

T.C.
KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN YAPRAĞI (*Olea europaea* L.) ÖZÜTÜNÜN VE ÖZÜTTEN
SAFLAŞTIRILAN METABOLİTLERİN İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİ VE
Oreochromis niloticus BALIK TÜRÜNÜN KAN DOKUSUNDA İYON VE BAZI
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

AHMET KISA

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

HAZİRAN 2016

KİLİS

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİN YAPRAĞI (*Olea europaea* L.) ÖZÜTÜNÜN VE ÖZÜTTEN SAFLAŞTIRILAN METABOLİTLERİN İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİ VE *Oreochromis niloticus* BALIK TÜRÜNÜN KAN DOKUSUNDA İYON VE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ahmet KISA

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Yıl 2016, Sayfa:92

Mevcut çalışmada, zeytin ağacının (*O. europaea*) yapraklarının etil asetat ve etanol ekstresinden silika jel kolon Kromatografisi ve ince tabaka Kromatografisi yöntemleri ile toplam 5 adet madde saflaştırıldı ve kimyasal yapıları UV, FT-IR, 1D ve 2D-NMR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR yöntemleri ile aydınlatıldı. OE-1, OE-2, OE-3, OE-4 ve OE-5 olarak kodlanan bu dört maddenin kimyasal yapısı oleuropein (OE-1), oleanolic asit (OE-3), maslinic asit (OE-4) ve eritrodiol (erythrodiol) ile uvaol (OE-5) karışımı olarak aydınlatıldı. Saflaştırılan OE-2 metabolitinin ise bir trisakkarit olduğu belirlenmesine rağmen kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamadı. Bu maddenin kimyasal yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Saf metabolitler iki farklı konsantrasyonda (1 g/100 g yem ve 4 g/100 g yem) balık yemine katılarak *Oreochromis niloticus* (Nil sazanı) türü balıklar 96 saat boyunca günde iki kez verilmek üzere beslendi ve kan serumunda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalin fosfat (ALP) enzimleri ve glikoz düzeyleri

belirlendi. Saf metabolitlerle beslenen balıklarda ALT, ALP, AST ve glikoz düzeyleri genellikle kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulundu. Bu sonuçlar bize zeytin yaprağı metabolitlerinin karaciğer metabolizmasını etkilediğini göstermektedir. Özellikle maslinic asit karaciğer için spesifik olan ALT enzim düzeyini önemli oranda yükseltmiştir. Zeytin metabolitleri ile beslenen balıklarda ayrıca kan serumundaki Na, Cl, Fe, Ca ve K iyon derişimleri de belirlendi. Sonuçlar zeytin metabolitlerinin kan iyon derişimleri üzerine düzenli bir etki sergilemediklerini göstermiştir. Örneğin uygulamalar arasında oleanolic asitin 4g/100 g yem uygulaması tüm iyon değerlerini etkileyerek kontrol grubuna göre iyonların derişimini azalttı ($p<0.05$). Oleuropein, eritrodiol+uvaol ve trisakkarit yapılı OE-2 metaboliti genelde bu iyonların üzerine istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir azaltıcı veya artırıcı etki sergilemedi. Maslinic asit ile (1g /100 g yem) beslenmiş olan balıklarda kontrol grubuna göre Fe oranı düşük bulunurken, maslinic asitin 4g/100 g yem konsantrasyonu ile beslenmiş olan balıklarda Ca düzeyi kontrol grubuna göre yüksek oranda tespit edildi.

Zeytin yapraklarından elde edilen metanol ve etil asetat ekstreleri ile bu ekstrelerden saflaştırılan saf metabolitler (oleuropein, oleanolic asit, maslinic asit, uvaol+eritrodiol) üç önemli depo zararlısı olan, *Sitophilus granarius* (buğday biti), *Tribolium confusum* (kırma biti) ve *Acanthoscelides obtectus* (fasulye tohum böceği)'a karşı toksik etkileri laboratuvar ortamında test edildi. Ekstre ve saf metabolitlerin üç farklı dozu (2,5, 5,0 ve 7,5 mg/Petri) kullanıldı ve böcek ölümleri 24, 48, 72 ve 96 saat sonra sayıldı. Uygulamaların toksik etkileri insektisit ilacı olan DDVP (dichlorvos)'in toksik etkisi ile karşılaştırıldı. Toksikite çalışma sonuçları hem ekstrelerin, hem de saf metabolitlerin depo zararlılarına karşı toksik etkilerinin insektisit toksik etkisi ile mukayese edildiğinde daha düşük olduğunu gösterdi. İnsektisit 48 saat sonra tüm böceklerin ölümüne neden olurken, ekstreler ve saf maddeler ise aynı saatte *S. granarius* erginlerinin % 16,7-63,3 oranında; *T. confusum* erginlerinin % 13,3-67,0 oranında; *A. obtectus* erginlerinin de % 26,7-59,0 oranında ölümüne neden oldu. Metanol ekstresi, etil asetat ekstresine göre daha toksik bulunurken, saf metabolitler böcek türüne göre değişik toksik etki sergilemişlerdir. Probit analizi ile ekstreler ve saf metabolitlerin LC₅₀ değerleri belirlendi. LC₅₀ değerleri mukayese edildiğinde maslinic asit en düşük LC₅₀ değerleri ile en toksik madde olarak tespit edildi. Eritrodiol+uvaol karışımı miktarı

yeterli olmadığı için *T. confusum* ve *A. obtectus* türlerine karşı toksik etkileri bakımından test edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Olea europea*, oleanolic asid, oleuropein, maslinic asid, eritrodiol, uvaol, *Oreochromis niloticus*, Nil sazanı, depo zararlıları, *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum*, *Acanthoscelides obtectus*, insektisidal etki, toksik etki, iyonlar, biyokimyasal parametreler



ABSTRACT

MSc Thesis

**INSECTICIDAL PROPERTIES AND THE EFFECTS OF OLIVE LEAF
EXTRACTS (*Olea europaea* L.) AND ITS SECONDARY METABOLITES ON
IONS AND SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF NIL TILAPIA
*Oreochromis niloticus***

Ahmet KISA

Kilis 7 Aralık University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Year: 2016, Page:92

In the present study, 5 metabolites from ethyl acetate and ethanol extracts of leaves of olive (*O. europea*) were isolated by chromatographic methods, silica gel column chromatography and thin layer chromatography and their chemical structures were characterized by UV, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D and 2D-NMR methods. The chemical structures of these four compounds coded as OE-1, OE-3, OE-4 and OE-5 were assigned as oleuropein, a trisaccharide, oleanolic acid, maslinic acid, a mixture of erythrodiol and uvaol and a trisaccharide, respectively. Chemical structure of OE-2, a trisaccharide has not been fully elucidated. Studies on the elucidation of the chemical structure is continuing.

The pure metabolites were added at two concentrations (1g/100g feed and 4g/100 g feed) into fish feed. *Oreochromis niloticus* (Nile carp) were fed twice a day with the feed during 96 hours. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) enzyme activities and glucose level in the blood serum of fishes were determined. In general, levels of ALT, ALP, AST enzymes and

glucose in the serums of fishes fed with pure compounds were found to be high as compared with the control group. These results indicate that the pure metabolites of olive leaf affect the liver metabolism in nil tilapia. In particular, maslinic acid considerably increased the ALT enzyme level that is a specific enzyme for the liver damage. Na, Cl, Fe, Ca and K ion concentrations were also determined in the blood serum with olive metabolites. Results indicated that olive metabolites exhibited a regular effect on the ion concentrations. For instance, 4g/100g feed application of oleanolic acid significantly reduced the all ion concentrations ($p < 0,05$). Oleuropein, eritrodiol+uvaol and trisaccharide, OE-2 generally did not exhibit any reducing or increasing effect on the ions. When compared with control group, Fe level was found to be low in fish fed with maslinic acid (1g/100g feed), whereas the Ca level in the fish serum fed with the maslinic acid (4g/100g feed) was higher than that of the control group.

The methanol and ethyl acetate extracts of olive leaves and the pure metabolites (oleuropein, oleanolic acid, maslinic acid, uvaol+eritrodiol) isolated from the extracts were tested for contact toxic effects against three important stored pests, *Sitophilus granarius* (weevil), *Tribolium confusum* (confused flour beetle) ve *Acanthoscelides obtectus* (bean weevil). The extracts and pure metabolites were used in three different concentrations (2.5, 5.0 and 7.5 mg/Petri dish) and the insect deaths were counted after 24, 48, 72 and 96 hours of treatments. The toxic effects of the applications were compared with those of commercial insecticide, dichlorvos (DDVP). Toxicity results showed that the toxic effects of the extracts and the pure metabolites were lower than those of the insecticide, dichlorvos. While the insecticide, dichlorvos caused complete mortality of the insects after 48 hours of treatments, the extracts and pure metabolites caused the mortality rates 16.7-63.3 %, 13.3-67.0 % and 26.7-59.0 % of *S. granarius*, *T. confusum* and *A. obtectus*, respectively. The methanol extract was found to be more toxic than the ethyl acetate extract, whereas the pure metabolites showed various toxicities against the insect species. Furthermore, the probit analysis into insecticidal results were performed to determine the LC_{50} values of the pure metabolites and the extracts. According to LC_{50} values of the extracts and the pure metabolites, maslinic acid has the most toxic compound with the lowest LC_{50} values (0.66 mg/Petri, 0.61 mg/Petri and 1.71 mg/Petri for *S. granarius*, *T. confusum* and *A. obtectus*, respectively). The mixture

eritrodiol+uvaol could not be tested for insecticidal effect against *T. confusum* and *A. obtectus* due to their low amounts.

Key Words: *Olea europea*, oleanolic acid, oleuropein, maslinic acid, eritrodiol, uvaol, *Oreochromis niloticus*, Nile tilapia, storage pest, *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum*, *Acanthoscelides obtectus*, insecticidal activity, toxic effect, ions, biochemicals parameters



TEŞEKKÜR

Bana bu tez konusunu öneren ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR 'a,

2014/01/MAP-05 nolu proje ile sunduğum bu çalışmaya maddi destek sağlayan Kilis 7 Aralık Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyonu Başkanlığına,

Bazı metabolitlerin zeytin yaprağı ve zeytin meyvesinden saflaştırılmasına yönelik kromatografik çalışmalara katkı sağlayan Kimya Bölümü arkadaşlarım Ümran ŞİLTELİOĞLU ve Binnur TEZEL'e,

Ekstre ve saf metabolitlerin balıklara uygulanması ve biyolojik aktivite çalışmalarının gerçekleştirilmesinde bana yardımcı olan Çukurova Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN'a,

Ekstre ve saf metabolitlerin insektisidal etkilerinin araştırılmasında destek veren Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Şaban KORDALI ve ekibine,

Ayrıca bana yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ ile diğer hocalarıma ve ekiplerindeki herkese; laboratuvar da birlikte çalışmaktan zevk aldığım Sayın Arş. Gör. Evrim BARAN'a,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ahmet KISA

KİLİS,

Haziran 2016

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

^{13}C	:Karbonun 13 izotopu
^1H	:Hidrojenin izotopu
g	:Gram
Hz	:Hertz
J	:Jiromanyetik sabiti (etkileşme sabiti)
ml	:Mililitre
mm	:Milimetre
nm	:Nanometre
CDCl_3	:Dötero kloroform
cm	:santimetre
<i>s</i>	:singlet
<i>d</i>	:dublet
ppm	:Milyonda bir

KISALTMALAR

ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALP	: Alkalen Fosfataz
ABS	: Absorbans
APT	: Attached Proton
ark	: Arkadaşları
1D	: Bir boyutlu
2D	: İki boyutlu
DEPT	: Distortionless Enhanced by Polarization Transfer
EtOAc	: Etil asetat
HMBC	: Heteronuclear Multi Bond Coherence

HETCOR	: HETeronuclear CORElation
DPPH	: di (phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
MeOH	: Metanol
IR	: Infrared (kızıl ötesi)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KK	: Kolon Kromatografisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonansı
Rf	: Yürüme hızı
SKK	: Silika jel Kolon Kromatografisi
UV	: Ultraviyole (mor ötesi)
COSY	: Korelasyon
MDA	: Malondialdahit
HPLC	: High-performance liquid chromatography
FAO	: Food and Agriculture Organization

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Çayır ve orman bitki örtüsü ile kaplı bir ekosistem	2
Şekil 1.2. Zeytin ağacı	6
Şekil 1.3. Oleuropein maddesinin kimyasal yapısı	7
Şekil 1.4. Maslinic asitin molekül yapısı.....	11
Şekil 1.5. <i>O. niloticus</i> (Nil sazanı)	14
Şekil 1.6. Buğday bitinin (<i>S. granarius</i>) farklı görünüşleri	16
Şekil 1.7. <i>Tribolium confusum</i> (un biti, kırma biti) erişkin ve larvaları	16
Şekil 1.8. <i>A. obtectus</i> (Fasülye böceği) erişkin ve larvaları	17
Şekil 3.1. OE-1(oleuropein)' in UV-Vis. spektrumu	28
Şekil 3.2. OE-1 (oleuropein)' in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	29
Şekil 3.3. OE-1 (oleuropein)' in ¹ H-NMR spektrumu (Pridin-d ₅)	30
Şekil 3.4. OE-1 (oleuropein)' in ¹³ C-NMR spektrumu (Pridin-d ₅)	30
Şekil 3.5. OE-2' in UV-Vis. spektrumu (CH ₃ OH)	32
Şekil 3.6. OE-2 (trisakkaritin)' in ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O)	33
Şekil 3.7. OE-2 (trisakkaritin)' in ¹³ C-NMR spektrumu (D ₂ O)	34
Şekil 3.8. OE-2 (trisakkaritin)' in DEPT135 ve DEPT90 ¹³ C-NMR spektrumları (D ₂ O)	34
Şekil 3.9. OE-2 (trisakkaritin)' in HMQC spektrumu (D ₂ O)	35
Şekil 3.10. OE-3 (oleanolic asit)' in IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	37
Şekil 3.11. OE-3 (oleanolic asit)' in ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	38
Şekil 3.12. OE-3 (oleanolic asit)' in ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)	39
Şekil 3.13. OE-3 (oleanolic asit)' ün APT ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)	40

Şekil 3.14. OE-3 (oleanolic asit)' in ^1H , ^1H -COSY spektrumu (CDCl_3).....	40
Şekil 3.15. OE-3 (oleanolic asit)' ün HMQC spektrumu (CDCl_3).....	41
Şekil 3.16. OE-3 (oleanolic asit)' ün HMBC spektrumu (CDCl_3).....	43
Şekil 3.17. OE-4 (maslinic asit)' ün IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	39
Şekil 3.18. OE-4 (maslinik asit)' ün ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3).....	44
Şekil 3.19. OE-4 (maslinik asit)' ün ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3).....	45
Şekil 3.20. OE-4 (maslinik asit)' ün APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)	46
Şekil 3.21. OE-4 (maslinik asit)' ün ^1H , ^1H -COSY NMR spektrumu (CDCl_3)	47
Şekil 3.22. OE-4 (maslinik asit)' ün HMQC spektrumu (CDCl_3).....	47
Şekil 3.23. OE-4 (maslinik asit)' ün HMBC spektrumu (CDCl_3)	48
Şekil 3.24. OE-5 metabolitinin IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış).....	50
Şekil 3.25. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3).....	51
Şekil 3.26. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3).....	52
Şekil 3.27. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)	52
Şekil 3.28. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in ^1H , ^1H -COSY NMR spektrumu (CDCl_3)	53
Şekil 3.29. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in HMQC spektrumu (CDCl_3).....	53
Şekil 3.30. OE-5 (eritrodiol+uvaol)'in HMBC spektrumu (CDCl_3)	54
Şekil 3.31. Zeytin saf metabolitlerin ALT enzimi üzerine etkileri	56
Şekil 3.32. Zeytin saf metabolitlerin AST enzimi üzerine etkileri	57
Şekil 3.33. Zeytin saf metabolitlerin ALP enzimi üzerine etkileri	58
Şekil 3.34. Zeytin saf metabolitlerin glikoz üzerine etkileri	59
Şekil 3.35. Ekstreler ve saf metabolitlerin <i>S. granarius</i> ' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları.....	63
Şekil 3.36. Ekstreler ve saf metabolitlerin <i>T. confusum</i> ' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları.....	66

