

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

# TÜKETİLEBİLİR PROPOLİS EKSTRELERİNDE KULLANILAN ÇÖZÜCÜLERİN (MENSTRUMLARIN) DEĞERLENDİRİLMESİ

## Evaluation of Solvents (Menstruums) Used in Consumable Propolis Extracts

Oktay YILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-0436-682X, E-posta: oktayyildiz@ktu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 15.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.659556

### ÖZ

Bu çalışmada propolis ekstraksiyonunda farklı çözücüler kullanarak elde edilen ekstraktların özellikleri araştırıldı. Su, gliserol, glikol ve etanolik ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri kıyaslandı. İstatistiksel olarak etanolik ekstraktlar fenolik madde miktarı, flavonoid madde miktarı ve FRAP antioksidan kapasitesi bakımından diğerlerinden yüksek bulundu. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri ile çözücülerin dielektirik sabitleri arasında paralellik gözlemlendi. Numunelerin toplam fenolik madde miktarları 0,79-87,56 mg GAE/mL; toplam flavonoid madde miktarları 0,73-24,72 mg KE/mL arasında ve FRAP antioksidan kapasite 7,52-870,121 mM Trolox E/mL arasında bulundu. Bulgular etanolik ekstraktlara glikol ekstraktlarının alternatif olabileceğini göstermiştir. Ekstrelerin farklı biyoaktif özellikleri ile birlikte çözücülerin kullanım limitlerinin göz önüne alınması gerekliliği tartışıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Propolis, Ekstraksiyon, Çözücü, Antioksidan Aktivite

### ABSTRACT

In this study, properties of extracts obtained by using different solvents in propolis extraction were investigated. The antioxidant activities of water, glycerol, glycol and ethanolic extracts were compared. Statistically ethanolic extracts were higher than others in terms of phenolic content, flavonoid content and FRAP antioxidant capacity. A parallelism was observed between the antioxidant capacities of the extracts and the dielectric constants of the solvents. Total phenolic amount of samples was 0.79-87.56 mg GAE/mL; total flavonoid substance amounts were between 0.73-24.72 mg KE/mL and FRAP antioxidant capacity was between 7.52-870.112 mM Trolox E / mL. Findings showed that glycol extracts may be an alternative to ethanolic extracts. The different bioactive properties of the extracts, along with the need to consider the limits of the use of solvents were discussed.

**Key words:** Propolis, Extraction, Solvent, Antioxidant Activity

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Propolis is a natural compound widely used in apitherapy since ancient times. In terms of its physical and chemical structure, direct consumption is not common and it is considered scientifically unsuitable. The main purpose of the consumption of propolis is to take advantage of particular useful components. Therefore, it is

necessary to separate the bioactive components from the non-bioactive waxy part of the propolis. This separation can be carried out by different extraction methods. The solvent used in the extraction process is the most important factor in the isolation of certain bioactive components. In addition, factors such as the extraction method (traditional or modern methods), temperature, and time are also important

in determining which bioactive components are extracted.

Today, the most widely used propolis extraction method is performed with ethyl alcohol. Ethanolic propolis extracts have a very high biological value. However, there are individuals who do not want to consume ethyl alcohol and children cannot consume these extracts because of the alcohol toxicity. Around the world, the tendency towards ethyl alcohol-free propolis extracts is increasing day by day. Water, olive oil, other vegetable oils, essential oils, polyalcohols/polyols (glycols), and vinegar, among others, are used as alternative solvents for propolis extraction.

The most important biologically active constituents in propolis are phenolic acids and flavonoids. Volatile components, organic acids, protein/peptides, and enzymes are also present. The polarity of each of these components is different. The most important factor in the dissolution of a component in the solvent is its polarity. An effective extraction cannot be obtained if the component-solvent pair has distant polarity levels. Therefore, it is very important and difficult to choose an effective extraction method and solvent. As a result, the biological activity of some propolis extracts on the market is quite low.

The most important risks in the solvents used are the toxicity of the solvent, the daily intake limits, and absorption excretion of the solvent in the body and the digestion products of the solvent in the body. Legal regulations and scientific findings should be taken into consideration in the production and consumption of propolis extracts which are considered to be food supplements.

**Materials and Methods:** Propolis samples collected from Maçka, Trabzon, in 2019, were used in this study. Propolis produced by Caucasian bees were taken from traps and frozen within the same day. On the day of extraction, the propolis was ground in a laboratory type blender. Samples were extracted with a propolis: solvent ratio of 1:10. Extraction was carried out at 40 degrees C, in the dark, for 24 hours, in a water bath. The mixture was first filtered through a coarse filter followed by a fine filter. The antioxidant capacity of the samples was determined by total phenolic content, flavonoid content, and FRAP antioxidant power determination methods. Our findings were evaluated using SPSS statistical software.

**Results and discussion:** The antioxidant capacities of the extracts were correlated with the dielectric constants of the solvents. The total phenolic content of the samples was 0.79 - 87.56 mg GAE/mL, the total flavonoid contents were between 0.73 - 24.72 mg KE/mL and the FRAP antioxidant capacity was between 7.52 – 870.121 mM Trolox E/mL. The results revealed that glycol extracts could be a viable alternative to ethanolic extracts. However, it is important to consider the usage limits of glycol as a solvent.

**Conclusion:** In this study, we compared different solvents to be used in the extraction of propolis and determined the consumable doses. In the propolis extraction industry, care must be taken so that the solvent used in the extraction is permitted. When preparing propolis standards, the relevant authorities should not focus solely on the biological activities of the final products. The solvents used must be included as part of the standard. The full name of the solvent (such as mono propylene glycol or polypropylene glycol) should be reported exactly on the label, and not be vaguely reported such as mentioning the solvent is only glycol.

### GİRİŞ

Balarılarının (*Apis mellifera*) ve bazı iğnesiz arı türlerinin değişik ağaç ve bitkilerden topladığı reçine benzeri maddeleri, balmumu, polen ve kendi sekresyonları ile karıştırarak oluşturduğu farklı renklerdeki (yeşil, kırmızı, sarı, kahverengi) yapışkan madde olarak bilinen propolis (Mot v.d. 2010) oldukça yüksek tıbbi, ekonomik ve tarihe değere sahip biyolojik bir üründür (Pobiega v.d. 2019, Saral v.d. 2019, Freires v.d. 2016, Sforcin 2007). Kavak, kızılbaş, huş, okalipüt, akasya, imza ağacı, kestane dahil çok sayıda ağacın yaprak, kabuk, çiçek, tomurcuk, çatlak ve saplardan toplanan oldukça yapışkan maddeler propolisin ana maddesini teşkil ederler (Baltas v.d. 2016, Bankova v.d. 2014a,). Arılar propolisi kovanlarını dış etkilere karşı korumak, kovan içi dezenfeksiyonu sağlamak, petek gözlerini temizlemek ve bal/yavru koymaya hazır hale getirmek, haşere ve hastalıklarla mücadele etmek için kullanırlar (Wagh 2013, Kartal v.d. 2003, Prytyk v.d. 2003, Hikmet ve Nazime 2006).

