asitlerin alt grubu olan hidroksi benzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısındadır (Şekil 2.16). Hidroksi benzoik asitlerden bazıları; şiringik asit, gallik asit, vanilik asittir. Diğer alt grup hidroksisinnamik asitler, C6-C3 fenilpropan yapısındadır. Hidroksisinnamik asitlerden bazıları: kafeik asit ve ferulik asittir. Halkaya bağlanan OH- grubunun lokasyonuna göre hidroksisinnamik asitler farklı özellikler gösterebilirler (Yavaşer, 2011).

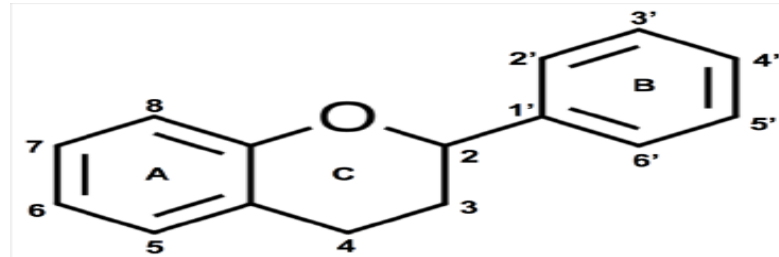


4-Hidroksisinnamik Asit

Hidroksibenzoik Asit

Şekil 2.16 Fenolik Asitlerin Temel Yapısı (Ulusoy, 2010)

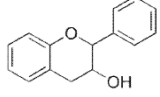
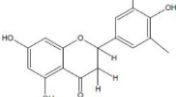
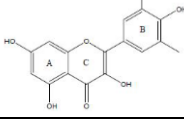
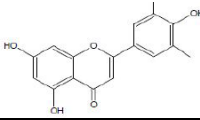
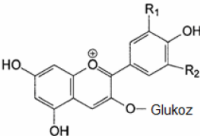
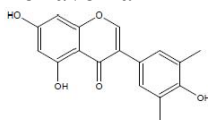
Polifenollerin bir diğer grubu olan **flavonoidler**; C6-C3-C6 yapısında, 15 karbon atomundan oluşan, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Kolaç ve ark., 2017) (Şekil 2.17). Flavonoidler içlerinde flavanoller, flavonoller, antosiyanidinler, flavanonlar, flavonlar ve izoflavonları içeren 13 alt grupta sınıflandırılabilirler (Robards ve ark., 1999).



Şekil 2.17 Flavonoid Molekülü Genel Yapısı (Ulusoy, 2010)

İnsan vücudu, flavonoidleri üretmez. Bu sebeple flavonoidlerin diyetlerle dışarıdan alınması gerekmektedir (Ulusoy, 2010). Flavonoidlerin bulunduğu çeşitli gıdalar şekil 2.18'de verilmiştir.



<p>Flavanoller</p> 	<p>Epikateşin Kateşin Epigallokateşin</p>	<p>Meyve çeşitleri, çay, çikolata</p>
<p>Flavanonlar</p> 	<p>Naringin Narinjenin Taksifolin</p>	<p>Turunçgiller, limon</p>
<p>Flavonoller</p> 	<p>Kuersetin Mirisetin</p>	<p>Soğan, brokoli, zeytin, çay üzüm, kırmızı şarap</p>
<p>Flavonlar</p> 	<p>Krisin Apijenin</p>	<p>Meyve kabuğu, maydonoz, kereviz</p>
<p>Antosiyanidinler</p> 	<p>Malvidin Apijenidin</p>	<p>Kırmızı üzüm, kırmızı şarap renkli meyveler ve kabukları</p>
<p>İzoflavonlar</p> 	<p>Genistin Daidzin</p>	<p>Soya fasülyesi</p>

Şekil 2.18 Flavonoid Çeşitleri ve Bulunduğu Gıdalar (Kolaç ve ark., 2017; Rice Evans ve ark., 1996; Yavaşer, 2011)

Flavonoidlerin, biyolojik, farmakolojik ve sağlık üzerine etkileri geniş çaplı bir şekilde incelenmektedir. Flavonoidlerin ve diğer bitki fenoliklerinin, radikal süpürücü aktiviteleri ve çok çeşitli biyolojik aktiviteleri çalışmalarla raporlanmıştır (Rice Evans ve ark., 1996). Bir çalışmada çayda bulunan flavonoidlerin, C vitamininden 20 kat daha fazla antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Craig, 1999). Flavonoidler başta olmak üzere polifenoller insan sağlığına birçok açıdan fayda sağlamakta ve hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle tüketilmesine dikkat edilmelidir.

2.4.2 Yapay Antioksidanlar

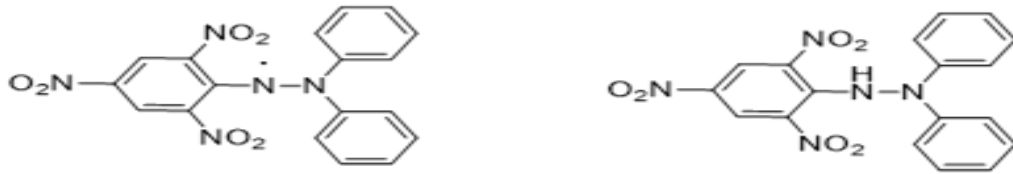
Ticari adı ile trolox (6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) E vitamininin suda çözünür bir formudur. Biyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda oksidatif stresi veya hasarı azaltmak üzere kullanılır. Bütil Hidroksi Toluen (BHT),

Bütil Hidroksi Anisol (BHA) sentetik madde olarak üretilir ve gıdalara tat, koku ve renk bozulmalarını engellemek amacıyla katılırlar.

2.5. Antioksidan Yöntemler ve Prensipleri

2.5.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite

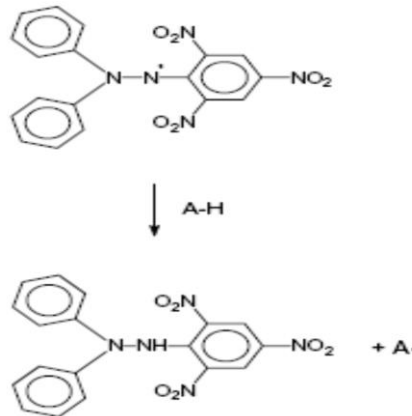
DPPH radikali (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest bir organik radikaldir. (DPPH: $C_{18}H_{12}N_5O_6$, MA=394.33 g/mol). DPPH Radikali süpürücü aktive yöntemi; 1958 yılında Blois tarafından serbest DPPH radikali kullanılarak, antioksidan aktiviteyi tayin etmek düşüncesiyle geliştirilmiştir. DPPH radikalindeki tek nitrojen atomu antioksidanlardan gelen bir hidrojen atomu ile hidrazine indirgenir (Kedare ve Singh, 2011) (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil ve 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazinin

Moleküler Yapıları

DPPH molekülü üzerinde delokalize bir elektron bulundurması sebebiyle serbest bir radikaldir. 520 nm'de etanoldeki çözeltisi absorbands verir ve radikalın koyu menekşe renginin artmasına sebep olur. DPPH radikali $Z\cdot$ ve donör molekül AH, birincil bir reaksiyonla ZH şeklinde indirgenmiş bir form oluşturur ve $A\cdot$ şeklinde serbest bir radikal ortaya çıkar (Şekil 2.20). Sonraki radikal tüm sitokiyometriyi kontrol eden bir dizi reaksiyona maruz kalır. Çözeltide radikalın indirgenmesiyle indirgenmiş yapı menekşe renginin açılmasına sebep olur (Blois, 1958).



Şekil 2.20 DPPH Radikalinin Kimyasal Yapısı ve A-H ile Reaksiyonu (Albayrak ve ark., 2010)

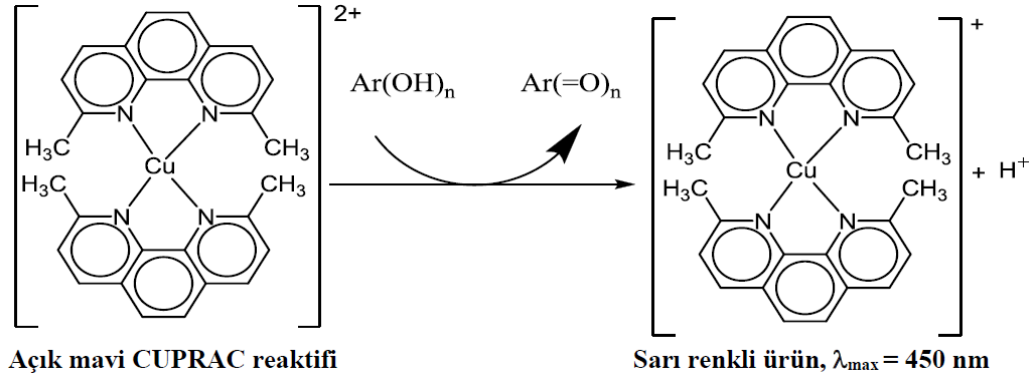
1995 yılında Brand-Williams ve arkadaşlarının metodu modifiye etmesiyle yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, Brand ve arkadaşları EC₅₀ değerini, başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunun %50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden değer olarak tanımlamıştır (Brand-Williams ve ark., 1995). Antioksidan aktivite arttıkça, EC₅₀ değerinin düşmesi beklenir. Yaygın bir şekilde kabul gören bir metot olmasına rağmen kısıtlı bir metottur. DPPH radikalinin diğer radikallerle etkileşime girebilmesi, Lewis bazlarına karşı hassas olması, sadece organik çözücülerde çözünebilmesi, basit bileşiklerle girişim yapması, metanol ve aseton içindeki çözeltisinde ışık altında absorbansının düşmesi gibi bazı dezavantajları vardır (Kedare ve Singh, 2011).

2.5.2 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Apak ve arkadaşları (2004) kromojenik bir yükseltgen olan Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifini kullanarak, flavonoidler, gıda polifenoller, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş bir alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan bu yöntem 2004 yılında dünya literatürüne Cupric Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) ismiyle geçmiştir.

Metot genel olarak antioksidan çözelti (direkt veya asit hidrolizinden sonra), bakır (II) çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi ve amonyum asetatın pH 7 tampon çözeltisi karışımlarının 30 dakika inkübasyonundan sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçümünün alınması esasına dayanmaktadır. Renk gelişimi, askorbik asit, gallik asit ve kuersetin gibi bileşikler için hızlıyken, narinjin ve narinjenin gibi bileşiklerde yavaştır. Bu durumda oksidasyonun tamamlanması için 20 dakika boyunca {[Cu(II)-Nc] reaktifinin ilavesinden sonra} 50 °C'deki su banyosunda inkübasyon yapılabilir.

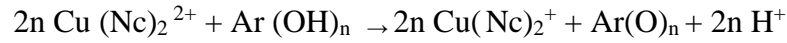
2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin Nc)'nin Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin [Cu(II)-Nc], 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] şelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 CUPRAC Yönteminin Kromojenik Oksidasyon Aracı Olan Cu(II)-Nc Reaktifinin Antioksidanlarla (Ar(OH)_n) Reaksiyonu Sonucu Cu(I)-Nc Renkli Şelatının Oluşumu (Apak ve ark., 2004)

Yöntemde fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc şelatı 450 nm’de maksimum absorbans gösterir. Oluşan renk, metal→ligand yönündeki yük aktarımının sonucudur. Bu reaksiyonda, (OH)_n grubu içeren antioksidanlar, teorikte 2n-e⁻ donörü olarak hareket eder.

CUPRAC yönteminde kullanılan bis(neocuproin)-Cu(II) klorür ile antioksidan arasındaki reaksiyon şekil 2.22’de gösterildiği gibidir (Apak ve ark., 2004).

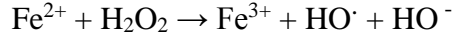


Şekil 2.22 Bis (Neocuproin)-Cu (II) Klorür İle Antioksidan Arasındaki Reaksiyon (Apak ve ark., 2004)

Bu metot, diğer elektron transferi bazlı yöntemlere göre çok belirgin avantajlara sahiptir. Basitliği, kullanışlılığı, kullanılan reaktiflerin stabilitesi, geniş konsantrasyon aralıklarındaki tekrarlanabilirliği, çalışma pH’ı seçiciliği (Folin ve FRAP metotlarının aksine), hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilirliği (Folin ve DPPH yöntemlerinin aksine), reaksiyon kinetiklerinin bazı yöntemlerden daha hızlı olması (FRAP yöntemi), yiyeceklerde bulunan şeker ve sitrik asidi etkilemeden antioksidanları seçici bir şekilde yükseltgeyebilme özellikleri sebebiyle dünya çapında kabul gören bir yöntem olmuştur. Yöntem çeşitlemeleri ile birlikte çok sayıda atıf almıştır ve dünyada önemli gıda antioksidan araştırmaları yapan laboratuvarlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Apak ve ark., 2007).

2.5.3 Metal Şelatlama Aktivitesi

Demir bileşikleri, Fenton reaksiyonları ile serbest radikaller oluştururlar (Şekil 2.23). Fe^{2+} iyonlarının yüksek reaktivitesinden dolayı lipit oksidasyonuna sebep olduğu bilinmektedir (Gülçin, 2005).



Şekil 2.23 Fenton Reaksiyonu (Gülçin, 2005)

Antioksidanlar serbest demiri bağlayarak, serbest demirin olası etkilerini ortadan kaldırırlar ve böylece Fenton reaksiyonları sonucu ortaya çıkan serbest radikal oluşumu engellenmiş olur. Bu sebeple metal şelatlama aktivitesi antioksidan kapasiteyi belirlemede oldukça önemli bir yöntemdir (Arora ve ark, 1998).

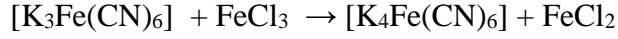
Başka bir şekilde ifade edersek metal şelatlama aktivitesi, ortamdaki Fe^{2+} iyonlarının inhibisyonu ile ölçülür. Antioksidan maddedeki şelat ajanlarının demir iyonunu şelatlaması ve sonrasında ortamdaki kırmızı rengin azalmasını içerir (Mathew ve Abraham, 2006).

Antioksidanların yüksek metal şelatlama aktivitesi göstermesi, insan sağlığı açısından faydalıdır. Vücutta metal iyonlarının fazlalığı çeşitli anomalilere yol açabilir. Metal iyon geçişleri, vücutta oksidatif hasara neden olurlar ve bu hasar Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik dejeneratif bozuklukları meydana getirir. Bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi çok önemlidir.

Metal şelatlama yöntemi, şelatlama terapisi ismi ile de bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Şelatlama terapisi, nötralize demir iyonu yüklemesiyle talasemi ve diğer anemilerin tedavisi için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Mevcut durumda şelatlama aktivitesi için kullanılan sentetik bileşiklerin yan etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle metal iyonlarının bitkisel ilaçlar ile şelatlanması yönteminin geliştirilmesi terapötik açıdan önem taşımaktadır (Sudan ve ark., 2014).

2.5.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi

Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına indirgenmesini temel alan bir antioksidan aktivite tayin yöntemidir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, onun potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir ayrıdır (Benslama ve Harrar, 2016). Yöntemde çözeltinin sarı renginin, bileşiklerin indirgeme gücüne bağlı olarak mavi ya da yeşilin farklı tonlarına dönüşmesi aşağıdaki reaksiyonla gözlemlenir (Jayanthi ve Lalitha, 2011).



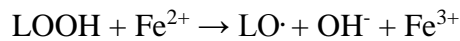
Şekil 2.24 Fe³⁺ İyonlarının Fe²⁺ İyonlarına İndirgenme Reaksiyonu (Jayanthi ve Lalitha, 2011)

Metotta indirgeyicilerin varlığında, Fe³⁺-ferrisiyanür kompleksinin Fe²⁺ iyonuna dönüşümü kullanılmaktadır (Şekil 2.24). Maksimum absrobans 700 nm'de Prusya mavisi rengi gözlemleyerek, Fe³⁺ iyonu konsantrasyonunu tespit etmek mümkündür (Jayanthi ve Lalitha, 2011). İndirgeyici gücü olan bileşikler elektron donörü olarak davranırlar ve oksitlenmiş lipid peroksidasyon işlemlerini azaltabilirler. Böylece birincil ve ikincil antioksidan rolü üstlenirler (Sudan ve ark., 2014). Bir bileşiğin indirgeyici gücü o bileşiğin redoks reaksiyonundaki elektron transfer kapasitesine işaret eder. Bunun sonucunda serbest radikallerin daha az reaktif ya da inert ürünlere dönüştürülmesine yol açar. Antioksidanların indirgeyici kapasitesi, polifenoller ve flavonoidler gibi bileşiklerin elektron transfer etme özelliklerine bağlıdır. Birçok çalışma bitki ekstralarının güçlü bir indirgeme kapasitesi olduğunu göstermektedir. Diğer yandan birçok araştırmacı, polifenol yapı ile demir iyonu indirgeyici kapasite arasında bir ilişki olduğunu raporlamıştır. Fenolik bileşikler serbest radikalleri yakalama, lipid peroksidasyonunu engelleme ve indirgeyici etkileri sebebiyle antioksidan olarak adlandırılırlar (Benslama ve Harrar, 2016).

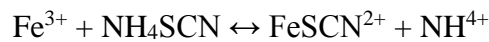
2.5.5 Ferrik Tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemi

Metot, linoleik asidin (LOOH) fosfat tamponu ile karıştığı ortamda 37 °C'de inkübasyonu ile oluşan peroksit miktarının ölçümüne dayanır.

Peroksit ile demir(II) klorür tepkimeye girer ve Fe²⁺, Fe³⁺ e yükseltgenir (Şekil 2.25). Fe³⁺ NH₄SCN ile tepkimeye girerek kırmızı renkli FeSCN²⁺ kompleksi oluşur (Şekil 2.26). 500 nm'de absorbans ölçümü alınır. Kırmızı renk arttıkça absorbans da artacaktır (Zahin ve ark., 2009). Antioksidan varlığında lipid peroksit ürünü meydana gelemeyeceği için ortamdaki peroksit miktarı ne kadar yüksek ise antioksidan aktivite o kadar düşüktür (Yavaşer, 2011).



Şekil 2.25 Peroksit ile Demir(II) Klorür Reaksiyonu (Yavaşer, 2011)



Şekil 2.26 Oluşan Fe³⁺ İyonlarının NH₄SCN ile Reaksiyona Girerek FeSCN²⁺ Oluşturması (Yavaşer, 2011)

2.5.6 Fitokimyasal Yöntemler

2.5.6.1 Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Tayini (Folin Ciocalteu) Yöntemi

Bitkiler bir veya daha fazla asidik hidroksil grubunun fenil halkasına bağlı olduğu çok çeşitli fenolik metabolitler üretirler. Hidroksisinamik asitler, flavonoidler, antosiyaninler ve taninler fenolik sınıfının büyük çoğunluğunu temsil ederler. Fenolik bileşikler mükemmel oksijen radikali süpürücüsüdürler. Çünkü fenolik radikallerin elektron indirgeme potansiyeli, oksijen radikallerinin elektron indirgeme potansiyelinden daha düşüktür.

Gıdalarda ya da biyolojik örneklerde toplam fenolik bileşiğin miktarını tespit etmek için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler genellikle kolorimetrik bir reaktif ve fenolik bileşiklerin reaksiyonu ile spektrumun görünür bölgesindeki bir ölçüme dayanır. Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi gıda ürünleri ve ek besinlerin antioksidan kapasitelerinin rutin kalite kontrolü ve ölçümü için kullanılan standart bir metottür. Metot; alkali ortamda fenolik bileşiklerden, fosfomolibdik/fosfotungstik asit kompleksine elektron transferine dayanır. Mavi renkli kompleks, 760 nm'de spektroskopik olarak tespit edilir. Standart kimyasal olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri cinsinden verilir.

FC metodunun yorumlanmasında en çok ortaya çıkan sorun, örnekteki diğer oksidasyon substratlarının girişim yapabileceğidir. Singleton ve Rossi, askorbik asitin FC reaktifi ile reaksiyona girebileceği ihtimali üzerinde durmuş ve bu yöntemi şaraplarda fenolik madde tespiti yapmak amacıyla geliştirmişlerdir (Singleton ve Rossi, 1965). FC kimyasının genel doğası sebebiyle, yöntemde toplam fenoller ve diğer oksidasyon substratlarının ölçümü mevcuttur. Yine de FC yöntemi basit, tekrarlanabilir olması açısından fenolik bileşen tayini çalışmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ainsworth ve Gillespie, 2007).

2.5.6.2 Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Yöntemi

Flavonoidler, C₆-C₃-C₆' yapısında, 15 karbon atomundan oluşan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Kolaç ve ark., 2017). Flavonoidler, hastalıklarla savaşmada insan sağlığına faydalı olduğundan kuvvetli antioksidanlardır. Flavonoidlerin antioksidan kapasitesi moleküler yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu

ve kimyasal yapıdaki diğer özellikler flavonoidin antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleri için önemlidir (Pallab ve ark., 2013).

Metodun prensibi alüminyum klorürün C-4 keto gruplarıyla veya flavon-flavonoidlerin C-3 veya C-5 hidroksil gruplarıyla sabit kompleksler oluşturmasıdır. Kullanılan metot kolorimetrik bir metottur. Çalışmalarda, bitki örneği ekstralarında toplam flavonoid ölçümü için kuersetinin uygun bir referans olduğu raporlanmıştır. Bu nedenle çeşitli konsantrasyonlardaki kuersetin çözeltileri standart kalibrasyon eğrisini çizmek üzere kullanılır (Bag ve ark., 2015).

2.6 Önceki Çalışmalar

Rebiai ve Lanez, (2012) 2010-2011 yıllarında Kuzeybatı Cezayir'deki 5 farklı bölgeden kurutulmuş arı poleni toplamışlardır. Molibdat iyonu indirgeme metodu kullanılarak toplam fenolik bileşikler, flavonoidler ve antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin ortalama değeri 30.46 ± 8.22 mg GAE/g polendir. Molibdat iyon indirgeme metodu kullanılarak $71.95-101.5$ µg GAE/g polen değerleriyle yüksek bir antioksidan aktivite gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre arı polenin metanol ekstraktının doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği ortaya çıkmıştır.

Carpes ve ark., (2007) yaptıkları bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki etanol ile hazırlanan polen ekstralarında, antioksidan aktivite ve fenolik içerik saptamışlardır. %40 ve %90 arasında hazırlanan etanol ekstralarının fenolik bileşik içeriğinde farklılıklar vardır. %60, %70 ve %80 oranında etanol ile hazırlanmış polen ekstraları daha yüksek antioksidan etki göstermesine rağmen ekstralar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Toplam fenolik miktarı Slagoas State poleni için 3.6 dan 8.1 mg'a, Parana State poleni için 6.6'dan 10.9 mg'a GAE/g düzeyinde bulunmuştur. En yüksek düzeyde antioksidan aktivite %60 Parana State polenin etanol ekstresinde bulunmuştur. Sonuçlara bakılarak farklı orandaki ekstraların farklı fenolik bileşen içermesi nedeniyle farklı antioksidan aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Morais ve ark., (2011) Portekiz doğal parklarından topladıkları beş farklı polen örneğinde, Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak fenolik bileşik içeriğini 10.5 ve 16.8 mg GAE/g polen olarak bulmuştur. DPPH radikali süpürme aktivitesi ise en yüksek olarak EC_{50} : 2.16 mg/ml olarak gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında arı

polenin sağlıklı bileşiklerin önemli bir kaynağını oluşturduğu ve hastalıklardan korunmada faydalı olabileceği düşünceyi desteklenmiştir.