Şekil 3.37. Ekstreler ve saf metabolitlerin *A. obtectus*' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları68

Şekil 4.1. Saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapıları.....74



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	20
Çizelge 2.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan yürütücü faz sistemleri	20
Çizelge 2.3. KK sonrası birleştirilen fraksiyonlar ve kodlar	24
Çizelge 3.1. Saf metabolitlerin balıklarda enzimler ve glukoz üzerine yaptığı etkiler	55
Çizelge 3.2. Saf metabolitlerin balıklarda iyon derişimleri üzerine yaptığı etkiler	60
Çizelge 3.3. Ekstreler ve saf metabolitlerin <i>S. granarius</i> türüne karşı toksik etkileri	62
Çizelge 3.4. Ekstreler ve saf metabolitlerin <i>T. confusum</i> türüne karşı toksik etkileri	65
Çizelge 3.5. Ekstreler ve saf metabolitlerin <i>A. obtectus</i> türüne karşı toksik etkileri	67
Çizelge 3.6. Uygulamalar için LC ₅₀ değerleri (72. saat için hesaplanmış değerler)	70

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ	1
1.2. Zeytin Ağacı (<i>Olea europea</i>)	5
1.2.1. <i>Olea europea</i> ' in ve metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri	7
1.2.1.1. Antioksidan	7
1.2.1.2. Sitotoksik.....	10
1.2.1.3. Diğer Biyolojik Aktiviteler	11
1.3. Enzimler.....	12
1.4. Depo Ürünleri Zararlıları Böcekler.....	15
1.4.1. <i>Sitophilus granarius</i> (Buğday biti)	15
1.4.2. <i>Tribolium confusum</i> (Kırma biti, un biti)	16
1.4.3. <i>Aconthoscelides obtectus</i> (Fasülye böceği).....	17
1.5. Çalışmanın Amacı.....	18
2.MATERYAL ve YÖNTEM	19
2.1. Bitkisel Materyal	19
2.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler	19

2.2.1. Kimyasal Maddeler	19
2.2.2. İzolasyon ve analiz çalışmalarında kullanılan aletler	19
2.2.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	19
2.2.4. Kullanılan Revelatörler.....	20
2.2.5. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	20
2.3. Etanol ile Ekstraksiyon ve Kromatografik Çalışmalar	21
2.3.1. Ekstraksiyon	21
2.3.2. Etil asetat fazına geçmeyen ekstre üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar	21
2.3.3. Etil asetat fazına geçen kısım üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar.....	22
2.4. Etil Asetat ile Ekstraksiyon ve Kromatografik Çalışmalar	23
2.5. Balıklarda Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	25
2.6. İnsektisidal Aktivite Çalışmaları.....	26
3. BULGULAR	27
3.1. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektral Bulgular	27
3.1.1.OE-1 (Oleuropein)	27
3.1.2. OE-2 (Trisakkarit).....	32
3.1.3.OE-3 (Oleanolic asit).....	36
3.1.4. OE-4 (Maslinic asit).....	42
3.1.5. OE-5 (Eritrodiol ve Uvaol Karışımı).....	49
3.2. Balıklarda Biyolojik Aktivite Çalışma Bulguları.....	55

3.3. Ekstreler ve Saf Metabolitlerin Depo Zararlısı Böceklerle Karşı Toksik Etkileri	
.....	61
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	81



1. GİRİŞ

Bitkiler (Latince: *Plantae*), fotosentez yapan, ökaryotik, ağaçlar, çiçekler, otlar, yosunlar ve benzeri organizmaları içinde bulunduran çok büyük bir canlılar alemidir. Fotosentezi bitkilerle beraber bazı tek hücreli canlılar da yaparlar.

Bitkiler, topluluk halinde yaşarlar. Bitkilerin bir bölgede oluşturdukları örtüye bitki örtüsü denir. Flora, bir bölgede yetişen bütün bitki türlerinin tümüne denir. Herhangi bir bölgenin yaşam koşullarında gelişen, benzer ekolojik yapı içeren bitki topluluğuna vejetasyon denir. Bunlar 4 sınıftır: Ormanlar (her zaman yeşil tropikal yağmur, subtropikal, orta kuşak, sert yapraklı, iğne yapraklı, kışın yaprak dökenler, muson ormanları, tropikal kuru, mangrov, galeri, bataklık), Çalılar (maki, garig, psödomaki), otlar (savan, step, çöl) ve tundra. Bitkilerin yetişmesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; ekvatora uzaklık, denizden yükseklik (rakım), arazi eğimi, ışık, sıcaklık, nem, yıllık yağış miktarı, toprak içeriği ve insan, hayvan, diğer bitkiler, mikroorganizmalar gibi canlı faktörlerdir. Bitkiler, ototrof canlılardır ve güneş enerjisini besin olarak kimyasal enerjiye dönüştüren çok önemli canlılardır. Bu özelliklerinden dolayı fotosentez yaparak ekolojik dengeyi sağlamada temel rol oynarlar. Bu açıdan hayvanların ve insanların dahil olduğu tüketicilerin (heterotrof canlılar) yaşamsal faaliyetlerinde çok önemli yere sahiptirler (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Bitki>).

Dünya florasında bitkiler aleminin 350.000' e yakın türü mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Günümüze kadar yapılan taksonomik çalışmaların sonucunda 2004 yılı sonu itibariyle 287.655 bitki türünün tanımı yapılmıştır. Bunlardan 258.650' si çiçekli bitkiler, 15,000' i ise yosun türleridir. Bu sayının 2016 yılı itibariyle daha da arttığı bilinmesine rağmen kesin araştırma sonuçlarına ulaşılammıştır. Bitkiler genelde ototrof (kendi besinini üretebilen) organizmalardır ve temel enerji kaynakları şüphesiz güneştir. Bitkiler hücrelerindeki kloroplastları sayesinde fotosentez yaparlar ve güneş ışığını klorofil vasıtasıyla tutarak kendi organik bileşiklerini üretirler. Bitkiler, tohumlu bitkiler (Cryptogamae) ve tohumlu bitkiler (Spermatophyta) olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Bitki>).

Bitki örtüsü denildiği zaman, bir yerde doğal olarak yetişen bitkilerin oluşturduğu orman, bozkır, çayır ve maki gibi topluluklar akla gelir. Bitkiler büyüebilmek için

inorganik besin maddeleri, su ve uygun sıcaklık şartlarına ihtiyaç duyarlar. Yeryüzü bitkilerin büyüebilme ortamları açısından çok büyük farklılıklara sahiptir. Dünya ekosistemindeki bazı yerler bitkilerin büyüebilmesi için çok uygun özelliklere sahipken bazı yerler ise son derece olumsuz şartlara sahiptir. Bu nedenle dünya ekosisteminde bitki örtüsü yönünden çok fakir alanlar olduğu gibi son derece zengin alanlarda bulunmaktadır. Şekil 1.1. de doğal şartlarda büyümüş çayır ve orman bitki topluluğu görülmektedir.



Şekil 1.1. Çayır ve orman bitki örtüsü ile kaplı bir ekosistem (<http://www.bilgiustam.com/turkiyenin-bitki-ortusu/>)

Bitki örtüsünün gelişmesine etki eden faktörler şunlardır:

- İklim
- Toprak özellikleri
- Yer şekilleri

İklim bitkilerin dünya ekosisteminde dağılımını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Çünkü bitkilerin yetişmesinde uygun sıcaklık koşulları önemli rol oynayan faktörlerden birisidir ve her bitkinin yetişebilmesi için uygun sıcaklık şartlarına ihtiyaç vardır. Bu bakımdan yeryüzünde bitki örtüsü kuşakları ile sıcaklık kuşakları arasında tam bir uyum söz konusudur. Yağış da bitkilerin büyümesini ve yayılmasını etkileyen önemli bir iklim elemanıdır. Bitkiler uygun sıcaklık şartlarının yanı sıra suya da ihtiyaç duyarlar. Bitkiler ihtiyaç duydukları su miktarına göre dünya ekosisteminde yayılış

gösterirler. Bu nedenle dünya ekosisteminin farklı bölgelerinde farklı bitki örtüleri gelişmiştir.

Sıcak ve nemli yerlerde yetişen bitki örtüsü daha gür ve çeşitlilik açısından daha zengindir. Diğer taraftan kurak ve soğuk yerlerde yetişen bitki türleri hem sayı hem de çeşit bakımından daha az sayıdadırlar ve bu ekosistemlerde yetişen bitkiler daha seyrek ve daha cılızdırlar.

Toprak yapısı da ekosistemlerde yetişen bitki tür çeşitliliğine ve sayısına etki eden faktörlerden birisidir. Dünya ekosisteminde bulunan farklı toprak çeşitleri su tutma özellikleri, kalınlıkları, içlerindeki minerallerin cinsi ve sayısı bakımından farklılıklar sergilerler. Toprak çeşitlerine bağlı olarak değişik oranda ve cinsten inorganik ve organik besin maddelerine sahiptirler. Bunlardan dolayı her bitki türü ancak kendisi için en uygun olan toprak üzerinde yetişebilir. Örneğin bazı bitki türleri geçirgen toprakları tercih ederken, bazı bitki türleri ise bol humuslu topraklarda yetişirler.

Bitki örtüsünün yetişmesinde ve yayılmasında yükseklik, bakım ve işleme gibi yeryüzü özellikleri ve şekilleri de etkili olmaktadır. Böylece bitki toplulukları ortaya çıkmıştır. Ekosistemlerde rakım arttıkça sıcaklık azalmakta ve belli bir rakımdan sonra da yağış miktarı genellikle düşmektedir. Bu durum bir dağ yamacı boyunca farklı özellikte türler içeren orman topluluklarının oluşması olarak kendini gösterir. Ülkemiz yeryüzü şekilleri, iklim ve toprak yapısı bakımından ormanların gelişmesi için uygun ortamlar oluşturmaktadır. Bu bilimsel veriler göz önüne alındığında ülkemizin günümüzde doğal olarak % 70' inin orman florası ile kaplı olması gerekirdi. Ancak özellikle eski dönemlerde insanların bilinçsiz bir şekilde, değişik amaçlarla ormanları tahrip etmeleri bu oranı düşürmüştür. Günümüzde ormanlarımız ülke yüz ölçümünün yaklaşık olarak % 25'ini kaplamaktadır.

Ülkemiz, yetişen bitki türleri bakımından Dünya'nın en zengin bitki florasına sahip ülkelerden birisidir. Ancak aynı durum bitki örtüsü bakımından söylenemez. Ülkemiz bitki örtüsü bakımından çok zengin sayılmamaktadır. Çünkü ülkemizin doğal bitki örtüsü yıllardan beri insanların bilinçsiz davranışından dolayı tahrip edilmektedir. Nihai olarak bitkilerin toprak, su ve sıcaklık şartları birbirinden farklıdır ve yetişme şartları

aynı olan bitkiler, belirli yerlerde yayılış gösterirler. Ülkemizdeki başlıca bitki toplulukları orman, maki, bozkır ve yüksek dağ çayırları olarak gruplandırılır.

Çevresel etkenlerden ve ailesel faktörlerden dolayı gün geçtikçe değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların büyük kısmında tehlikeli yan etkilerinin olması bilim insanlarını tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Hayatımızın birçok alanında kolaylık sağlayan teknolojinin gelişmesiyle artan radyasyon; sanayi ve endüstrinin gelişmesi sonucu hayatımızın her alanında yer alan kimyasal ajanlar gibi çevresel faktörler birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu faktörlerden sadece insanlar değil çevre kirliliğinden dolayı doğal ortamında yaşayan canlılarda kismetlerini almaktadırlar. Özellikle yerleşim birimlerine yakın bölgelerde yaşayan canlılar bundan daha fazla etkilenmektedirler. Su ekosisteminde yaşayan balıklarda bu faktörlerden etkilenmektedir. Sentetik ilaçların çevreye verdiği zararlı etkileri azaltmak üzere doğal ilaçlar bir alternatif olarak düşünülebilir. Doğal ilaçlar doğada kısa sürede bozdukları için çevre açısından da daha az risk oluşturmaktadırlar. Bu kapsamda, son zamanlarda insanların ve diğer canlıların tedavisinde alternatif tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine bilimsel çalışmalar artmıştır (Makkar ve ark., 2007; Castro ve ark., 2008; Pachanawan ve ark., 2008; Chakraborty ve Hancz, 2011; Davies ve ark., 2011; Harikrishnan ve ark., 2011; Hossain ve ark., 2011).

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından biridir ve bu nedenle bitkilerin tedavi amaçlı kullanılması ilk uygarlıklara kadar dayanır (Baytop, 1999). Bitkilerden elde edilen ilk etken madde 1805' te afyon maddesinden izole edilen morfindir. Bunu, 1820' de kınakınanın kabuklarından kinin, 1868' de yüksük otu (*Digitalis* türleri) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalinin ve 1890' da söğüt dalı kabuğundan salisilik asitin izolasyonu takip etmiştir. Daha sonra ise doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur. Bu amaçla, yeni doğal ilaç hammaddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır.

1979 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan bir araştırmada farmakopelerde kayıtlı olan ülkelerde kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel drogların miktarı 2.000 olarak tespit edilmiştir. Aynı kuruluşun 91 ülkenin farmakopeleri ve tıbbi

bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre de tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 civarında olduğu saptanmıştır. Ancak şüphesiz ki; bu miktar gerçek miktardan çok aşağıdadır. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerinde yapılan çalışmalar ve bunlara karşı olan ilgi çok artmıştır (Makkar ve ark., 2007; Castro ve ark., 2008; Ghosh ve ark., 2008; Pachanawan ve ark., 2008; Rajendiran ve ark., 2008). Bunun sebepleri; bazı ilaç maddelerinin bitkisel droglardan sentetik olanlardan daha ucuza ve kolaylıkla elde edilmeleridir. Steroid bileşikler, kına alkaloidleri, afyon alkaloidleri, çavdar mahmuzu alkaloidleri, atropa belladonna alkaloidleri, *Digitalis purpurea* glikozitleri bunlara en somut örneklerdir. Ülkemizde ise 8500 tür yetiştirmekte ve bunlardan 650 kadarı halk hekimliğinde kullanılmaktadır (<http://tibbivearomatikbitkiler.blogcu.com/tibbi-ve-aromatikbitkiler/4232103>)

1.2. Zeytin Ağacı (*Olea europea*)

Zeytin ağacı (*Olea europaea*), zeytingiller (Oleaceae) familyasından meyvesi yenen, Akdeniz iklimine özgü, kültüre alınmış önemli bir ağaç türüdür (Şekil 1.2). *Olea* cinsine ait türler Afrika'nın güneyi, Güney Asya, Doğu Avustralya ve Yeni Kaledonya'da yayılış gösteren türlerdir ve dünya florasında yaklaşık olarak 16 tür karakterize edilmiştir. Zeytin ağacı 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her dem yeşil yapraklı bir ağaç türüdür. Geniş, kıvrımlı ve yumru yumru bir gövdeye sahiptir. Ağaç yaşlandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Uzun ömürlü bir ağaç türüdür, yaklaşık 2000 yıl kadar yaşayabilmektedir. Anadolu'da anıt ağaç olarak bir çok zeytin ağacı vardır. Verimli topraklarda taç açık ve asimetric, verimsiz topraklarda ise daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve hemen hemen üç köşelidir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Olea>). Mızraksı, çok kısa saplı, deri gibi sert yaprakları sürgünlere karşılıklı çiftler halinde dizilmiştir. Yaprakları basit, tam kenarlı ve kenarlar alt yüze doğru hafif kıvrıktır. Yaprığın boyu 20–86 mm, genişliği de 5–17 mm'dir. Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprığın üst yüzü koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır.