Propolis insanlık tarafından antik çağlardan beri kullanılmış, mumyalama ritüellerinde, halk hekimliğinde yer bulmuştur. Daha yakın zamanda ise yiyecek ve içecek endüstrisinde, kozmetik

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sektöründe, gargaralarda ve diş macunlarında kullanım alanına girmiştir (Wagh 2013, Banskota v.d. 2001). Propolis bu kadar geniş kullanım alanı bulmasının sebebi oldukça yüksek antioksidan aktivite, antimikrobiyal etki, anti inflamatuvar etki, antikanser etki, antitüberküloz etki, analjesik etki, doku yenileyici etki, antihepatotoksik etki, anti ülser etki, yüksek enzim inhibitör potansiyeli göstermesinden kaynaklanmaktadır (Turkut v.d. 2019, Widelskiv.d. 2018, Saral v.d. 2016, Kolayli v.d. 2016, Can v.d. 2015, Doğanyigit 2013, Cottica v.d. 2011, Sahin v.d. 2011, Oliveira v.d. 2010, Dalben-Dota v.d. 2010, Kambur v.d. 2009, Marcucci v.d. 2008, Silici ve Kutluca 2007, Oliveira v.d. 2006, Silici v.d. 2005, Özcan v.d. 2003, Banskota v.d. 2001, Miyataka v.d. 1997, Burdock 1998). Propolis içeriğinden dolayı iyi bir doğal immünomodülatör (bağışıklık düzenleyici) ajan (Sforcin 2007, Watson v.d. 2018) olup son yıllarda özellikle bu özelliğinden dolayı aileler tarafından ekstraktları çocukları için sıklıkla tercih edilmektedir.

Propolis farmakolojik özelliklerinden dolayı terapötik bir madde olmasının yanında ekstraktlarında biyoaktif bileşiklerin bulunması nedeniyle aynı zamanda fonksiyonel bir gıdadır (Medić-Šarić v.d. 2009). Türk Gıda Kodeksi de bu ekstraktları "Takviye Edici Gıda" olarak nitelemektedir (Tebliğ No: 2013/49). Kaynağı bitkiler olmasına rağmen arılar tarafından işlendiği ve kendi sekresyonları ile karıştırıldığı için hayvansal gıda sınıfındadır.

1945 yılından bugüne kadar 5000'den fazla nitelikli bilimsel çalışmada (Wos) propolis kimyasal kompozisyonu, fiziksel özellikleri, biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır. Çalışmalar *in vitro*, *in vivo*, pre-klinik ve klinik seviyelerde yapılan apiterapiye yönelik çalışmalar olup her geçen gün propolis hakkında yeni bilgiler bilimsel yazına kazandırılmaktadır.

Arıcıların da sıkça sorduğu propolisin ham hali ile tüketimi önemli bir konudur. İçeriğinde oransal olarak çok az miktarda bulunan biyoaktif bileşenlerin vücuda faydalı olacak miktarda alınabilmesi için tüketilebilecek ham propolis miktarı oldukça fazladır. Arıcının kovanla ilgilenirken kazdığı küçük propolis parçalarını çiğnemesi sıkça rastlanılan bir uygulamadır. Ham propolis küçük parçalar halinde çiğnenebilir ancak büyük miktarlarda tüketimi mide rahatsızlıklarına/karın ağrısına neden olabileceğinden tavsiye edilmemektedir (Krell 1996).

Propolis kullanım amacı ne olursa olsun en önemli ve zor husus propolisin yapısında bulunan şimdiki kadar tespiti yapılabilmiş 420'den fazla kimyasal

maddenin (Milojković-Opsenica v.d. 2016), %80-90 oranlarını bulan mumsu maddeler (Juliano v.d. 2007, Cavaco v.d. 2008) içerisinde ekstrakte edilmesidir. Çünkü ham propolisin direk tüketimi bu mumsu maddelerin/waksların yoğunluğu, biyoaktif bileşimin oransal olarak çok düşük olması ve kirlilikler nedeniyle uygun değildir. Propolis tüketiminde ana amaç, içerisinde bulunan yararlı bileşenlerin alınmasıdır. Bu nedenle bu kompleks yapının içerisinde biyoaktif maddelerin ayrılması yani ekstrakte edilmesi gereklidir. Ekstraksiyon işlemi kullanılan ekstraksiyon tekniği ve kullanılan çözücü çok önemlidir. Çünkü mumsu yapı nedeniyle oldukça apolar karakterde olan kompleks yapıdan biyoaktif maddeleri alıp çıkarmak oldukça güçtür. Günümüzde en yaygın kullanım alanı bulan ekstraksiyon çözücüsü etil alkoldür. Etil alkolün polaritesi propolisteki ekstraksiyonu yapmak için uygun aralıktadır. Etanolik propolis ekstraktları yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmasına rağmen etil alkol tüketmek istemeyen bireyler, etil alkolün zararlı olduğunu düşünenler ve çocuklar yeni çözücü alternatiflerine yönelmektedir. Dünyada oldukça iyi bir ekonomik pazar oluşmasında bu yönelimin etkisi büyüktür. Etil alkol içermeyen propolis ekstraktlarının sayısı piyasada hızla artmaktadır. Bunlar su ekstraktları, zeytinyağı başta olmak üzere bitkisel yağ ekstraktları, uçucu yağ ekstraktları, çoklu alkollerin ekstraktları (gliserol, glikol vb.) ile daha az kullanılan içeceklerde bekletme, sirke gibi ürünlerde çözme, değişik sıvı karışımlarında demleme ve/veya bütün bunların kombinasyonlarıdır. Günümüzde yaygın olmamakla birlikte propolis ekstraksiyonunda modern ekstraksiyon yöntemleri de (süper kritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon, alkali ekstraksiyon, vakum ekstraksiyon vb.) kullanılmaktadır. Propoliste çözgen olarak kullanılan bu maddelerin propolis içerisinde koparıp alabileceği biyoaktif bileşen sayısı ve miktarları değişiktir. Öyle ki bazılarında biyolojik aktivitenin aynı miktar meyve sularından bile daha düşük seviyelerde olduğu bulunmuştur. Çözücü, propolisin en önemli biyoaktif bileşenleri olan fenolik maddeleri çözüp alabilecek nitelikte olmalıdır. Propolisin yapısında bulunan fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler, uçucu organik bileşenler, alkoller, ketonlar, steroidler, terpenoidler, aminoasitler vb. (Cunha v.d. 2018, Havsteen v.d. 2002, Bankova v.d. 2000, Marcucci v.d. 2000, Line 2018) bileşenlerin polariteleri farklıdır. Bir molekülün herhangi bir çözücü içerisinde çözünürlüğünde en önemli faktör polariteleridir. Yaygın bilinen şekli ile benzer benzeri çözer ilkesi propolis ekstraksiyonunda

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

da geçerlidir. Polariteleri uzak olan çözünen: çözücü çiftlerinde ekstraksiyon zor olmaktadır.

Uygun ekstraksiyonun yapılması ve etkili ekstraktın elde edilmesinde yüksek biyolojik aktiviteli ürün elde etmek kadar kullanılan çözücünün non-toksik olması, tüketilebilir olması, ekstraksiyon sonrası uzaklaştırılıp uzaklaştırılmayacağı hususu, günlük alım miktarları, vücutta emilimi ve metabolize olduğunda açığa çıkan ürünler ve bunların atılımı son derece önemlidir. Bu nedenle ticari olarak üretilen ve takviye edici gıda olarak piyasada satılan propolis ekstraktlarının üzerinde hiçbir şüphe bulunmamalıdır. Ekstraktlara ait standartlar hazırlanırken çözücünden bağımsız standardizasyon ciddi hatalar oluşturmaktadır. Yasal düzenlemeler ve bilimsel çalışmalar ekstrakt hazırlanmasında ve tüketiminde dikkate alınmalı ve tüketici için her şey şeffaf olmalıdır.