LeBlanc ve ark., (2009) Sonoran Çölü'nden topladıkları 6 farklı polen örneğinde 8 farklı çözücü ile hazırladıkları örneklerde DPPH ve FRAP analizleri uygulamıştır. Standart olarak troloks, gallik asit ve α -tokoferol kullanılmıştır. Mimoza poleni en yüksek antioksidan etkiye sahiptir. Toplam polifenoller, flavanoller, flavonlar tespit edilmiş ve sonuçlar gallik asit, kuersetin, narinjenin miligramı cinsinden raporlanmıştır. Antioksidan aktivite ve fenolikler arasında iyi bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir.

Leja ve ark., (2005) 12 bitki örneği arı polenin fenolik bileşiklerini ve antioksidan kapasitelerini saptamışlardır. Polenlerde fenolik bileşik seviyesi 82.4-12.9 mg/g polen arasında, flavanol içeriği ise 1.7- 13.4 mg/g polen arasında saptanarak büyük bir çeşitlilik göstermiştir. Radikal süpürücü aktivite (%8.6-91.5 DPPH nötralizasyonu), hidroksil radikali süpürücü aktivite (%10.5-98 deoksiriboz bozunma inhibisyonu) testlerinin kendi içlerinde büyük farklar mevcuttur ve çalışılan bütün örneklerde bu test sonuçları ve fenolik bileşik içeriği arasında direkt bir ilişki saptanmamıştır. Toplam antioksidan aktivite farklılık gösterse de çoğu polende antioksidan aktivite yüksek ve fenil propanoid seviyesi ile uyumludur. Bitki örneklerinin çoğunda arı polenin antioksidan kapasitesinin çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Pascoal ve ark., (2011) İspanya ve Portekizden topladıkları 8 çeşit ticari polen ile bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu 8 çeşit polene DPPH radikali süpürücü aktivite analizi ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu analizleri yapılmıştır. Örnekler içinde en yüksek fenolik değer 32.15 \pm 2.12 mg GAE/g polen, en düşük fenolik değer 18.55 \pm 0.95 mg GAE /g polen, en yüksek flavonoid değer 10.14 \pm 1.57 mg CAE/g polen, en düşük flavonoid değer ise 3.92 \pm 0.68 mg CAE/g polen olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre bu çalışmada fenolik bileşikler ile antioksidan aktivite arasında güçlü bir ilişki olmadığı açığa çıkmıştır.

Temizer ve ark., (2018) Türkiye'de farklı 7 şehirden topladıkları polen çeşitleri üzerinde toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, hidrojen peroksit süpürücü aktivite, demir indirgeme gücü, radikal süpürücü aktivite, metal şelatlama aktivitesi metotlarını çalışmışlardır. Toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, hidrojen

peroksit süpürücü aktivite, demir indirgeme gücü, radikal süpürücü aktivite, metal şelatlama aktivitesi çalışmasının sonuçları sırasıyla 1360.70-2981.34 mg GAE/100 g polen, 74.23-111.74 mg kafeik asit eşdeğeri/100 g polen, 25.56-30.28 µg/ml, %71.92-73.86, 52.26-53.27 µg/ml ve %43.97-65.21 olarak elde edilmiştir. BHA, BHT ve tokoferol standartlarına karşı çalışıldığında hidrojen peroksit süpürücü aktivite, demir indirgeme gücü ve radikal süpürücü aktivite çalışmalarında polen örnekleri etkili bir antioksidan aktivite göstermişlerdir.

Jin ve ark., (2018) 2016 yılı Temmuz ayında Changbai Dağı, Kuzey Jilin ve Çin'den arı polenleri toplamışlardır. Topladıkları polenleri su ve metanolde çözmüşlerdir ve bu polen ekstralarına *in-vitro* koşullarda DPPH radikali süpürücü aktivite, O₂ radikali süpürücü aktivite ve Demir indirgeme gücü testlerini; *in-vivo* koşullarda ise süperoksit dismutaz, lipid peroksidasyonu ve toplam antioksidan kapasite tayini testlerini uygulamışlardır. Sonuçlara bakıldığında *in-vitro* koşullardaki metanol ekstraları daha yüksek antioksidan aktivite göstermişlerdir. Hayvan deneylerinde süperoksit dismutaz ve toplam antioksidan kapasite doza bağlı olarak yükselmiştir. Sonuçlar ıhlamur arı poleni metanol ekstresinin doğal bir antioksidan kaynağı olarak fayda sağlayacağına işaret etmektedir.

Marghitas ve ark., (2009) Romanya'nın farklı bölgelerinde topladıkları 12 adet arı poleninde antioksidan kapasite ve toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği araştırılmıştır. DPPH radikal süpürücü aktivite, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite ve demir indirgeme gücü testleri uygulanmıştır. Toplam fenol içeriği 4.4 mg GAE/g-16.4 mg GAE/g polen arasında, toplam flavonoid içeriği 0.6 mg QE/g -13.6 mg QE/g polen arasında, DPPH değerleri 0.135- 2.814 mmol Troloks/g polen , TEAC (Troloks eşdeğeri Antioksidan Kapasite) metodu sonuçları 0.546 mmol Troloks/g - 6.838 mmol Troloks/g polen ve (FRAP) sonuçları ise 0.255-5.355 mmol Fe (II)/g polen arasında tespit edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında antioksidan aktivite ve farklı botanik orjinli polenlerin toplam polifenol içeriği arasında büyük bir değişkenlik mevcuttur. Bu sonuçlar ışığında antioksidan aktivitenin her bir tür için farklı olduğu ve toplam fenolik bileşen içerikleri ile net bir şekilde ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Şahin ve ark., (2014) Karadeniz bölgesinden topladıkları on farklı deli bal örneğinde antioksidan aktivite tayini ve Grayanotoksin-III tayini yapmışlardır. Grayanotoksin-

III tayini LC-MS/MS cihazında yapılmıştır. Sonuçlar arasında 7 numaralı bal örneğinin Grayanotoksin-III miktarı 68.754 µg/g bal sonucuyla en yüksek seviyede bulunmuştur. Topladıkları örnekleri metanolde çözerek antioksidan aktivite analizleri yapmışlardır. Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılmış sonuçlar 0.134-0.606 GAE/g bal, FRAP sonuçları 0.619-1.606 µmol Troloks/g bal, ABTS ve DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçları sırasıyla 0.302-0.918 ve 0.030-0.097 g/ml bulunmuştur. Balların radikal süpürücü aktiviteleri her iki yöntemde de trolokstan daha düşük çıkmıştır. Çalışılan on örnek arasında 3. örnek FRAP, ABTS, DPPH ve toplam fenolik madde değerleri açısından en yüksek antioksidan aktiviteye sahip bulunmuştur.

Kurtoğlu ve ark., (2014) 2010, 2011 ve 2012 yıllarında 3 yıl boyunca Karadeniz’de 7 bölgeden topladıkları 178 deli bal örneğinde nem, asitlik, prolin içeriği, HMF, diastaz sayısı, şeker kompozisyonu, toplam fenolik madde, radikal süpürücü aktivite ve grayanotoksin tayini analizleri yapmıştır. Yapılan grayanotoksin tayini analizinde ortalama sonuçlar GTX I ve GTX 3 için sırasıyla 0.4 ± 1.69 ve 8.20 ± 1.93 mg/kg bal tespit edilmiştir. Antioksidan aktiviteyi ölçmek amacıyla yaptıkları antioksidan aktivite testlerinde toplam fenolik madde ortalaması 2010 yılında 131 ± 6.55 , 2011 yılında 87.7 ± 4.04 ve 2012 yılında 108 ± 7.63 mg/kg bal tespit edilmiştir. Radikal süpürücü aktivite ortalamaları 2010 yılında $\%84.3 \pm 3.60$, 2011 yılında $\%76.3 \pm 2.51$ ve 2012 yılında $\%91 \pm 1.02$ olarak tespit edilmiştir.

Silici ve ark., (2010) Karadeniz bölgesinden elde edilen 50 adet deli bal örneğinde Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde içeriği, fosfomolibden yöntemi ve DPPH radikali süpürücü aktivite analizleri yapmıştır. Yapılan analizler sonucunda toplam fenolik madde içeriği 0.24-141.83 mg GAE/100 g bal olarak bulunmuştur. Balların antioksidan aktivitesi 12.76-80.80 mg AAE/g (Askorbik Asit Eşdeğeri) bal olarak tespit edilmiştir. Radikal süpürücü aktivite ise $\%2.3$ ile 90.73 arasında saptanmıştır. Bal en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*’e karşı göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında deli balın insan sağlığını koruyacak antibakteriyel ve antioksidan bir ajan olduğu ortaya konmuştur.

Malkoç ve ark., (2016) deli balın nektar kaynağı olan *Rhododendron Ponticum*'u kimyasal olarak karakterize etmiş ve toplam fenolik madde, antioksidan özellikler açısından incelemiştir. Antioksidan aktivite, ABTS ve DPPH radikali süpürücü aktivite bakımından iki farklı yöntemle incelenmiştir. Fenolik asit ve flavonoidler yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile tespit edilmiştir. Çiçeklerin metanol ekstreleri yapraklarla kıyaslandığında 349.53 ± 0.346 mg GAE /100 g ekstre ile en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip bulunmuştur. Toplam flavonoid içeriği 311.16 ± 1.669 mg QE/100 g ekstre , IC₅₀ değeri bakımından DPPH 1.23 mg/ml, ABTS ise 1.30 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Gök Uğur ve ark., (2015) Karadeniz Bölgesinde, Ordu İlinde, Göğüs Hastalıkları Polikliniği'nde deli bal kullanımı ile ilgili araştırmaya katılmayı kabul eden 353 hasta ile bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada hastaların deli balı astım, mide ve bağırsak rahatsızlıkları, hipertansiyon ve öksürük durumunda kullandığı ve deli bal kullanan hastaların bir kısmının zehirlenme yaşadığı belirlenmiştir. Deli bal zehirlenmesinde görülen semptomlar alınan doza bağlı olarak, kişiden kişiye değişmekte ve bazı durumlarda farklılık gösterebilmektedir. Bu kapsamda, araştırmada deli bal tüketimi fazla olan kişilerin zehirlenme durumu yaşadığı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda sağlık profesyonellerinin halka deli balın vücuttaki etkileri ve riskleri konusunda eğitim ve danışmanlık yapması önerilmektedir.

Koca ve ark., (2007) deli bal hakkında verdikleri bir brifingte şu bilgileri vermişlerdir. *Ericaceae* ailesinden bitkiler insanları zehirleyen grayanatoksinleri üretmektedirler. Bu zehirlenmeler genellikle *Rhododendron* nektarlarından meydana gelmektedir. Türkiye'de çok görülen bir zehirlenmedir. Genellikle deli bal tüketimindeki doz aşımı sebebiyle meydana gelmektedir. Deli bal zehirlenmesinin belirtileri bulantı, kusma, halsizlik, terleme, aşırı tükürük gibi etkilerdir. Zehirlenme etkileri nadiren ölümcüldür ve 24 saatten fazla sürmez. Halk sağlığı için olumsuz etkileri görülse de deli balın kimyasal yapısı ve deli bal zehirlenmesinin önlenmesi gibi konularda çok detaylı bilgiler mevcut olmadığı için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM



3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

2, 2-Difenil-1-pikrillhidrazil (DPPH)

Bakır(II) klorür (CuCl_2)

Demir(II) klorür (FeCl_2)

Demir(III) klorür (FeCl_3)

Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]

Trikloroasetik asit (CCl_3COOH)

Aluminyum(III) klorür (AlCl_3)

Ferrik Tiyosiyanat (FTC: $\text{C}_3\text{FeN}_3\text{S}_3$)

Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4)

Disodyum fosfat (Na_2HPO_4)

Polisorbat 20 (Tween-20)

Hidroklorik asit (HCl)

Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

Amonyum tiyosiyanat (NH_4SCN)

Etilendiamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA)

Sodyum nitrit (NaNO_2)

Aluminyum klorür (AlCl_3)

Sodyum hidroksit (NaOH)

Sodyum karbonat (Na₂CO₃)

Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)

3-(2-Pikridil)-5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin)

(±)-6-Hidroksil-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks)

2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol (Tris)

Rezorsinol (1,3-Dihidroksibenzen)

Gallik asit (3,4,5-Trihidroksibenzoik asit)

Folin–Ciocalteu reaktifi (Fosfomolibdat ve fosfotungistatin bir karışımıdır.)

Kuersetin [2-(3,4-Dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 3,3',4',5,6-Pentahidroksiflavon)]

Linoleik asit (cis-9, cis-12-Oktadekandioik asit)

Askorbik asit (Vitamin C)

Neokuproin (2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin)

Etanol

Metanol

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler

‘Wise Stir MSH-20A’ ve ‘Heidolph MR’ marka **ısıtıcı manyetik karıştırıcı** sadece karıştırma fonksiyonuyla oda sıcaklığında ve tampon ile diğer çözeltilerin hazırlanması sırasında kullanıldı.

‘Sartorius Arium’ marka **saf su cihazı** antioksidan aktivite çalışmalarında, ekstraksiyon işlemlerinde kullanılacak saf suyun hazırlanmasında ve antioksidan yöntemler için kullanıldı. Ultra saf su için Merck Milli-Q saf su sistemi kullanıldı.

‘Ohaus Pioneer’ marka **hassas terazi** tüm tartım işlemlerinde kullanıldı.

‘Nuve ST30’ marka **çalkalamalı su banyosu** (Ankara, Turkey) inkübasyon işlemleri için kullanıldı.

Solüsyonlar ‘Velp Scientifica Tx4 Digital’ (Usmate, Italy) marka **IR sensörlü vortex karıştırıcı** kullanılarak vortekslendi, tam çözünme için ve bazı testlerde inkübasyon amaçlı da kullanıldı.

‘MPW-351R Laboratory Centrifuge’ (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) marka cihaz **santrifüj** işleminde kullanıldı.

Her bir antioksidan yöntemde absorbans tayini uygun dalgaboyu ayarlanarak ‘Epoch 2 Microplate **spektrofotometre**’ (BioTek, Winooski, USA) marka cihaz kullanılarak ölçüldü.

Ekstrelerin çözücülerini **döner buharlaştırıcı** ‘Heidolph-2’ ve onun ekipmanı ‘Heidolph Rotavac Vario pumping unit’ marka cihaz kullanılarak buharlaştırıldı.

FTIR spektroskopik çalışmaları ‘Shimadzu IR Affinity-1’ marka ATR ekipmanlı FTIR spektrometresi ile 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yapıldı.

UV-Vis spektroskopik analizleri ‘Shimadzu UV-1800’ marka spektrofotometre kullanılarak 200-900 nm dalga boyu aralığında, 1.5 mg/3 ml konsantrasyondaki su ve etanol ekstralarında yapıldı.

3.3 Polen Materyalinin Temini

Arı polenleri; 2017 yılının Mayıs-Haziran aylarında Sinop-Ayancık Meştan köyü 41°51'12.1"N 34°32'12.0"E lokasyonunda, 446 m rakımdan, Ordu-Altınordu Ortaköy mahallesinde 40°49'25.7"N 37°58'55.6"E lokasyonunda, 945 m rakımdan, Giresun-Merkez Hamidiye Köyü 40°49'43.7"N 38°15'59.3"E lokasyonunda, 594 m rakımdan, Trabzon-Vakfikebir Dereğözü Köyü 41°00'52.6"N 39°21'22.2"E lokasyonunda, 473 m rakımdan polen tuzakları ile arıcılar tarafından toplandı.

3.4 Polenlerin Tanımlanması, Ayıklanması ve Kurutulması

Taze arı polenleri mikroskop altında tanımlama ve ayıklama işlemlerinin ardından takiben Ordu Arıcılık Araştırma Enstitüsü atölyesinde yapılan tepsili kurutucuda 40 °C’de kurutuldu. Kurutulduktan sonra ekstraksiyon işlemi yapılmaya kadar +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi. Örneklerin bekletilmemesine özen gösterildi.

3.5 Polenlerin Ekstraksiyon Çalışmaları

Ordu, Giresun, Trabzon ve Sinop illerinden temin edilen *Rhododendron Ponticum* arı poleni örnekleri hassas terazide tartıldı. Tartılan örnekler için çözücü olarak hem saf

su, hem de etanol kullanıldı. Polen örneklerine ait ekstreler, uygun hacimlerde saf su ve etanol ekstreler hazırlandı. Analiz işlemlerinde karışıklığı önlemek amacıyla polen ekstreleri kodlandı (Çizelge 3.1). Tüm ekstreler derin dondurucuda muhafaza edildi.

Çizelge 3.1 Polen Ekstrelerinin Kodlanması

Polen Kodu	Polen Ekstresi İçeriği
P1	Sinop Arı Poleni Su Ekstresi
P2	Ordu Arı Poleni Su Ekstresi
P3	Giresun Arı Poleni Su Ekstresi
P4	Trabzon Arı Poleni Su Ekstresi
P5	Sinop Arı Poleni Etanol Ekstresi
P6	Ordu Arı Poleni Etanol Ekstresi
P7	Giresun Arı Poleni Etanol Ekstresi
P8	Trabzon Arı Poleni Etanol Ekstresi

P1 5.08 g kuru polen üzerine 50.8 ml saf su, **P2** 5 g kuru polen üzerine 50 ml saf su, **P3** 2.6 g kuru polen üzerine 26 ml saf su, **P4** 4.21 g kuru polen üzerine 42.1 ml saf su, **P5** 5 g kuru polen üzerine 50 ml etanol, **P6** 4.96 g kuru polen üzerine 49.6 ml etanol, **P7** 2.5 g kuru polen üzerine 25 ml etanol ve **P8** 5.03 g kuru polen üzerine 50 ml etanol eklenerek 24 saat boyunca Wise Stir MSH-20A ve Heidolph MR ısıtıcılı manyetik karıştırıcılar kullanılarak 300 rpm devirde oda sıcaklığında karıştırıldı. Örnekler 24 saat karıştırıldıktan sonra süzüldü. Polenlerin üzerine **P1** için 25.4 ml saf su, **P2** için 25 ml saf su, **P3** için 13 ml saf su, **P4** için 21.05 ml saf su, **P5** için 25 ml etanol, **P6** için 24.8 ml etanol, **P7** için 12.5 ml etanol ve **P8** için 25 ml etanol daha eklenerek 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 300 rpm devirde oda sıcaklığında karıştırıldı. 48 saat süren karıştırma işleminden sonra örnekler süzülerek ekstreler birleştirildi. **P1-P8** ekstreleri döner buharlaştırıcı kullanılarak 30 °C sıcaklıkta, gerektiğinde pompa kullanılarak (su ekstreleri için) çözücüleri uçurulup polen özütleri elde edildi. Ardından cihazın vakum pompası kullanılarak arı poleni ekstrelerinde kalabilecek çözücüler tamamen uzaklaştırıldı.

3.6 Verim Tablosu

Ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen **P1-P8** polen ekstralarında polen ekstrat miktarı ve % verimler çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Polen Örneklerinin % Verim Hesapları

Polen Kodu	Kuru Bitki Materyali Miktarı (g)	Ekstrakt Miktarı (g)	% Verim
P1	5.08	2.33	45.0
P2	5.0	2.56	51.20
P3	2.60	0.59	22.60
P4	4.21	2.34	52.06
P5	5.0	1.44	28.80
P6	4.96	1.25	25.20
P7	2.50	0.35	14.0
P8	5.03	1.31	26.04

3.7 Antioksidan Aktivite Tayin Çalışmaları

3.7.1 Çözelti Hazırlama

3.7.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Çözeltileri

-0.25 mM DPPH Çözeltisinin Hazırlanması

5 mg 2, 2-Difenil-1-pikrillhidrazil 50 ml etanol içinde çözülerek hazırlanır. Karanlıkta saklanır ve günlük olarak kullanılır.

3.7.1.2 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

-Çözeltileri

-0.01 M Bakır(II) klorür Çözeltisi Hazırlanması

67.22 mg Bakır(II) klorür 50 ml saf su içinde çözülerek hazırlanır.

- 7.5×10^{-3} M Neocuproin Çözeltisi Hazırlanması

78 mg Neocuproin 50 ml etanol içinde çözülerek hazırlanır ve serin bir ortamda muhafaza edilir.

-1 M Amonyum asetat Tamponu Hazırlanması

7.7 g Amonyum asetat 80 ml saf su içerisinde çözülür ve pH ayarlanır. Bu amaçla seyreltik (0.1 M) HCl ya da KOH çözeltileri kullanılır. pH ayarlandıktan sonra su ile 100 ml’ye tamamlanır.

3.7.1.3 Metal Şelatlama Aktivitesi Çözeltileri

-2 mM Demir(II) klorür Çözeltisinin Hazırlanması

0.0397 g Demir(II) klorür 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanır. Karanlıkta saklanır.

-5 mM Ferrozin Çözeltisinin Hazırlanması

0.123 g Ferrozin 50 ml saf su içinde çözülerek hazırlanır.

3.7.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi Çözeltileri

-0.2 M pH 6.6 Fosfat Tamponu Hazırlanması

- 0.2 M Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) Çözeltisinin Hazırlanması

31.20 g sodyum fosfat monobazik dihidrat saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

- 0.2 M Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) Çözeltisinin Hazırlanması

35.59 g sodyum fosfat dibazik dihidrat saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

0.2 M sodyum fosfat monobazik dihidrat çözeltisinden 250 ml, sodyum fosfat dibazik dihidrat çözeltisinden 93.75 ml alınarak üzerlerine 50 ml saf su eklenir ve pH 6.6'ya ayarlanır. Bu amaçla seyreltik (0.1 M) HCl veya KOH çözeltileri kullanılır. pH ayarlandıktan sonra çözelti saf su ile 500 ml'ye tamamlanarak fosfat tamponu hazırlanmış olur.

-%0.1'lik Demir(III) klorür Çözeltisinin Hazırlanması

100 mg Demir(III) klorür 100 ml saf su içinde çözülerek hazırlanır. Karanlıkta saklanır.

-%1'lik Potasyum ferrisiyanür Çözeltisinin Hazırlanması

1 g Potasyum ferrisiyanür 100 ml saf su içinde çözülerek hazırlanır.

-%10'luk Trikloroasetik asit Çözeltisinin Hazırlanması

10 g Trikloroasetik asit 100 ml saf su içinde çözülerek hazırlanır.

3.7.1.5 Toplam Fenolik Bileşen Tayini Çözeltileri

-Folin-Ciocalteu Çözeltisinin Hazırlanması

Saf su ile 10 kat seyreltilerek hazırlanır ve buzdolabında saklanır.

-%7.5'luk Sodyum karbonat Çözeltisinin Hazırlanması

7.5 g Sodyum karbonat tartılarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.7.1.6 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Çözeltileri

-%5'lik Sodyum nitrit Çözeltisinin Hazırlanması

5 g Sodyum nitrit tartılarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

-%10'luk Alüminyum(III) klorür Çözeltisinin Hazırlanması

10 g Alüminyum(III) klorür tartılarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

-1 M Sodyum hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

4 g Sodyum hidroksit tartılır ve 100 ml saf su ile tamamlanarak hazırlanır.

3.7.1.7 Ferrik Tiyosiyanat ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Çözeltileri

-0.04 M pH 7.4 Fosfat Tamponunun Hazırlanması

- A Çözeltisi:

27.8 g Monobazik monosodyum fosfat (NaH_2PO_4) saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

- B Çözeltisi:

28.4 g Dibazik disodyum fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

Ardından A çözeltisinden 540 ml, B çözeltisinden 126.6 ml alınır, üzerlerine 100 ml saf su eklenir ve karıştırılarak seyreltik (0.1 M) HCl veya KOH çözeltileri ile pH 7.4'e ayarlanır. pH ayarlandıktan sonra çözelti saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 0.04 M pH 7.4 fosfat tamponu hazırlanmış olur.