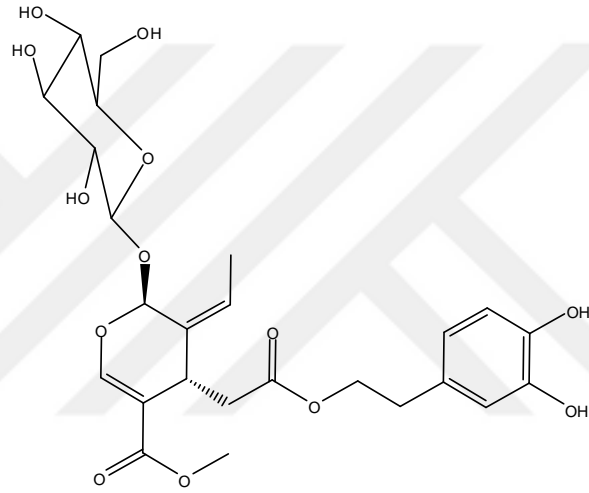


Şekil 1.2. Zeytin ağacı (<http://www.cepolina.com/tu/zeytin-agaci-fotograf.htm>)

Baharın sonlarına doğru yaprakların dal ile birleştiği bölgelerde seyrek salkımlar halinde, küçük beyazımsı-sarı renkli, kokulu çiçeklere sahiptir. Rüzgârların taşıdığı çiçek tozlarıyla döllenmiş çiçekler etli ve yağlı meyve verir. Meyve önce yeşil, olgunlaştıktan sonra da parlak siyah bir renk alır. Etli meyvenin içinde sert bir çekirdek vardır. Meyvenin etli kısmından ve çekirdeğinden elde edilen yağ bakımından çok değerli bir ağaçtır. Aynı zamanda ağacının çok heybetli ve estetik bir görünümü vardır. Odunu çürümeye karşı son derece dayanıklıdır (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Zeytin>).

Zeytinin yaprağında tanen, uçucu yağlar, organik asitler ve rezin bulunur. Yapraklar ve gövde kabuğu % 5 çay (infüzyon) halinde iştah açıcı, idrar söktürücü ve ateş düşürücü olarak kullanılır. Şeker hastalığında kullanım alanı olduğu gibi, tansiyon düzenleyici olarak da bilinir. Dermokozmetik amaçlı da kullanılmaktadır. Zeytinyağlı şampuanlar saç dökülmesini engeller, saçın çabuk uzamasını sağlar, lezyonlu saçlı deriyi onarmaya yardımcı olur ve kepek oluşumunu engeller. Zeytinyağlı sıvı sabun, duş jelleri, katı sabun, bebek şampuanları cildi olumsuz dış etkenlere karşı korurlar. Cildi güzelleştirip yaşlanmasını geciktirerek ciltteki kırışıklık oluşumunu engeller. Zeytin aynı zamanda dayanıklılığın sembolüdür. Doğal zeytinyağlı dermokozmetik ürünler cildimizde kimyasal kalıntılar bırakmadığından dünyada kullanımları giderek artmaktadır. Yüzyıllardır Akdenizlilerin sağlık ve güzellik kaynağı olmuştur. Kutsal metinlerde de şifa kaynağı olduğu belirtilmiştir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Zeytin>).

Zeytin ağacının hem meyveleri hem de yaprakları önemli biyolojik özelliklere sahip fenolik maddelerce zengin olup, bu fenolik bileşenlerin başlıcası oleuropein (**Şekil 1.3.**) maddesidir (Malik ve Bradford, 2006; Japon-Lujan ve ark., 2006; Bouaziz ve ark., 2008). Olgunlaşmamış zeytinlerde oleuropein (**Şekil 1.3.**), meyve ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Meyve olgunluğa eriştiği zaman, oleuropein içeriği azalır. Zeytin meyvesinin oleuropein içeriği, genç meyvedeki kuru maddenin %14'üne erişebilmektedir. Küçük meyve kültürleri, yüksek oleuropein içeriği ile karakterize edilirken, büyük meyve kültürleri genellikle, oleuropeinin az miktarlarını içermekte olduğu bildirilmektedir (Tokusoglu ve Bozoglu, 2010).



Şekil 1.3. Oleuropein maddesinin kimyasal yapısı

1.2.1. *Olea europea'* in ve metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri

1.2.1.1. Antioksidan

Oksidan maddeler canlılarda enerji üretim prosesi ve savunma sisteminde doğal olarak oluşan ajanlardır. Canlılar oksidan maddelerin toksik etkilerini azaltmaya yönelik olarak enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmasına sahiplerdir. Çevre kirliliği, stres, genetik ve çevresel faktörler bu antioksidan savunma sistemini olumsuz yönde etkilerler. Böyle bir durumda dışarıdan antioksidan takviyesi yapılmasına ihtiyaç vardır. Oksidan maddeler kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoproz (kemik erimesi), alzheimer hastalığı ve premenstrüel sendrom gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli rol oynarlar. Antioksidan gıdalar ve maddeler bu hastalıklardan korunmada önemli rol

oynadıkları için son zamanlarda antioksidan maddeler üzerine yapılan bilimsel çalışmalar çok yaygınlaşmıştır (Cervellati ve ark., 2002; Fernandez-Bolanos, 2008; Fistic ve ark., 2012).

Yapılan literatür taramasında *Olea europea* bitki türünün yapraklarından elde edilen ekstre ve bazı metabolitlerinin antioksidan aktiviteleri üzerine fazla sayıda bilimsel çalışmanın olduğunu göstermiştir. Botsoglou ve ark. (2014) *Olea europea* yaprak ekstresinin n-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş domuz eti köftesinde protein ve lipid oksidasyonu üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışma sonuçları ekstrenin lipid peroksidasyonunu ve malondialdehit (MDA) oranını azalttığını göstermiştir. Aynı çalışmada ayrıca ekstrenin protein oksidasyonunu da önemli oranda inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu araştırma sonuçlarına dayanarak araştırmacılar sentetik antioksidanların yerine zeytin yaprağı ekstresinin et endüstrisinde antioksidan olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Botsoglou ve ark. (2013) yaptıkları araştırmada tavukların 1 kg yemlerine zeytin yaprağının 5 ve 10 g lık kısımlarını katmış ve tavuklarda yumurta üretimi, yem alımı ve yumurta özellikleri üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre zeytin yaprağı yumurta üretimi ve yumurtada n-3 yağ asidi oranı üzerine herhangi bir olumsuz etki yapmamıştır. Diğer taraftan 10 gram zeytin yaprağı ile beslenen tavukların yumurtalarında lipid peroksidasyon ve MDA oranları kontrol grubuna göre önemli oranda düşük seviyede ölçülmüştür. Yine aynı araştırmacıların yaptığı farklı bir çalışmada zeytin yaprağı ile beslenmiş çiğ ve pişirilmiş domuz etlerinde lipid ve protein oksidasyon düzeylerini belirlemişlerdir (Botsoglou ve ark., 2012). Araştırmacılar zeytin yaprağı ile beslenen domuz etlerinde lipid peroksidasyonunun önemli oranda azaldığını bildirmişlerdir.

Lee ve Lee (2010) *O. europea* yaprak ekstresindeki fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini hem tek hem de birleştirilmiş halde tespit etmişlerdir. Araştırmacılar zeytin yaprağında bulunan fenoliklerden oleuropein, rutin, vanilin, kafeik asiti hem saf hemde belirli oranlarda birleştirmiş ve hem antioksidan hemde antimikrobiyal özelliklerini belirlemişlerdir. Araştırma sonuçları bu bileşenlerin nitrit süpürücü etkisinin %72,7-92,2 aralığında değiştiğini göstermiştir. Aynı çalışmada bu maddelerin hem saf hem de karışık halde güçlü DPPH radikal giderme aktivitesinin de

olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan maddeler arasında oleuropein *S. enteritidis* türüne karşı güçlü antimikrobiyal özellik sergilemiştir.

Benavente-Garcia ve ark. (2000) araştırmalarında zeytin yaprağının fenolik bileşiklerini HPLC ile belirlemiş ve yaprağın bağıl olarak %24,54 oranında oleuropein içerdiğini bildirmişlerdir. Zeytin yaprağının oleuropeinin yanısıra %1,46 oranında hidrokstitrazol, %0,71 oranında tirazol içerdiği aynı araştırmada bulunmuştur. Aynı araştırmada bu fenolikler saf halde ABTS.⁺ radikal giderme aktivitesi belirlenmiş ve tüm fenoliklerin ve de ekstrenin güçlü antioksidan özelliğinin olduğu gözlenmiştir.

Amoo ve ark. (2012) zeytin yaprağının da dahil olduğu uzun vadeli depolanan tıbbi bitkilerin hem taze hem de depolanmış olan örneklerinde antioksidan ve antikolinesteraz enzim inhibitörü etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar taze zeytin yaprağı ile depolanan zeytin yapraklarının antioksidan özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bununla beraber, DPPH radikal giderme aktivitesini depolanan zeytin yaprağında daha düşük bulmuşlardır. Benzer bir sonuç antikolinesteraz enzim inhibitörü içinde bulunmuş ve depolanan ve taze zeytin yaprağının enzim inhibitör etkilerinin birbirinden çok farklı olmadığı rapor edilmiştir.

Cumaoglu ve ark. (2011a) redoks homeostazi boyunca sitokin ile uyarılmış beta-hücrelerinin zarar görmesine karşı zeytin yaprağından elde edilen polifenolik maddelerce zengin ekstrenin koruyucu etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Redoks homeostazi hücre dışı gerçekleşen olaylar esnasında hücrenin bir kısım enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla kendi metabolizmasını koruması sürecidir. Sitokinler gibi pankreastan salgılanan beta-hücreleri stresörleri, insülin salgısının azalması ve apoptotik ve nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif stresi artırır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada zeytin yaprağı ve meyvelerinden elde ettikleri ekstratlar ile oleuropein maddesinin sitokin ile uyarılmış beta-hücrelerine karşı toksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, zeytin yaprağı ekstresinin ve oleuropein maddesinin canlı hücre sayısını artırdığını ve sitokinin bu hücrelere karşı toksik etkisini önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir. Cumaoglu ve ark. (2011b) yaptıkları benzer bir çalışmada ise pankreatik beta-hücrelerinde oksidatif stresi polifenolik maddelerce zengin olan zeytin yaprağı ekstresinin önemli oranda azalttığı ve insülin salgılayan bu

beta-hücrelerini H₂O₂ oksidan maddenin sebep olduğu oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir.

Hidroksitirozol ve türevi bileşikler zeytin yaprağında ve meyvelerinde bulunan oleuropein maddesinin hidrolizi ile oluşan fenolik bileşiklerdir. Zeytin meyveleri ve yaprağı bu maddelerce zengindir. Yapılan araştırmalar bu maddelerin apopitoz olayını uyararak kanser koruyucu özelliğinin yanı sıra kalp koruyucu, antioksidan, radikal süpürücü, antiaterojenik (kan sulandıran), UV ışınları ve antienflamatuar aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir (Amro ve ark., 2002; Cervellati ve ark., 2002; Bitler ve ark., 2005; Bianco ve ark., 2006; Fernandez-Bolanos ve ark., 2008; Katsiki ve ark., 2007).

Katsiki ve ark. (2007) oleuropein maddesinin insan bağ dokusundaki fibroblastların ömrünü artırırken, hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeyini ve protein oksidasyonunu önemli oranda azalttığını belirlemişlerdir. İnsanlarda bağ dokularında bulunan fibroblast hücreler yaraların iyileşmesinde önemli görevler alan kollajen proteininin yapımından sorumlu hücrelerdir.

1.2.1.2. Sitotoksik

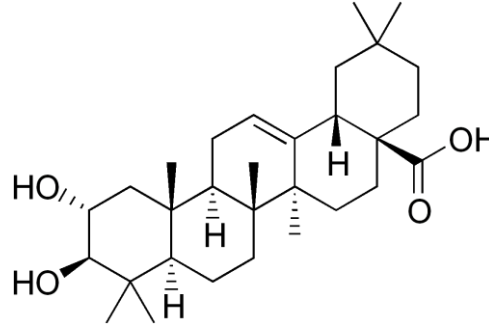
Belscak-Cvitanovic ve ark. (2014) dört farklı tıbbi bitki türünün (*Achillea millefolium*, *Crataegus oxyacantha* L., *Glechoma hederacea* L. ve *Olea europea*) su ekstralarını üç farklı yöntem (demleme, karıştırma ve kaynatma) ile elde etmiş ve bu ekstraların antioksidan özelliğinin yanı sıra HEP2 kanser hücrelerine (insan gırtlak kanseri) karşı test etmiştir. Araştırma sonuçları tüm bitki türlerinin kanserli hücrelerin çoğalmasını önemli oranda azalttığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar ayrıca bitki türlerinin ekstraların fenolik madde içeriğini araştırmış ve gözlenen aktivite ile bileşenler arasındaki ilişkiyi tartışmışlardır.

Cumaoglu ve ark. (2011b) yaptıkları benzer bir çalışmada ise pankreatik beta-hücrelerinde oksidatif stresi polifenolik maddelerce zengin olan zeytin yaprağı ekstresinin önemli oranda azalttığı ve insülin salgılayan bu beta-hücrelerini H₂O₂ oksidan maddenin sebep olduğu oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir.

Bouallagui ve ark. (2011) hidroksitirazol ve oleuropein bakımından zengin zeytin yaprağı ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik özelliğini test

etmiş ve ekstrenin doza bağımlı olarak kanserli hücre hatlarının çoğalmasını önemli oranda inhibe ettiğini bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar sitotoksik aktivitenin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak kanserli hücrelerin çoğalmasında önemli bazı faktörleri de araştırmış ve etki mekanizmasını ortaya koymaya çalışmışlardır.

Reyes ve ark. (2006) zeytin ezmesinin majör bir bileşeni olan maslinic asit (Şekil 1.4) molekülünü HT29 ve Caco-2 kolon kanser hücre hatlarına karşı test etmiş ve bu maddenin %50-80 oranında her iki hücre hattını da inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Aynı araştırmada ayrıca maslinic asit molekülünün apoptoz prosesinde önemli rol oynayan kaspaz-3 enzim aktivitesini artırdığını ve apoptozu teşvik ettiği belirlenmiştir.



Şekil 1.4. Maslinic asitin molekül yapısı

1.2.1.3. Diğer Biyolojik aktiviteler

Zeytin yaprağının ekstreleri üzerine yapılan diğer bir çalışma ise zeytin yaprağı ekstresinin nohut böceği *Callosobruchus chinensis* türüne karşı insektisidal etkisidir. Zia ve ark. (2011) zeytin yaprağının yanısıra dokuz adet farklı bitkinin ekstresini bu böceğe karşı toksik etkisini belirlemiş ve *Allium sativum* (sarımsak), *Syzygium aromaticum* (karanfil), karabiber (*Piper nigrum*) ve kırmızı biber (*Capsicum annum*) ekstrelerinin çok etkin olduğunu rapor etmişlerdir.

Literatürde zeytin yağının kimyasal bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri ve yağ asitleri bileşimi ayrıntılı olarak araştırılmıştır (Patumi ve ark., 1999, 2002; Salas ve ark., 1999; Nergiz ve Engez, 2000; Tura ve ark., 2007; Sakouhi ve ark., 2008; Ocakoglu ve ark., 2009).