### Çözücüler (Menstrumlar)

Ham propolislerden tüketilebilir ekstreler elde etmek için kullanılan farklı ekstraksiyon yöntemlerinde birçok menstrum kullanılmaktadır. Elde edilen ekstre isimlendirilirken çözücüler üzerinden yapılmaktadır /yapılmalıdır. Oysa piyasada ciddi isimlendirme hataları mevcuttur. Bugün piyasada çözücüye bağlı yapılan isimlendirmelerle değişik ürünlere rastlanmaktadır. Etanol kullanılarak üretilen propolis ekstraktı, "etanolik propolis ekstraktı" ismiyle; sadece su kullanılarak hazırlananlar "propolis su ekstraktı" ismiyle ya da yaygın kullanımı ile "sulu propolis ekstraktı" ismi ile anılmalıdır. Su bazlı propolis ifadesi daha geniş bir ifade olup bu ürünü nitelendirmektedir. Genel literatürde "su bazlı" ifadesine bakıldığında yapıda suyun olması ya da suda çözünür olması durumu için kullanılır. Mesela; jelatin bazlı yenilebilir film, jelatin temelinde hazırlanan, yapısında jelatin bulunan ve jelatinin özelliklerine dayanılarak üretilen film demektir. Su bazlı boya ifadesi ise suda çözünebilir anlamına gelmektedir. Glikoller kullanılarak elde edilen propolis ekstraktı da suda çözüldüğünden su bazlı propolis tanımının bu ürünü de kapsamı gerekmektedir. Halbuki su bazlı ifadesi ile piyasada kastedilmek istenen sadece su ile hazırlanmış ekstraktlardır.

Halk arasındaki yanlış algılardan biri de suda çözünür propolis "sulu propolis" olarak algılanmasıdır. Suda çözünür propolis su içerisinde çözünebilir glikoller (mono etilen etilen glikol, polietilen glikol v.b) ya da suda çözünebilir başka bir çözücü ile hazırlanmış ekstrelerdir.

Yine bitkisel yağlarda hazırlanan propolislerde de

isimlendirmeye dikkat edilmelidir. Zeytinyağı içerisinde hazırlanmış propolis ekstraktı "propolis zeytinyağı ekstraktıdır". İsimlendirmelerde ekstrakt yerine ekstre kullanımı da yanlış bir kullanım değildir.

Yalnızca bir çözücünün kullanılmadığı ekstraksiyon yöntemlerinde yardımcı maddelerin de etikette belirtilmesi tüketici sağlığı ve bilinçlendirmesi açısından önemli bir konudur. Bazı kombine yöntemlerde değişik kimyasal maddeler (mesela alkali ekstraksiyonda pH ayarlamada) ya da gıda katkı maddelerinin (lesitin, şeker alkoller vb.) kullanıldığı bilinmektedir. Bu yardımcı maddelerin ürün isimlendirmesinde olmasa bile içerikte mutlaka belirtilmesi gereklidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Gereç:

2019 yılı Haziran- Eylül ayları arasında kovanlara takılı propolis tuzaklarından elde edilen propolisler çalışmada materyal olarak kullanıldı. Propolisler sezon sonunda tuzaklardan söküldü ve -18°C'da muhafazaya alındı. Ekstraksiyon zamanı tüm kovanlardan hasat edilen propolisler homojen bir örnek profili oluşturmak için iyice öğütüldü ve karıştırıldı. Kullanılan temel kimyasal maddeler Sigma Aldrich'ten (Germany) temin edildi.

### Yöntem:

#### Ekstraksiyon:

Örnek karışımı ekstraksiyon yapılacak metotlara göre gruplara ayrıldı. Her gruptaki propolislerin homojenliğinin kontrolü ham propolislerde toplam fenolik madde miktarı tayini yapılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası toplam fenolik madde miktarları arasında %1'in altında bir fark ana ham propolis homojen olduğunu gösterdi. Öğütülmüş ve homojen hale getirilmiş propolisler menstrumun (çözücü) %20'si (v/v) olacak şekilde ağız kapalı, ışık geçirgenliğini önlemek için alüminyum folyo ile izole edilmiş kavanozlara çözücü ile birlikte alındı. Ekstraksiyon yöntemlerinden dekoksasyon metodu uygulandı. Çözücü olarak saf su, gliserol (%70), etanol (%70), glikol (%70) kullanıldı (Krell, 1996). Su banyosu içerisine alınan kavanozlar 40 ±1°C'da 60 rpm'de 24 saat sürekli çalkalandı. Karışım önce kaba krom filtreden, ardından 50 µm gözenek çaplı süzgeçten filtre edildi. Saf su ile ekstraksiyon yönteminde uygulanan yöntemde klasik

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ekstraksiyon uygulandı, patente konu olan ve yüksek aktivite elde edilebilen yöntemlere (Patent 2019) başvurulmadı. Filtratlar antioksidan testler için kullanıldı.

### Antioksidan Kapasite Tayinleri:

Numunelerin antioksidan testleri toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, demir indirgeme antioksidan güç (FRAP) tayini ile yapıldı.

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı analizi bu maddelerin yapısında bulunan fenol halkasının bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip,

kendisinin okside forma döndüğü bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu esasıyla yapılır. Reaktif, indirgenmiş halinde 760 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilebilen farklı şiddette mavi renk verir. Renk şiddeti fenolik madde miktarı ile orantılıdır. Çalışma Tablo 1'deki ölçeklendirilmiş analiz reçetesine uygun şekilde çalışma yapıldı. Gallik asit (GA) referans fenolik madde olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak absorbans grafiği oluşturuldu. Fenolik madde içeriği bilinmeyen ekstraktın ölçülen absorbansından yola çıkılarak bu grafikten konsantrasyonu bulundu ve sonuçlar mg GAE/mL olarak ifade edildi (Slinkard ve Singleton 1977).

**Tablo 1.** Toplam fenolik madde miktarı tayini analiz reçetesi

**Table 1.** Analysis recipe for determination of total phenolic contents

	Kör Tüpleri	Standart Tüpleri	Test Tüpleri
Saf su(mL)	0,1	-	-
Gallik asit standartları (mL)	-	0,1	-
Ekstrakt numunesi(mL)	-	-	0,1
Saf su (mL)	5	5	5
0,2 N Folin Reaktifi (mL)	0,5	0,5	0,5
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
%2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	1,5	1,5	1,5
2 saat inkübasyon ve 760 nm'de köre karşı absorbans okunur			

Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı analizinde Kuarsetin referans flavonoid olarak kullandı. Artan bir seri konsantrasyon ile hazırlanan Kuarsetinin (K) ölçülen absorbansları ile oluşturulan grafik derişimi bilinmeyen numunenin flavonoid

miktarını bulmada kullanıldı ve sonuçlar kuarsetin eşdeğeri (mg KE/mL)cinsinden ifade edildi. Tablo 2'de Toplam flavonoid tayininde kullanılan analiz reçetesi verilmiştir (Fukumoto v.d. 2000).

**Tablo 2.** Toplam flavonol tayini için analiz reçetesi

**Table 2.** Analysis recipe for determination of total flavonoids

	Kör Tüpleri	Standart Tüpleri	Test Tüpleri
Ekstrakt (mL)	-	-	0,5
Kuarsetin standardı (mL)	-	0,5	-
Metanol (mL)	4,8	4,3	4,3
%10 Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (mL)	0,1	0,1	0,1
1 M NH <sub>4</sub> .CH <sub>3</sub> COO (mL)	0,1	0,1	0,1
40 dk. oda sıcaklığında inkübasyon ve 415 nm'de saf suya karşı absorbans tespiti.			

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Propolis ekstraktlarının Demir (III) indirgeme / FRAP yöntemi ile antioksidan kapasite tayini, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazin) kompleksinin propoliste bulunan antioksidan aktiviteli bileşiklerin bulunması halinde indirgenip, mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksini oluşturması ve oluşan renkli yapının 593 nm'de maksimum absorbanı vermesi esasına dayanmaktadır (Benzie v.d. 1999).Referans

antioksidan madde olarak Troloks®'un farklı konsantrasyonları ile çalışma grafikleri oluşturuldu ve sonuçlar mM Troloks® eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi. Taze FRAP reaktifinin [300 mM pH 3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl<sub>3</sub> (10: 1: 1)] kullanıldığı yöntemin analiz reçetesi Tablo 3'de gösterildi.