-Linoleik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Bir kapta 313 µl linoleik asit, 10.15 ml 0.04 M pH 7.4 fosfat tamponu ile seyreltilir. Ayrı bir kapta 350 µl Tween-20 ve 10.15 ml 0.04 M fosfat tamponu hazırlanır. İki ayrı kaptaki çözelti birbirine eklenerek karıştırılır ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak linoleik asit çözeltisi hazırlanır. Soğukta saklanır.

-20 mM Demir(II) klorür Çözeltisinin Hazırlanması

0.57 ml %37'lik Hidroklorik asit saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

281 mg Demir(II) klorür yukarıda hazırlanan hidroklorik asit çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanarak 20 mM demir(II) klorür çözeltisi hazırlanmış olur. Demir(II) klorür HCl çözeltisine bir çeker ocak altında, dikkatlice azar azar eklenmelidir.

-%30'luk Amonyum Tiyosiyanat Çözeltisinin Hazırlanması

15 g Amonyum tiyosiyanat 50 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.

3.7.2 Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Uygulanması

3.7.2.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Stok çözeltiler hem örnekler hem de standart olarak kullanılan kimyasallar için hazırlandı. Bu amaçla öncelikle her bir örnek ve standart için 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde ana stok çözeltiler hazırlandı. Ardından DPPH yöntemi ile belirlenen konsantrasyonların stokları antioksidan aktivite çalışmaları için hazırlandı ve buzdolabında muhafaza edildi.

Yapılan çeşitli denemeler sonucunda ilk dört ekstre suda (**P1-P4**) ve son 4 ekstre (**P5-P8**) ise etanolde çözüldü. Tüm standart stok çözeltileri için çözücü olarak etanol kullanıldı. Ardından bütün antioksidan aktivite tayini deneylerinde DPPH yöntemiyle belirlenmiş beş farklı konsantrasyon için her bir örneğe ve konsantrasyona karşılık bir deney tüpü hazırlandı. İzleyen tüm çalışmalar istatistik analiz yapmak üzere üçerli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.2.2 Çalışılacak Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi

DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Yönteminin ve diğer testlerin uygulanabilmesi için ilk önce örneklerin çalışılacak konsantrasyon aralığının belirlenmesi gerekmektedir. % DPPH radikali giderme aktivitesi değeri %40-60 aralığına denk gelen konsantrasyonları belirlemek üzere çeşitli konsantrasyonlarda çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışmalar sonunda %40-60 aralığına denk gelen konsantrasyon aralığı olarak 100-2000 µg/ml alınarak izleyen 5 konsantrasyon değeri tespit edildi: 100, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml.

Bütün antioksidan aktivite tayin yöntemlerinde belirlenen bu konsantrasyonlarda çalışmalar yapıldı.

3.7.2.3 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Analizinin Yapılışı

P1-P8 kodlu sekiz adet örnekten ve yöntemin standardı olan BHT ve askorbik asitin beş farklı stok konsantrasyonundan 500 µl örnek alınarak, önceden örnek ismi ve konsantrasyon olarak etiketlenen üçerli cam tüplerin içerisine aktarıldı. Örneklerin üzerine 3 ml etanol ve 300 µl 0.25 mM DPPH çözeltisi karanlıkta eklendi. Sadece 3 ml etanol ve 1 ml DPPH çözeltisi bulunan tüpler kontrol olarak ve 3 ml etanol bulunan tüp kör olarak hazırlandı. 60 Dakika boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra 517 nm’de köre karşı okuma yapılarak absorbans değerleri saptandı. Standart olarak BHT ve askorbik asit kullanıldı. % DPPH Radikali Giderme Aktivitesi aşağıda gösterilen formüle göre hesaplanarak grafik haline getirildi (Brand Williams ve ark., 1995).

$$\% \text{ DPPH Giderme Aktivitesi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.1)$$

şeklinde olup burada A_{kontrol} : kontrolün absorbans değeri, $A_{\text{örnek}}$ ise örneğin absorbans değerini ifade etmektedir.

3.7.2.4 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini Analizinin Yapılışı

P1-P8 kodlu sekiz adet örneğin ve standartların her birinin beş konsantrasyondaki stok çözeltilerinden üçerli tüplere aktarmak üzere 62.5 µl alındı. Üzerine 125 µl 0.01 M bakır(II) klorür çözeltisinden eklendi. 125 µl 7.5×10^{-3} M neokuproin, 125 µl 1 M pH 7 amonyum asetat tamponu ve 75 µl saf su ilavesinden sonra 30 dakika bekletildi ve 450 nm’de köre karşı okuma yapılarak absorbans değerleri saptandı.

Kör olarak saf su, standart olarak ise troloks ve askorbik asit kullanıldı. Standartların ve örneklerin absorbans değerleri ile örneklerin CUPRAC aktivitesi standartlara karşı hazırlanan bir grafik ile gösterildi (Apak ve ark., 2004).

3.7.2.5 Metal Şelatlama Aktivitesi Analizinin Yapılışı

P1-P8 kodlu sekiz adet örneğin ve standartların her birinin beş konsantrasyondaki stok çözeltilerinden üçerli tüplere aktarmak üzere 250 µl alındı. Üzerlerine 925 µl saf su eklendi ve 25 µl 2 mM demir(II) klorür eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk çalkalamalı su banyosunda tam çözünme sağlandı. Ardından her bir örnek ve standardın üzerine 5 mM 50 µl ferrozin çözeltisi eklendi. 25 Dakika çalkalamalı su banyosunda oda sıcaklığında inkübe edilen örneklerin 562 nm’de kör ve kontrole karşı spektrofotometrik analizi yapılarak absorbans değerleri belirlendi. Kör olarak 25 µl

demir(II) klorür + 925 µl saf su karışımı kullanıldı. Kontrol olarak 1175 µl su + 25 µl 2 mM demir(II) klorür + 50 µl ferrozin çözeltisi kullanıldı (Decker ve Welch, 1990).

% Metal Şelatlama Aktivitesi aşağıda gösterilen formüle göre hesaplanarak grafik haline getirildi.

$$\% \text{ Metal şelatlama aktivitesi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.2)$$

şeklinde olup burada A_{kontrol} : kontrolün absorbans değeri, $A_{\text{örnek}}$ ise örneğin absorbans değerini ifade etmektedir.

3.7.2.6 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Analizinin Yapılışı

P1-P8 kodlu sekiz adet örneğin ve standartların her birinin beş konsantrasyondaki stok çözeltilerinden üçerli tüplere aktarmak üzere 100 µl alındı. Üzerlerine 1250 µl 0.2 M pH 6.6 fosfat tamponu ve 1250 µl %1'lik potasyum ferrisiyanür çözeltisi eklendi ve her bir tüp vortekslendikten sonra 50 °C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra örneklerin soğuması beklendi. Soğuyan örnekler 1250 µl %10'luk trikloroasetik asit çözeltisi eklenerek 300 rpm devirde her bir tüp 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra üstte kalan tabakadan 1250 µl alındı, üzerine 1250 µl su ve %0.1'lik 250 µl demir(III) klorür eklendi. İyi karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 700 nm'de kör ve kontrole karşı spektrofotometrik analiz yapılarak absorbans değerleri belirlendi. Kontrol olarak örnek yerine 100 µl saf su ve üzerine örneklere eklenen miktarda diğer reaktifler ilave edilerek aynı işlemlere tabi tutuldu. Kör olarak ise bir tüpe 1250 µl %10'luk trikloroasetik asit çözeltisi, 250 µl %0.1'lik demir(III) klorür ve 100 µl saf su ilave edildi. Standart olarak BHT ve askorbik asit kullanıldı. Bu metotta artan absorbans değerleri yüksek indirgeme etkisini ifade etmekte olup, direkt olarak ölçülen absorbans değerleri kullanılarak sonuçlar standartlara karşı grafiklendirildi (Oyaizu, 1986).

3.7.2.7 Ferrik tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Analizinin Yapılışı

Örnek ve standart çözeltiler ana stoklar kullanılarak aşağıdaki çizelgeye göre hazırlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Örnek ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Örnek Konsantrasyonu (µg/ml)	Alınacak örnek ve standart miktarı (µL)	Fosfat tamponu (0.04 M pH 7.4) miktarı (µL)	Linoleik asit miktarı (µL)
100	20	480	500
500	100	400	500
1000	200	300	500
1500	300	200	500
2000	400	100	500

Örnekler 37 °C’de sabitlenmiş bir etüve inkübe edilmek üzere yerleştirildi. Kontrolün absorbans değerinin düşmeye başladığı zamanı tespit etmek üzere 4., 8., 12., 16. ve 20. saatlerde 500 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Her bir saat ardından konsantrasyonlarına göre ve üçerli olarak hazırlanan örnek ve standart tüplerine 10 µl inkübe edilmiş numune, 470 µl etanol eklendi. Ardından eş zamanlı olarak 10 µl %37’lik hidroklorik asit ile hazırlanmış 20 mM demir(II) klorür çözeltisi ve 10 µl %30’luk amonyum tiyosiyanat eklendi. 3 Dakika çalkalamalı su banyosunda çalkalanan örneklerin 500 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Kör olarak etanol, kontrol çözeltisi olarak ise 500 µl fosfat tamponu, 500 µl linoleik asit ve 470 µl etanolden oluşan çözelti kullanıldı. Bu deneyde standart kimyasal olarak askorbik asit ve α-tokoferol kullanıldı. Tüm bu işlemler her bir 4 saatlik zaman dilimi ile inkübasyonun ardından tekrar edildi. Kontrolün absorbansının düşmeye başladığı zamandan itibaren iki okuma daha yapıldı.

Sonuçlar hesaplanırken kontrolün absorbansının düşmeye başladığı saatteki kontrol ve örneğin absorbans değerleri kullanıldı. Buna göre aşağıda gösterilen denklem kullanılarak % Toplam Antioksidan Aktivite değeri hesaplandı.

$$\% \text{ Toplam antioksidan aktivite} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.3)$$

şeklinde olup burada A_{kontrol} : kontrolün absorbans değeri, $A_{\text{örnek}}$ ise örneğin absorbans değerini ifade etmektedir.

Hesaplamaların ardından elde edilen % Toplam antioksidan aktivite değerleri konsantrasyonlara karşı kullanılan standart kimyasallarla birlikte grafiğe geçirildi (Chang ve ark., 2002).

3.7.3 Fitokimyasal Yöntemler

3.7.3.1 Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) Toplam Fenolik Bileşen Tayini Analizinin Yapılışı

Analize başlamadan önce gallik asitin kalibrasyon grafiğini hazırlamak ve lineer eğri denklemini belirlemek üzere 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mg/ml konsantrasyonlarda örnekler hazırlandı. Gallik asit sadece etanol içerisinde çözünmemektedir. Gallik asit örnekleri hazırlanırken %50 su, %50 etanol çözücü karışımı olarak tercih edilmiştir. Her bir konsantrasyondan üçerli olmak üzere 50 µl alınarak üzerlerine 2.5 ml on kat saf su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisi ekledikten sonra 2 dakika bekletildi. Örneklerin üzerine 2 ml %7.5'lük sodyum karbonat çözeltisi eklenerek vortekslendi. 50 °C'de Çalkalamalı su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Son olarak köre karşı 760 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerine karşı konsantrasyon değerlerinin kalibrasyon eğrisi çizildi. Yüksek R^2 değeri için eğri denklemi belirlendi. Bu denklem örneklerin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşen miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

Gallik asit kalibrasyon grafiği hazırlandıktan sonra her bir örnek ve referans örnek olarak kullanılan rezorsinol üçerli olmak üzere 125 µg/ml konsantrasyonda yukarıda belirtilmiş aynı işlemlere tabi tutularak 760 nm'de absorbans değerleri köre (saf su) karşı okundu. Ardından hesaplama işlemine geçildi. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = ax + m$ denkleminde; y = örneğin ölçülen absorbansını, x ise gallik asit eşdeğeri fenolik bileşen miktarını ifade etmektedir. y Değeri yerine ölçülen absorbans değerleri yazılarak örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik bileşen miktarları belirlendi ve referans kimyasal rezorsinol ile birlikte grafiğe geçirildi.

Polenlerin toplam fenolik bileşen madde miktarları GAE cinsinden mg fenolik madde/g ekstre numune olarak hesaplandı (Slinkard ve Singleton, 1977).

3.7.3.2 Kuersetin Eşdeğeri (QE) Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Analizinin Yapılışı

Analize başlamadan önce kuersetinin 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µg/ml konsantrasyonları için kalibrasyon eğrisini hazırlamak üzere örnek tüpleri hazırlandı. Üçerli çalışılarak her bir tüpten alınan 125 µl çözelti üstüne 500 µl saf su ve 37.5 µl %5'lik sodyum nitrit çözeltisi eklendi. Ardından oda sıcaklığında beş dakika bekletildi. Bu işlemten sonra 37.5 µl %10'luk alüminyum(III) klorür çözeltisi eklendi ve altı dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 250 µl 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile 300 µl su ilave edilerek beş dakika çalkalandı. 510 nm Dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak su kullanıldı. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı kalibrasyon grafiği çizildi ve yüksek R² değeri için eğri denklemi belirlendi.

Kuersetinin kalibrasyon eğrisi denklemi belirlendikten sonra, üçerli olarak hazırlanmış 125 µg/ml konsantrasyondaki örnekler yukarıda açıklanan aynı işlemlere tabi tutularak 510 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen absorbans değerleri kuersetin kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = ax + m$ denkleminde kullanıldı. Burada, y= örneğin ölçülen absorbansını, x ise kuersetin eşdeğeri flavonoid bileşen miktarını ifade etmektedir. y Değeri yerine ölçülen absorbans değerleri yazılarak örneklerin kuersetin cinsinden toplam flavonoid bileşen miktarları belirlendi ve sonuçlar grafiğe geçirildi.

Polenlerin toplam flavonoid bileşen madde miktarları QE cinsinden mg flavonoid bileşen/g ekstre numune olarak hesaplandı (Park ve ark., 2008).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Sonuçlar 3 deneysel verinin ortalaması olarak \pm (SD) standart sapma şeklinde ifade edildi. Veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc (Tukey veya Tamhane's T2 testi) ile analiz edildi. Farklılıklar, $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.1 Antioksidan Aktivitenin Tayini

4.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite

Çizelge 4.1 Polen Ekstrelerinin DPPH Radikali Süpürücü % Aktiviteleri

Örnek*	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
P1	34.05 \pm 2.67 ^a	36.2. \pm 4.32	42.85 \pm 4.94	42.02 \pm 3.77	44.92 \pm 4.27
P2	31.15 \pm 0.40 ^b	41.55 \pm 3.18	48.57 \pm 7.59	57.16 \pm 3.33	63.63 \pm 1.55 ^c
P3	37.68 \pm 2.61 ^d	48.05 \pm 4.61	59.42 \pm 3.12	57.14 \pm 2.09 ^e	62.85 \pm 4.36
P4	30.43 \pm 0.73 ^f	31.42 \pm 4.26	32.46 \pm 2.80 ^g	35.06 \pm 2.17 ^h	38.96 \pm 5.22
P5	31.88 \pm 0.51 ⁱ	69.44 \pm 4.74	71.42 \pm 6.50	85.71 \pm 2.17 ^{a,d,g,h,j}	89.72 \pm 4.62
P6	33.82 \pm 0.73 ^k	36.36 \pm 4.61	42.85 \pm 1.43 ^j	53.24 \pm 3.63	68.83 \pm 7.54
P7	34.05 \pm 2.21 ^{j,m}	55.07 \pm 5.80	77.14 \pm 3.72	82.87 \pm 4.54	89.85 \pm 3.97
P8	31.88 \pm 1.08 ^{c,j}	51.94 \pm 7.23	53.62 \pm 2.14 ^{i,n}	84.41 \pm 5.19	86.95 \pm 6.80
BHT	65.94 \pm 1.46 ^{f,h,k,l,m}	72.3 \pm 5.15	74.02 \pm 1.60 ^{h,l,m}	85.71 \pm 5.69	83.07 \pm 4.06
Askorbik asit	97.26 \pm 1.22 ^{b,c,h,i,k,l,m,n}	97.94 \pm 0.81 ^{b,f,i,k,l,m}	97.94 \pm 1.46 ^{a,c,d,e,f,h,i,k,l,m,n}	97.94 \pm 1.15 ^{b,c,f,h,i,k,l,m}	98.63 \pm 1.00 ^{b,c,f,h,i,k,l,m}

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (\pm), Tamhane's T2 test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi

Çizelge 4.2 Polen Ekstrelerinin Metal Şelatlama % Aktiviteleri

Örnek*	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
P1	83.34 ± 0.32 ^a	85.00 ± 3.32	85.64 ± 3.23 ^b	84.25 ± 2.78 ^c	79.88 ± 1.13 ^d
P2	71.91 ± 1.70 ^e	61.8 ± 2.66	56.78 ± 4.04	60.75 ± 1.14 ^{d,f}	60.61 ± 3.44
P3	80.27 ± 4.96	67.72 ± 1.20 ^g	64.94 ± 2.34 ^h	37.26 ± 2.22 ^{c,i}	31.54 ± 1.05 ^{a,d,e,f,g,j}
P4	80.32 ± 0.87 ^{f,j,k}	68.50 ± 1.50 ^{j,l}	75.09 ± 0.83 ^{j,m}	68.18 ± 2.40 ⁿ	25.49 ± 2.02 ^{b,c,d,e,g,h,n,o}
P5	73.70 ± 2.11 ^{i,o,p}	53.93 ± 1.41 ^{d,q}	39.44 ± 5.62	37.05 ± 1.30 ^{d,e,g,k,l,m,r}	35.85 ± 2.71 ^c
P6	78.93 ± 0.95 ^{f,q,r,s}	60.95 ± 1.68 ^o	58.76 ± 7.59	60.95 ± 0.39 ^{a,t}	53.78 ± 1.32 ^{d,k,s}
P7	84.06 ± 1.02 ^{f,j,o,r,u}	75.46 ± 0.6 ^{j,r,t,x}	39.12 ± 1.52 ^{d,e,g,k,l,p,s,u}	38.65 ± 1.57 ^{d,e,g,k,l,p,s,u}	30.95 ± 5.17
P8	61.37 ± 3.24	58.31 ± 1.46 ^{j,u}	54.16 ± 0.68 ^{a,d,j,k,m,s,u,x,w}	51.19 ± 0.54 ^{a,k,m,s,t,u,x,y}	45.50 ± 1.70 ^{d,u}
EDTA	93.52 ± 0.11 ^{t,y,z}	98.12 ± 0.48 ^{a,j,m,r,t,x,w,y,a'}	98.53 ± 0.30 ^{a,j,t,x,w,y,b'}	99.56 ± 0.52 ^{a,f,j,k,m,t,x,w,y,c'}	100.00 ± 0.42 ^{a,j,t,w,y,d'}
BHT	37.16 ± 1.50 ^{a,d,e,g,k,l,m,s,u}	23.02 ± 0.47 ^{a,d,g,k,m,s,t,u,x,w,y,z, a', b',c',d'}	0 ^{a,k,m,t,x,y,z, a', b',c',d'}	0 ^{a,k,m,t,x,y,z, a', b',c,d''}	0 ^{a,k,m,t,x,y,z, a', b',c,d''}

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (±), Tamhane's T2 test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.1.3 Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Çizelge 4.3 Polen Ekstrelerinin Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasiteleri (Absorbans)

Örnek*	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
P1	1.00 ± 0.05 ^a	0.94 ± 0.01 ^b	0.88 ± 0.03 ^c	0.82 ± 0.03 ^d	0.80 ± 0.02 ^e
P2	0.80 ± 0.02 ^f	0.84 ± 0.04 ^g	0.85 ± 0.03 ^h	0.93 ± 0.06 ⁱ	0.94 ± 0.05 ^j
P3	0.86 ± 0.03 ^k	0.85 ± 0.02 ^l	0.95 ± 0.04 ^m	1.05 ± 0.02 ⁿ	1.10 ± 0.04 ^o
P4	1.18 ± 0.12	1.14 ± 0.03 ^p	1.09 ± 0.04 ^q	1.04 ± 0 ^r	0.99 ± 0.01 ^s
P5	1.02 ± 0 ^t	1.02 ± 0.05 ^u	1.29 ± 0.14	1.45 ± 0.23	1.53 ± 0.09
P6	0.93 ± 0.04 ^x	0.10 ± 0.02 ^w	1.00 ± 0.02 ^y	1.05 ± 0.07 ^z	1.11 ± 0.05 ^{a'}
P7	0.97 ± 0.04 ^{b'}	1.06 ± 0.05 ^{c'}	1.15 ± 0.08	1.21 ± 0.21	1.30 ± 0.04 ^{d'}
P8	1.08 ± 0.08	1.12 ± 0.02 ^{e'}	1.23 ± 0.06 ^{f'}	1.25 ± 0.07 ^{g'}	1.4 ± 0.05 ^{h'}
Trolox	0.82 ± 0.04 ^{i'}	1.23 ± 0.07 ^{j'}	1.82 ± 0.05 ^{a,c,d,g,i,j,k,m,o,q,x,b',i',k'}	2.51 ± 0.01 ^{b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,p,r,s,t,w,y,b',e',i'}	2.56 ± 0.02 ^{b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,p,r,s,t,w,y,b',e',i'}
Askorbik asit	1.18 ± 0.36	2.13 ± 0.05 ^{a,c,d,g,i,j,k,m,o,p,q,u,x,a',b',c',d',f',i'}	2.12 ± 0.10	2.31 ± 0.10	2.57 ± 0.04 ^{a,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,u,x,w,y,z,a',b',c',d',e',f',g',h',i',j',k'}

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (±), Tamhane's T2 test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi

Çizelge 4.4 Polen Ekstrelerinin Toplam İndirgeme Gücü Aktiviteleri (Absorbans)

Örnek*	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
P1	1.54 ± 0.04	1.66 ± 0.02	1.66 ± 0.04	1.74 ± 0.06	1.75 ± 0.04
P2	1.73 ± 0.05	1.69 ± 0.09	1.66 ± 0 ^a	1.64 ± 0.04	1.66 ± 0.03
P3	1.76 ± 0.01	1.73 ± 0.02	1.71 ± 0.03	1.71 ± 0.08	1.69 ± 0.04
P4	1.69 ± 0.02	1.70 ± 0.01	1.73 ± 0.02	1.74 ± 0.03	1.77 ± 0.01
P5	1.60 ± 0.08	1.72 ± 0.07	1.76 ± 0.03	1.76 ± 0.03	1.76 ± 0.03
P6	1.87 ± 0.03	1.82 ± 0.02	1.53 ± 0.10	1.50 ± 0.05	1.42 ± 0.03
P7	1.27 ± 0.06	1.35 ± 0.08	1.65 ± 0.03	1.75 ± 0.01	1.76 ± 0.01 ^b
P8	1.69 ± 0.05	1.71 ± 0.02	1.75 ± 0.06	1.76 ± 0.03	1.77 ± 0.06
BHT	1.75 ± 0.03	1.75 ± 0.01	1.79 ± 0.05	1.79 ± 0.02	1.83 ± 0.06
Askorbik asit	1.77 ± 0.03	1.81 ± 0.01 ^a	1.90 ± 0.06	1.94 ± 0 ^{a,b}	1.85 ± 0.04

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (±), Tamhane's T2 test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.1.5 Ferrik Tiyosiyanat (FTC) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Çizelge 4.5 Polen Ekstrelerinin Dört Saat Aralıklarla Ölçülen Absorbans Değerleri (500 µg/ml konsantrasyon için)