1.3. Enzimler

Enzim yanıtlarının çoğu ikincil stres yanıtı olup hücrel hasarlarla ortaya çıkmaktadır. Enzim yanıtı dokularda enzim aktivitelerinin veya enzim miktarlarının ölçülmesi kolayca belirlenmektedir. Canlı hücreleri ilaç, kirletici, mikroorganizma gibi yabancı ajanlara maruz kaldığı zaman biyolojik cevap olarak enzimlerin düzeylerinde ve aktivitelerinde önemli değişiklikler olmaktadır. Bu enzimlerdeki değişiklikler canlılardaki stresin erken tanısına olanak sağlamaktadır (Barnhoorn ve van Vuren, 2004). Enzimler üzerine yabancı ajanların etkileri ya spesifik yada spesifik olmayan düzeylerde olmaktadır.

Serum enzim aktivitelerinin ölçülmesi balıklar üzerine yabancı ajanların etkisini belirlemede önemli bir parametredir (Bucher ve Hofer, 1990). Bu nedenle serum enzimleri (kolinesteraz, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrojenaz ve alkalen fosfataz gibi) çeşitli araştırmacılar (Cajaraville ve ark., 2000; Hamed ve ark., 2003) tarafından hem yabancı ajanların biyokimyasal belirteçleri hem de su ekosistemlerindeki yabancı ajan varlığı için duyarlı parametreler olarak kabul edilmektedir. Kolinesterazlar, asetilkolin ve diğer kolin-esterleri hidroliz eden polimorfik enzimlerdir.

Alanin aminotransferaz (EC 2.6.1.2, ALT) ve aspartat aminotransferaz (EC 2.6.1.1, AST), aminoasit metabolizmasına katılan en önemli enzimlerdir (Cowey ve Walton, 1988). ALT ve AST normalde hücre içerisinde olan enzimlerdir. Bu enzimlerin kan serumunda yükselmesi travma veya karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. İlaçların ve çevresel ajanların olumsuz etkileri, ALT ve AST enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle gösterilmiştir (Nemcsok ve ark., 1987). Plazmadaki ALT ve AST aktivitelerindeki artışların başta karaciğer olmak üzere diğer organların (böbrek ve/ya da solungaç) zarar görmesi sonucu oluştuğu kabul görmektedir (Nemcsok ve Hughes, 1988). Alkalen fosfataz (EC 3.1.3.1, ALP) (bazı organlardaki hücre ölümlerinden sonra kana girmektedir) önemli serum enzimlerinden biri olup karaciğer ve böbrek doku hasarlarının belirteci olarak kullanılmaktadır (Nemcsok ve Boross, 1982; Kalender ve ark., 2005). ALT enzimi AST enzimine göre karaciğer için daha spesifik bir enzimdir. AST enzim seviyesindeki değişiklik başka faktörlere bağlı olarak değişmesine karşın, ALT değerinin kanda yükselmesi karaciğer hasarının bir

göstergesidir. İnsanlarda safra yollarının tıkanması, alkol kullanımı, karaciğer sirozu, karaciğer yağlanması (alkol kullanımı, diyabet ve obezite sonucu), karaciğer kanserleri, şiddetli yanıklar, otoimmün ve viral hepatitler ile ilaç ve toksik madde alınımı ALT değerinin yükselmesine neden olur.

Kan plazması yada serumun biyokimyasal analizi, iç organlar (karaciğer ve böbrek gibi), proteinler (albuminler, globulinler), besleyici ve metabolik parametreler (kolesterol, trigliserid, glukoz gibi) ve elektrolitler (Na, Cl, K, Ca, P) hakkında bilgiler sağlamaktadır (Jain, 1986; Duncan ve ark., 1994). Bu nedenle plazma/serum parametreleri canlılarda yabancı ajanların toksik etkilerinin belirteçleri olarak kullanılmaktadır (Bergdahl ve ark., 1997). İyonlar (Na, Cl, K ve Ca gibi) balıkların büyümeleri ve iyon dengelerinin sağlanması için gerekli olup çoğu sudan solungaçlar aracılığıyla alınmaktadır (Eddy, 1982). Sudaki toksik maddelerle veya yabancı ajanlarla, ilaçlarla etkileşimde iyon alınımı hasar görmekte ve iyon dengesi bozulmaktadır (McDonald ve Wood, 1993).

Tilapya balıkları (Şekil 1.5), uzun zamandır insan tüketimi için besin olarak yetiştirilmiştir; Mısır mezarlarındaki resimler, Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) yetiştiriciliğinin 3000 yıl öncesine kadar uzandığını göstermektedir. Afrika'nın endemik balıkları olmalarına rağmen, daha çok tropik ve subtropik bölgere getirilmesiyle tilapya balıklarının yayılım alanı genişletilmiştir. Günümüzde tilapya yetiştiriciliği ile elde edilecek balık üretiminin çok önemli olduğu düşünülmektedir. FAO (Food and Agriculture Organization) 2002 verilerine göre dünyada 1 milyardan fazla insan, hayvansal protein ihtiyacının başlıca kaynağı olarak balığa güvenmektedir. Dünya nüfusunun hızla artması ucuz protein kaynağına olan ihtiyacı giderek artırmakta ve tilapya üretiminin artırılmasını zorunlu kılmaktadır (Almeida, 2001). *O. niloticus*'un (Şekil 1.5.) bu çalışmada kullanılmasının nedeni, besin kaynağı olarak yaygın tüketilmesi (Almeida, 2001), fizyolojik mekanizmaların yüksek omurgalılara benzemesi, daha kısa zamanda verimli döl vermesi, dış etkenlere karşı daha dirençli bir canlı olması ve (Cogun ve ark., 2003; Cogun ve Kargin., 2004; Sağlamtimur ve ark., 2004; Cogun ve Sahin, 2012), fizyolojik cevapları kısa sürede vermesinden dolayıdır.



Şekil 1.5. *O. niloticus* (Nil sazani)

Son zamanlarda doğal içerikli ekstre ve doğal ilaçlarla tedavi önemli hale gelmiştir (Davies ve ark., 2011; Hossain ve ark., 2011; Harikrishnan ve ark., 2011; Kanani ve ark., 2014). Bu konudaki *in vivo* çalışmalar genellikle fareler üzerinde yapılmaktadır. Ancak son zamanlarda diğer canlılar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarında önemli hale gelmiştir (Galina ve ark., 2009; Davies ve ark., 2011; Hossain ve ark., 2011; Harikrishnan ve ark., 2011; Kanani ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar bitkisel ekstre ve metabolitlerin balıkların büyümesini hızlandığı, besin değerini artırdığını ve savunma sistemlerini güçlendirdiğini ortaya koymuştur (Drew ve ark., 2007; Galina ve ark., 2009; Chakraborty ve Hancz, 2011; Harikrishnan ve ark., 2011; Metts ve ark., 2011; Turker ve Takemura, 2011; Pirarat ve ark., 2012; Trosvik ve ark., 2012; Lu ve ark., 2013; Pan ve ark., 2013; Verma ve ark., 2013; Freccia ve ark., 2014; Kanani ve ark., 2014). Ancak yapılan literatür taramasında *Oreochromis niloticus* üzerine *Oleo europea* metabolitleri ve ekstrelerinin etkisi konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızın amacı zeytin yaprağının ekstreleri ve bu ekstrelerin içindeki etken madde polifenolik antioksidanlardan biri olan oleuropeinin ve yaprak özütünden saflaştırılacak olan diğer metabolitlerin balıklarda iyonlar (Na, K, Ca, Cl) ve kandaki biyokimyasal parametrelerinin (ALT, AST, ALP ve glikoz) düzeylerinin araştırılmasını teşkil etmektedir.

1.4. Depo Ürünleri Zararlıları Böcekler

1.4.1. *Sitophilus granarius* (Buğday biti)

Sitophilus granarius (Buğday Biti) : Ergin, parlak koyu kahve veya esmer renkli, baş ucunda bir çift kuvvetli mandibula bulunan hortumla sonlanır (Şekil 1.6). Protonum ve elitra üzerinde oval, derin çukurcuklar, kısa, sık ve sarımsı tüyler bulunmakta, pronotum üzerindeki oval çukurcuklar dağınık, elitra üzerindeki çukurcuklar, artarda gelerek çizgiler oluşturmakta, arka kanatlar bulunmadığı için uçuş yeteneği bulunmamaktadır (Şekil 1.6.). Boyu 3-5 mm'dir (Şekil 1.6.). Yumurtalar beyaz renkli, larvalar krem renkte, 2,5-3 mm boyunda ve bacaksız, pupa sarımsı beyaz renkte ve 4 mm boyundadır. Depolanmış hububatların en önemli zararlılarından birisidir. Ülkemizde hemen her bölgede mevcut olup depo ürünlerine önemli zararlar vermekte ve bu yolla ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Buğday biti kışı, ergin veya larva olarak tahıl tanelerinin içerisinde veya ergin olarak depo ve ambarlardaki çatlak ve yarıklarda da kışlamaktadır. Çiftleştikten sonra dişi böcek, hortumu yardımıyla tahıl tanelerinde embriyoya yakın bir yerde delik açarak açtığı bu deliğe bir yumurta koymakta ve üzerini jelatinimsi bir ağız salgısı ile kapatmaktadır. Bir dişi, 150-300 adet yumurta bırakabilmektedir. Yumurtalar, normal oda sıcaklığında bir haftada açılır. Larva tane içerisine girerek burada beslenir ve pupa olur. Uygun şartlarda gelişme süresi 30-45 gün sürmekte, ülkemiz şartlarında yılda 3-4 döl vermekte ve erginler 7-8 ay kadar yaşamaktadır.

Kışın depoda oluşan düşük sıcaklıklara karşı erginler çok dayanıklı olup 5°C'nin altında kışlamaya geçmektedir. Tahıl depolarında -15°C'ye dayanıklı olan böcek, 5°C'den sonra aktifleşmekte, 12°C' den sonra üreme faaliyetine girmektedir. Üründe % 10 veya daha yüksek orandaki nem gelişmeleri için uygundur ve yüksek neme dayanıklıdır. Gıdasızlığa uzun süre dayanabilen bir tür olup, 5-6°C'de bir yıl, 18- 20°C'de iki ay aç kalabilmektedir. Bu nedenle boş ambarlarda uzun süre varlıklarını sürdürebilmektedirler. Ergin ve larvalar, bütün tahıl tanelerinde ve tahıldan yapılmış gıda maddelerinde beslenmektedirler. Larvalar içten erginler dıştan kemirerek zarar vermekte, yoğun üremede, geriye sadece tane kabukları kalmaktadır. Popülasyon yoğun olduğunda üründe kızışmaya sebep olmakta ve ürünü gıda maddesi olarak kullanılamaz hale getirmektedir. Erginler tanelerin yanında un, kepek, irmik, makarna, pasta ve ekmekte de beslenebilmektedir.



Yetişkin çizgi görünümü

Yetişkin sırt görünümü

Yetişkin yan görünümü

Şekil 1.6. Buğday bitinin (*S. granarius*) farklı görünüşleri

1.4.2. *Tribolium confusum* (Kırma biti, un biti)

T. confusum ergin, parlak koyu kırmızı renkli 3.5-4 mm boyundadır. (Şekil 1.7) Baş ve torax sık noktalıdır. Kın kanatların üzeri boyuna ince çizgilidir. Larva, ince, silindirik şekilli ve 5-7 mm boyundadır. Vücut sonunda bir çift çıkıntı vardır. Pupa önceleri beyaz sonraları sarı renklidir. Ergin, 300-400 yumurta bırakır. Yumurtadan ergine gelişme süresi 46-60 gündür. Yılda 3-4 döl verir. Dişi yumurtalarını gıda maddesinin içine bırakır. Erginler ortalama 1 yıl yaşarlar ve uçuşa yetenekleri yoktur. Un, makarna, bisküvi, kepek, nişasta, kuru meyve gibi gıda ürünlerine zararlar vererek önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Özellikle un depoları, değirmen ve un fabrikalarında yaygın olarak bulunan bir zararlıdır. Ürünü yiyerek tüketirler. Ülkemizde un biti adıyla da bilinirler. Ayrıca larva gömlekleri ve diğer artıkları ile ürünü kirletirler.



Şekil 1.7. *Tribolium confusum* (un biti, kırma biti) erişkin ve larvaları

1.4.3. *Aconthoscelides obtectus* (Fasulye böceği)

Fasulye tohum böceği ergininin vücudu uzunca oval, biraz yassı, açık veya koyu kahverengidir. Vücudun üzeri arkaya yatık sarı yeşil çok kısa tüylerle örtülü olup, açık gri tüylerle kaplı uzunca lekeler bulunmaktadır. Vücudun alt tarafı kırmızımsı sarı

renklidir. Antenleri 11 segmentli olup, ilk 4 segment ve son segmenti açık kahverengi diğerleri koyu kahverengidir. Bacakları kırmızımsı kahverengi renktedir. Fasulye tohum böceği'nin erkeği boyca küçük oluşu ve alttan son karın segmentinin dış kenarı içe doğru yuvarlak olması nedeniyle dışisinden ayrılır. Dişi boyca daha iri, son karın segmentinin çizgisi düzdür. Yumurtaları, uzun ve ovaldır. Yumurta, ilk konduğu zaman saydam parlak beyaz renklidir. Zamanla renk donuklaşır, süt beyazı olur. Açılıma yakın yumurtanın yuvarlak ucunda larvanın kafası belirginleşir. Yumurtadan ilk çıktığı zaman larvanın gövdesi silindirik yapıda uzun olup, arkaya doğru gittikçe inceler, uzun tüylerle kaplıdır. Baş esmerimsi, vücut beyaz renklidir. Yumurtadan çıkan larva bir süre tanenin üzerinde dolaştıktan sonra, tane kabuğunu oyarak bir galeri (tünel) açar ve orada beslenir. Bu sırada larvanın gövdesi silindirik olup yay gibi kıvrıklaşır, ayaklar kaybolmuştur. Bu haliyle larva 1. dönem larvadan çok farklıdır. Son dönem larvanın vücut uzunluğu 33.5 mm'dir. Pupa, tane kabuğunun hemen altındaki bir odacıkta oluşur. Bu durum tane kabuğu üzerinde yuvarlak yağ lekesine benzer renk değişimi ile kolayca anlaşılır. Zamanla lekenin rengi esmerleşir. İlk zaman parlak beyaz olan pupa rengi zamanla koyulaşır matlaşır ve kirli sarımsıdan açık kahverengine dönüşür. Pupa boyu 2.9-4.6 mm'dir.



Şekil 1.8. *A. obtectus* (Fasulye böceği) erişkin ve larvası

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşaması, zeytin yaprağının etil asetat ve metanol ekstrelerinden polifenolik antioksidanlardan biri olan oleuropein ve diğer metabolitleri saflaştırmak ve kimyasal yapılarını UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D ve 2D-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleri ile aydınlatmaktır. İkinci aşaması oleuropein ve saflaştırılan diğer metabolitlerin 46 saatlik uygulama süreleri sonunda *Oreochromis niloticus* balıkların kan düzeyindeki bazı iyonlar (Na, K, Ca, Cl) ve biyokimyasal parametreler (ALT, AST, ALP ve glikoz) üzerindeki etkisini belirlemek. Üçüncü aşaması ise *O. europea*'ın yapraklarından elde edilen ekstre ve saf metabolitlerin önemli depo zararlıları olan *S. garanarius*, *T. confusum* ve *A. Obtectus* erişkinlerine karşı toksik etkilerini belirlenmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde, çalışmamızda kullanılan bitkisel materyal, kimyasal maddeler ve aletler verilmiştir.