**Tablo 3.**FRAP yöntemi ile antioksidan tayini analiz reçetesi

**Table 3.** Analysis recipe for determination of antioxydant by FRAP method

	Kör	Propolis Ekstraktları	Troloks®
FRAP Reaktif (mL)	3	3	3
Numune (µL)	-	100	-
Troloks (Değişen kons.) (µL)	-	-	100
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Değişen kons)	-	-	-
Destile Su (mL)	-	-	-
Metanol	100 µL	-	-

### İstatistiksel analiz

Bütün veriler 5 değer in ortalaması ve  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar SPSS paket programı kullanılarak ANOVA testi ile analiz edildi. P < 0.05 seviyesinde farklılık anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışılan propolis ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri Tablo 4'de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde farklı dielektrik sabitlere sahip menstrumlardan elde edilen ekstraktların farklı antioksidan aktivite gösterdikleri anlaşılmaktadır. Ürünlerin antioksidan madde sonuçları tüketilebilir sıvı ekstraktın mL'si üzerinden verildi. Bu doğrudan tüketimde vücuda alınacak antioksidan miktarını

göstermesi açısından önemlidir. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları arasında istatistiki olarak dört farklı çözücü için de anlamlı farklılık bulundu (P=0,01; P < 0.05). 0,79-87,56 mg GAE/mL arasında fenolik madde miktarı tespit edildi. Fenolik maddeler içerisinde bir grup olan flavonoidlerin miktarları 0,73-24,22 mg KE/mL arasında değişti, saf su ve gliserol ekstraktları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi (P=0.01; P<0.05). Yine propolislerin demir indirgeme antioksidan güç tayin (FRAP) bulgularının 7,520-870,121 mM Troloks E/mL arasında olduğu ve her çözücü için istatistiki olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü (p=0,1; P > 0.05).

Her tip menstrum için dekoksasyon ile ekstraksiyonda sıcaklık ve süreler, uygulanan işlemler aynı olduğu için elde edilen ürünlerin özelliklerinin kıyaslanması anlamlı olmaktadır.

**Tablo 4.**Propolis ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri\*

**Table 4.** Antioxidant capacity of propolis extracts\*

Örnek Kodu (sayısı:n)	Çözücü (Menstrum)	Dielektrik sabiti ( $\delta$ )	Oranı (%)	Toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/mL)	Toplam flavonoid miktarı (mg KE/mL)	FRAP antioksidan güç (mM Troloks E/mL numune)
PSE (5)	Saf su	78,5	100	0,79 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,73 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	7,520 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>
PGE (5)	Gliserol	46	70	3,72 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,06 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	35,823 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup>
PEE (5)	Etil alkol	24,3	70	87,56 $\pm$ 6,88 <sup>d</sup>	24,22 $\pm$ 1,34 <sup>c</sup>	870,121 $\pm$ 25,23 <sup>d</sup>
GGLE (5)	Glikol	32,1	70	49,78 $\pm$ 2,55 <sup>c</sup>	6,81 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	420,543 $\pm$ 15,23 <sup>c</sup>

\*Sonuçlar ortalama $\pm$  standart sapma olarak verilmiş olup, aynı küçük harf (a,b,c) P < 0.05 seviyesinde istatistiki fark olmadığını göstermektedir.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

### TARTIŞMA

Ekstraksiyon olayı tam bir çözünme olayı olmasa da çözücünün ekstrakte ettiği bileşenlerle etkileşimi açısından önemlidir. Çözünme olayında çözünen molekülleri tıpkı çözücü moleküllerinde olduğu gibi belirli moleküller arası kuvvetler (dipol-dipol etkileşimleri, iyon-iyon etkileşimleri vb.) ile bir arada tutulurlar. Propolisteki etken bileşenlerin çözücü içerisinde çözünürlüğü, büyük ölçüde çözücü polaritesinin bir fonksiyonudur. Çözücüler polar, yarı polar ve apolar olabilirler. Polar çözücüler polar ve iyonik çözünenleri çözerler. Yarı polar çözücüler (örneğin alkoller) bir dereceye kadar apolar moleküllerde polariteye neden olabilir ve böylece polar-apolar moleküllerin karışabilirliğini sağlar. Polarite ve çözünürlük arasındaki ilişki, bir ilacın farmasötik bir çözeltide çözünürlüğünü değiştirmek için pratikte kullanılabilir. Çözünme olayında birçok yaklaşım ile çözünürlük artırılabilir. Propolis ekstraksiyonunda başvurulabilecek/başvurulan başka bir yaklaşım, çözüneni çözmek için optimum polariteye sahip bir çözücü sistemi oluşturmak üzere farklı polaritedeki çözücülerini karıştırmaktır. Bir bileşiğin dielektrik sabiti ( $\delta$ ) polaritesinin bir göstergesi olup polaritenin artışı ile dielektrik sabiti de artış gösterir (Mukerjee v.d. 1982). En düşük dielektrik sabite sahip olanlar apolar karakterdeki çözgenlerdir. Orta polarite derecesine sahip çözgenler propolis için daha uygundur. Tek başına apolar karakterli çözgenler tıpkı polar çözgenler gibi etkili bir çözme sağlayamamaktadır. Çözücüler sahip oldukları dielektrik sabitlerine göre sınıflandırılırken polar olanlar ( $\delta > 50$ ), yarı-polar olanlar ( $\delta = 20-50$ ) ve apolar olanlar ( $\delta = 1-20$ ) şeklinde gruplandırılırlar.

Tablodaki çözücülerden tüketilebilir propolis ekstraksiyonlarında ana çözücü olarak kullanılan çözücüler yaygın olarak etanol, su, polialkoller (glikoller, monopropilen glikol, polietilen glikol, monoetilen glikol, gliserol vb.) ve sıvı yağlardır. Gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinden süperkritik ekstraksiyonda ise CO<sub>2</sub> kullanılmakta, ancak bu sistemde CO<sub>2</sub> sistem sonrasında uzaklaştığı için üründe kalmamaktadır. Literatür eter kullanımından da bahsedilmekte olup (Krell 1996) piyasada bu ekstraktlara pek rastlanmamakta ve toksisitesinden dolayı tarafımızca kesinlikle tavsiye edilmemektedir. Etanolik ekstraktların en yüksek, sulu ekstraktların en düşük aktivite göstermesi bu çözücülerin polariteleri ile ilgilidir.