Örnek*	4. saat	8. saat	12. saat	16. saat	20. saat
Kontrol	0.172 ±0.02	0.188 ±0.02	0.364 ± 0.05	0.129 ± 0.02	0.108 ±0.01
P1 500 µg/ml	0.110 ±0.01	0.130 ± 0.01	0.137 ± 0.01	0.051 ±0	0.052 ± 0.01
P2 500 µg/ml	0.056 ± 0.02	0.059 ± 0	0.064 ± 0.31	0.049 ±0.01	0.048 ± 0
P3 500 µg/ml	0.040 ±0	0.060 ± 0.02	0.073 ± 0	0.030 ± 0	0.027 ± 0.01
P4 500 µg/ml	0.022 ± 0	0.028 ±0	0.073 ± 0.32	0.062 ± 0	0.035 ± 0
P5 500 µg/ml	0.076 ± 0	0.078 ± 0.01	0.125 ± 0.01	0.034 ± 0.01	0.027 ± 0
P6 500 µg/ml	0.029 ± 0	0.031 ± 0.01	0.113 ± 0	0.029 ± 0	0.028 ± 0
P7 500 µg/ml	0.068 ±0.01	0.141 ± 0.01	0.146 ± 0	0.087 ± 0.01	0.088 ± 0.01
P8 500 µg/ml	0.020 ±0.01	0.051 ±0	0.094 ± 0	0.060 ± 0.01	0.027 ± 0.01
α-Tokoferol 500 µg/ml	0.021 ± 0	0.028 ± 0	0.044 ± 0.01	0.034 ±0.01	0.013 ± 0
Askorbik asit 500 µg/ml	0.017 ± 0	0.026 ± 0	0.035 ± 0	0.025 ± 0	0.025 ± 0

*Grup sayısı 50'den fazla olduğu için istatistiksel çoklu karşılaştırma testi gerçekleştirilememiştir; SD (±), (n: 3)

Çizelge 4.6 Polen Ekstrelerinin Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu Gücüyle İfade Edilen Toplam Antioksidan % Aktiviteleri

Örnek*	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
P1	69.51 ± 0.01 ^a	62.36 ± 0.02	25.55 ± 0.01 ^{a,b}	6.32 ± 0.02	0.82 ± 0.03
P2	82.96 ± 0.01 ^b	82.41 ± 0 ^c	55.49 ± 0.02	27.75 ± 0.02	22.53 ± 0.10
P3	84.89 ± 0.01 ^d	79,95 ± 0.01 ^b	68.96 ± 0.03 ^e	52.47 ± 0.01	0 ± 0.03 ^{e,f}
P4	82.42 ± 0.01 ^b	79.95 ± 0.01 ^b	52.47 ± 0 ^{c,g}	26.37 ± 0.03	0 ± 0.04
P5	80.49 ± 0.01 ^{b,g,h}	65.66 ± 0.01 ^b	70.88 ± 0 ^{g,i}	54.95 ± 0.01 ^{c,h,j}	27.20 ± 0.03
P6	73.08 ± 0.01 ^b	68.96 ± 0.01	64.84 ± 0 ^{b,k}	21.43 ± 0.02 ^f	0 ± 0.03
P7	73.90 ± 0.01 ^b	59.89 ± 0 ^{b,l}	50 ± 0 ^{h,m}	47.53 ± 0.01	27.20 ± 0.03
P8	92.31 ± 0.01 ^{b,m,n}	74.18 ± 0 ^{g,o}	67.58 ± 0.01	66.76 ± 0.01	49.73 ± 0.01 ^{d,n,p}
Askorbik asit	92.31 ± 0.01 ^{b,g,j,k,l,m,q}	90.38 ± 0.01 ^{b,g,j,m,r}	86.54 ± 0 ^{b,j,l,m,s}	78.02 ± 0 ^{c,s,t}	42.86 ± 0.01 ^{d,i,n,q,r,u}
α-Tokoferol	91.21 ± 0 ^{b,g,i,j,l,m,t,u}	87.912± 0.01 ^{b,g,j,k,l,m,p,u}	87.64 ± 0 ^{g,i,o,t}	66.21 ± 0 ^{g,t}	48.90 ± 0.01 ⁿ

*A_{kontrol}'ün maksimum olduğu (0.364) 12. inkübasyon saati ölçümüne göre hesaplanmış verileri içerir. Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (±), Tamhane's T2 test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.2. Fitokimyasal Analizler

4.2.1 Toplam Fenolik Bileşen Tayini

Çizelge 4.7 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$ ekstre)

Örnek*	1 mg/ml
P1	17.66 ± 0^a
P2	$19.68 \pm 0.01^{a,b}$
P3	19.48 ± 0.01^c
P4	16.81 ± 0^d
P5	$24.99 \pm 0.01^{a,b,c,d,e}$
P6	$19.08 \pm 0^{a,d,e,f}$
P7	$22.22 \pm 0^{a,b,c,d,f,g}$
P8	$21.31 \pm 0^{a,b,d,f,g,h}$
Rezorsinol	$79.85 \pm 0.07^{a,b,c,d,e,f,g,h}$

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (\pm), Tukey test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.2.2 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini

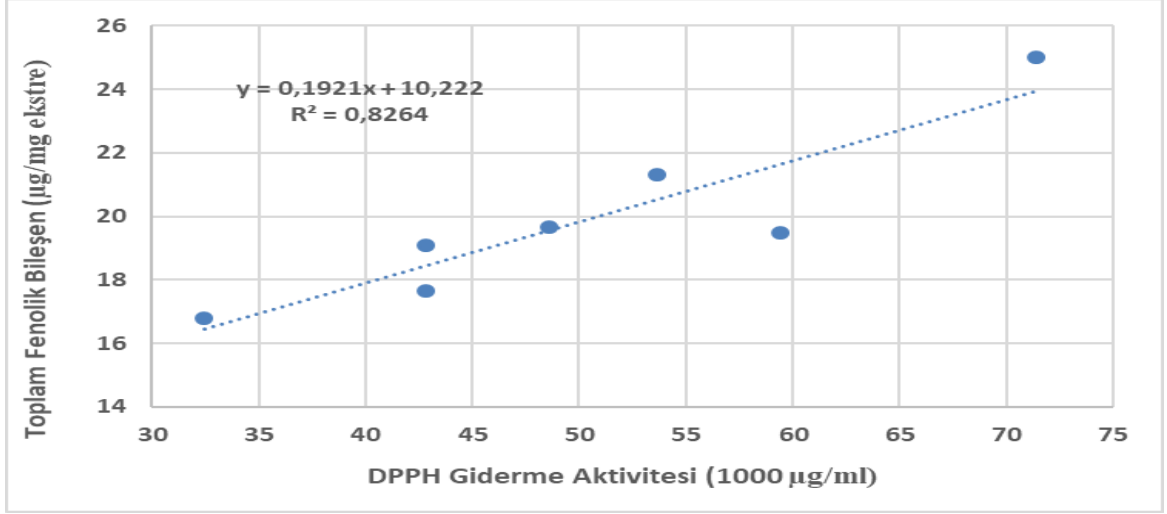
Çizelge 4.8 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$ ekstre)

Örnek*	1 mg/ml
P1	7.00 ± 0^a
P2	7.56 ± 0^b
P3	7.56 ± 0^c
P4	7.28 ± 0^d
P5	$13.62 \pm 0^{a,b,c,e}$
P6	$8.40 \pm 0^{d,e,f}$
P7	$11.42 \pm 0^{b,f,g}$
P8	$12.25 \pm 0.01^{a,b,c,d,e,f,g}$

*Aynı harfle işaretli verilerin birbirlerinden farkı istatistiksel olarak anlamlıdır; SD (\pm), Tukey test, $p < 0.05$ (n: 3)

4.3 Antioksidan Metotlar Arası Korelasyonlar

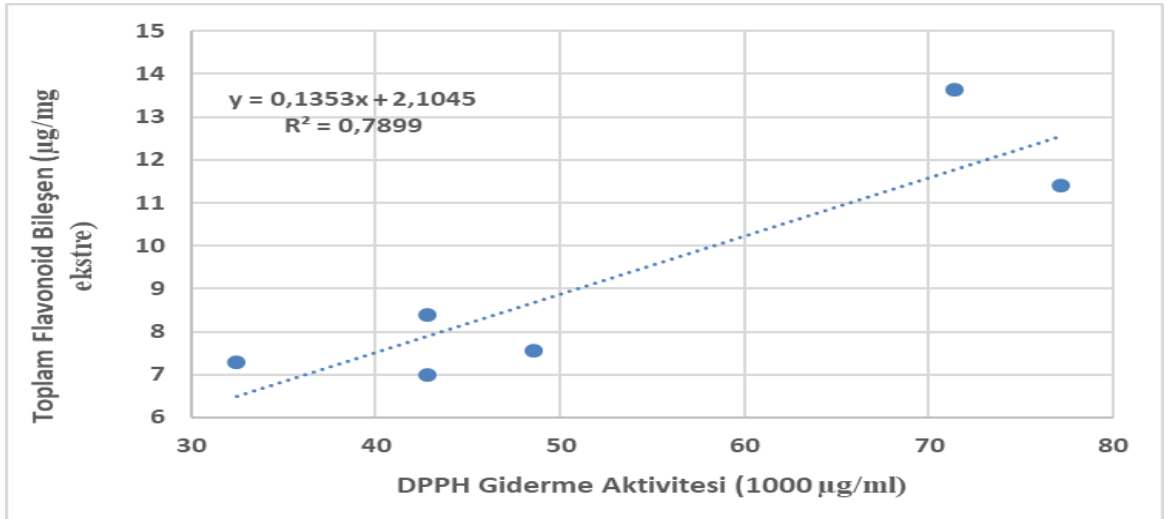
4.3.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml)



Şekil 4.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)

Polen ekstralarının ‘DPPH Radikali Süpürücü Aktivite’ ve ‘Toplam Fenolik Bileşen Tayini’ analizlerine ait sonuçlar arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ve 1000 µg/ml örnek konsantrasyonu sonuçları için hazırlanan grafik ile $R^2=0.8264$ olarak belirlendi (Şekil 4.1).

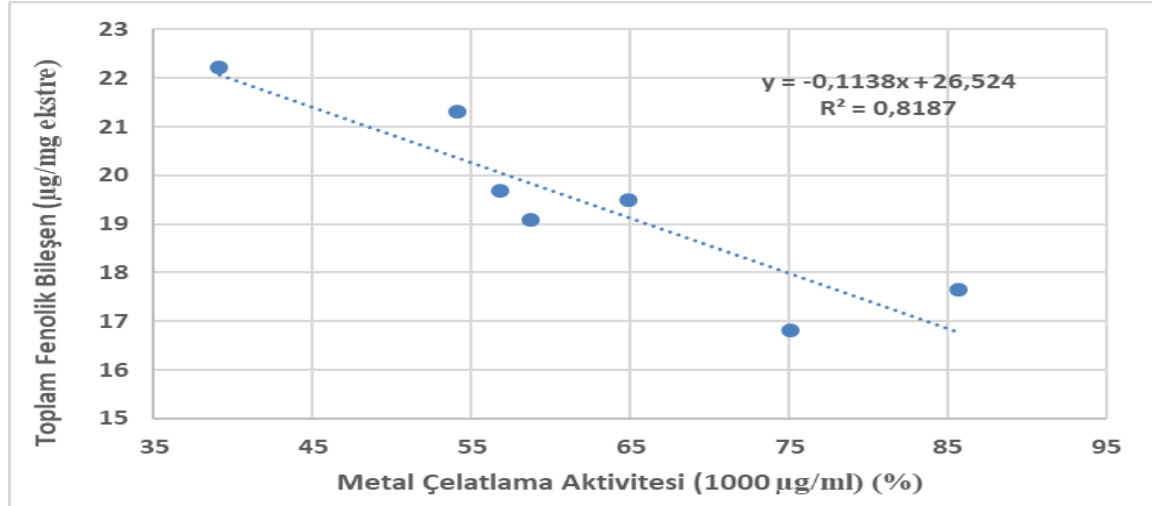
4.3.2 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini (1000 µg/ml)



Şekil 4.2 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)

Polen ekstralarının ‘DPPH Radikali Süpürücü Aktivite’ ve ‘Toplam Flavonoid Bileşen Tayini’ analizlerine ait sonuçlar arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ve grafik ile 1000 µg/ml konsantrasyon için $R^2=0.7899$ olarak belirlendi (Şekil 4.2).

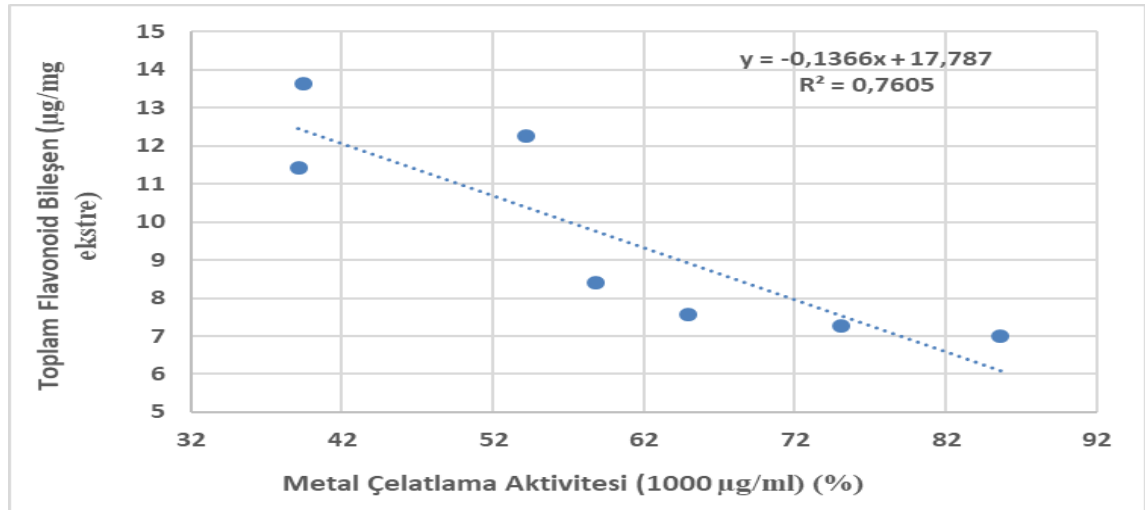
4.3.3 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml)



Şekil 4.3 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)

Polen ekstralarının ‘Metal Şelatlama Aktivitesi’ ve ‘Toplam Fenolik Bileşen Tayini’ analizlerine ait sonuçlar arasında negatif korelasyon olduğu gözlemlendi ve 1000 µg/ml konsantrasyon için grafik ile $R^2=0.8187$ olarak belirlendi (Şekil 4.3).

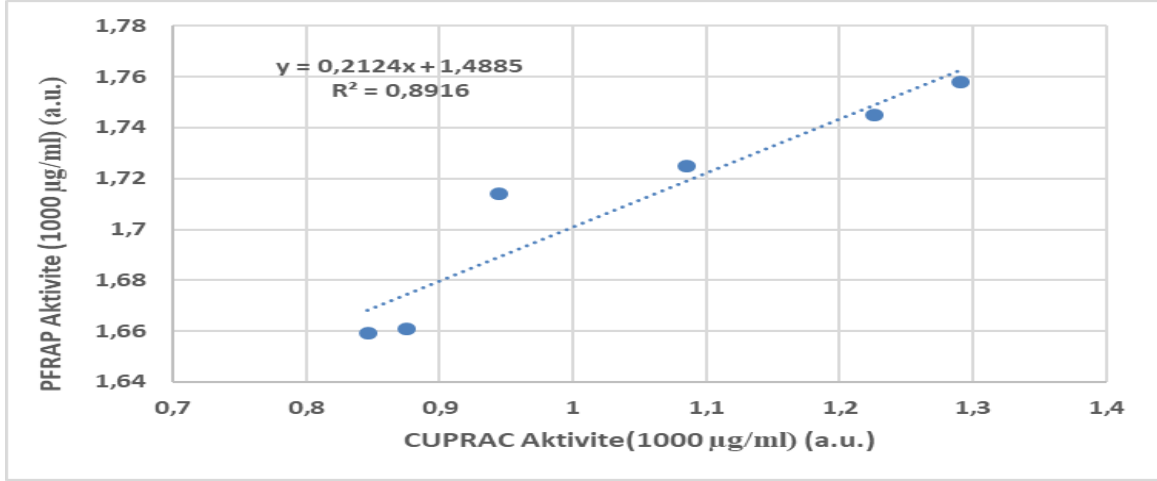
4.3.4 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini (1000 µg/ml)



Şekil 4.4 Metal Şelatlama Aktivitesi ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini Korelasyonu (1000 µg/ml)

Polen ekstralarının ‘Metal Şelatlama Aktivitesi’ ve ‘Toplam Flavonoid Bileşen Tayini’ analizlerine ait sonuçlar arasında negatif korelasyon olduğu gözlemlendi ve 1000 µg/ml konsantrasyon değerleri için grafik ile $R^2=0.7605$ olarak belirlendi (Şekil 4.4).

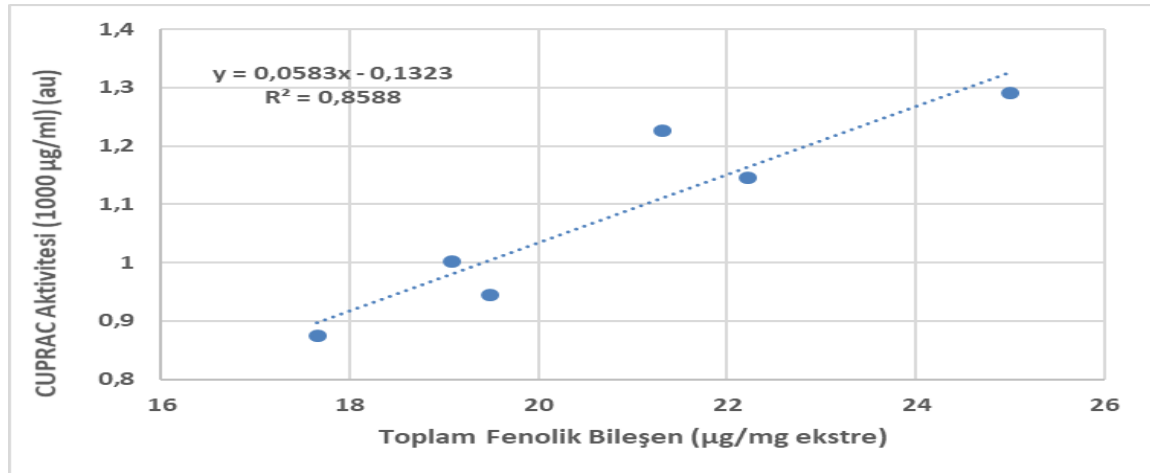
4.3.5 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç (PFRAP) Yöntemi (1000 µg/ml)



Şekil 4.5 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç Yöntemi (PFRAP) Korelasyonu (1000 µg/ml)

Polen ekstralarının ‘Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi’ ve ‘Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç Yöntemi’ analizlerine ait sonuçlar arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ve 1000 µg/ml konsantrasyon değerleri için grafik ile $R^2=0.8916$ olarak belirlendi (Şekil 4.5).

4.3.6 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Toplam Fenolik Bileşen tayini (1000 µg/ml)

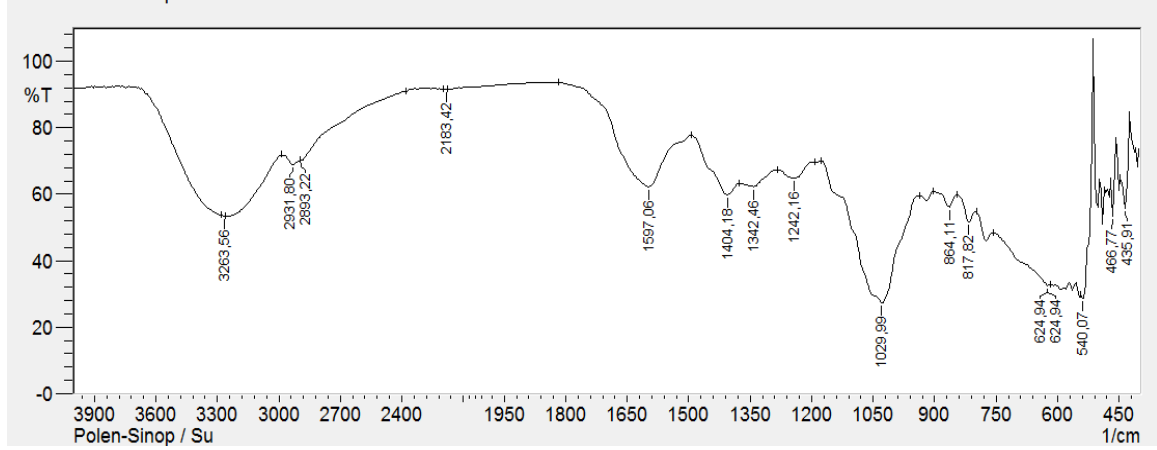


Şekil 4.6 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi ve Toplam Fenolik Bileşen Tayini (1000 µg/ml) Korelasyonu

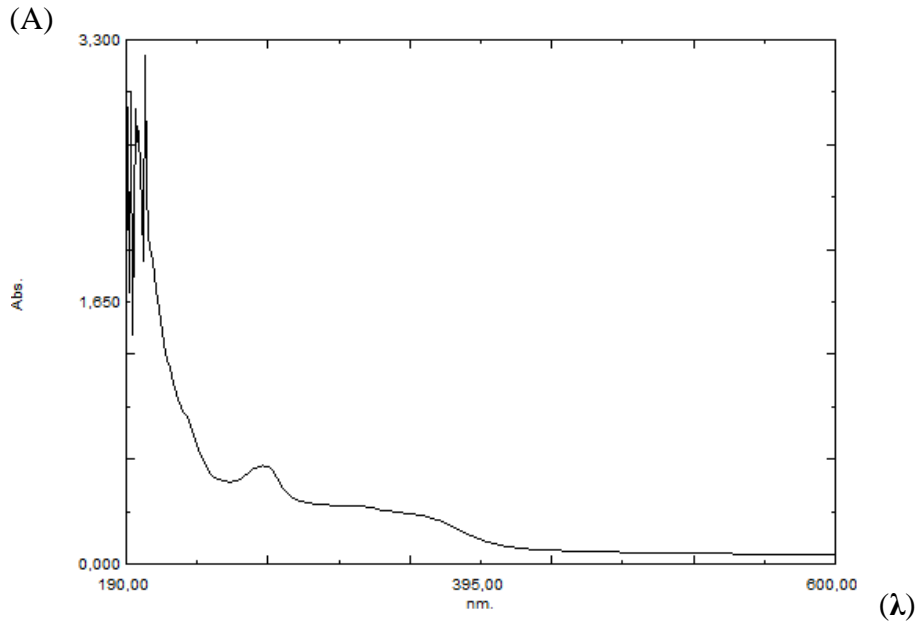
Polen ekstralarının ‘Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi’ ve ‘Toplam Fenolik Bileşen Tayini’ analizlerine ait sonuçlar arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi ve grafik ile 1000 µg/ml konsantrasyon örnek değerleri için $R^2=0.8588$ olarak belirlendi (Şekil 4.6).