2.1. Bitkisel Materyal

Çalışmalarda kullandığımız *Olea europaea* Kilis'in zeytin bahçelerinden toplanmıştır. Bitki örneği, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

2.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler

2.2.1. Kimyasal Maddeler

Ekstraksiyon işlemlerinde destillenmiş çözücüler kullanıldı.

2.2.2. İzolasyon ve analiz çalışmalarında kullanılan aletler

UV-Görünür Bölge Spektrofotometre	: PG instruments Ltd.
UV Lambası	: Model Mineralight
Döner buharlaştırıcı	: BSI
¹³ C-NMR Spektroskopisi	: Bruker 400 MHzSpektrometre
¹ HNMR Spektroskopisi	: Bruker 400 MHzSpektrometre
Infrared Spektrofotometresi	: Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR
Kompresör	: KNF LabLaborpurt
Hassas Terazi	: Scaltec SPB 31

2.2.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Kromatografik yöntemler ile yapılan izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında kullandığımız adsorbanlar **Çizelge 3.1.**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

YÖNTEM	ADSORBAN
Kolon Kromatografisi	Silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck) Silika jel (Kiesel gel 60, 230-400 mesh Merck)
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	Silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm, Merck, 5554)

2.2.4. Kullanılan revelatörler

İTK’da maddelere ait lekeler, UV lambasında, UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm de belirlendi. UV ışığında görünmeyen maddelere ait lekeler ise vanilin/H₂SO₄ (%1) reaktifinin püskürtülmesinden sonra, kromatogramın 105 °C da birkaç dakika ısıtılması ile belirlendi.

2.2.5. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri Çizelge 3.2. de verilmiştir.

Çizelge.2.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan yürütücü faz sistemleri

No	Yürütücü faz sistemleri	Yöntemler
1	Dikolorometan—metanol (9:1, 8:2)	SKK, İTK
2	Kloroform—etil asetat (9:1)	İTK
3	Diklorometan— metanol (8,5:1,5, 3:2, 1:1, 6:4)	İTK
4	Etil asetat	SKK, İTK
5	Hekzan—etil asetat (7:3, 6:4)	SKK, İTK
6	Dietileter	İTK
7	Hekzan—dietil eter (1:1)	İTK
8	Hekzan—diklorometan (3:7)	İTK
9	Diklorometan	İTK
10	Hekzan—metanol (8:2)	İTK
11	Kloroform—metanol (9,5:0,5)	İTK
12	Kloroform—etil asetat (7:3)	İTK
13	Hekzan—dietil eter (4:6)	İTK
14	Hekzan—etil asetat (2:3, 1:4)	İTK
15	Hekzan—dietil eter (6:4, 7:3)	İTK
16	Metanol—dikolorometan (6:4)	SKK, İTK
17	Metanol— dikolorometan (3:7, 2,5:7,5)	İTK
18	Dikolorometan— etil asetat (8:2,)	SKK, İTK
19	Dikolorometan— etil asetat (8,5:1,5)	İTK
20	Aseton	İTK

2.3. Etanol ile Ekstraksiyon ve Kromatografik Çalışmalar

2.3.1. Ekstraksiyon

300 g zeytin yaprağı 1 L etil alkol ile 5 kez ekstrakte edildi. Ekstreler birleştirildi ve etil alkol döner buharlaştırıcıda düşük sıcaklık ve basınçta uzaklaştırıldı. Bu işlemlerin sonunda koyu kahverengi renkli 85 g ekstre elde edildi. Ekstredeki klorofil ve düşük polariteli maddeleri tüketmek için ekstrenin üzerine etil asetat (500 ml) eklendi ve bu işlem dört kez tekrarlandı. Bu işlem sonrasında 45 g etil asetatta çözülmeyen ekstre elde edildi.

2.3.2. Etil asetat fazına geçmeyen kısım üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar

Elde edilen ekstre metanolde çözüldü. Üzerine 40 g silika jel eklendi, metanol döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kolona yüklenmek üzere hazırlandı. Ekstre fraksiyonlanmak üzere 250 g silika jel (700-230 mesh) CH_2Cl_2 -MeOH (8:2) sisteminde süspanse edilerek kolona yüklendi ve ekstre kuru olarak kolona tatbik edildi. Elüent olarak yine CH_2Cl_2 -MeOH (8:2) sistemi tercih edildi ve elüsyon esnasında toplam 60 fraksiyon alındı. Toplanan her bir fraksiyon İTK CH_2Cl_2 -MeOH (8:2), CHCl_3 -EtOAc (7:3), hekzan-EtOAc (6:4) gibi değişik hareketli fazlarda yürütüldü ve aynı maddelere ait lekeleri içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi. Bu işlemin sonucunda ekstre toplamda dört ana fraksiyona bölündü ve sırasıyla OEEA (1-4 Fr.), OEEB (6-14. Fr.), OEEC (15-46. Fr.) ve OEED (47-60. Fr.) olarak kodlandı.

OEEA fraksiyonu sadece klorofil ve lipofilik madde içerdiği için üzerinde saflaştırma çalışmaları yapılmadı ve bu fraksiyon atıldı.

OEEB fraksiyonu İTK da CHCl_3 -EtOAc (9:1) sisteminde EtOAc fazına geçen kısım ile beraber yürütüldü ve aynı maddeleri içerdiği belirlendi. Bu fraksiyon etanol ekstresinin EtOAc' e geçen kısmı ile birleştirildi.

OEEC fraksiyonunun İTK ile yapılan kontrollerinde, zeytin yaprağı ve meyvesinin karakteristik bileşeni, oleuropein olduğu düşünülen bir maddeyi içerdiği gözlemlendi. Bu maddeyi saflaştırmak üzere yeniden silika jel KK yapıldı. Bu amaçla, 150g silika jel (70-230 mesh) tartıldı ve CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) hareketli faz sistemi kullanılarak kolona

yüklendi. Fraksiyon aynı sistemde çözüldü ve kolona tatbik edildi. Elüent olarak aynı sistem kullanıldı ve toplam 73 fraksiyon alındı. İTK ile yapılan kontrollerde 56-69. fraksiyonların oleuropein olduğu tahmin edilen saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Fraksiyonlar birleştirildi, çözücüsü uzaklaştırıldı ve saf madde **OE-1** olarak kodlandı (4,75 gram).

OEED fraksiyonu İTK ile metanol—diklormetan (6:4) hareketli faz sisteminde kontrol edildi ve az miktar OE-1 maddesinin yanı sıra daha polar bir veya birkaç madde içerdiği tespit edildi. Bu fraksiyondaki metabolitleri saflaştırmak üzere OEED fraksiyonu silika jel KK'a tabi tutuldu. Bu amaçla 125 gram silika jel (70-230 mesh) aynı hareketli faz sisteminde süspansiyon haline getirilerek kolon hazırlandı. Fraksiyon kolona yüklendi ve 25 ml hacimler halinde fraksiyonlar toplandı. Sistem polar olduğu için toplamda 15 fraksiyon toplandı ve toplanan fraksiyonlar İTK da değişik hareketli faz sistemi kullanılarak kontrol edildi ve aynı maddelere ait lekeleri içeren fraksiyonlar birleştirildi. Kontroller sonunda 3-5. Fraksiyonların OE-1 ve diğer fraksiyonlarda daha majör olan farklı bir madde içerdiği gözlemlendi. Daha önce yeterli miktarda OE-1 kodlu madde saflaştırıldığı için bu fraksiyon üzerinde ayrıca kromatografik çalışmalar yapılmadı. 6-15. fraksiyonların ise OE-1 in yanı sıra majör farklı bir madde içerdiği belirlendi. Bu maddeyi saflaştırmak üzere yeniden silika jel KK yapıldı. Bu amaçla 50 g silika jel (70-230mesh) daha az polar diklormetan—metanol (7,5:2,5) sisteminde süspansiyon haline getirildi, kolona yüklenerek hazırlandı. Elüent olarak aynı sistem kullanıldı ve toplam 20 fraksiyon toplandı. Toplanan fraksiyonlar İTK da kontrol edildi ve 10-20. fraksiyonların saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Bu fraksiyonlar birleştirildi, tartıldı ve yeni saflaştırılan madde **OE-2** (750 mg) olarak kodlandı.

2.3.3. Etil asetat fazına geçen kısım üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar

Bu fazdaki maddeleri saflaştırmak üzere silika jel kolon Kromatografisi (180g, 70-230 mesh) yapıldı. Ekstre kolona tatbik edilmek üzere uygun bir çözücüde çözüldü ve 20 gram silika jele emdirildi. Bu amaçla, 180 gram silika jel (70-230 mesh) CH₂Cl₂-MeOH (8:2) hareketli faz sisteminde süspansiyon haline getirildi ve kolona yüklendi. Fraksiyonlar 30 ml'lik hacimler halinde toplandı ve toplamda 38 fraksiyon alındı. Toplanan her bir fraksiyon CH₂Cl₂:MeOH (8:2) hareketli fazında yürütülerek kontrol edildi ve aynı lekeleri içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi. Yapılan

kontrollerde ilk 18 fraksiyonun klorofil ve terpenik veya steroidal yapılu bileşikleri içerdiği belirlendi. Bu fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi ve OEEtA olarak kodlandı (12.5 g). İTK ile yapılan kontrollerde 19-37. fraksiyonların saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Bu maddeyi saf olarak içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi, İTK da daha önce saflaştırılan **OE-1** kodlu madde ile beraber yürütüldü ve aynı maddeler olduğu belirlendi. Saflaştırılan tüm OE-1 kodlu maddeler birleştirildi, tartıldı ve toplamda 8,71 g OE-1 saflaştırıldı (% verim: 2,90).

2.4. Etil Asetat ile Ekstraksiyon ve Kromatografik Çalışmalar

Daha önce de bahsedildiği gibi ekstrenin ana kolonda fraksiyonlanması esnasında alınan OEEB fraksiyonu İTK da CHCl_3 -EtOAc (9:1) sisteminde yürütülmüş, aynı maddeleri içerdiği belirlenmiş ve etanol ekstresinin EtOAc'e geçen kısmı ile birleştirilmişti. Birleştirme işleminin sonunda EtOAc fazına geçen 16,27 gram madde elde edildi. Bu fazdan saflaştırılacak olan metabolitler üzerinde ileriki aşamalarda bazı biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması tez hocamız tarafından planlanıyordu. Bu metabolitleri yeterli miktarda saflaştırmak için ekstre miktarının artırılması gerekmekteydi. Bu nedenle, 500 gram öğütülmüş zeytin yaprağı etil asetat ile (5 x 2,5L) ekstrakte edildi. Ekstreler birleştirildi, etil asetat buharlaştırıldı ve bu işlemin sonunda 42,99 gram ekstre (% verim: 8.60) elde edildi.

Ekstredeki klorofil ve düşük polariteli molekülleri uzaklaştırmak üzere ekstre sıcak hekzan (50 °C) üzerinden beş kez yıkandı ve yıkama işlemi sonrası hekzanda çözünmeyen kısım 28,98 gram olarak tartıldı.

Etil asetat ekstresi aseton içerisinde, ultrasonik su banyosu yardımıyla çözüldü ve üzerine 20 gram silika jel ilave edildi. Aseton döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve böylece ekstre KK' a kuru olarak tatbik etmek üzere hazır hale getirildi. Silika jel KK için 300 gram silika jel (70-230mesh) CH_2Cl_2 :EtOAc (8:2) hareketli faz ile süspansiyon haline getirildi ve kolona yüklendi. Fraksiyonlar 50 ml hacimler halinde toplandı ve bu sürecin sonunda toplam 74 fraksiyon alındı. Toplanan fraksiyonlar İTK da CH_2Cl_2 :EtOAc (8:2) hareketli faz ile kontrol edildi ve aynı maddelere ait lekeleri içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi. Aynı maddeleri içeren fraksiyonlar ve verilen kodlar aşağıdaki Çizelge 3.3.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. KK sonrası birleştirilen fraksiyonlar ve kodlar

Fraksiyon No	Kod	Kütle(g)
1-16	EtA	4,17
17-26	EtB	8,17
27-47	EtC	6,52
48-77	EtD	2,42

İTK ile yapılan kontroller esnasında EtA fraksiyonunun sadece klorofil içerdiği tespit edildi. Bu nedenle EtA fraksiyonu üzerinde kromatografik çalışmalar yapılmadı ve bu fraksiyon atıldı.

İTK ile yapılan kontrollerde EtB fraksiyonunun safsızlık olarak klorofillerin yanı sıra tek bir maddeyi içerdiği belirlendi. Bu fraksiyon yeşil renkli amorf bir katıydı. Bu fraksiyondaki klorofilleri uzaklaştırmak üzere sırasıyla hekzan, hekzan:CHCl₃ ve dietileter üzerinden hızlı bir şekilde yıkandı. Yıkama işlemleri sonrası klorofiller uzaklaştırıldı ve beyaz amorf bir katı elde edildi (1,88 g). Madde İTK ile CHCl₃:EtOAc sistemi kullanılarak saflığı kontrol edildi ve maddenin saf olduğu gözlemlendi. Saflaştırılan bu yeni madde **OE-3** (1,88 g) olarak kodlandı. Yıkama işlemleri sırasında hekzan, CHCl₃ ve dietiletere geçen kısım İTK ile CHCl₃:EtOAc ile kontrol edildi ve bu sistemde **OE-3**'den farklı bir madde içerdiği tespit edildi. Bu fraksiyon 75 gram silika jel (70-230 mesh) kullanılarak KK' a tabi tutuldu. Fraksiyonlar 25 ml'lik hacimler halinde toplandı ve toplam 35 fraksiyon alındı. Fraksiyonlar İTK ile kontrol edildi ve 13-20. fraksiyonların saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Fraksiyonlar birleştirildi, çözücü uzaklaştırıldı ve **OE-4** (1,650g) kodlandı.

EtC fraksiyonu (6,52 g) İTK ile CH₂Cl₂:EtOAc (8:2) hareketli faz ile kontrol edildi ve küçük safsızlıkların yanı sıra majör bir madde içerdiği tespit edildi. Bu iki majör maddeyi saflaştırmak üzere EtC fraksiyonu 125 gram silika jel (70-230 mesh) ve CH₂Cl₂:EtOAc (8:2) hareketli faz ile KK' a tabii tutuldu. Fraksiyonlar 25 ml'lik hacimler halinde toplandı ve toplam 16 fraksiyon alındı. İTK da yürütüldüğünde ilk 5 fraksiyonun (1-5) sadece klorofil içerdiği belirlendi ve bu nedenle atıldı. İTK ile kontrol edildiğinde diğer fraksiyonların yüksek oranda saf olduğu gözlemlendi ve içerisindeki

küçük safsızlıklar metil alkol üzerinden yıkanarak uzaklaştırıldı. Bu işlemin sonunda beyaz renkli, amorf bir katı elde edildi ve **OE-5** (2,52g) olarak kodlandı.

EtD fraksiyonu üzerinde ise Kromatografik çalışmalar yapılmadı.

2.5. Balıklarda Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Saflaştırılan metabolitler ve ekstralar balıkların yemlerine katılmak süratiyle, balıkların kan dokusundaki bazı iyonlar ve bazı biyokimyasal parametrelerin üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu araştırmada kullanılan *Oreochromis niloticus* balık türü Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından temin edildi ve üç ay süre ile 40X100X40 cm boyutlarındaki dokuz (9) stok akvaryum içerisinde laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlandı. Balıklar bu sürenin sonunda uygun boy ve ağırlığa ulaştılar. Deneyler $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta yürütüldü, akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırıldı ve günde sekiz saat aydınlanma (8 saat gündüz / 16 saat gece) periyodu uygulandı. Balıklar, günde iki kez olmak üzere balık ağırlığının % 1'i kadar hazır balık yemi (Pınar Balık Yemi, Türkiye) ile beslendi.