Propolis ekstraktlarında farklı ekstraksiyon metodları ve çözücüler kullanılarak yapılan bazı çalışmalar literatürde mevcut olup (Chen v.d. 2019, Turkut v.d. 2019, Keskin ve Kolaylı 2019, Trusheva v.d. 2007, Bankova v.d. 2014b, Lim v.d. 1994) bulgular etanolik ekstraktların, süper kritik akışkanla elde edilen ekstraktların, modifiye edilmiş sulu propolis ekstraktlarının değişik antioksidan kapasite gösterdiğini belirtmektedir. Araştırmamıza benzer ancak maserasyon ile uygulanan etanolün kullanıldığı bir çalışmada toplam fenolik madde miktarı 43-44 mg/mL; 8,6-8,8 mg/mL toplam flavonoid madde tespit edilmiştir (Trusheva v.d. 2007). Bulguların çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerin yarısına yakın olmasını çalışmamızda maserasyona ilaveten eklenen 40°C'lık sıcaklık ile dekoksasyon işleminin farkıdır. Buradan hareketle sıcaklık artışının ekstraksiyonda verimi artırdığı anlaşılmaktadır. Fakat çok yüksek sıcaklıkların fenoliklere nasıl bir etki yapabileceği hususu daha detay çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Cottica v.d. (2011) yaptıkları çalışmada 48-87 mgGAE/mL arasında toplam fenolik madde içeriği, 10-26 mg KE/mL toplam flavonoid içeriği ve FRAP değeri 528-2068  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  propolis ekstrakt olarak bulmuştur. Sonuçlardan fenolik madde miktarı ve flavonoid içeriğinin bulgularımızla uyumlu olduğu görülmektedir. Frap değeri ise Trolox cinsinden ifade edilmediği için kıyaslama yapılamamıştır. Yine Keskin ve Kolaylı (2019) yaptıkları çalışmada Türkiye piyasasından topladıkları değişik çözgenlerle üretilen propolis ekstraktlarını analiz etmiş ve antioksidan parametrelerini belirlemişlerdir. Etanolik ekstraktlarda 10-77 mg GAE/mL; sulu ekstraktlarda 0,09-12 mg/GAE/mL fenolik madde içeriği bulmuşlardır. Toplam flavonoid madde miktarları ise etanolik ekstraktları en fazla 11,83 mg KE/mL; sulu ekstraktlarda ise 0,06 mg KE/mL bulunmuştur. Araştırmacıların bulgularının piyasada çok geniş bir aralıkta antioksidan içeriğine sahip propolis ekstraktları olduğunu, bazılarının içeriğinin meyve sularından dahi düşük olduğu görülmektedir. Araştırmacıların bulguları çalışma bulgularımızla örtüşmekte olup gerek tartıştığımız menstrumlar gerekse yöntemlerin ekstraktların içeriğini direkt etkilediğini göstermektedir.

Dünyada da farklı çözücüler içerisinde üretilen propolis ekstraktları piyasada satılmaktadır. Yine bulgularımızla paralel bulguları içeren, bir çalışmada ekstraktların polifenol içerikleri 9-85 mg GAE/mL olarak bulunmuştur (Herrera v.d. 2010). Litvanya propolislerinin su, alkol, glikol ve bunların karışımları

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ile yapılan ekstraksiyonlarında ekstraların fenolik madde miktarları kalite parametresi olarak çalışılmış ve %5 propolis kullanılması ile elde edilen ürünlerde su ile ekstraksiyonda 17; etanol ile ekstraksiyonda 175; glikol ile ekstraksiyonda 118 mg/g ferulik asit cinsinden toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiştir (Ramanauskienė v.d. 2013). Çalışmamızda gallik asit cinsinden sonuç vermiş olsak bile bu sonuçlar da aslında elde edilen ürünlerin içeriklerindeki farklılıkları yansıtmaktadır.

Yapılan ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan bu çözücüler içerisinde bakterisidal etken maddelerin çoğunluğunun sulu ve etanolik ekstraktlarda olduğu bildirilmektedir. Kullanılabilecek onlarca organik çözücünden çok azı toksik değildir. Bunlardan toksik olmayanlar insan ve hayvan uygulamalarında kullanılabilir. Uzman kişiler (eczacı, kimyager, mühendis vb.) tarafından ekstraksiyonun yapılması bu açıdan çok önemlidir. Bazı durumlarda kullanılan çözücünün uzaklaştırılması, azaltılması gereklidir. Mesela etanolik ekstraksiyonda etanolün uzaklaştırılması gibi. Liyofilizasyon, vakum evaporasyon, distilasyon bu amaçla faydalanılabilecek uzmanlık gerektiren işlemlerdir (Krell 1996).

Propoliste tespit edilen aktif bileşenlerin büyük çoğunluğu glikol ve etanolde çözünmekte, sulu ekstraksiyon yöntemlerinden ise geliştirilmiş kombine metodlarla aktif bileşenlerin büyük miktarı alınmaktadır (Patent 2019, Krell 1996). Aseton ekstralarının şampuan, losyon gibi kozmetik ürünlerinde kullanılabilir. Alkol ekstraksiyonunda etkili yöntemin %70'lik etil alkol ile yapılan ekstraksiyon olduğu bildirilmektedir. Sürenin uzatılması propolise geçen madde miktarını artırmakla birlikte 2-3 haftadan fazla bekletmenin etkinliği daha fazla artırmadığı bildirilmektedir (Debuyser 1984). Ekstraksiyon öncesi propolis dondurulması ve toz haline getirilmesi ekstraksiyon verimini artırmada son derece önemlidir.

Etanolün vücuda alımı propolis ekstraktlarında da olduğu gibi çoğunlukla oral yoldadır. Alkollü bir içkiye oranı %0,5–95 arasındadır. Ağız yıkama sıvılarında ve toniklerde %10–18, muhtelif soğuk algınlığı ilaçları %4–10, reçete edilen bir antitussif olarak terpin hidratın eliksiri %40 oranında etil alkol içerebilir (Baduroğlu ve Durak 2010, Hunsaker ve Hunsaker. 2004, Logan ve Distefano 1998, Modell v.d. 1993). %70'lik propolis ekstraktlarındaki etil alkol oranı alkol uzaklaştırılıp konsantre aşamasına getirilmemiş, çözünen propolis miktarına bağlı olarak

%50'den fazladır. Biyoaktif bileşenlerin toksik dozunun hiç olmadığı varsayılsa bile bu oranda alkol içeriği tüketim için ciddiye alınması gereken, hatta çocuklarda daha da önemsenmesi gereken bir husustur. Etil alkol gastrointestinal mukozal yüzeyden derhal emilir. %20–25 i mideden, %75-80'i ince bağırsaklardan emilir. Etil alkolün farmakokinetiği (absorbsiyon, distribsiyon ve eliminasyon) kişiye göre değişir. Maksimum absorpsiyon oranı %20'lik etil alkol ile mümkündür (Denney v.d. 2000). Etil alkol, merkezi sinir sistemine etki yapan diğer maddelerle beraber alındığında kandaki 150- 200 mg/100 ml etil alkol değeri minimal letal doz olarak kabul edilmektedir (Baduroğlu ve Durak 2010, Kugelberg ve Jones 2007). Yıldız v.d. (2014) farklı çözücülerle hazırlanan propolis ekstraktlarının biyoyararlılıkları hakkındaki çalışmada sulu ekstraktlar için bulgularımızla paralel (0,20-1 mg GAE/ml) veriler elde etmişlerdir.

Tüketilebilir propolis ekstraksiyonunda metanol kesinlikle kullanılmamalıdır. Etanol kullanımında ise en büyük risklerden biri de teknik etanol da denilen daha ziyade laboratuvar çalışmaları ve hijyen amaçlı kullanılan etanolün propolis ekstraksiyonunda kullanılmasıdır. Uygun olmayan alkollerle hazırlanan propolis ekstraktları kaynaklı ölümlere dünyada rastlanmıştır (Krell 1996). Günümüzde birçok ülkede kullanılan ve ülkemizde de 2017 yılında yürürlüğe giren mevzuatla evsel kullanım amaçlı etil alkolün bu tip ekstraktlarda kullanımının veya evlerde içki yapımının önüne geçilmiştir. İlgili mevzuata göre (Resmi Gazete 2017) gıda amaçlı kullanılacak etil alkol dışındaki etil alkollere oldukça acı bir madde olan ve analitik olarak tespiti yapılabilen Denatonyum benzoattan 1,2 g/HLkatılma zorunluluğu getirilmiştir. Bu düzenleme propolis etanol ekstraktlarında kontrolsüz üretimin kısmen önüne geçecektir. Bütün bunlar dikkate alındığında alkol ekstraktlarının evde veya yetkin olmayan kişilerce üretimi kesinlikle uygun değildir. Zaten Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'nın EMA/HMPC/85114/2008 nolu raporu, etil alkollü propolis ekstraktlarının çocuklarda, formülasyonunda etanol bulunan preparatlarla birlikte kullanılmasının uygun olmadığı bildirmektedir (EMA, 2009).