4.4 Arı Polen Ekstrelerinin FTIR ve UV-Vis Spektrumları

4.4.1 P1 Örneği

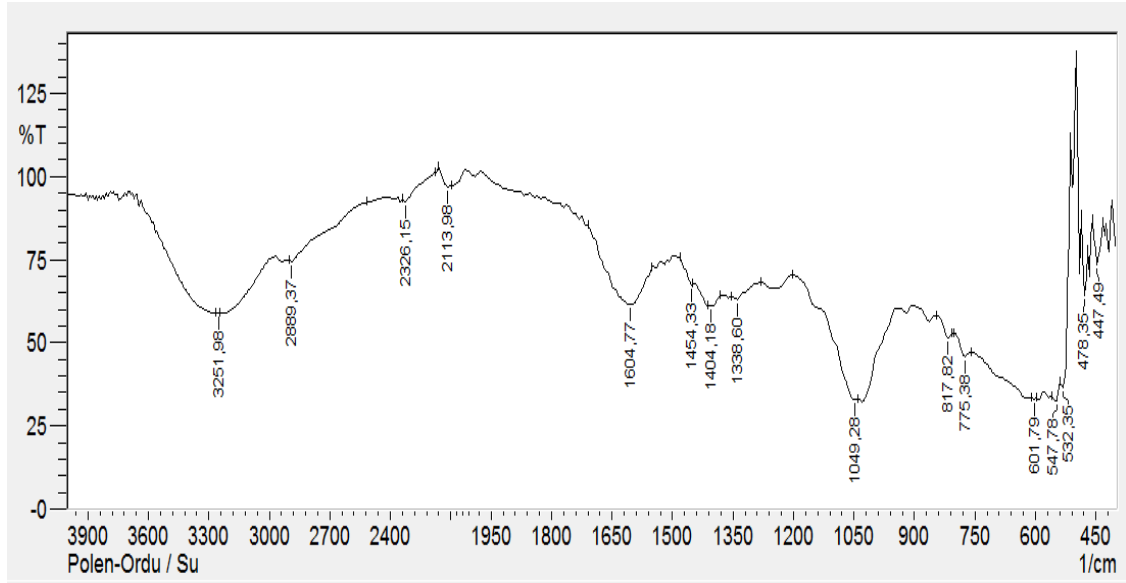


Şekil 4.7 P1 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

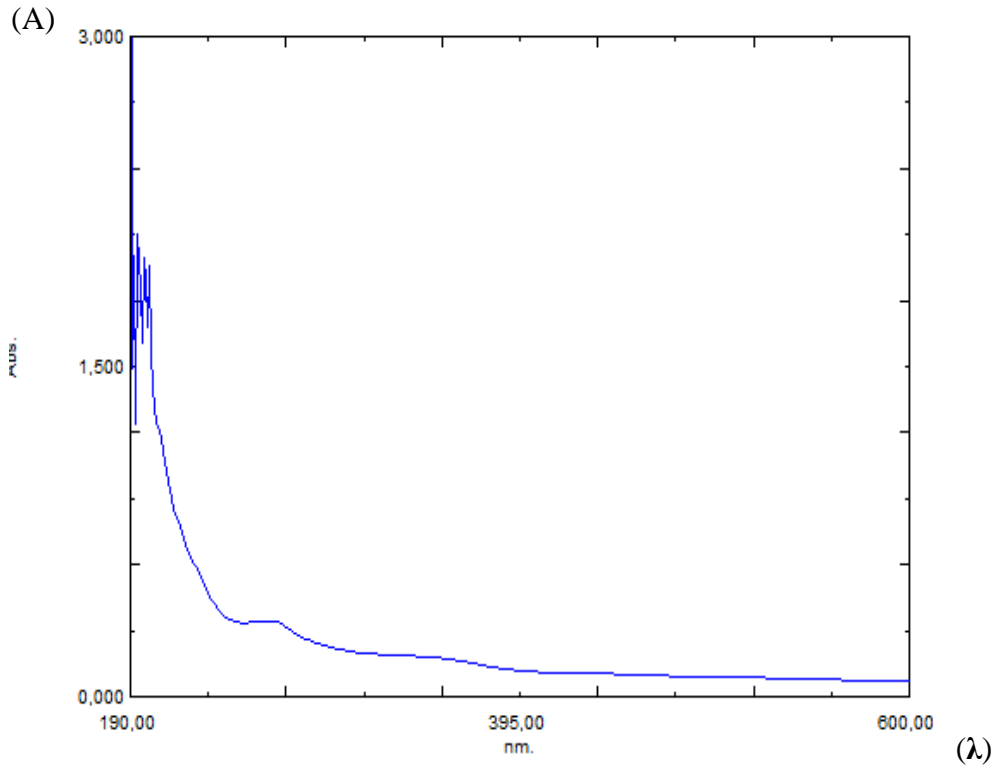


Şekil 4.8 P1 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.2 P2 Örneği

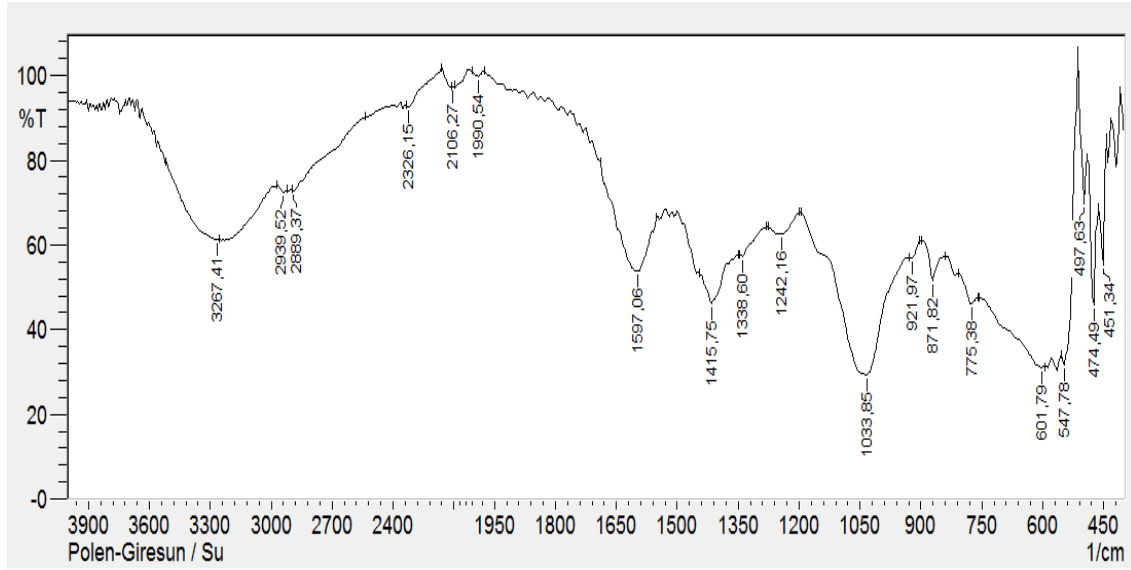


Şekil 4.9 P2 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

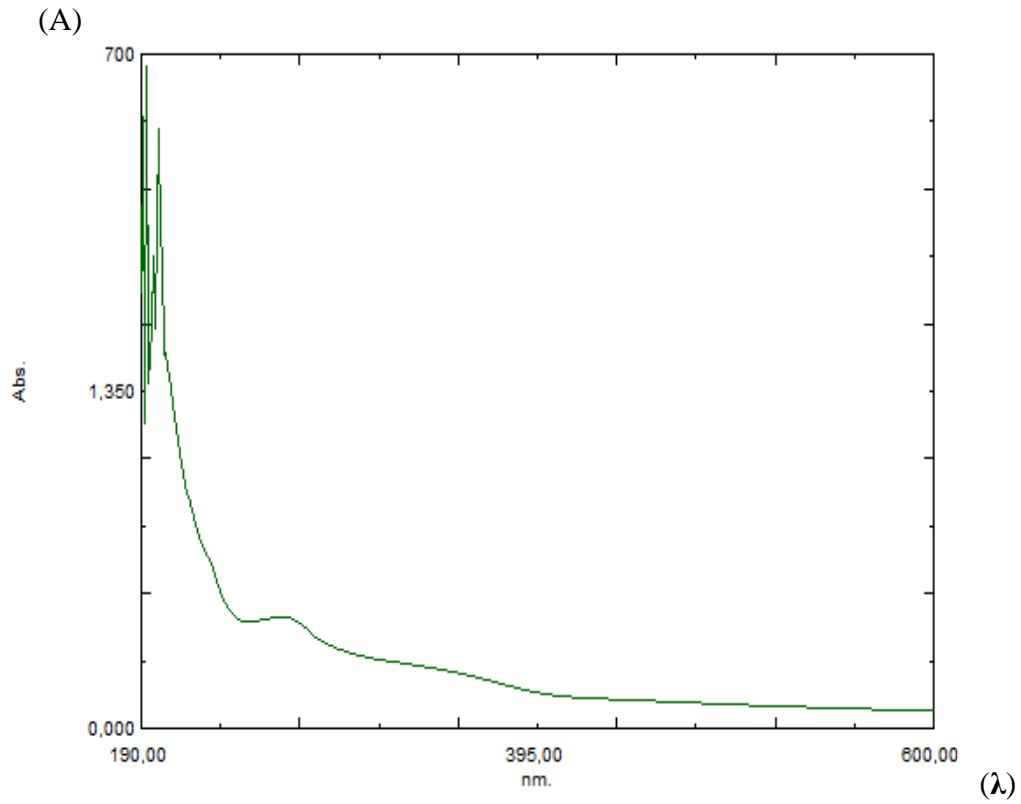


Şekil 4.10 P2 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.3 P3 Örneği

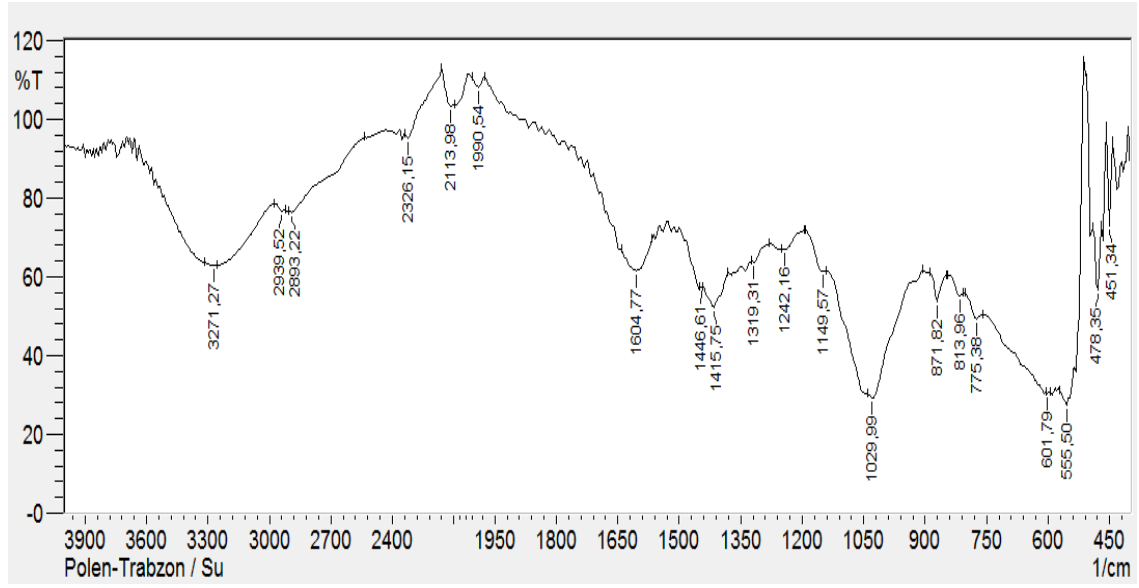


Şekil 4.11 P3 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

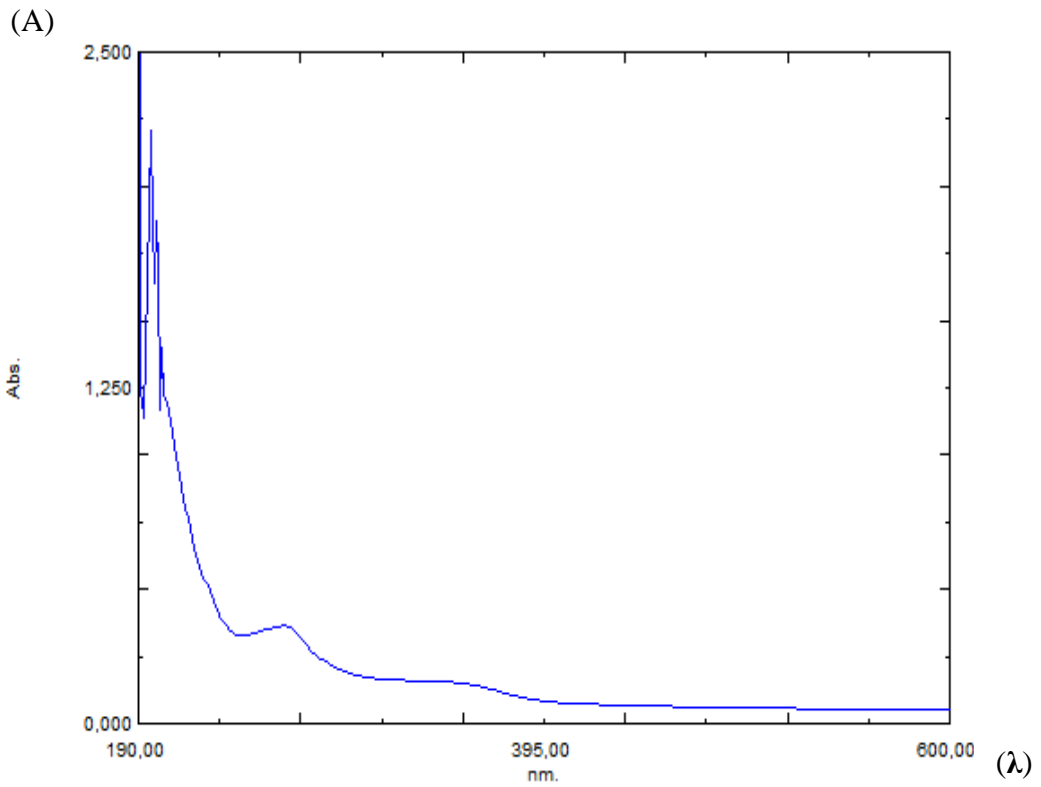


Şekil 4.12 P3 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.4 P4 Örneği

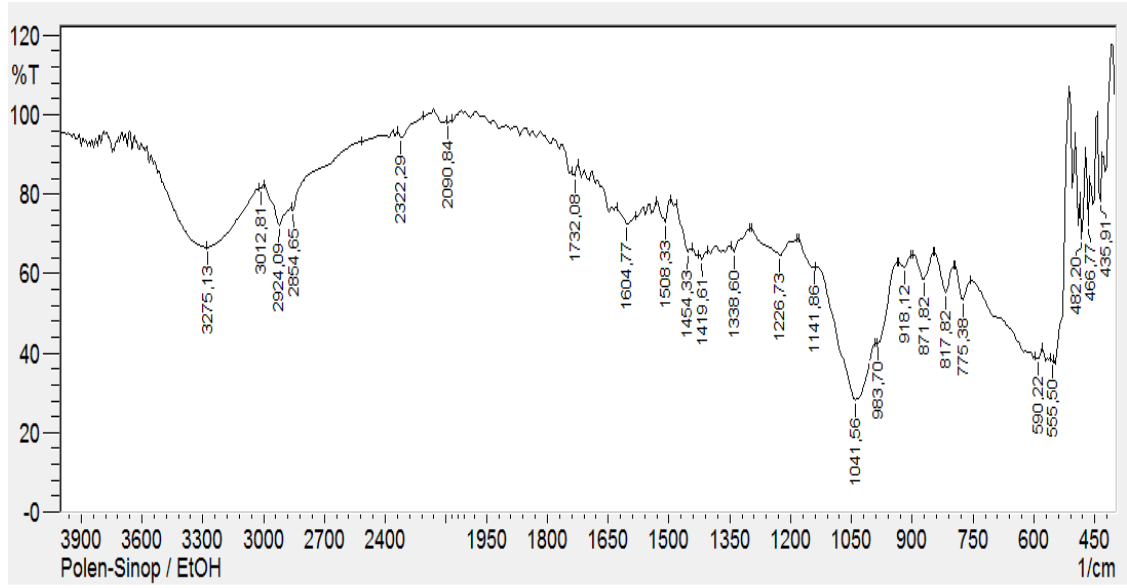


Şekil 4.13 P4 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

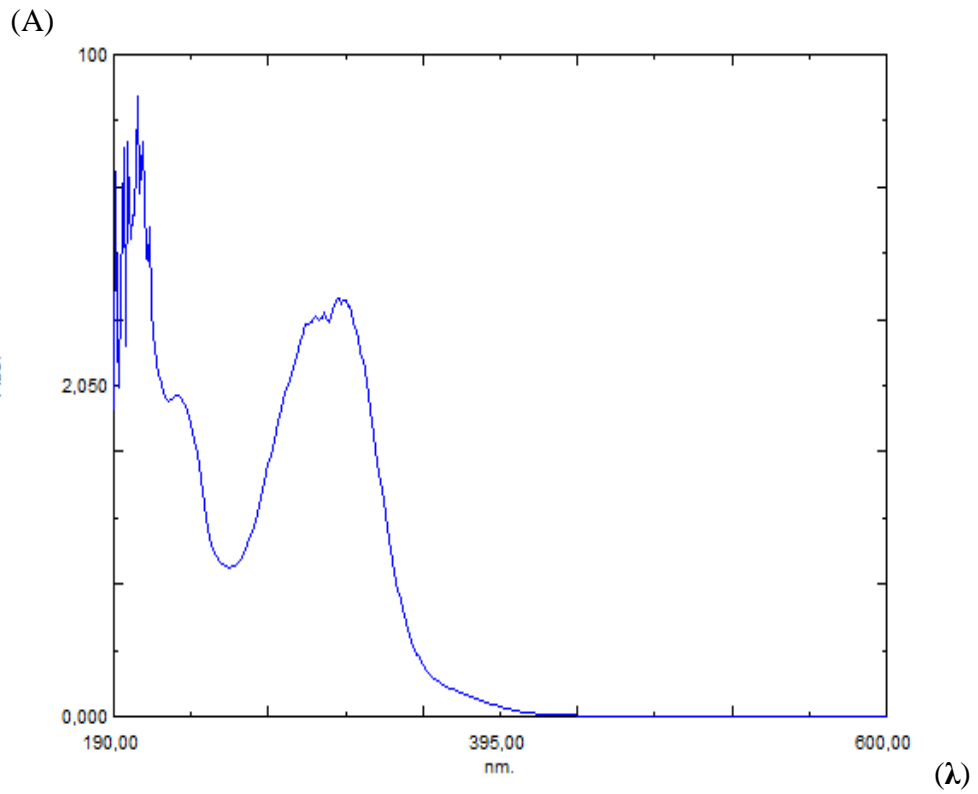


Şekil 4.14 P4 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.5 P5 Örneği

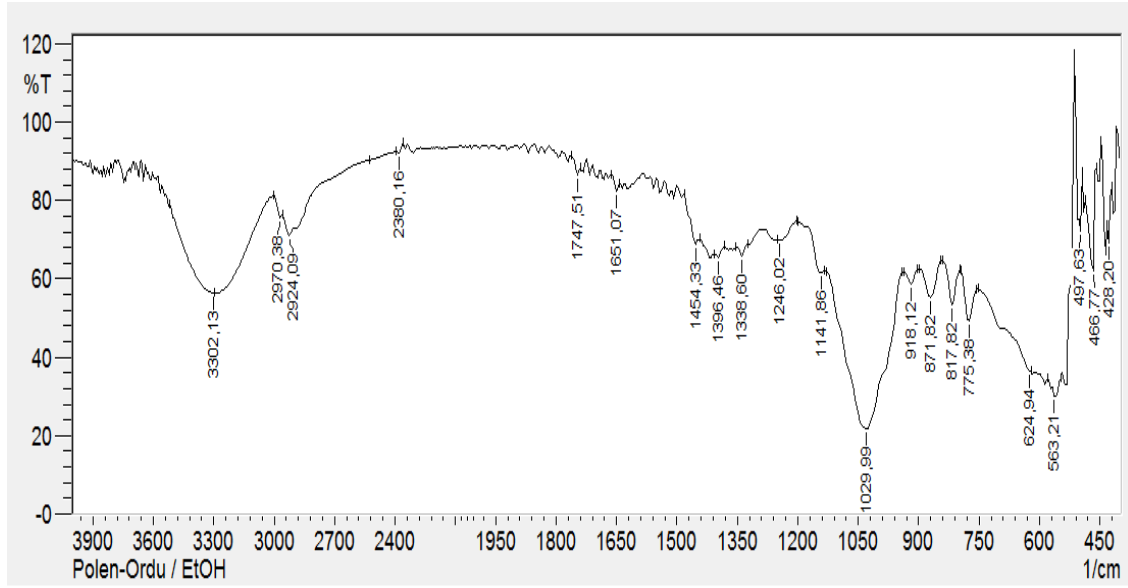


Şekil 4.15 P5 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

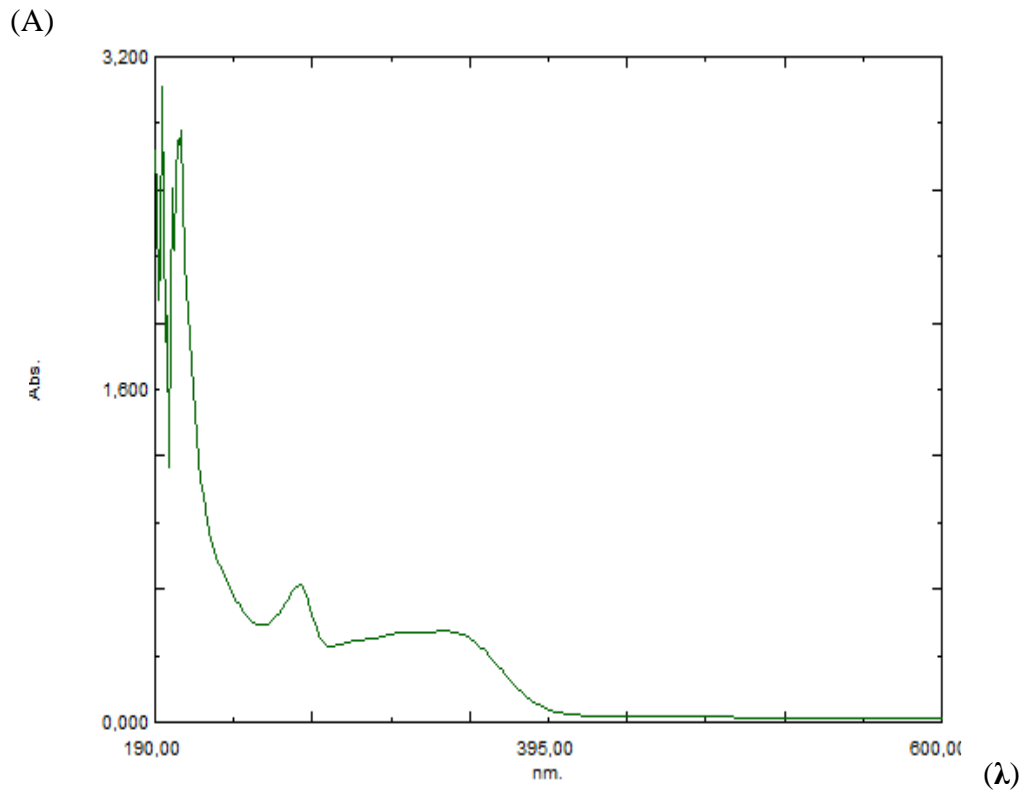


Şekil 4.16 P5 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (0.75 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.6 P6 Örneği