Saf metabolitlerin yüksek (4g ekstre veya metabolit/100g yem) ve düşük derişim (1g ekstre veya metabolit/100g yem) halinde olmak üzere iki farklı derişimde balık yemlerine katıldı. Balıklara 96 saat boyunca günde iki kere bu yemlerden verilmesi sağlandı. Süre sonunda balıkların kanları 2 grup halinde alındı, birinci grup iyon düzeyleri için (Na, K, Ca ve Cl) diğer grup ise ALT, AST, ALP ve glikoz gibi biyokimyasal parametreleri ölçümleri için kullanıldı. Biyokimyasal ve iyon ölçümleri Kilis Devlet Hastanesi merkez laboratuvarında Roche Hitachi P 800 marka cihaz ile gerçekleştirildi.

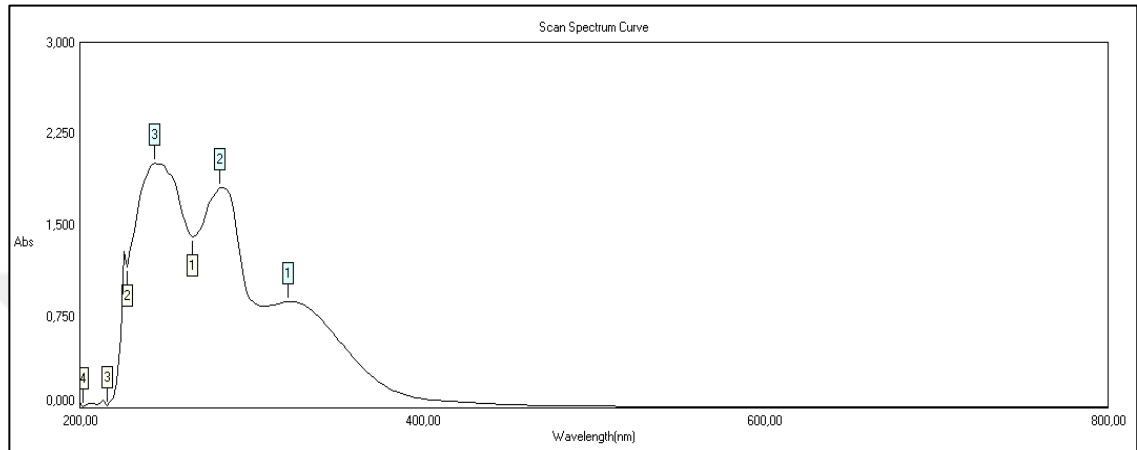
Deneylerden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri “ Regresyon analizi ve Student-Newman Keuls Test (SNK)” testleri uygulanarak yapıldı.

2.6. İnektisidal Aktivite Çalışmaları

İnektisidal aktivite çalışmaları Erzurum Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışmada üç önemli depo zararlıları olan *Sitophilus granarius* (buğday biti), *Tribolium confusum* (kıрма biti, un biti) ve *Acanthoscelides obtectus* (fasülye böceği) erişkinleri kullanılmıştır. Laboratuvar şartlarında beslenen böceklerin erginleri uygun besi ortamı ile beraber Petri kaplarına 20 adet olacak şekilde yerleştirildi. Belirli konsantrasyonlarda (2,5 mg, 5 mg ve 7,5 mg/Petri kabı) hazırlanan ekstre ve yeterli miktarda saflaştırılan saf metabolitler petri kaplarına ilave edilerek kapların ağzı kapatıldı. Saflaştırılan metabolitler etanol-destile su (% 10 hacimce) sisteminde çözüldü ve petri kaplarına eklendi. Aynı şartlarda hazırlanan inektisit ilacı DDVP (dichlorvos; 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise sadece maddeleri çözmek üzere kullanılan etanol-destile su (% 10 hacimce) kullanıldı. Ölü böcekler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayılarak kaydedildi.

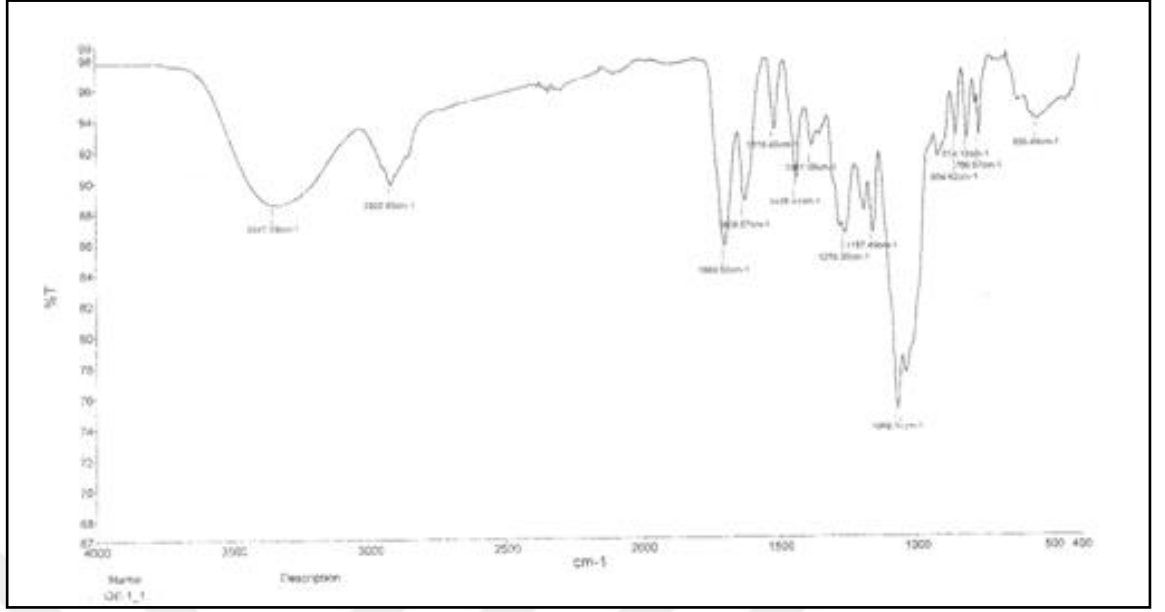
Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “ANOVA” (LSD ve Duncan testleri) ve “ Probit Regresyon Analizi” testleri uygulanarak yapıldı.

OE-1 molekülünün kimyasal yapısı UV-Vis, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektral verilerinden zeytin yaprağı ve meyvelerinin karakteristik bileşeni olan oleuropein olarak aydınlatıldı. OE-1 (oleuropein) metaboliti UV-VIS spektrumunda yapıyla uyumlu olarak (Şekil 3.1) $\lambda_{\text{max}}=244$ (2,00), $\lambda_{\text{max}}=282$ nm (1,81) ve $\lambda_{\text{max}}=322$ nm (0,87) de maksimum absorpsiyonları verdi (Solomons, 1990; Erdik, 1998; Fessenden ve ark., 2001).



Şekil 3.1.OE-1(oleuropein)' in UV-Vis. spektrumu

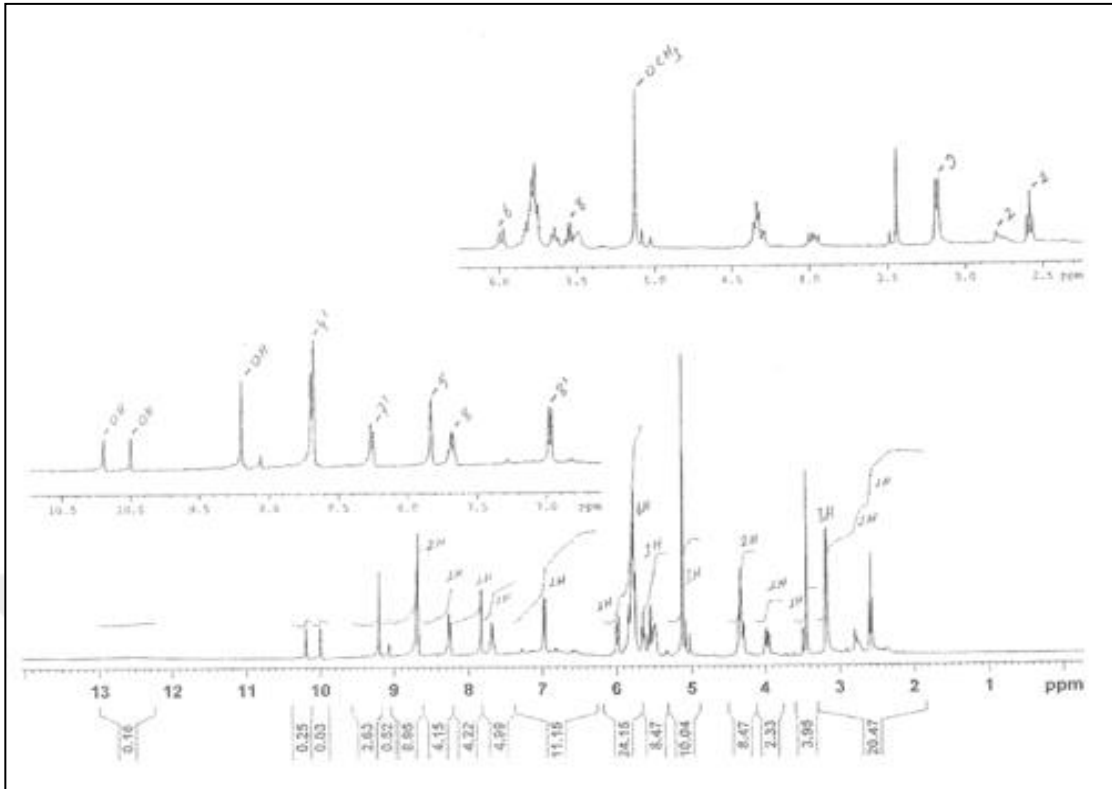
Oleuropeinin (OE-1) FT-IR spektrumu (Şekil 3.2) da oleuropeinin kimyasal yapısı ile uyumlu kimyasal bağ titreşimlerine ait absorpsiyon bantları vermiştir. Spektrumdan görüleceği üzere 3347 cm^{-1} de fazla sayıda $-\text{OH}$ grubuna ait (aromatik halkaya bağlı ve glikoz birimindeki $-\text{OH}$ grupları) absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir. Spektrumda 2923 cm^{-1} civarında gözlenen titreşim bantları ise moleküldeki alifatik C-H titreşimlerine ait absorpsiyonlardır. Ester karbonil grubuna ait titreşim absorpsiyon bantları ise 1700 cm^{-1} ve 1627 cm^{-1} de gözlemlenmiştir (Solomons, 1990; Erdik, 1998; Fessenden ve ark., 2001). Bu absorpsiyon bantlarından 1700 cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bandı konjuge ester karbonil karbonuna aittir. Moleküldeki çok fazla sayıdaki C-O bağı titreşimlerine ait absorpsiyonlar ise 1069 cm^{-1} de çok kuvvetli bir bant olarak gözlemlenmiştir.



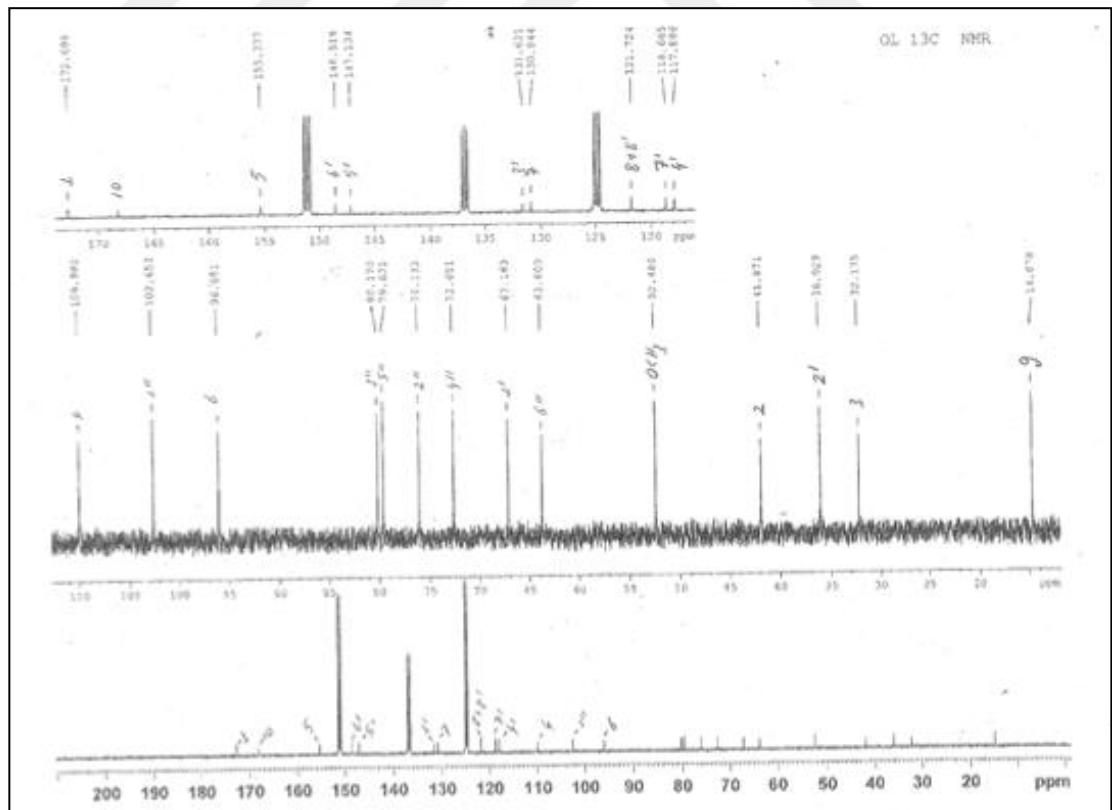
Şekil 3.2. OE-1 (oleuropein)' in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

IR: ν_{\max} : 3347 cm^{-1} (O-H titreşim bandı), 2800-3000 cm^{-1} (alifatik ve aromatik C-H titreşim bantları), 1699 ve 1627 cm^{-1} (ester C=O titreşim bantları), 1400-1600 cm^{-1} (C=C titreşim bantları), 1069 cm^{-1} (C-O titreşim bandı).

OE-1' in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.3) oleuropein molekülünün kimyasal yapısı ile uyumludur. Molekülün fenolik kısmına ait hidrojenlerin kimyasal kaymaları $\delta=8,70$ ppm de *d* (H-4'), $\delta=8,27$ ppm de *d* (H-7'), $\delta=6,95$ ppm de *d* (H-8') sinyaller olarak gözlenmiştir. Moleküldeki H-5 ise $\delta=7,85$ ppm de *s* sinyal vererek rezonans olmuştur. Molekülde glikoz biriminin anomerik hidrojenine ait sinyal $\delta=6,02$ ppm de *d* sinyal olarak gözlenmiştir. Bu sinyalin *J* etkileşme sabiti büyük olup glikozun β - bağı ile bağlandığını göstermektedir. Moleküldeki H-9, H-8 ile etkileşerek $\delta=3,20$ ppm de *d* sinyal vermiştir. Metoksi grubu (-OCH₃) hidrojenlerinin kimyasal kayma değeri ise $\delta=5,14$ ppm olup, şiddetli bir *s* sinyal olarak gözlenmiştir. Moleküldeki OH hidrojenleri ise $\delta=9,10$ ppm, $\delta=9,21$ ppm, $\delta=10,02$ ppm ve $\delta=10,25$ ppm de geniş *s* sinyal vererek rezonans olmuşlardır.