İnsanların alkol ekstraktlarına gerek sağlık kaynaklı gerek inanç kaynaklı olan mesafesi, alkolsüz (alkol free) ekstraktlara ilgisini artırmıştır. Sulu veya suda çözünür propolis ekstraktlarının son yıllarda popüler olmasının nedeni de budur. Bu popülerlik, çoklu



## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

alkollerin ekstraktlarına yönelmeye neden olmuştur. Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) tek OH içerirken poli alkoller birden fazla OH grubu içeren alkollerdir. İki hidroksil grubu içeren bileşikler glikol, üç hidroksil grubu içerenler ise triollerdir. Gliserol, gliserin yada propantriol 3 OH içeren (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>) bir alkol olup propolis ekstraksiyonunda kullanılır. Etilenglikol ya da 1,2 etandiol ve propilen glikol iki hidroksil içeren alkollerdir. Propolis ekstraksiyonunda kullanılan etilen glikolde etilenler uzayarak n sayıda bir polialkole döner. Bu molekül polietilen glikol olup ekstraksiyonda başvurulan bir çoklu alkoldür.

Avrupa İlaç Ajansının EMA/CHMP/704195/2013 raporuna göre propilen glikol santral sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve /veya solunum sisteminde meydana getirebileceği potansiyel toksisite riskleri göz önüne alındığında, normal doğal yolla doğan 0-1 aylık bebeklerde 1 mg/kg; 1 ay-4 yaş arası çocuklarda 50 mg/kg; 5-7 yaş arası çocuklar ve yetişkinlerde 500 mg/kg maksimum günlük kullanım limitleri verilmiştir. Gliserol için ise çocuklarda bir limit verilmemişken, yetişkinlerde 1,5 mg/kg kullanım limiti verilmiştir (EMA, 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 414, 1-22 raporuna göre polietilen glikol (EFSA, 2006) günlük alım limitleri gıda takviyesi olarak 2 mg/kg seviyelerindedir. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücüleri Tebliği (Tebliğ no: 2013/45) incelendiğinde hekzanın bulunduğu ancak tamamen uzaklaştırılması gerektiği görülmektedir. Ancak, Gıda Katkı Maddeleri Tebliğinde (Tebliğ no: 2013/49) polietilen glikol (E 1521) ve propilen glikolün (E1520) katkı maddesi olarak limitleri verilmiştir. Her ne kadar burada çözücü durumları yerine katkı maddesi limitleri verilmiş olsa da günlük tüketilebilir limitlerine de yorum yapılabilir. Bu tebliğde, E1520 için gıdalarda tüm kaynaklardan gelen E 1518 ve E 1520 için maksimum miktar 3000 mg/kg (kişinin toplamı) olarak bildirilmiştir. Yine propilen glikolün taşıyıcı olarak kullanılması durumunda son üründe en çok 1000 mg/kg olması gerektiği bildirilmiştir. Bütün bunlarla birlikte Türk Gıda Kodeksinde EFSA ve EMA'daki gibi bir limit belirlemesi bulunmamakta, ivedi olarak hazırlanması gerekmektedir.

Süper kritik ekstraksiyonda yüksek akışkanlığı nedeniyle ve basınç kaldırılınca ortamdan uzaklaşma yeteneği ile CO<sub>2</sub> iyi bir çözücüdür. Bu yöntemle elde edilen propolis ekstraktlarının biyoaktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar (Pessoaa v.d. 2019, Fachri v.d. 2019, Di Capua v.d. 2018, Machado v.d. 2015, Catchpole v.d. 2004) oldukça

yüksek aktivitede ve verimde ekstra elde edildiğini göstermiştir.

Bitkisel yağlar dielektrik sabitleri bakımından apolar özellikte çözücülerdir. Bu yönleri ile propolis ekstraksiyonunda apolar bölgedeki bileşenler için iyi bir çözücü özelliği göstermektedir. Bu anlamda zeytinyağının, kanola yağının, palm yağının, soya yağının, keten tohumu yağının ve bazı bitkisel yağların kullanıldığı ve değişik seviyelerde biyoaktivitenin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (Fingerv.d. 2013, Abdulrhmanv.d. 2012, Carvalho v.d.2011, Pujirahayu v.d. 2005, Biavatti v.d. 2003, Biavatti v.d. 2003, Lim v.d. 1994).

Yaygın olmamasına rağmen sirkenin içerisindeki asetik asitten kaynaklanan çözücü özelliğinden yola çıkarak değişik sirkelerin propoliste çözücü olarak kullanıldığı akademik olmayan çalışmalar ekstraksiyon çözücüsü olarak bu ürünün de kullanıldığını göstermektedir.

Analitik çalışmalarda sıkça rastlanılan dimetilsülfoksit (DMSO) ile propolis ekstraksiyonu (Al-Shaher v.d. 2004, Uğur ve Arslan 2004, Aso v.d. 2004, Amaros v.d. 1992) daha çok metod öncesi bir işlem olarak görülmektedir. DMSO en güçlü organik çözücülerden biri olarak uzun zamandır kullanılmaktadır. Suda çözünür olmayan birçok terapötik ajan DMSO'da çözünür. Ancak tüketimi durumunda DMSO'nun toksisitesi ile ilgili ciddi şüpheler vardır. Halen DMSO'nun onaylanmış veterinerlik uygulamaları sınırlıdır ve onaylanmış/onaylanmamış bu uygulamaları üzerindeki tartışmalar devam etmektedir (Brayton 1986). Mevcut bilimsel bulgular ışığında DMSO'nun tüketilebilir propolis ekstraktlarında kullanımının bu nedenlerle uygun olmadığı düşünülmektedir.

Hangi ekstrenin tercih edilmesi gerektiği konusunda dikkate alınması gereken bir diğer durum da ekstraktların biyoyararlanımlarının/emilimlerinin incelenmesidir. Bazen yüksek aktivitedeki ekstraktlarda vücudun kullanabildiği kısım çok düşük olabilmektedir.

Bütün bu genel bakışla birlikte propolisin halen araştırılmaya ihtiyaç duyulan yönleri, çözücülerin vereceği potansiyel etkiler göz önüne alınarak propolis ekstraktlarının 2 yaş altı çocuklarda hekim tavsiyesi olmadan kullanılmaması gerektiğini şiddetle ifade ediyoruz.

Hangi çözücü kullanılırsa kullanılsın gerek bilimsel literatürde gerekse bilimsel olmayan kaynaklarda son ekstre içerisindeki propolis konsantrasyonunun

verilmesinde iki yöntem kullanılmaktadır. Bilimsel olan birinci yöntemde son ekstrakt içerisinde çözünmüş madde miktarı (kuru madde olarak) çözücü ağırlığına/hacmine oranlanır ve konsantrasyon verilir. Çözünen ekstrakt miktarının belirlenmesinin analitik bir işlem ile (kuru madde tayini gibi) yapıldığı bu yöntem temel kimya bilimi açısından da kabul edilebilir yöntemdir. Bilimsel olmayan ikinci yöntemde ise çözücünün içine ilk başta atılan ham propolis miktarı çözücü miktarına oranlanır ve konsantrasyon verilir. Oysa bu çalışmada sıkça değinilen propolisin tam olarak çözülmemesi, mum/vaks oranlarının değişik olması, ekstraksiyon yöntemi, çözücü tipi, propolisin içeriği vb. çok parametre ile değişken olması nedeniyle ikinci konsantrasyon verme yöntemi bilimsellikten uzaktır. Propolis ekstraktlarında standardizasyon işleminde de bu husus dikkate alınmalıdır (Krell 1996).