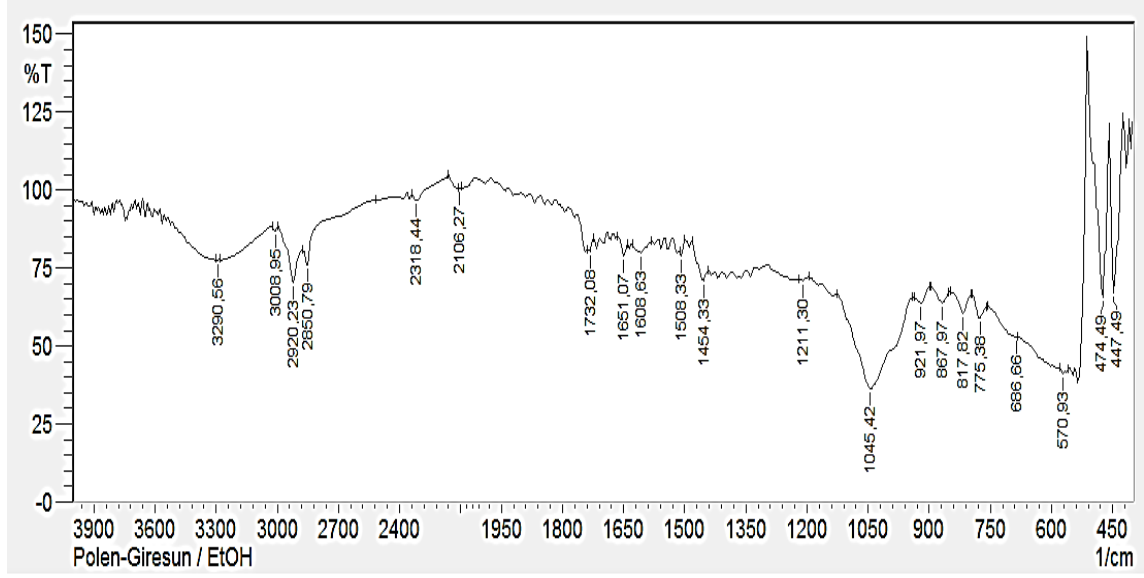


Şekil 4.17 P6 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

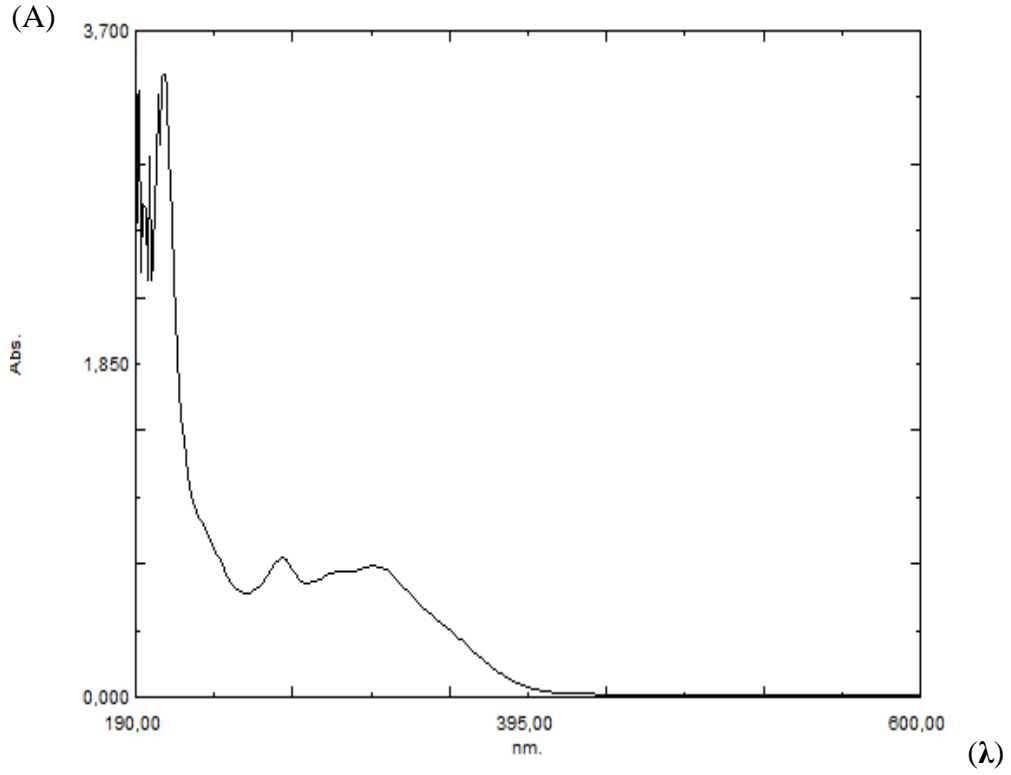


Şekil 4.18 P6 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.7 P7 Örneği

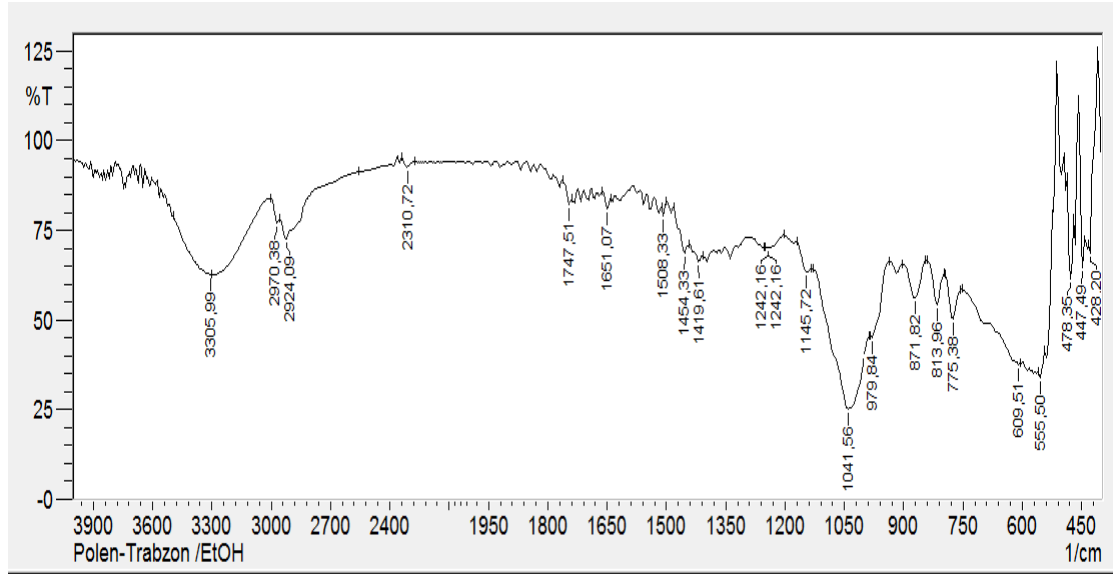


Şekil 4.19 P7 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu

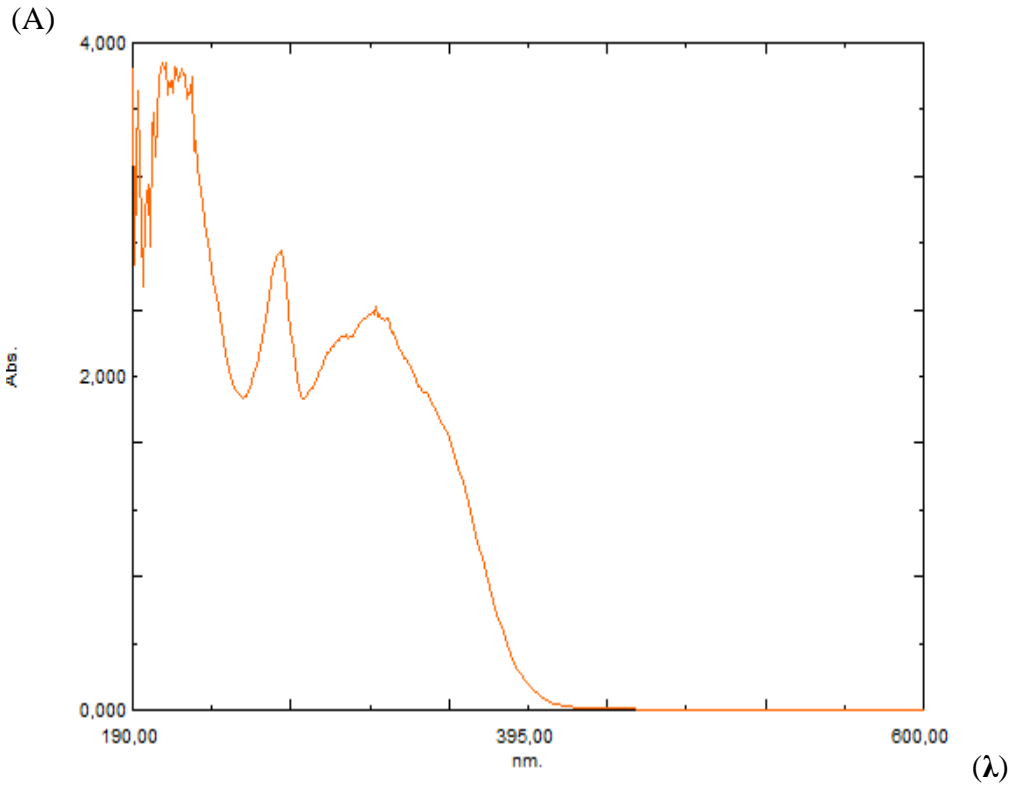


Şekil 4.20 P7 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.8 P8 Örneği



Şekil 4.21 P8 Örneğinin FTIR (ATR) Spektrumu



Şekil 4.22 P8 Örneğinin UV-Vis Spektrumu (1.5 mg ekstre/3 ml metanol)

4.4.9 UV-Vis Bulguları

Çizelge 4.9 Delibal Arı Polen Özütlerinin UV-Vis Bulguları

Ekstre	λ_{\max} (nm) ¹	A
P1	193, 271, 353	2.98, 0.61, 0.32
P2	194, 200, 264, 339	2.10, 1.96, 0.35, 0.19
P3	193, 199, 225, 265, 346	2.65, 2.40, 0.68, 0.46, 0.23
P4	196, 199, 265, 355	2.21, 1.87, 0.31, 0.15
P5	224, 302, 313	1.99, 2.50, 2.58
P6	194, 202, 265, 342	3.05, 2.79, 0.66, 0.44
P7	229, 266, 316	0.87, 0.77, 0.73
P8	267, 298, 314	2.75, 2.24, 2.38

¹ λ_{\max} : Maksimum absorbanstaki dalga boyu değeri; A: Absorbans, karşılık gelen değerler sırasıyla ifade edilmiştir.

4.4.10 FTIR Bulguları

Çizelge 4.10 Delibal Arı Polen Özütlerinin FTIR (ATR) Bulguları

Fonksiyonel grup/ Titreşim modu ¹	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
ORTAK PİKLER								
Aromatik =C-H gerilmesi	-	-	-	-	3012 (w)	-	3008 (w)	-
Alifatik C-H gerilmesi	2931 2893 2803 (w)	2939 2889 (w)	2939 2809 (w)	2893 (w)	2924 2854 (w)	2970 2924 (w)	2920 2850 (w)	2970 2924 2854 (w)
C≡N gerilmesi	2183 (w)	2326 (w)	2326 (w)	2326 (w)	2322 (w)	2380 (w)	2318 (w)	2310 (w)
Aromatik C-C gerilmesi	1597 (m)	1604 (m)	1597 (m)	1604 (m)	1604 (m)	1651 (w)	1651 (w)	1651 (w)
Alifatik C-H düzlem içi eğilme	1404 (m)	1454 (w)	1415 (m)	1446 (w)	1454 (w)	1454 (w)	1454 (w)	1454 (w)
C-N gerilmesi	1242 (w)	1246 (w)	1242 (w)	1242 (w)	1226 (w)	1246 (w)	1211 (m)	1242 (w)
C-O gerilmesi	1029 (s)	1049 (s)	1033 (s)	1029 (s)	1041 (s)	1029 (s)	1045 (s)	1041 (s)
Aromatik =C-H düzlem dışı eğilme	775 (m)	775 (m)	775 (m)	775 (m)	775 (m)	775 (m)	775 (m)	775 (m)
O-H gerilmesi	3232 (m)	3267 (m)	3267 (m)	3271 (m)	3275 (m)	3290 (m)	3290 (m)	3275 (m)
ORTAK OLMAYAN PİKLER								
C=O gerilmesi	-	-	-	-	1732 (s)	147 (s)	1732 (w)	1747 (w)

¹İlgili değerler dalga sayısıdır (cm⁻¹); Pik yoğunlukları, s: güçlü, m: orta, w: zayıf kısaltmalarıyla gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik malzemelerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, gıda, ilaç ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanımlarının araştırılması için önemlidir. Merkezi sistemdeki çevresel stres gibi çeşitli metabolik süreçler reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Bu türler canlı sistemlerdeki biyomoleküllere zarar vererek işlevlerini göstermektedir. Doğal antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini en aza indirerek doğal koruma sağlamaktadır (Mishra ve ark., 2012).

Bitkiler olağanüstü çeşitlilikte fenolik metabolitler üretir ve bu yapılarda aromatik benzen halkası üzerinde bir veya daha fazla hidroksil grubu bulunmaktadır. Fenolik asitler, flavonoidler ve proantosiyanidinler, bitkilerde yaygın bir şekilde koruyucu olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitkilerde antioksidan etki de dahil olmak üzere çeşitli işlevleri yerine getirirler. Reaktif oksijen türlerini mükemmel bir şekilde yok ederler ve fenolik radikalın elektron yok etme potansiyeli, oksijen radikallerinin potansiyelinden daha az olduğu için oksidatif reaksiyonların oluşumunu desteklemezler (Ainsworth ve Gillespie, 2007).

Bu tez çalışmasının amacı deli bal arı polenin antioksidan aktivitesinin farklı metotlar yardımıyla tayini ve fitokimyasal analiz olarak toplam fenolik bileşen ve flavonoid bileşen tayini çalışmalarının gerçekleştirilmesi olmuştur. Elde edilen sonuçlar deli bal arı polenin biyoyararlılığını destekleyecek, bilimsel temele dayalı bir çalışma olarak uluslararası bilimsel literatürle paylaşılacaktır.

Apiterapinin bir amacı da bal arısı ürünlerinin hastalıkları önleyici, iyileştirici ya da sağlığı arttırıcı etkilerinin kanıta dayalı olarak sunulması ve raporlanmasıdır. Bu tez çalışmasının sonuçları bu amaca da katkı sağlayacaktır.

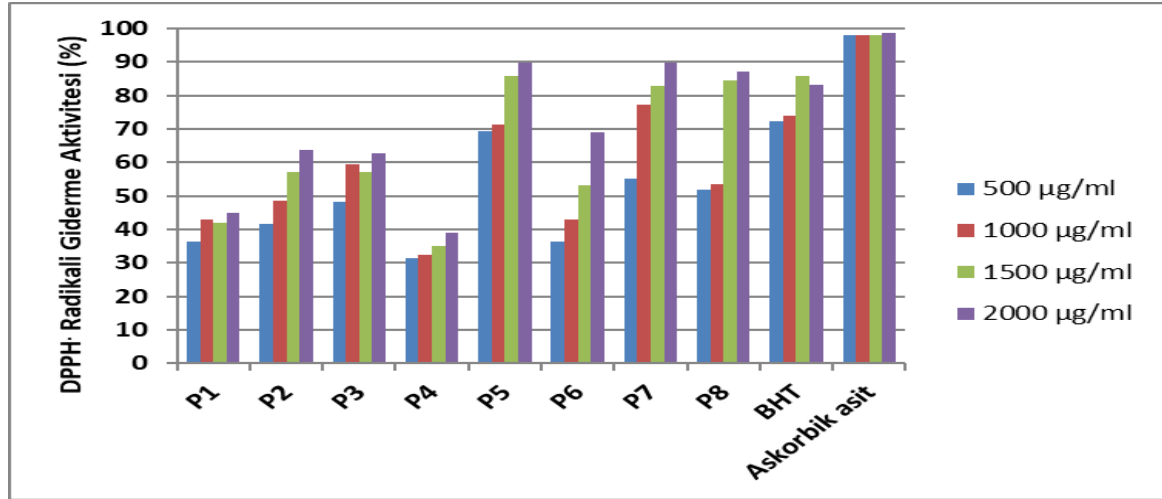
Örnekler 2017 yılı Mayıs-Haziran aylarında toplanarak çalışmalara başlanmıştır. Su ve etanolde, oda sıcaklığında ve maserasyon tekniğiyle hazırlanan örnekler **P1-P8** olarak kodlanmıştır. Tez önerisine göre isimlendirilen tez çalışmamız Ordu, Giresun ve Trabzon illerinden toplanan numunelerin araştırılmasına yöneliktir. Fakat polen temini sırasında, Sinop ilimizden de örnek alınabilmiş ve bu örnekte tez çalışmasına dahil edilmiştir. Tez çalışmamızda kullandığımız antioksidan aktivite tayin yöntemleri; ‘DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Tayini’, ‘Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç Yöntemi (PFRAP)’, ‘Fe²⁺ ile Şelat Oluşturma Aktivitesi’, ‘Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi’ ve

‘Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)’ testleridir. Ayrıca ek olarak ‘Toplam Fenolik Bileşen Tayini’ ve ‘Toplam Flavonoid Bileşen Tayini’ fitokimyasal çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Tüm testlerde doza bağlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

5.1 Antioksidan Aktivitenin Tayini

5.1.1 DPPH Radikali Süpürücü Aktivite



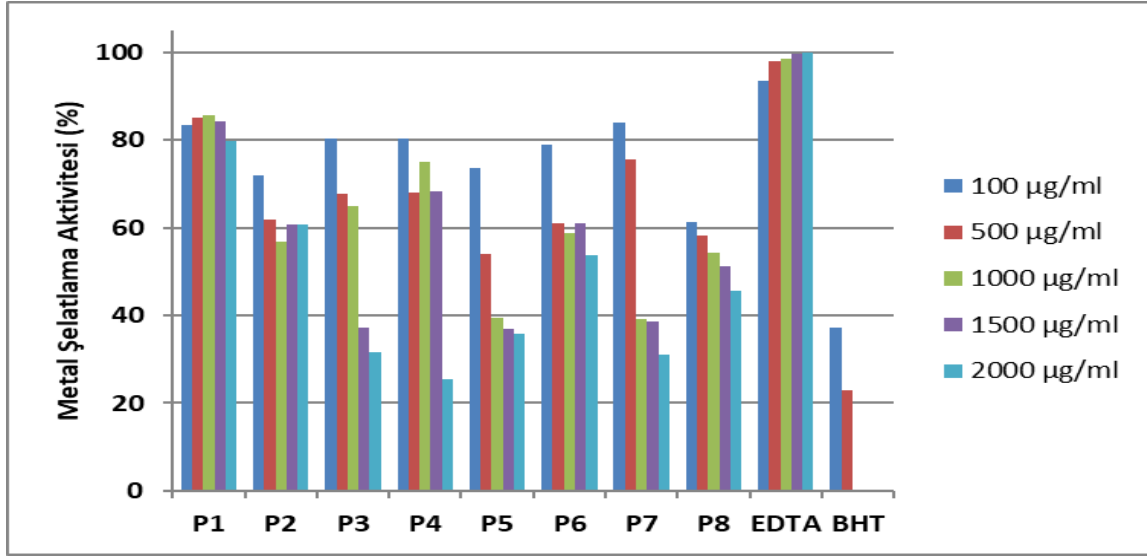
Şekil 5.1 Polen Ekstrelerinin DPPH Radikali Süpürücü % Aktiviteleri Grafikselsel Gösterimi

DPPH radikali dimerizasyon yapmayan stabil bir radikaldir. DPPH radikalinde serbest elektronun tüm molekül üzerinde konjugasyonu söz konusudur. Bu konjugasyon nedeniyle, molekül koyu mor görünür ve etanol içindeki çözeltisi 517 nm'lik bir dalga boyunda maksimum absorbans verir. DPPH radikali, serbest elektronları yakalama özelliğine sahip başka bir maddeyle karşılaştığında elektron vererek radikal özelliğini kaybeder ve bu kolorimetrik olarak ölçülebilir (Nur Alam ve ark., 2013).

Sonuçlara bakıldığında polenlerin etanol ekstrelerinin, polenlerin su ekstrelerine göre daha yüksek bir DPPH Radikali Süpürücü Aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 5.1). En yüksek aktiviteyi **P5** (Sinop-etanol), **P7** (Giresun-etanol) ve **P8** (Trabzon-etanol) kod numaralı etanol polen ekstreleri gösterirken en düşük aktiviteyi **P1** (Sinop-su) ve **P4** (Trabzon-su) kod numaralı polen su ekstreleri göstermektedir. Leja ve ark., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada 12 farklı arı poleninin antioksidan özellikleri ölçülmüş ve ‘DPPH Radikali Süpürücü Aktivite’nin %8.6 ile %91.5 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada 2000 µg/ml ekstre konsantrasyonu için 89.72 ± 4.62 , 89.85 ± 3.97 ve 86.95 ± 6.80 ‘DPPH Radikali Giderme’ değerleri [(**P5** (Sinop-etanol), **P7**

(Giresun-etanol) ve **P8** (Trabzon-etanol) için sırasıyla] elde edilmiştir. DPPH radikali süpürücü aktivitesi bölgeden bölgeye değişim göstermekle birlikte sonuçlar göstermektedir ki etanol polenler üzerinde daha etkili bir çözüğendir. Sinop ve Trabzon yaylalarından temin edilen deli bal arı polenlerinin etanol ekstrelerinin DPPH radikali gidermede en etkin örnekler oldukları saptanmıştır.

5.1.2 Metal Şelatlama Aktivitesi



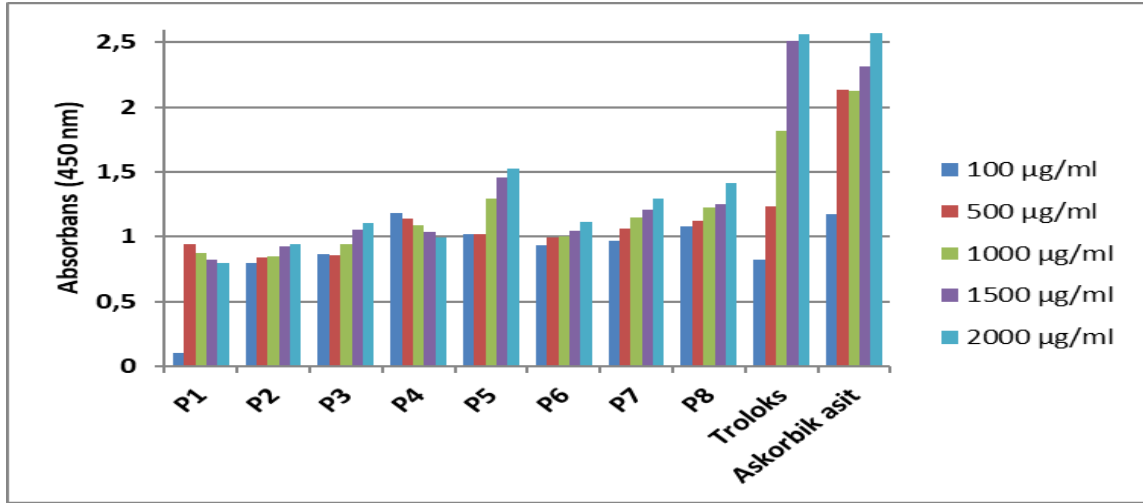
Şekil 5.2 Polen Ekstrelerinin Metal Şelatlama % Aktiviteleri Grafikselsel Gösterimi

Ferrozin, açık kırmızı bir kompleks oluşturan demir iyonu bağlayıcı bir maddedir. Diğer şelatörlerin varlığında, bu reaksiyon inhibe edilir ve renk görünümü spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Böylece, numunelerin demir iyonlarını yakalama kabiliyeti ferrozin ile yarıştırlarak belirlenir (Mohan ve ark., 2012). Geçiş metal iyonları, özellikle demir, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonuyla yoluyla serbest radikallerin oluşumundan sorumludur (Haber ve Weiss, 1932; Gülçin, 2005). Lipid peroksidasyonunun oluşturduğu peroksil ve hidroksil radikalleri, organizmada yeni radikal zincir reaksiyonlarını indükleyerek oksidatif hasarı başlatır.