Şekil 3.3.OE-1 (oleuropein)' in ¹H-NMR spektrumu (Pridin-d₅)

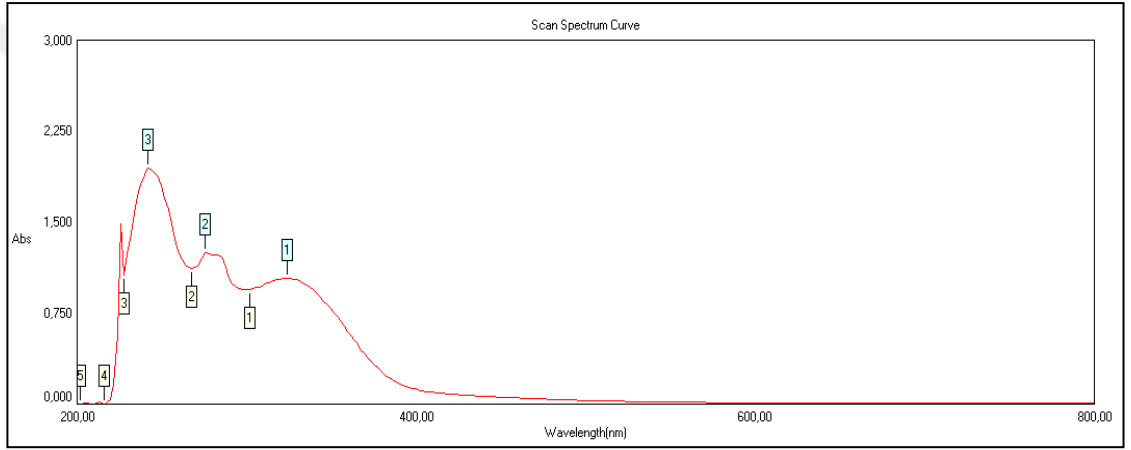


Şekil 3.4.OE-1 (oleuropein)' in ¹³C-NMR spektrumu (Pridin-d₅)

OE-1' in decoupled (etkileşmemiş) ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.4) oleuropeinin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak toplam 24 C sinyali gözlemlenmiştir. Oysa molekülün molekül formülü $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ olup bir C sinyali eksik gözlenmiştir. Bir karbon sinyalinin eksik görünmesinin nedeni C-8 ve C-8'' ün aynı yerde ($\delta=121,7$ ppm) rezonans olmasıdır. Sırasıyla, $\delta=172,7$ ppm ve $\delta=168,4$ ppm de gözlenen C sinyalleri moleküldeki 1 ve 10 numaralı ester karbonile ait sinyalleridir. C-5, C-6' ve C-5' olefinik ve aromatik C atomlarına ait sinyaller bu atomlara bağlı O atomunun indüktif etkisinden dolayı daha aşağı alanda sırasıyla, $\delta=155,4$ ppm, $\delta=148,5$ ppm ve $\delta=147,1$ ppm'de rezonans olmuşlardır. Moleküldeki anomerik C atomuna (C-1'') ait sinyal bağlı iki O atomunun indüktif etkisinden dolayı $\delta=102,7$ ppm de ölçülmüştür. Benzer bir durum C-6 içinde gözlenmiş olup bu atomun kimyasal kayması $\delta=96,1$ ppm'dir. Oleuropeinin ^{13}C -NMR spektrumunda bir O atomunun bağlı olduğu C sinyalleri $\delta=82-60$ ppm aralığında toplam 6 sinyal olarak gözlenmiş olup bu sinyallerin beş tanesi glikoz birimine, bir tanesi ise C-1'' e ($\delta=67,2$ ppm) ait sinyallerdir. Metoksi grubuna ait C atomu $\delta=52,5$ ppm de rezonans olurken, oleuropeinin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak alifatik bölgede ($\delta=10-50$ ppm aralığı) dört C sinyali gözlenmiştir. OE-1'in kimyasal yapısının zeytin yaprağının yaygın bir metaboliti oleuropein olduğu daha önce yayınlanmış spektral verilerle de doğrulanmıştır (Tanahashi ve ark., 1999; Al-Azzawari, 2004).

3.1.2. OE-2 (Trisakkarit)

OE-2 zeytin yaprağının etanol ekstresinden hafif kahverengimsi, amorf bir katı olarak izole edildi. Maddenin erime noktası 76-78 °C olarak belirlendi. OE-2 İTK da görünür ışıkta renksiz, UV₂₅₄ nm’de hafif mor renkli ve H₂SO₄-vanilin reaktifi püskürtüldüğünde ise açık kahverengimsi bir renk vermekteydi. Bu molekülün UV-Vis spektrumunda (Şekil 3.5) üç maksimum absorbands bandı gözlenmiştir. Maksimum absorbandslar sırasıyla $\lambda_{\text{max}}=324$ nm, $\lambda_{\text{max}}=276$ nm ve $\lambda_{\text{max}}=250$ nm da ölçülmüştür. Bu maksimum absorbandslar molekülde fazla sayıda $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $n \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişleri olduğuna işaret etmektedir (Solomons, 1990; Erdik, 1998; Fessenden ve ark., 2001).

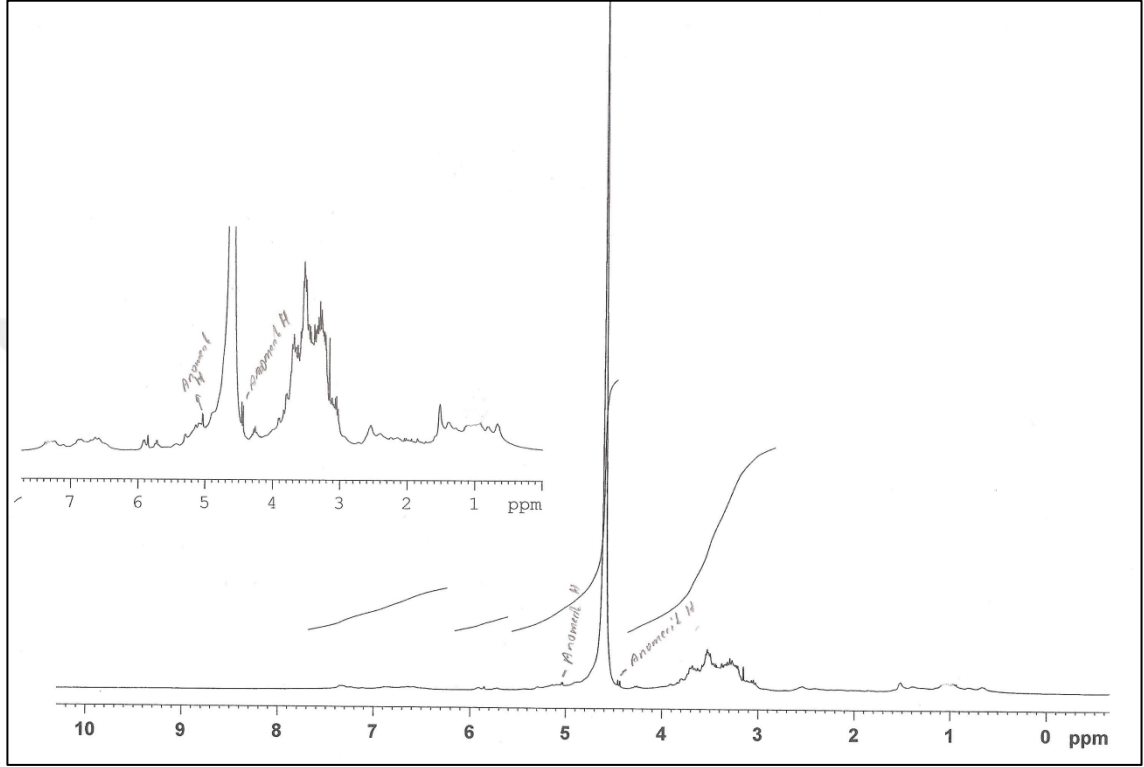


Şekil 3.5.OE-2’ in UV-Vis. Spektrumu (CH₃OH)

OE-2 molekülünün diğer, ¹H-NMR (Şekil 3.6.), ¹³C-NMR (Şekik 3.7), DEPT135 ve DEPT90 (Şekil 3.8) ve HMQC (Şekil 3.9) spektroskopik verileri ile kimyasal yapısının bir trisakkarit olduğu tespit edilmiştir. Ancak spektral veriler yapılar analiz edilerek trisakkaritin kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır.

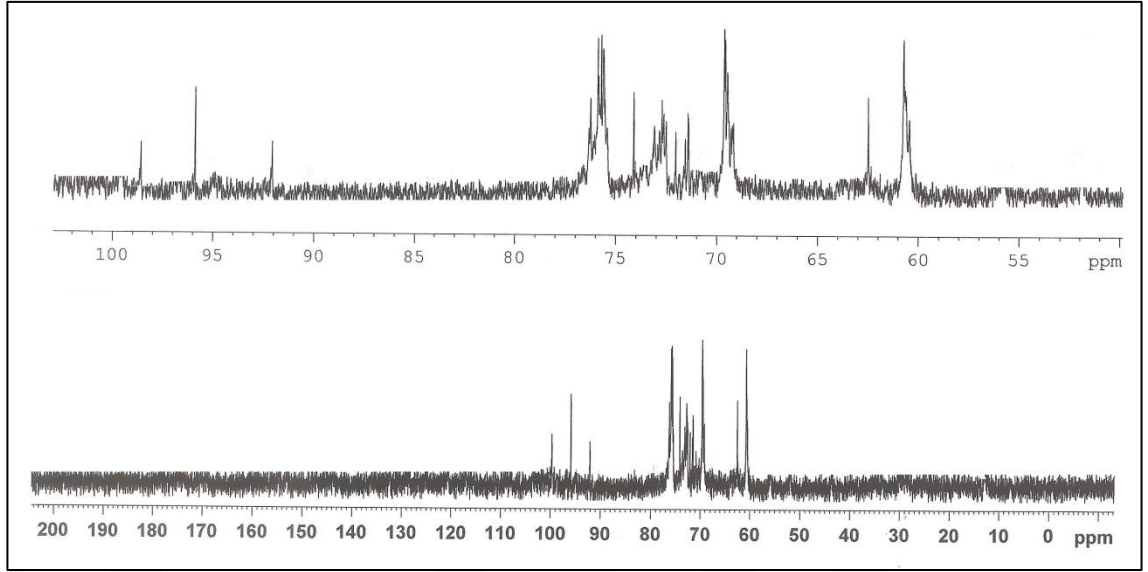
OE-2’ in ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.6.) $\delta=5,05$ ($J=3,72$ Hz) ppm, $\delta=4,45$ ppm ($J=7,90$ Hz) ile $\delta=4,70$ ppm civarında gözlenen ancak D₂O pikinin altında kalan üç adet anomerik hidrojenlere ait sinyaller gözlenmesi bu molekülün bir trisakkarit olduğunu göstermektedir. $\delta=4,70$ ppm civarında gözlenen ancak D₂O pikinin altında kalan sinyalin etkileşme sabiti hesaplanamamıştır. Diğer taraftan $\delta=5,05$ ppm’de gözlenen sinyal için $J=3,72$ Hz lik bir etkileşme sabiti monosakkaritin α - bağı ile bağlandığını göstermektedir. $\delta=4,45$ ppm de gözlenen anomerik hidrojen için ise etkileşme sabiti, $J=9,70$ Hz olarak hesaplanmış olup, β - bağı ile bağlandığını

göstermektedir. Bu etkileşme sabiti genellikle glikoz şekerine ait olup β - bağı ile başka bir monosakkarite bağlandığını göstermektedir. Üç monosakkarit birimine ait diğer hidrojenlerin sinyali ise $\delta=4,00-3,00$ ppm arasında gözlemlenmiş olup molekülün bir trisakkarit olduğunu doğrulamaktadır.



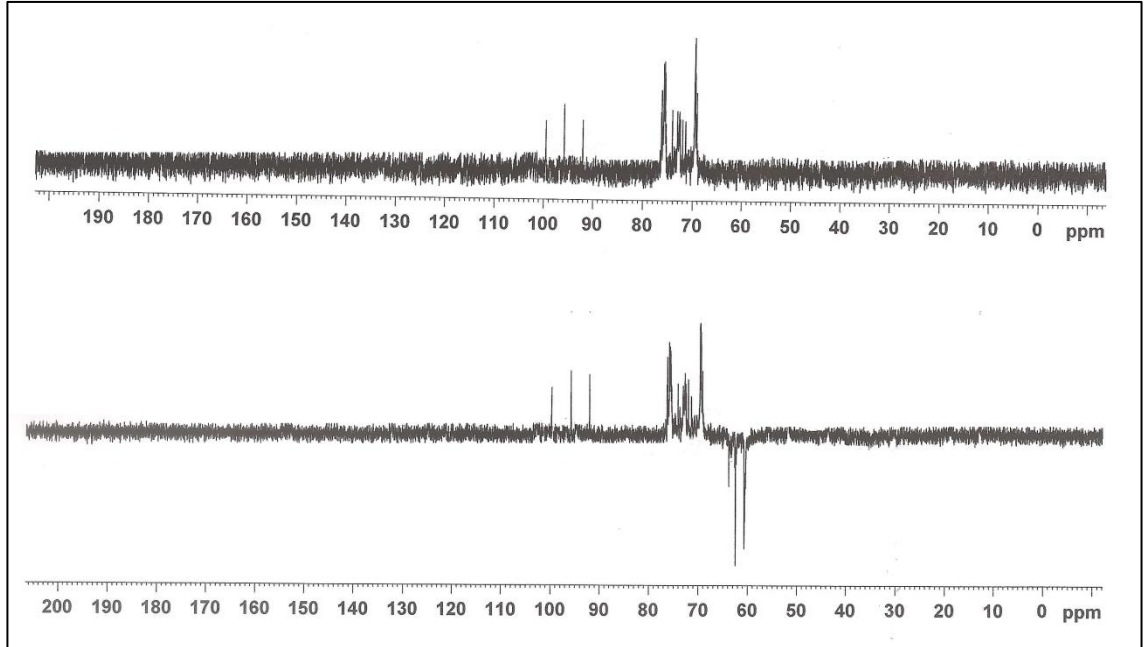
Şekil 3.6. OE-2 (trisakkaritin)' in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (D_2O)

OE-2' in $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.7.) tüm karbon sinyalleri $\delta=60,0-102,0$ ppm aralığında gözlemlenmiştir. Üç monosakkarit birimine ait 6 nolu C sinyalleri $\delta=62,5$ ppm, $\delta=62,6$ ppm ve $\delta=63,8$ ppm'de gözlemlenmiştir. Daha aşağı alandaki $\delta=99,6$ ppm, $\delta=95,9$ ppm ve $\delta=92,0$ ppm'de ki C sinyalleri ise anomeric karbonlara ait sinyaller olup, molekülün bir trisakkarit olduğunu göstermektedir. Diğer C sinyalleri ise trisakkarit yapısına uygun olarak $\delta=65,0-80,0$ ppm aralığında rezonans olmuşlardır.