### SONUÇ

Bu çalışmada, dünyada tartışılan ekstraksiyon sıvılarından etanol, su, gliserol ve glikol kullanılarak elde edilen propolis ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri üç farklı metotla belirlendi. Bulgular etanolük ekstraktlar yanında gliserol ve glikolün de etil alkolsüz ekstraktlar için iyi bir tercih olabileceğini ortaya koymuştur. Bunun yanında çalışmada etkin bir şekilde tüketilebilmesi için propolislerde kullanılan çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleri genel bir çerçevede bir arada incelenmiştir. Kullanılan çözücülerin değişik standartlarda kabul edilebilir tüketilme limitlerinin de tartışıldığı çalışmada propolis için klasik ekstraksiyon metotlarının yaygın kullanıldığı ve su, çoklu alkoller (bunlardan gliserol ve glikoller) ile etanolün en yaygın çözücüler olduğu ancak bunlar içerisinde su dışındakiler hakkında halen bazı tartışmaların devam ettiği anlaşılmıştır. Bilimsel çalışmaların her geçen gün hızlanarak devam ettiği bir süreçte yeni ekstraksiyon metodlarının, çözücü/çözücü birlikteliklerinin, kombine ekstraksiyon yöntemlerinin propolis ekstraksiyonuna katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Propolis hakkında son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda yeni özellikleri ortaya çıkmaktadır. Buna rağmen, halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu nedenle, takviye edici bir gıda olarak kullanılan propolis ekstraktlarına bundan fazla bir anlam yüklemek, ilaç yerine koymak ya da ilaç tedavilerine alternatifmiş gibi sunmak da bilimsel

açıdan etik olmadığı gibi uygun öneriler değildir. Standartlarda günlük tüketim limitleri verilmesine rağmen, bilhassa belli hastalığı/rahatsızlığı olan bireylerde, ilaç tedavisi görenlerde, çocuklarda ve özel beslenme ihtiyacı duyan kişilerde mutlaka hekim önerisi/kontrolünde kullanılmalıdır.

Ticari propolislerde gerekli standardın oluşması ve etiketleri üzerinde kritik bilgilerinin mutlaka yer alması tüketicinin sağlığı ve gıda güvenliği açısından elzem bir durumdur. Propolis gibi oldukça değerli bir ürünün amacına uygun ve kontrollü tüketimi ile tıbbi ve ekonomik açıdan katma değer üretilmesi mümkün olacaktır.