Sonuçlara bakıldığında 100 µg/ml konsantrasyon değeri için bütün polen ekstreleri yüksek metal şelatlama aktivitesi göstermektedir (Şekil 5.2). Ancak konsantrasyon arttıkça polen ekstrelerinin 'Metal Şelatlama Aktivite'sinde de düşüş gözlemlenmiştir. **P1** (Sinop-su) kodlu örnekte bütün konsantrasyonlarda yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Temizer ve ark., (2018) Türkiye'de farklı 7 şehirden topladıkları polen çeşitleri üzerinde 'Metal Şelatlama Aktivitesi'ni %43.97 ile %65.21 arasında tespit etmişlerdir. Temizer ve arkadaşlarının elde

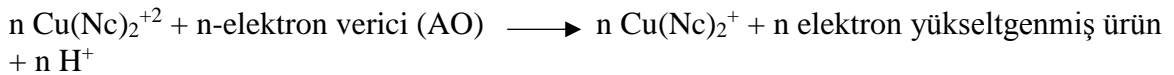
ettikleri sonuçlara göre bu çalışmada daha yüksek metal şelatlama aktivitesi değerleri saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında çözgen çeşidinin metal şelatlama aktivitesine etkisi saptanmamıştır. Sonuçlar tüm numunelerin demir şelatlama yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

5.1.3 Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi



Şekil 5.3 Polen Ekstrelerinin Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitelerinin (Absorbans) Grafikselsel Gösterimi

CUPRAC metodu için kullanılan kromojenik redoks reaktifi, bis(neocuproin)-bakır(II) şelatıdır. Bu reaktif, pH 7'de etkilidir ve indirgenmiş polifenollerle oluşan redoks reaksiyonu sonucu oluşan Cu(I)-Nc şelatı renklidir ve absorbansı 450 nm'de ölçülür. CUPRAC yönteminin kromojenik oksitleyici reaktifi, yani bis(neocuproin)-bakır(II) klorür [Cu (II) -Nc], aşağıdaki şekilde n-elektron redüktif antioksidanlarla (AO) reaksiyona girer.



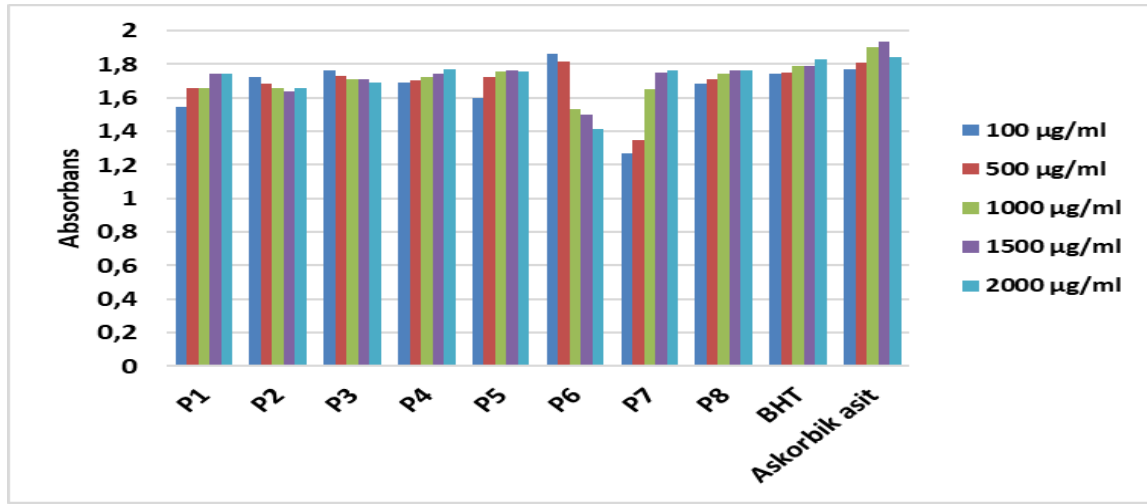
Şekil 5.4 Bis(Neocuproin)-Cu (II) Klorür ile Antioksidan Arasındaki Reaksiyon (Apak ve ark., 2004)

Bu reaksiyonda, reaktif Ar-OH polifenolik antioksidan grupları karşılık gelen kinonlara oksitlenir (askorbik asit de hidroaskorbik aside oksitlenir) ve Cu (II)-Nc, maksimum renkli Cu(I)-Nc şelatına indirgenir (Apak ve ark., 2007) (Şekil 5.4).

Sonuçlara bakıldığında **P5** (Sinop-etanol) ve **P7** (Giresun-etanol) kodlu polen ekstralarında en yüksek 'Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite' gözlemlenmektedir (Şekil

5.3). En düşük aktivite ise **P2** (Ordu-su) örneğinde gözlemlenmekle birlikte genel olarak bütün polen ekstraktları yüksek aktivite değerlerine sahiptir. Apak ve arkadaşlarının 2008 yılında raporladıkları bir çalışmada (Apak ve ark., 2008) kafeik asit ve klorojenik asit için TEAC_{CUPRAC} değerleri sırasıyla 2.89 ve 2.47 olarak belirlemiştir. Bu çalışmada ise arı poleni ekstraktlarında ‘Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite’, ‘Absorbans’ değerleriyle ifade edilmiştir ve örneklerin absorbans değerleri yaklaşık olarak trolox ve askorbik asit standartlarının kapasitesinin ortalamasını geçen değerler olarak saptanmıştır. Sinop polen etanol ekstresi (**P5**) tüm örneklerden daha yüksek Cu(II) iyonu indirgeme aktivitesi göstermektedir.

5.1.4 PFRAP (Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç) Yöntemi

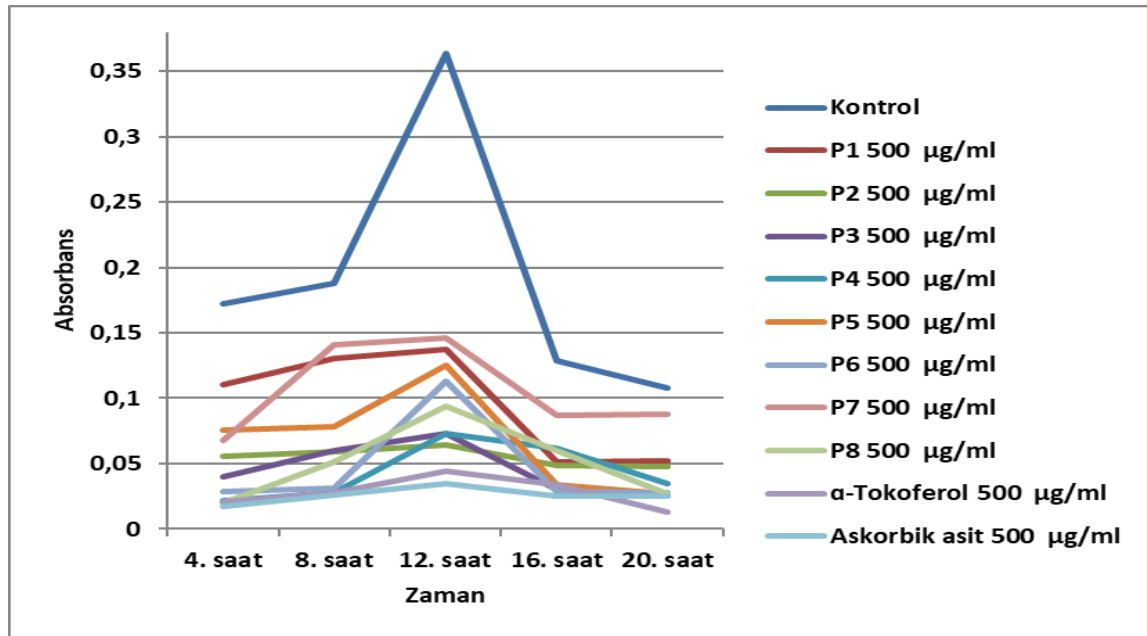


Şekil 5.5 Polen Ekstrelerinin Toplam İndirgeme Gücü Aktiviteleri (Absorbans) Grafikselle Gösterimi

Polen özütlerinin toplam indirgeme gücü, içerdikleri indirgeyici bileşiklere bağlıdır. Potasyum ferrisiyanür indirgeyici güç yöntemi, diğer antioksidan aktivite belirleme testlerini tamamlayıcıdır ve temel olarak fenollerin antioksidan kapasitesi hakkında bilgi verir (Biskup ve ark., 2013). Bu yapılar serbest radikallerin neden olduğu zincir reaksiyonları bir hidrojen radikali vererek sonlandırır. Bu yeteneğe sahip antioksidan maddeler, FeCl₃ varlığında Fe₇CN₁₈ (ferrik ferrosiyaniür) oluşturan K₄FeCN₆'yı oluşturmak üzere K₃FeCN₆ ile reaksiyona girer. Prusya mavisi renge sahip bileşik 700 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Test çözeltilerinin artan absorbansı, indirgeme gücünde bir artış olduğunu gösterir.

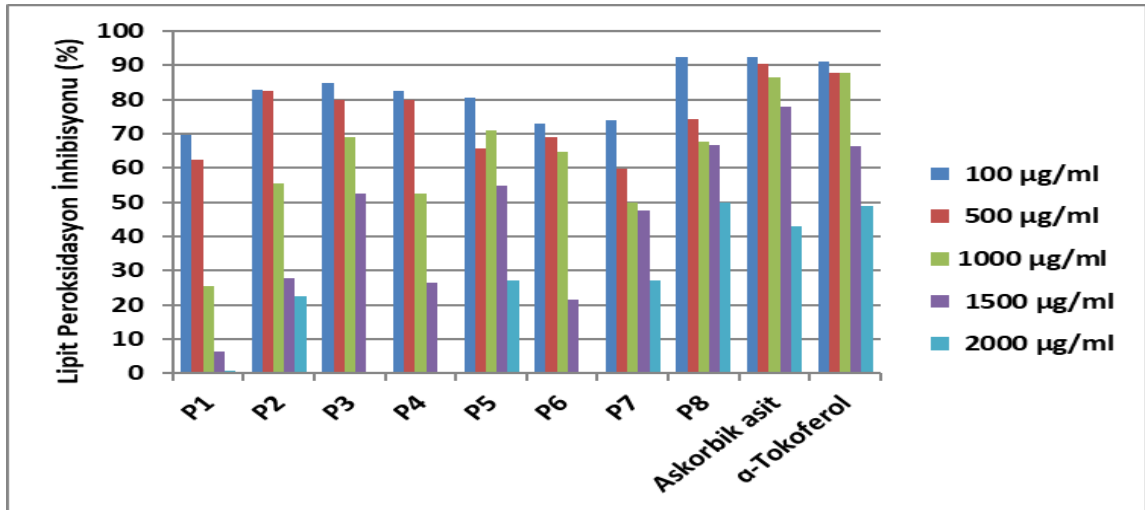
Sonuçlara bakıldığında polen ekstralarının standart olarak kullanılan askorbik asit ve BHT'ye yakın değerler gösterdiği görülmektedir (Şekil 5.5). Konsantrasyonla birlikte anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 'En yüksek Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç' **P6** kodlu Ordu yaylalarından temin edilen polen etanol ekstresinde saptanırken, en düşük potasyum ferrisiyanür indirgeyici güç **P7** kodlu Giresun yaylasından temin edilen etanol polen ekstresinde saptanmıştır. Ekstrelerin hazırlanmasında çözügen olarak kullanılan etanolün ya da suyun bu aktiviteye olan etkisi hakkında bir sonuca ulaşılamamıştır. Marghitas ve ark., (2009) Romanya'nın farklı bölgelerinden topladıkları 12 adet arı poleninde FRAP yöntemi sonuçlarını 0.255-5.355 mmol Fe (II)/g polen olarak raporlamıştır. Bu çalışmada en yüksek 'Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç' aktivite gösteren **P6** (Ordu-etanol) örneğinin 100, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml konsantrasyondaki örnekleri için elde edilen absorbans değerleri: 1.87 ± 0.03 , 1.82 ± 0.02 , 1.53 ± 0.10 , 1.50 ± 0.05 ve 1.42 ± 0.03 iken BHT standardı için elde edilen değerler sırasıyla 1.75 ± 0.03 , 1.75 ± 0.01 , 1.79 ± 0.05 , 1.79 ± 0.02 , 1.83 ± 0.06 olarak tespit edilmiştir.

5.1.5 FTC (Ferrik Tiyosiyanat) ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini



Şekil 5.6 Polen Ekstrelerinin 4 Saat Aralıklarla Ölçülen Absorbans Değerlerinin Grafikselleştirilmesi (500 µg/ml)

FTC yöntemiyle yapılan toplam antioksidan aktivite belirleme testi, lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında peroksit miktarını belirlemek üzere kullanılır. Bir organizmada meydana gelen lipid peroksidasyonu, hücre yapısını ve dolayısıyla geçirgenliğini etkileyebilen önemli bir konudur. Burada, ekstraktların linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Elde edilen peroksitler, demir(II) iyonlarını (Fe^{2+}), ferrik tiyosiyanat $[Fe(SCN)]^{2+}$ kompleksini oluşturan demir(III) iyonlarına (Fe^{3+}) okside eder. Bu kompleks 500 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Gözlenen yüksek absorbans değerleri, yüksek peroksit miktarına karşılık gelir. Polen ekstraktlarının absorbans değerleri 12. saatte pik noktasına ulaşmış ve daha sonraki saatlerde düşme eğilimi göstermiştir (Şekil 5.6). Bu sebeple tüm örnek ve standartların 12. saatteki absorbans değerleri kullanılmıştır.



Şekil 5.7 Polen Ekstrelerinin Lipit Peroksidasyonu İnhibisyonu Gücüyle İfade Edilen Toplam Antioksidan % Aktiviteleri'nin Grafikselsel Gösterimi

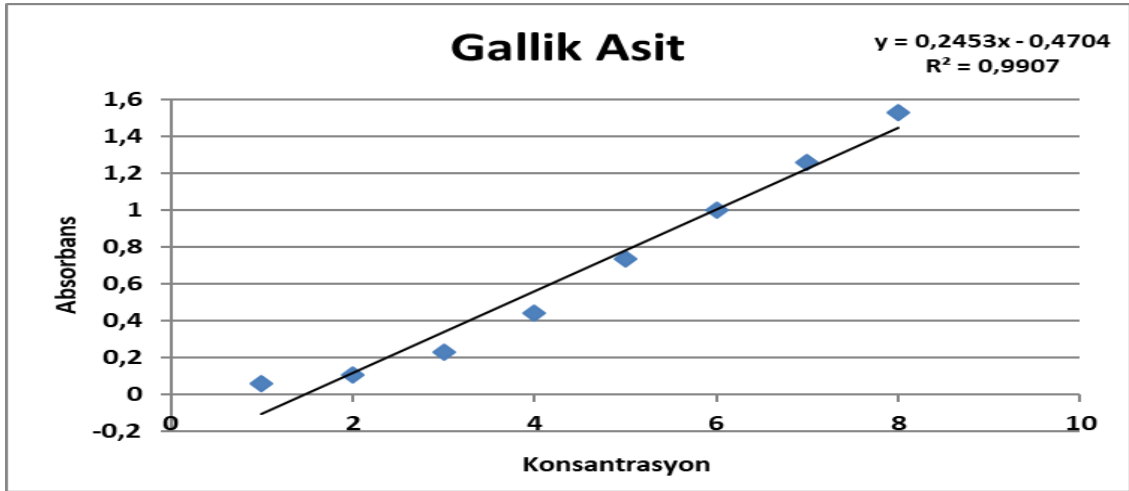
Sonuçlara bakıldığında en yüksek lipid peroksidasyonunu **P8** kodlu Trabzon yaylasından elde edilen etanol numunesinin gösterdiği, standart olarak kullanılan askorbik asit ve α -tokoferolden bile daha yüksek bir aktivite sergilediği belirlenmiştir (Şekil 5.7). En düşük lipid peroksidasyonu sağlayan örnek ise **P1** (Sinop-su) kodlu polen ekstresidir. Fakat genel olarak bakıldığında **P2** (Ordu-su), **P3** (Giresun-su) ve **P4** (Trabzon-su) kodlu numuneler de yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi göstermektedir.

5.2. Fitokimyasal Analizler

5.2.1 Toplam Fenolik Bileşen Tayini

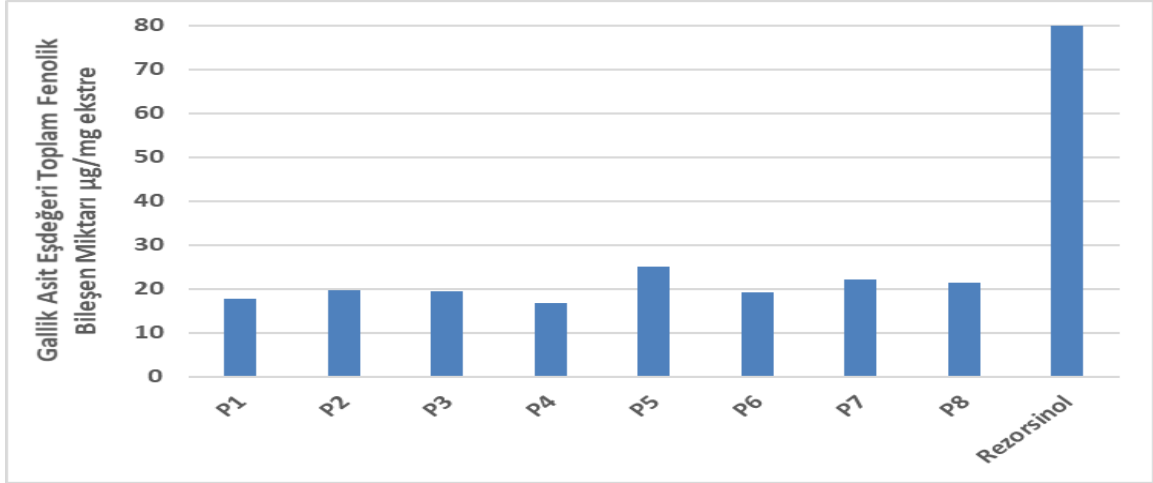
Toplam fenolik içerik belirleme yöntemi, numunedeki fenolik ve diğer indirgeyici bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifindeki molibdene elektron transferine dayanır. Karşılık gelen mavi renkli kompleks 760 nm dalga boyunda belirlenir. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinin denklemine göre hesaplanır ve 1 gram ekstrakttaki mg gallik asit eşdeğeri olarak verilir.

Spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda çalışılarak absorbans değerleri Y ekseninde ve konsantrasyon değerleri X ekseninde olacak şekilde bir standart (Gallik Asit) grafiği hazırlandı (Şekil 5.8). Standart çalışma grafiğinden elde edilen doğru denklemi $y = 0.2453x - 0.4704$ olarak belirlendi. Hazırlanan standart çalışma grafiği ile 1 mg polen özütünün içerdiği μg gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarları tespit edildi.



*SD (\pm), $p < 0.05$ (n: 3)

Şekil 5.8 Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği (c: 25, 50,100, 200, 300, 400 ve 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



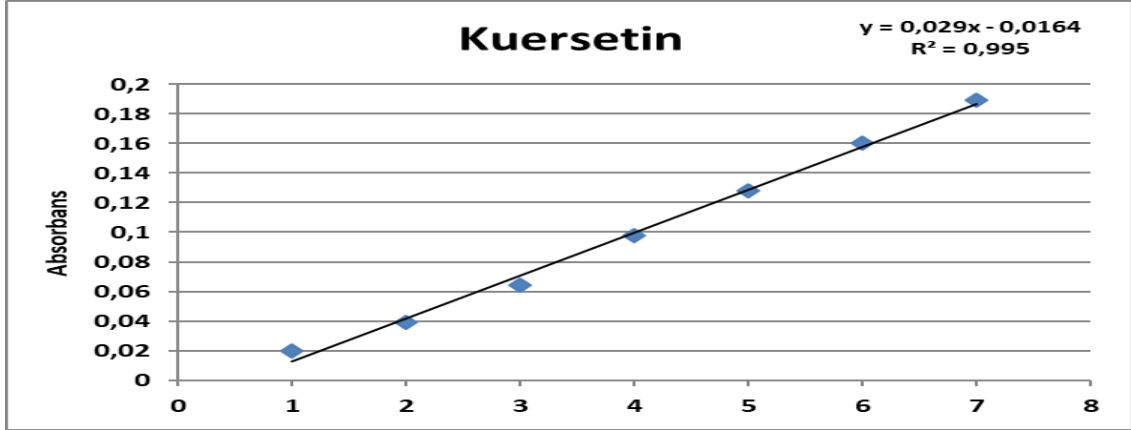
Şekil 5.9 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Gallik Asit Eşdeğeri Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre) Grafikselsel Gösterimi

Polen ekstralarının toplam fenolik bileşen madde miktarı; en yüksek **P5** (Sinop-etanol) ve **P7** (Giresun-etanol) kodlu polen ekstralarında sırasıyla 24.99 µg GAE/mg ekstre ve 22.22 µg GAE/mg ekstre değerleriyle gözlemlenirken, en düşük toplam fenolik bileşen madde miktarı 16.81 µg GAE/mg ekstre ile **P4** (Trabzon-su) kodlu polen ekstrasında bulundu (Şekil 5.9). Rebiai ve Lanez, (2012) yaptıkları bir çalışmada ortalama toplam fenolik bileşen madde miktarını 30.46 ± 8.22 µg GAE/mg polen olarak tespit etmişlerdir. Pascoal ve ark., (2011) İspanya ve Portekizden topladıkları 8 çeşit ticari arı poleni ile bir çalışma yürütmüşlerdir ve en yüksek fenolik değeri 32.15 ± 2.12 mg/g ekstre, en düşük fenolik değeri 18.55 ± 0.95 mg/g ekstre olarak saptamışlardır. Diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında polen ekstraları yüksek bir ortalama göstermiştir. Ayrıca standart olarak kullanılan rezorsinol ile karşılaştırıldıklarında yaklaşık olarak ortalama üzeri bir aktivite tespit edilmiştir. Çözücü olarak etanolün kullanıldığı örneklerde daha yüksek aktivite gözlemlenmiştir.

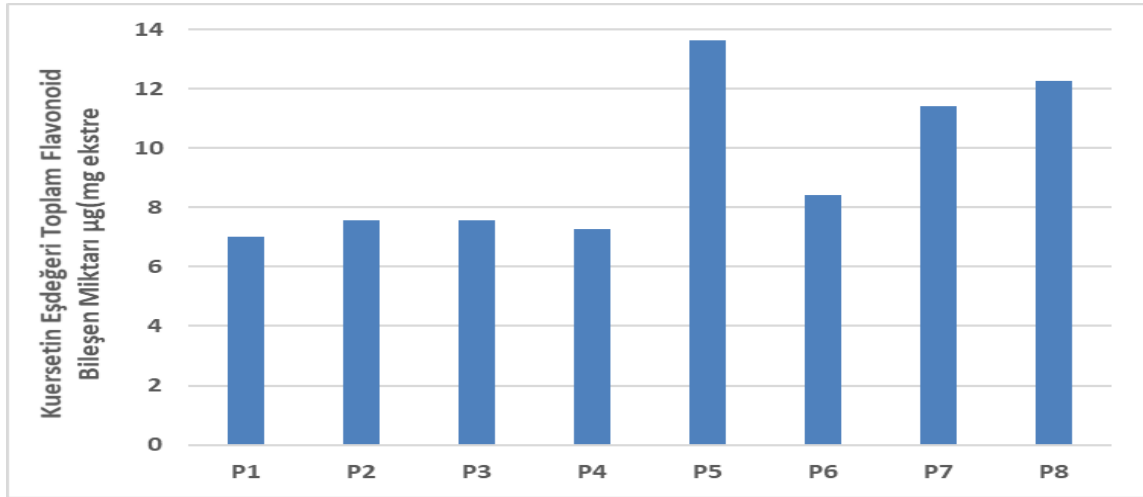
5.2.2 Toplam Flavonoid Bileşen Tayini

Bitkisel ekstraktların toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi, klorür ve C-4 keto- ya da flavon ve flavanollerin C-3 ve C-5 hidroksil grupları ile asidik ve kararlı kompleksleşme prensibine dayanan $AlCl_3$ kolorimetrik metodu kullanılarak tespit edilebilir (Bag ve ark., 2015). Kuersetin, bitkilerde bulunan toplam flavonoid bileşiklerin belirlenmesinde uygun bir standarttır. Flavonoidlerin içeriği, kuersetin kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi ile belirlenir ve kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilir.