### KAYNAKLAR

- Abdulrhman, M., Samir Elbarbary, N., Ahmed Amin, D., Saeid Ebrahim, R. 2012. Honey and a mixture of honey, beeswax, and olive oil-propolis extract in treatment of chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized controlled pilot study. *Pediatric hematology and oncology*, 29(3), 285-292, doi.org/10.3109/08880018.2012.669026.
- Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W., Baugh, D. 2004. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of endodontics*, 30(5), 359-361.
- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M. 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23(3), 231-240, doi.org/10.1051/apido:19920306.
- Aso, K., Kanno, S., Tadano, T., Satoh, S., Ishikawa, M. 2004. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 727-730, doi.org/10.1248/bpb.27.727.
- EFSA, 2006. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 414, s: 1-22.
- Baduroğlu, E., Durak, D. 2010. Alkol ile ilgili adli tıp sorunları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 36(2), 65-71,
- Baltas, N., Yıldız, O., Kolaylı, S. 2016. Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (sup1), 52-55, doi.org/10.3109/14756366.2016.1167049.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Bankova, V., Galabov, AS., Antonova, D., Vilhelmova, N., Di Perri, B. 2014a. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21(11), 1432-1438.
- Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B. 2014b. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal*, 8, 24, doi:10.1186/1752-153X-8-28.
- Bankova, VS., de Castro, SL., Marcucci, MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15, doi.org/10.1051/apido:2000102.
- Banskota, AH., Tezuka, Y., Adnyana, IK., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. 2001. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8 (1), 16-23, doi.org/10.1078/0944-7113-00004.
- Banskota, AH., Tezuka, Y., Kadota, S. 2001 b. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15(7), 561-571, doi.org/10.1002/ptr.1029.
- Benzie, IF., Strain, JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid Concentration. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 15-27). Academic Press.
- Biavatti, MW., Bellaver, MH., Volpato, L., Costa, C., Bellaver, C. 2003. Preliminary studies of alternative feed additives for broilers: Alternanthera brasiliana extract, propolis extract and linseed oil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(2), 147-151.
- Brayton, CF. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, 76(1), 61-90.
- Burdock, G A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Can, Z., Yildiz, O., Şahin, H., Asadov, A., Kolaylı, S. 2015. Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. *Mellifera*, 15(1), 16-28.
- Carvalho, AA., Finger, D., Machado, CS., Schmidt, EM., da Costa, PM., Alves, APNN., dos Santos, J. MT. 2011. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239-1245.
- Catchpole, OJ., Grey, JB., Mitchell, KA., Lan, JS. 2004. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. *The Journal of supercritical fluids*, 29(1-2), 97-106.
- Cavaco, AM., Cruz, C., Ferreira, AL., Guia, MD., Antunes, MD., Miguel, MG. 2008. Pigments, protein and activity of antioxidant enzymes in propolis collected at various sites of Algarve. In R. Oria, J. Val, A. Ferrer (Eds.), *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas* Acribia, S.A.: Zaragoza, pp. 286-293
- Chen, CT., Chien, YH., Yu, YH., Chen, YW. 2019. Extraction and Analysis of Taiwanese Green Propolis. *JoVE; Journal of Visualized Experiments*, (143), e58743. doi: 10.3791/58743.
- Cottica, SM., Sawaya, AC., Eberlin, MN., Franco, SL., Zeoula, LM., Visentainer, JV. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(5), 929-935.
- Cunha, A., Alves, H., Araújo, C., Barroso, L., Cruz, M., Freitas, AS., Passão, C., Peixoto, M., Pereira, H., Silva-Carvalho, R., Valença, I., Ferreira, AM., Baltazar, F., Pinto-Ribeiro, F., Cardoso, S, Oliveira, R., Almeida-Aguiar, C. 2018. Portuguese Propolis: A Source of Valuable Bioactivities. *Journal of Apitherapy and Nature* (Apiterapi ve Doğa Dergisi), 1(3), 27.
- Dalben-Dota, KF., Faria, MG., Bruschi, ML., Pelloso, SM., Lopes-Consolaro, ME., Svidzinski, TI. 2010. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(3), 285-290.
- Debuyser, E. 1984. La propolis. These pour diplôme de docteur en Pharmacie. Fac. Pharmacie, Univ. Nantes, France, 34 pp.
- Denney, RC. 2000. Body Fluids. In: Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. UK: Harcourt Publishers Ltd, 80-6.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Di Capua, A., Bejarano, A., Adami, R., Reverchon, E. 2018. Preparation and characterization of Chilean propolis coprecipitates using Supercritical Assisted Atomization. *Chemical Engineering Research and Design*, 136, 776-785.
- Doğanyığıt, Z. 2013. Propolis ve karaciğere koruyucu etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 13(2), 70-78.
- EMA, 2009. (European Medical Agency), 2009. Reflection paper: formulations of choice for the pediatric population (EMA/CHMP/PEG/194810/2005). Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003782.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003782.pdf)
- EMA, 2013. (European Medical Agency), 2013. Reflection paper: formulations of choice for the pediatric population (EMA/CHMP/704195/2013). Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-propylene-glycol-used-excipient-medicinal-products-human-use\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-propylene-glycol-used-excipient-medicinal-products-human-use_en.pdf)
- Fachri, BA., Sari, P., Yuwanti, S., Subroto, E. 2019. Experimental Study and Modeling on Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Indonesian Raw Propolis using Response Surface Method: Influence of Pressure, Temperature and CO<sub>2</sub> Mass Flowrate on Extraction Yield. *Chemical Engineering Research and Design*.
- Finger, D., Machado, CS., Torres, YR., Quináia, SP., Thomaz, ACG., Gobbo, AR., Eberlin, MN. 2013. Antifungal Bioassay Guided Fractionation of an Oil Extract of Propolis. *Journal of Food Quality*, 36(5), 291-301.
- Freires, IA., de Alencar, SM., Rosalen, PL. 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, 267-279.
- Fukumoto LR., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Havsteen, BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther.* 96, 67–202.
- Herrera, CL., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., Salazar, LA. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp., *Cien. Inv. Agr.* 37(1):75-84.
- Hikmet, K., Nazime, M. 2006. Turkish propolis from different regions. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 1151–1153.
- Hunsaker, DM., Hunsaker, JC. 2004. Postmortem alcohol interpretation. In *Forensic Pathology Reviews* (pp. 307-338). Humana Press, Totowa, NJ.
- Juliano, C., Pala, CL., Cossu, M. 2007. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17(3), 177-182.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S. 2009. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 909-915.
- Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topçu, G. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 69-73.
- Keskin, M., Kolaylı, S. 2019. Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. *Uludağ Bee Journal*, 19(1): 43-49.
- Kolayli, S., Ebru Cakir, H., Sahin, H. 2016. Anti-Inflammatory Activities of Some Bee Products by Inhibition of Bovine Testes Hyaluronidase. *Current Enzyme Inhibition*, 12(2), 183-187.
- Krell, R. 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Kugelberg, FC., Jones, AW. 2007. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic science international*, 165(1), 10-29.
- Lim, DK., Choi, U., Shin, DH., Jeong, YS. 1994. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 26(5), 622-626.
- Line, HCCC. 2018. In vitro Assessments of Cytotoxic and Cytostatic Effects of Propolis in Cells from the Human Colon Carcinoma Cell Line (HCT 116). *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 51-51.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Logan, BK., Distefano, S. 1998. Ethanol content of various foods and soft drinks and their potential for interference with a breath-alcohol test. *Journal of Analytical Toxicology*, 22(3), 181-183.
- Machado, BAS., de Abreu Barreto, G., Costa, AS., Costa, SS., Silva, RPD., da Silva, DF., Padilha, FF. 2015. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS One*, 10(8), e0134489.
- Marcucci, MC., Ferreres, F., Custodio, AR., Ferreira, MMC., Bankova, VS., Garcia-Viguera, C., Bretz, WA. 2000. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions, *Z. Naturforsch. C*, 55, 76–81.
- Marcucci, MC., Sawaya, ACHF., Custodio, AR., Paulino, N., Eberlin, MN., 2008. In Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine, Orsolich, N.; Basic, I. eds., *Transworld Res Network: Kerala, India*, pp. 33-54.
- Medić-Šarić, M., Rastija, V., Bojić, M., Maleš, Ž. 2009. From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8, 33, doi:10.1186/1475-2891-8-33.
- Miljković-Opsenica, D., Ristivojević, P., Trifković, J., Vovk, I., Lušić, D., Tešić, Z. 2016. TLC Fingerprinting and pattern recognition methods in the assessment of authenticity of poplar-type propolis. *Journal of Chromatographic Science*, 54(7), 1077–1083.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Satoh, T. (1997). Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20(5), 496-501.
- Modell JG, Taylor JP, Lee JY., 1993. Breath alcohol values following mouthwash use. *JAMA*. Dec 22-29; 270(24):2955-6
- Moş, AC., Soponar, F., Sârbu, C. 2010. Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: geographical variation in Romanian samples. *Talanta*, 81(3), 1010-1015.
- Mukerjee, P., Ramachandran, C., Pyter, RA. 1982. Solvent effects on the visible spectra of nitroxides and relation to nitrogen hyperfine splitting constants. Nonempirical polarity scales for aprotic and hydroxylic solvents. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(16), 3189-3197.
- Oliveira, ACP., Shinobu, CS., Longhini, R., Franco, SL., Svidzinski, TIE. 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5), 493-497.
- Oliveira, AP., França, HS., Kuster, RM., Teixeira, LA., Rocha, LM. 2010. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(1), 121-130.
- Özcan, M., Ceylan, DA., Ünver, A., Yetişir, R. 2003. Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Sağlanan Polen ve Propolis Ekstraktlarının Antifungal Etkisi. *Uludag Bee Journal*, 27.
- Pessoaa, BA., de Souzaa, LABS., Machadoa, JJIHD., de Oliveira Fernando Reisb, LP. 2019. Extraction of propolis using supercritical carbon dioxide. *Green Sustainable Processes for Chemical and Environmental Engineering and Science: Supercritical Carbon Dioxide As Green Solvent*, 169.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Gniewosz, M. 2019. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in food science & technology*, 83, 53-62.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., Uslinawaty, Z. 2015. Antibacterial activity of oil extract of trigona propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 419-422.
- Ramanauskienė, K., Inkėnienė, AM., Petrikaitė, V., Briedis, V. 2013. Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Resmi gazete, 2017. Etil Alkol ve Metanolün Üretimi ile İç ve Dış Ticaretime İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (RG 30.12.2017 - 30286)
- Sahin, H., Aliyazicioglu, R., Yildiz, O., Kolayli, S., Innocenti, A., Supuran, C. T. 2011. Honey, polen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- metalloenzyme carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(3), 440-444.
- Saral, Ö., Kilicarlan, M., Şahin, H., Yıldız, O., Dincer, B. 2019. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(4), 441-447, doi:10.3906/vet-1901-3.
- Saral, Ö., Yıldız, O., Aliyazicioğlu, R., Yuluğ, E., Canpolat, S., Öztürk, F., Kolaylı, S. 2016. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(1), 194-202, doi:10.3906/sag-1411-35.
- Sforcin, JM. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14, doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012.
- Silici, S., Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silici, S., Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G. 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1797-1803.
- Slinkard, K., Singleton, VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 13.
- Turkut, G. M., Mehtap, E. R., Degirmenci, A. 2019. Evaluating Bioactivity and Bioaccessibility Properties of Turkish Propolis Extracts Prepared with Various Solvents. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 2(1), 7-11, doi.org/10.35206/jan.577616.
- Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinin ve Gıda Bileşenlerinin Üretiminde Kullanılan Ekstraksiyon Çözücülerini Tebliği (Tebliğ No: 2013/45).
- Türk Gıda Kodeksi, Takviye Edici Gıdalar Tebliği (Tebliğ No: 2013/49).
- Ugur, A., Arslan, T. 2004. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 90-94.
- Wagh, V D. 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 308249, doi:10.1155/2013/308249.
- Watson, DG., De Koning, H., Ebiloma, G., Igoli, J., Siheri, W., Alenzi, N., Harnett, SAW. 2018. The Immune Modulatory and Anti-Protozoal Effects of Different Propolis Samples. *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 7-7.
- Widelski, J., Golus, J., Okręnczyk, P., Sawicki, R., Ginalska, G., Mroczek, T., Skalicka-Woźniak, K. 2018. Antituberculosis Activity of Propolis. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(3), 77-77.
- Yıldız, O., Kolaylı, S. 2015. Ham Propolisden Biyoaktif Potansiyeli Yüksek Sulu Propolis Ekstrakti Hazırlama Yöntemi", Türkiye, Patent, 2015/04984, Mayıs 2019.
- Yıldız O., Can Z., Hotaman HE., Kolaylı S. 2014. Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Biyoyararlılıkları, 4. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi eşzamanlı olarak 20. Apisilvia Kongresi, Muğla, Türkiye