Polen ekstralarının toplam flavanoid içeriğini belirlemek üzere ilk önce kuersetin standartının 510 nm dalga boyunda belirlenen değerler için absorbans değerleri Y ekseninde ve konsantrasyon değerleri X ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Standart çalışma grafiğinde elde edilen doğru denklemi $y = 0.029x - 0.0164$ olarak tespit edildi (Şekil 5.10). Hazırlanan standart çalışma grafiği ile 1 mg polen ekstresinin içerdii µg kuersetin eşdeğeri cinsinden flavanoid bileşen miktarları belirlendi.



Şekil 5.10 Kuersetin Kalibrasyon Grafiği (c: 25, 50,100, 200, 300, 400 ve 500 µg/ml)



Şekil 5.11 Polen Örneklerinin 1 mg/ml Ekstrelerindeki Kuersetin Eşdeğeri Toplam Flavonoid Bileşen Miktarı (µg/mg ekstre) Grafıksel Gösterimi

Polen ekstralarında toplam flavanoid bileşen madde miktarı en yüksek 13.62 µg QE/mg ile **P5** (Sinop-etanol) kodlu numune olurken, toplam flavanoid bileşen madde miktarı en düşük 7 µg QE/mg ile **P1** (Sinop-su) kodlu numunede tespit edildi. Genel olarak polenlerin etanol ekstralarında daha yüksek toplam flavanoid bileşen madde miktarı gözlemlenirken, polenlerin su ekstralarında daha düşük toplam flavanoid bileşen madde miktarı

gözlemlendi (Şekil 5.11). Marghitas ve ark., (2009) Romanya'nın farklı bölgelerinden topladıkları 12 adet arı poleninde toplam flavonoid içeriği 0.6 mg QE/g ile 13.6 mg QE/g arasında bulmuştur. Temizer ve ark., (2018) Türkiye'de 7 farklı şehirden topladıkları polen çeşitleri üzerinde toplam flavonoid içeriği 74.23 ile 111.74 mg kafeik asit eşdeğeri/100 g olarak tespit etmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarıyla yapılan bir karşılaştırmada deli bal arı poleni örneklerinin ortalama miktarda flavonoid bileşen içerdiği anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre bu metot için etanolün daha yüksek bir flavonoid içerik sonucu sergileyen çözücü olduğu söylenebilir.

5.3 FTIR ve UV-Vis Çalışması

Spektroskopik teknikler, bitki özlerinin kalitatif analizi için avantajlı bir şekilde kullanılabilir. Bitki materyali ekstraktlarının kimyasal bileşimi kullanılan çözücünün polarite değerine bağlıdır. Birçok organik ve inorganik bileşiğin, UV-Vis'te güçlü absorpsiyon bantlarına sahip olması, bu tekniği doğal bileşiklerin analizi için etkili kılar (Jain ve ark., 2016).

Sonuçlar, tüm numuneler için tipik aromatik benzen halkası E1, E2 ve B bantlarına karşılık gelen ve yaklaşık olarak 190-260 nm dalga boyu aralığında görülen $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinden ortaya çıkan bantların bulunduğunu göstermektedir. Neredeyse tüm numuneler için yaklaşık 260 ve 350 nm dalga boyları aralığında görülen iki band: Doymamış grupların ve azot, kükürt, oksijen ve halojen gibi heteroatomların varlığına işaret olabilir. Sonuçlara göre, deli bal arı poleni ekstraktları kendi içlerinde benzer absorpsiyon spektrumlarına sahiptir. Tüm ekstraktlarda görülen yaklaşık 300-350 nm civarındaki absorpsiyon bantları (**P1-P8** sırasıyla: 353, 339, 346, 355, 313, 342, 316 ve 314 nm) organik kromofor grupların varlığını göstermektedir.

FTIR tekniğinin, selüloz, lignin, pektin, mineraller ve balmumları gibi doğal liflerin ana ve küçük fito içeriklerinin tanımlanmasında dikkat çekici bir teknik olduğu bulunmuştur. Bitkilerde FTIR ile aktif bileşenlerin fonksiyonel gruplarının karakterizasyonu ve tanımlanması çoğunlukla başarılıdır (Cozzolini, 2009). Numunelerin FTIR spektrumlarında gözlenen aromatik =C-H gerilmeleri, aromatik C-C gerilmeleri, aromatik =C-H düzlem dışı eğilme pikleri aromatik grupların ve fenolik bileşenlerin, alifatik =C-H gerilmeleri, alifatik C-H düzlem içi eğilme pikleri alifatik bileşiklerin, C-N gerilmesi amino asitlerin/proteinlerin, C-O gerilmesi fenolik bileşikler, karbohidratlar ve yağların,

ve sadece **P5** (Sinop-etanol), **P6** (Ordu-etanol), **P7** (Giresun-etanol) ve **P8** (Trabzon-etanol) örneklerinde rastlanan C=O gerilmesi ise yağların, yağ asitlerinin, karbohidratların ve bazı vitaminlerin, O-H gerilme bantları ise fenolik bileşenlerin varlığına işaret edebilir. Numunelerin her birinde aromatik grupların varlığı tespit edilmiş, fakat sadece **P5** (Sinop-etanol) ve **P7** (Giresun-etanol) örnekleri için aromatik =C-H gerilme değerleri (3012 cm⁻¹ ve 3008 cm⁻¹, sırasıyla) okunabilmiştir. Diğer numunelerin karşılık gelen gerilme değerleri, geniş O-H gerilme bandının altında kaldığı için okunamamıştır. Karbonil gerilme değerlerinin sadece etanolik ekstrelerde saptanması, suyun karbonil grubu içeren fonksiyonel yapıları ekstre edemediğini göstermektedir.

5.4 Öneriler

Deli bal yüzyıllardır geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanılan doğal bir bal türüdür. Fakat insanoğlunun edindiği tecrübeler bu balın az miktarlarda kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur. Yapılan bilimsel çalışmalar deli balın kg vücut ağırlığı başına 50 mg olarak, örneğin 100 kg ağırlıkta bir kişi için 5 g, yaklaşık 1 kahve kaşığı kadar kullanılması gerektiğini göstermektedir. Ülkemizde ve dünyada, bal üretimi sırasında arıların bacaklarından dökülen polen, deli balın zehirleyici etkisinden dolayı toplanmamaktadır. Bunun sebebinin deli balda bulunan ve belirli bir miktardan sonra toksik ve halusinojenik etki oluşturan grayanotoksin maddesi olduğu bilinmektedir. Tarihte ilk biyolojik silah olarak kullanılan deli balla ilgili araştırmalara hep çekingen yaklaşılmıştır. Bir başka sebep ise araştırmacıların saf deli bala ulaşabilme güçlüğüdür. Oysaki arı poleni sağlığa sayısız katkı sağlayan bir besin desteğidir ve literatürde deli bal arı poleninin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ya da fitokimyasal bileşen miktarının saptanmasıyla ilgili tek bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmayla deli bal arı poleninin antioksidan özelliği ve fitokimyasal bileşen miktarı ortaya konmuştur. Elbette deli bal arı poleninin diğer biyoaktif özelliklerinin araştırılması da büyük önem taşımaktadır.

Fakat balı gibi, balın poleni için de kg vücut ağırlığı başına tüketilebilir miktarının araştırılması önemlidir. Ancak o zaman fayda sağlayan bir besin desteği olarak kullanılması önerilebilir.

Arıların bal üretimi sırasında, büyük bir kısmı petek dışına dökülen arı poleninin polen tuzaklarıyla biriktirilmesi önemlidir. Çünkü, polenin sadece hastalıkları iyileştirici etkisi

için ya da gıda desteği olarak kullanılması düşünülemez. Elbette, polen faklı alanlarda kullanılabilen bir biyomalzeme olarak da değerlendirilebilir ve önemli bir ticari ürüne dönüştürülebilir.

Günümüzde geleneksel ve tamamlayıcı tıp olarak nitelendirilen doğal ürünlerle tedavide, bu ürünlerle ilgili araştırmalardan elde edilecek sonuçların göz önünde bulundurulması, daha bilinçli ve etkili kullanımları açısından özellikle önem taşımaktadır. Bu sebeple, hastalıkları önleyici ya da tedavi amaçlı kullanılan doğal ürünlerle yapılacak araştırmalar, geleneksel ve tamamlayıcı tıbbın bilimsel tabanını oluşturması nedeniyle destekleyici çalışmalar olarak artış göstermelidir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelmonem, A. M., Rasheed, S. M., & Mohamed, A. S. (2012). Bee-honey and yogurt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286(1), 109-114.
- Ainsworth E. A., & Gillespie K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, 875-877.
- Ainsworth, E., & Gillespie K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-ciocalteu reagent. *Nature Publishing Group*, 2(4), 875-877.
- Al Somai N., Coley, K. E., Molan, P. C., & Hancockb, M. (1994). Susceptibility of heliobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87, 9-12.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., González- Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., Bompadre, S., Quiles, J. L., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1508-1516.
- Anonim, (1989). Polen. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Anonim, (1990). Bal. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Anonim, (2010a). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhododendron_luteum_02.JPG (Erişim tarihi: 20.03.2019).
- Anonim, (2010b). <http://www.haberturk.com/saglik/haber/532291-bilincsiz-kullanilan-aci-balzehirliyor>. (Erişim tarihi: 20.03.2019).
- Anonim, (2010c). <http://www.gazetevatan.com/dikkat---bu-bali-sakin-yemeyin--349246-saglik/>. (Erişim tarihi: 20.03.2019).
- Anonim, (2011). www.tab.org.tr/downloads/orman_gulu_rhododendronbali.pdf. (Erişim tarihi: 12.08.2011)
- Anonim, (2013a). <http://www.nodiggardener.co.uk/2013/10/a-passion-for-rhododendrons.html>.
- Anonim, (2013b). <http://www.haberturk.com/saglik/haber/832753-deli-bal-can-aldi> (Erişim tarihi: 20.03.2019)
- Anonim, (2015). <http://www.bermondseystreetbees.co.uk/in-the-apiary-mid-august-csi-pollen-study> (Erişim tarihi: 20.03.2019)
- Anonim, (2016). <http://www.trthaber.com/haber/turkiye/deli-bal-3-kisiyi-zehirledi-249560.html>. (Erişim tarihi: 20.03.2019)
- Anonim, (2018a). <https://www.medicalnewstoday.com/articles/321873.php>. (Erişim tarihi: 20.03.2019)
- Anonim, (2018b). <http://www.tab.org.tr/> (Erişim Tarihi: 21.03.2019).

- Anonim, (2018c). <https://yemek.com/ari-poleni/>. (Erişim tarihi: 20.03.2019).
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., & 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 (26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., & Özyurt, D. (2007). comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Celik, S. H. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160, 413–419.
- Arora, A., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (1988). Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1355-1363.
- Arts, I.C., Hollman, P.C., & Kromhout, D. (1999). Chocolate as a source of tea flavonoids. *The Lancet*, 354(9177), 488.
- Avcı, M. (2004). Rhododendrons and their natural occurrences in Turkey. *Coğrafya Dergisi*, 12, 13-29.
- Aynacı, O., Gunduz, A., Guzel, N., Karahan, S. C., Mentese, A., Sahin, A., Turedi, S., Turkmen, S., & Yulug, E. (2014). A Comparison of the effects of “mad honey,” normal honey and propolis on fracture healing. *Elsevier*, 46(2), 302.
- Bag, G. C., Devi, P. G., & Bhaigiyabati, T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154-159.
- Benslama, A., & Harrar, A. (2016). Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian Sahara medicinal plants extracts. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(6), 158-161.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, & A., Sroka, Z. (2013). Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 67, 958-963.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Bognadov S. (2004). Quality and standard of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334-341.
- Bonhevi S. J., & Jorda E. J. (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honeybee- collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 725-732.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., & Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28, 25–30.

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Bulut, S., & Lenger, D. S. (2015). Antik Dönemde Arı Ürünlerinin Kullanımı: Arı Ürünleri ve Sağlık, Editörler: Akçiçek, E., Yücel, B., Sidas, İzmir, 7-12.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer – a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236–1258.
- Carpes, S. T., Begnini, R., de Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 31(6), 1818-1825.
- Carr, A. C., & Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 169 (6), 1086-1107.
- Chang, L.W., Yen, W. J., Huang, S. C., & Duh, P. D. (2002). Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, 78, 347-354.
- Cozzolino D (2009). Near Infrared Spectroscopy in natural products analysis. *Planta Medica*, 75, 746-756.
- Craig, W. J. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 491-499.
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stress ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çeter, T., & Güney, K. (2011). Ormangülü ve Deli Bal. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 11(4), 124-129.
- Demir, S., Turan, İ., & Yazıcıoğlu, Y. (2016). Selective cytotoxic effect of Rhododendron luteum extract on human colon and liver cancer cells. *Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(4), 883-888.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38, 674-677.
- Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen. a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4303-4309.
- Di Bella, G., Lo Turco, V., Potorti, A. G., Bua, G. D., Fede, M. R., & Dugo, G. (2015). Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 25–35.
- Doğaroğlu, M. (2015). Arı Ürünleri ve Sağlık: Arı Ürünleri ve Sağlık, Editörler: Akçiçek, E., Yücel, B., Sidas, İzmir, 17-23.
- Du, Q., Zheng, J., & Xu, Y. (2008). Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 390-395.
- El Denshary, E. S., Al-Gahazali, M. A., Mannaa, F. A., Salem, H. A., Hassan, N. S., & Abdel Wahhab, M. A. (2011). Dietary honey and ginseng protect against

carbon tetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8), 753-760.

- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, Salleh, K. N. S., & Gurtu, S. (2012). Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-14.
- Ertürk, Ö., Karakaş, F., Pehlivan, D., & Nas, N. (2009). The antibacterial and antifungal effects of Rhododendron derived mad honey and extracts of four Rhododendron species. *Turkish Journal of Biology*, 33, 151-158.
- Fauzi, A. N., Norazmi, M. N., & Yaacob, N. S. (2011). Tualang honey induces apoptosis and Disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 871- 878.
- Feas X., Vazquez-Tato M. P., Estevinho L., Sei-jas J. A., & Iglesias A. (2012). Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17 (7), 8359-8377.
- Fedakar, P. (2015). Türk Kültüründe Arı ve Bal: Arı Ürünleri ve Sağlık, Editörler: Akçiçek, E., & Yücel, B., Sidas, İzmir, 1-6.
- Gök Uğur, H., Efe, B., Tekgül, A. T., & Sıralı, R. (2015). Deli Balın Alternatif Tedavide Kullanımı: Türkiye Ordu İli Örneği. Uluslararası Katılımlı 3. Kültürlerarası Hemşirelik Kongresi, 21-25 Mayıs, Çanakkale.
- Gökpmar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 1(1), 85-89.
- Gülçin, İ. (2005). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gündüz, A., Türedi, S., & Ayaz F. A. (2011). Deli Balın İçindeki Zehir: Grayanotoxin. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 95-96.
- Haber F., Weiss J. (1932). Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*. 20 (51), 948–950.
- Haro, A., Lopez-Aliaga, I., Lisbona, F., Barrionuevo, M, Alferez, M. J., & Campos, M. S. (2000). Beneficial effect of pollen and/or propolis/on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5715-5722.
- Irondi, E. A., Oboh, G., Akindahunsi, A. A., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2015). Phenolics composition and antidiabetic property of Brachystegia eurycoma seed flour in high-fat diet, low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5, 159–165.
- Jaganathan, S. K., & Mandal, M. (2010). Involvement of non-protein thiols, mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species and p53 in honey induced apoptosis. *Investigational New Drugs*, 28(5), 624-33.
- Jaganathan, S. K., Mazumdar, A., Mondhe, D., & Mandal, M. (2011). Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. *Cell Biology International*, 35(6), 607-15.

- Jain P. K., Soni A, Jain P., & Bhawsar J. (2016). Phytochemical analysis of *Mentha spicata* plant extract using UV-VIS, FTIR and GC/MS technique. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 1-6.
- Jayanthi, P., & Lalitha, P. (2011). Reducing Power Of The Solvent Extracts Of *Eichhornia Crassipes*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 126-128.
- Jin, T.Y., Saravanakumar, K., & Wang, M. H. (2018). In vitro and in vivo antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 186–189.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (1), 65-76.
- Kasapçopur Özel, G. S., & Birdane Y. O. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 7 (2), 41-52.
- Keckes, S., Gasic, U., Velickovic, T. C., Milojkovic-Opsenica, D., Natic, M., & Tesic, Z. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138, 32–40.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
- Kızılpınar Temizer, İ., Güder, A., Temel, F. A., & Avcı, E. (2018) A comparison of the antioxidant activities and biomonitoring of heavy metals by pollen in the urban environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(8), 462.
- Koca, İ., & Koca, A. F. (2007). Poisoning by mad honey: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 1315-1318.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., & Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5(1), 1-14.
- Komosinska Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-6.
- Krell, R. (1996). Value-Added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Kurtoğlu, A. B., Yavuz, R., & Akdemir Evrendilek, G. (2014). Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar. *Food Chemistry*, 161, 47-52.
- LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Food antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Chemistry*, 115, 1299–1305.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekonska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100, 237–240.

- Li, Y., Schellhorn, & H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition*, 137(10), 2171-2184.
- Maghsoudi, H., Salehi, F., Khosrowshahi, M. K., Baghaei, M., Nasirzadeh, M., & Shams, R. (2011). Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of burn wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 24(3),132-137.
- Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C., & Torres, J. L. (2008). A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *Journal of Neurochemistry*, 107, 690-700.
- Malkoç, M., Laghari, A. Q., Kolaylı, S., & Can, Z. (2016). Phenolic Composition and Antioxidant Properties of *Rhododendron ponticum*: traditional nectar source for mad honey. *Analytical Chemistry Letters*, 6(3), 224-231.
- Marghitaş, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. G. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115, 878-883.
- Masella, R., Di Benedetto, R., & Vari, R. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1610, 577-586.
- Mathew, S. & Abraham, T. E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, 94, 520-528.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- Mohamed, M., Sulaiman, S. A., Jaafar, H., & Sirajudeen, K. N. S. (2010). Effect of different doses of Malaysian honey on reproductive parameters in adult male rats. *Andrologia*, 44(1), 182-186.
- Mohan, S. C., Balamurugan, V., Thiripura Salini, S., & Rekha, R. (2012). Metal ion chelating activity and hydrogen peroxide scavenging activity of medicinal plant *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(1), 197-202.
- Morais, M., Moreira, L., Feas, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1096-1101.
- Nur Alam M., Bristi N. J., & Rafiquzzaman M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Othman, N. H. (2012). Honey and cancer: sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.


- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Öztaşan, N., & Songur, A. (2007). Sıçanda antihipertansif olarak deli bal kullanımı. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 8, 55-58.
- Öztaşan, N., Altınkaynak, K., Akçay, F., Göçer, F., & Dane, Ş. (2005). Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 1093-1096.
- Öztürk, A. İ., & Akçiçek, E. (2015). Polen ve Polenin Tıbbi Özellikleri: Arı Ürünleri ve Sağlık, Editörler: Akçiçek, E., Yücel, B., Sidas, İzmir, 107-114.
- Özyurt G. (2006). Deli bal-eski silah olgu sunumu. *Anestezi Dergisi*, 14(2), 133.
- Pallab, K., Barman, T. K., Pal, T. K., & Ramen, K. (2013). Estimation of total flavonoids content (TFC) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum Sensitivum Linn.* *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(4), 33-37.
- Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Heo, B. K. H., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., & Gorinstein, S. (2008). Antioxidants and proteins in ethylenetreated kiwi fruits. *Food Chemistry*, 107, 640-648.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feas, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 233–239.
- Pasupuleti, V. R., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, 657–664.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. (2008). *International Journal of Biomedical Sciences*, 4(2), 89-96.
- Rebiai, A., & Lanez, T. (2012). Composition and antioxidant activity of *Apis Mellifera* bee pollen from Northwest Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 4(2), 155-163.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Trucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Samarghandian, S., Afshari, J. T., & Davoodi, S. (2011). Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 46-52.
- Sen S., & Chakraborty R. (2011). The role of antioxidants in human health. *American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, 1, 1-37.
- Silici, S. (2014). Arı poleni ve arı ekmeği. *Uludag Bee Journal*, 14(2), 99-105.

- Silici, S., Sagdic, O., & Ekici, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry*, 121, 238–243.
- Silici, S., Uluoğlu, O. D., Tuzen, M., & Soylak, M. (2008). Assessment of trace element levels in Rhododendron honeys of Black Sea Region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1-3), 612-618.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Soriani, M., Pietraforte, D., & Minetti, M. (1994). Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 180-188.
- Sudan, R., Bhagat, M., Gupta, S., Singh, J., & Koul, A. (2014). Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (Himalayan Cobra Lily). *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 1-7.
- Şahin, H., Akyüz Turumtay, E., Yıldız, O., & Kolaylı, S. (2014). Grayanotoxin-III detection and antioxidant activity of mad honey. *International Journal of Food Properties*, 18(12), 2665-2674.
- Şahinler, N. (2000). Arı ürünleri ve insan sağlığı açısından önemi. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 5(1-2), 139-148.
- Uçar, M., Değer, O., Yiğit Gerigelmez, A., Cengiz, S., Barlak, Y., & Ovalı, E. (2016). Effect of Turkish pollen and propolis extracts on caspase-3 activity in myeloid cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(11), 2445-2449.
- Ulusoy, E. 2010. Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
- Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y., & Li, S. (2013). Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular Medicine Reports*, 7(5), 1555-1558.
- Wang, L., Lee, I. M., Zhang, S. M., Blumberg, J. B., Buring, J. E., & Sesso, H. D. (2009). Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(3), 905–912.
- Wu, Y. D., & Lou, Y. J. (2007) A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells 194. *Phytotherapy Research*, 21(11), 1087-1091.

- Yavaşer, R. (2011). Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın.
- Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2009). The *in-vitro* antioxidant activity and total phenolic content of four Indian medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 88-95.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hilal ATMACA
Doğum Yeri	Şişli
Doğum Tarihi	10.06.1989
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0535 648 03 46
E-Posta Adresi	hilaltevkur@hotmail.com



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya Bölümü
Mezuniyet Yılı	28.06.2011

Yayınlar
Hilal Atmaca, Emine Bağdatlı, Ömer Faruk Atmaca, Serdar Mehmetoğlu, “Antioxidant Activity of <i>Rhododendron Ponticum</i> Bee Pollen”, 6. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, 15-19 Ekim 2018, Muğla, Türkiye.
Emine Bağdatlı, Hilal Tevkür, “Total Phenolic and Flavonoid Content of Mad Honey Bee Pollen from Black Sea Region of Turkey”, International Balcan Chemistry Congress (IBCC), 17-20 Eylül 2018, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.
Emine Bağdatlı, Hilal Tevkür, “Total Antioxidant Capacity Determination of Mad Honey Bee Pollen with Ferric Thiocyanate Method”, 1. Uluslararası Teknoloji Bilimleri ve Sempozyumu (ITESDES), 7-29 Haziran 2018, Giresun Üniversitesi, Giresun, Türkiye.
Bağdatlı, E., Tevkür, H. “Türkiye, Karadeniz Bölgesi Yaylaları, Deli Bal Arı Poleninin Antioksidan Özellikleri, Toplam Fenolik Bileşen ve Flavanoit Tayini”, Araştırma projesi, ODÜ-BAP (AR-1648), (20.10.2016-Devam ediyor.