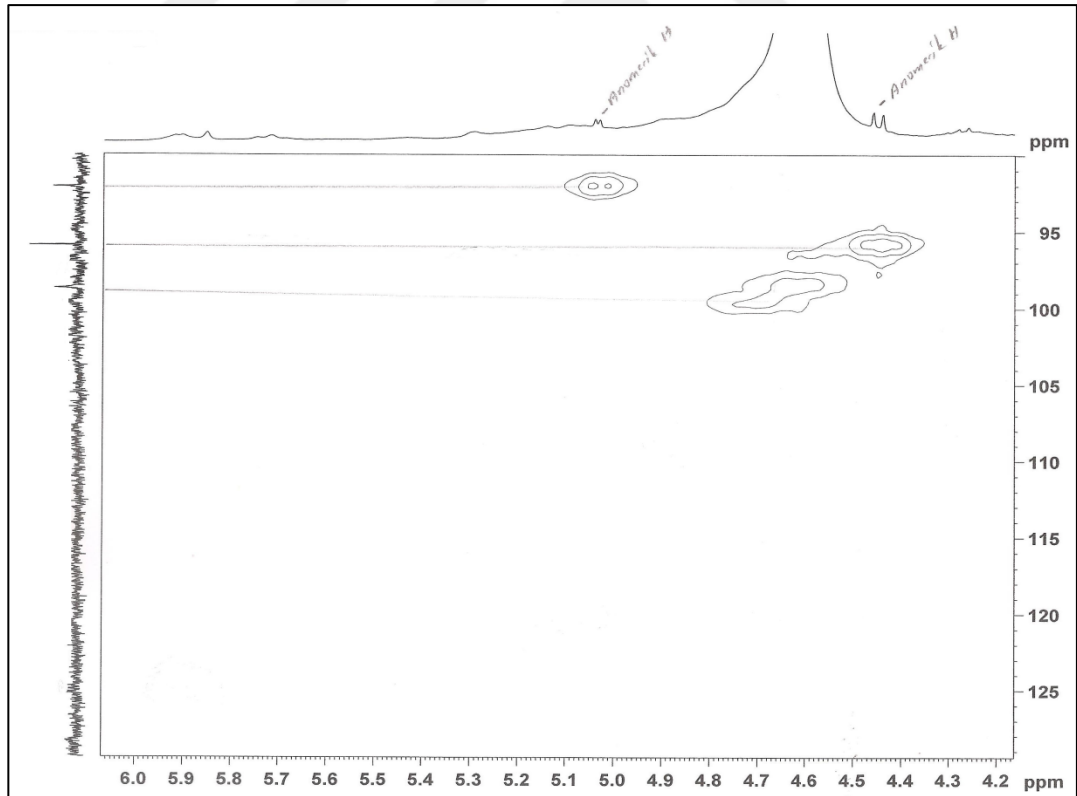
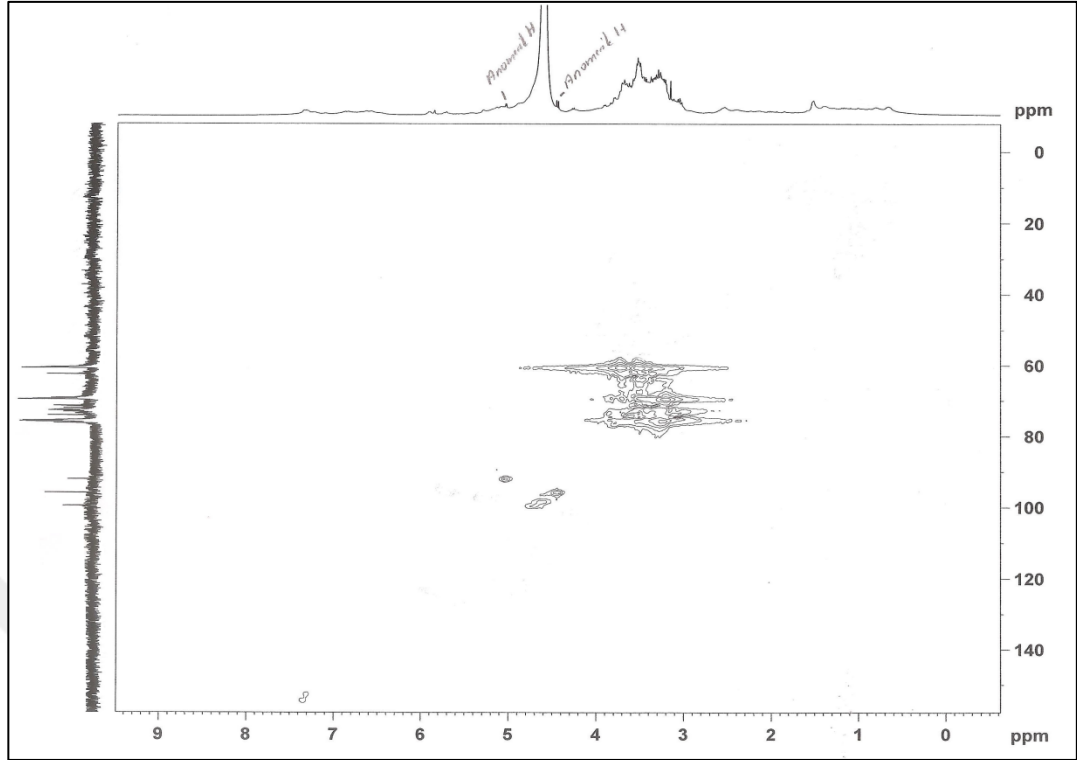


Şekil 3.7. OE-2 (trisakkaritin)' in ^{13}C -NMR spektrumu (D_2O)

OE-2 molekülünün DEPT135 ve DEPT90 (Şekil 3.8), HMQC (Şekil 3.9) spektrumları da molekülün bir trisakkarit olduğunu doğrulamaktadır. Ancak bu spektral verilere rağmen spektrumların çok iyi alınmamasından dolayı veriler tam olarak analiz edilememiş ve monosakkaritlerin yapısı ve birbirine bağlanma düzenleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

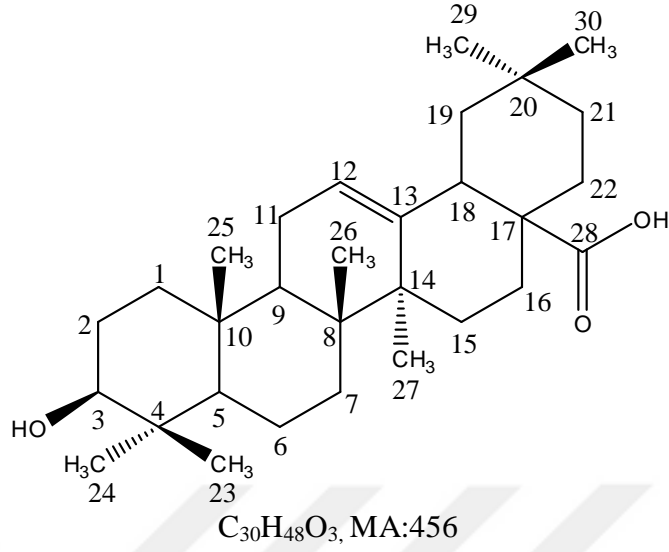


Şekil 3.8. OE-2 (trisakkaritin)' in DEPT135 ve DEPT90 ^{13}C -NMR spektrumları (D_2O)



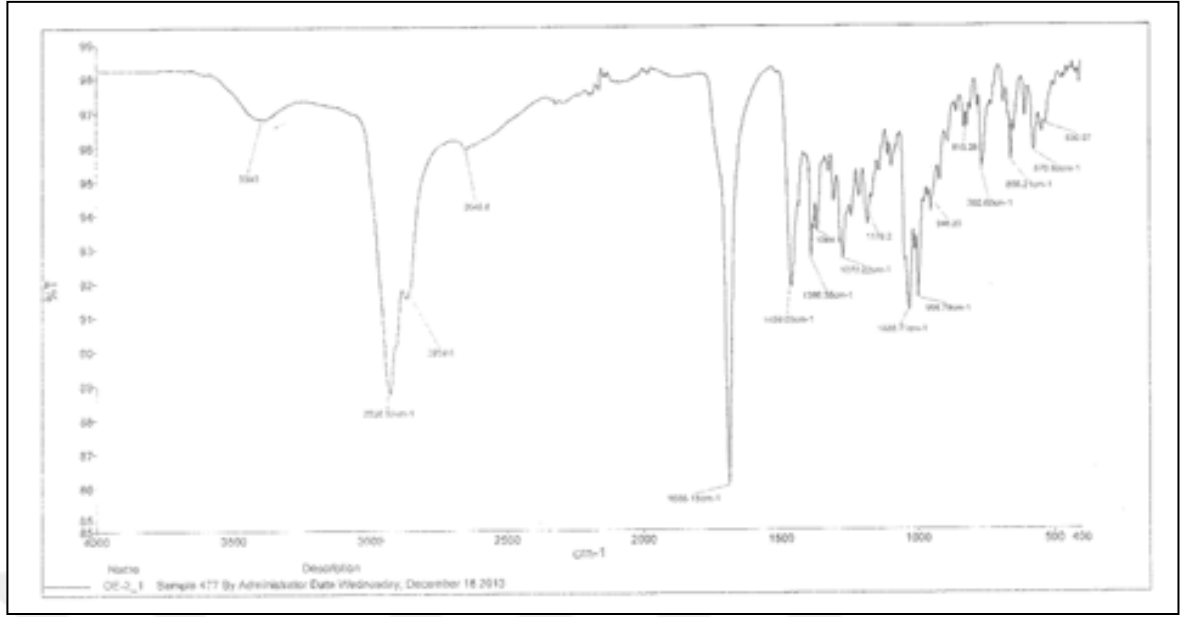
Şekil 3.9. OE-2 (trisakkaritin)' in HMQC spektrumu (D₂O)

3.1.3. OE-3 (Oleanolic asit)



OE-3 molekülü beyaz amorf katı görünümünde bir madde halinde saflaştırıldı. Maddenin erime noktası 288-300 °C olarak belirlendi. Bu madde İTK'da görünür ışıkta, UV₂₅₄ nm ve UV₃₆₆ nm de renksiz, H₂SO₄-vanilin (%1) reaktifi püskürtüldüğünde ve 105 °C da biraz bekletildiğinde ise pembe-mor bir renk vermektedir. Reaktif püskürtüldükten sonra ve ısıtıldığında oluşan pembe-mor renk bu maddenin steroid veya terpenik yapılu bir madde olduğunu göstermektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Bladt, 1996).

OE-3 molekülünün ATR tekniği ile alınmış FT-IR spektrumunda (Şekil 3.10.) 3393 cm⁻¹ dalga boyu civarında gözlenen zayıf ve yaygın absorbans molekülde -OH ve -COOH grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden ve ark., 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990). 2950-2800 cm⁻¹ dalga boyu aralığındaki C-H titreşim bantları molekülde alifatik grupların olduğunu göstermektedir. Bunların yanı sıra 1686, 1459 ve 1028 cm⁻¹ dalga boylarında gözlenen absorbans bantları da sırasıyla, C=O, C=C ve C-O bağlarının varlığına işaret etmektedir (Fessenden ve Fessenden, 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990).

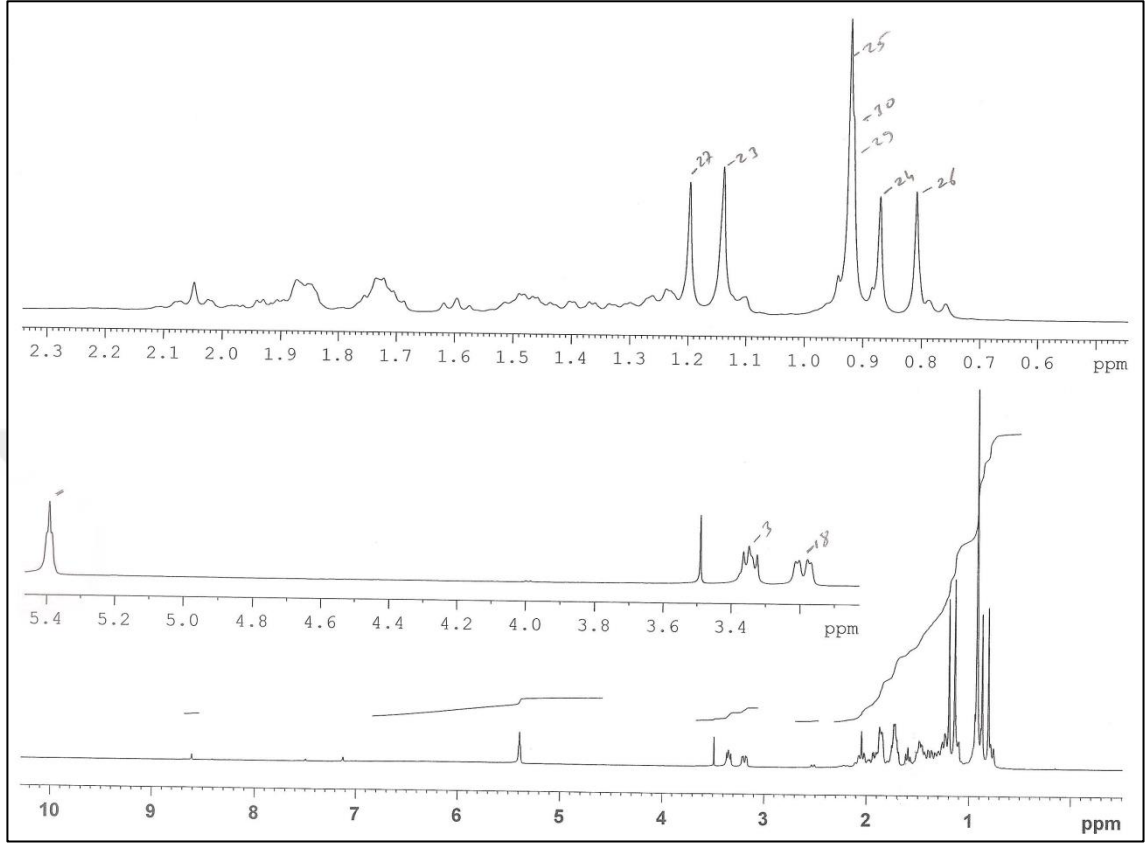


Şekil 3.10. OE-3 (oleanolic asit)' ün IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

IR: ν_{\max} : 3393 cm^{-1} (-OH ve COOH titreşim bandı), 2950-2800 cm^{-1} aralığı (alifatik C-H titreşim bantları), 1686 cm^{-1} (C=O titreşim bandı), 1459 cm^{-1} (C=C titreşim bandı), 1029 cm^{-1} (C-O gerilme bandı).

Triterpenler ve steroidler H_2SO_4 -vanilin (%1) reaktifi ile aynı pembe-mor renkleri verirler. Steroidler ile triterpenlerin farkı $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan kolayca anlaşılabilir. Triterpenlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda yukarı alanda $-\text{CH}_3$ hidrojenlerine ait daha fazla sayıda s gözlenirken, steroidlerde metil gruplarına ait s sinyal sayısı daha azdır. OE-3 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.11.) incelendiğinde CH_3 hidrojenlerine ait yedi adet kuvvetli s sinyal gözlenmiştir. Bu sinyaller bileşiğin bir triterpen olduğunu göstermektedir. OE-3 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 3.11.), $^{13}\text{C-NMR}$ (Şekil 3.12.) spektrumlarındaki veriler yorumlanarak molekülün kimyasal yapısının yaygın bir triterpenik asit olan oleanolic asit olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde yaygın olan diğer bir triterpen asit ise ursolic asit olup kimyasal yapısı oleanolic asite çok benzemektedir. Ursolic asit molekülünde oleanolic asit molekülündeki 20 nolu C atomuna bağlı olan $-\text{CH}_3$ grubu, 19 nolu C atomuna bağlanmıştır. Bu iki molekül arasındaki fark $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda $\delta=0-1,5$ ppm aralığında gözlenen $-\text{CH}_3$ grubuna ait sinyaller ile kolayca anlaşılabilir. Oleanolic asit molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda bu bölgede 7 singlet gözlenmesi gerekirken, ursolic asit molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda bu bölgede 5 s sinyal gözlenmelidir. Bu bilgilerden yola çıkılarak OE-3 molekülünün kimyasal yapısı oleanolic asit olarak

tespit edilmiştir (Saimaru ve ark., 2007; Pollier ve Goossens, 2012; Kotan ve ark., 2014).

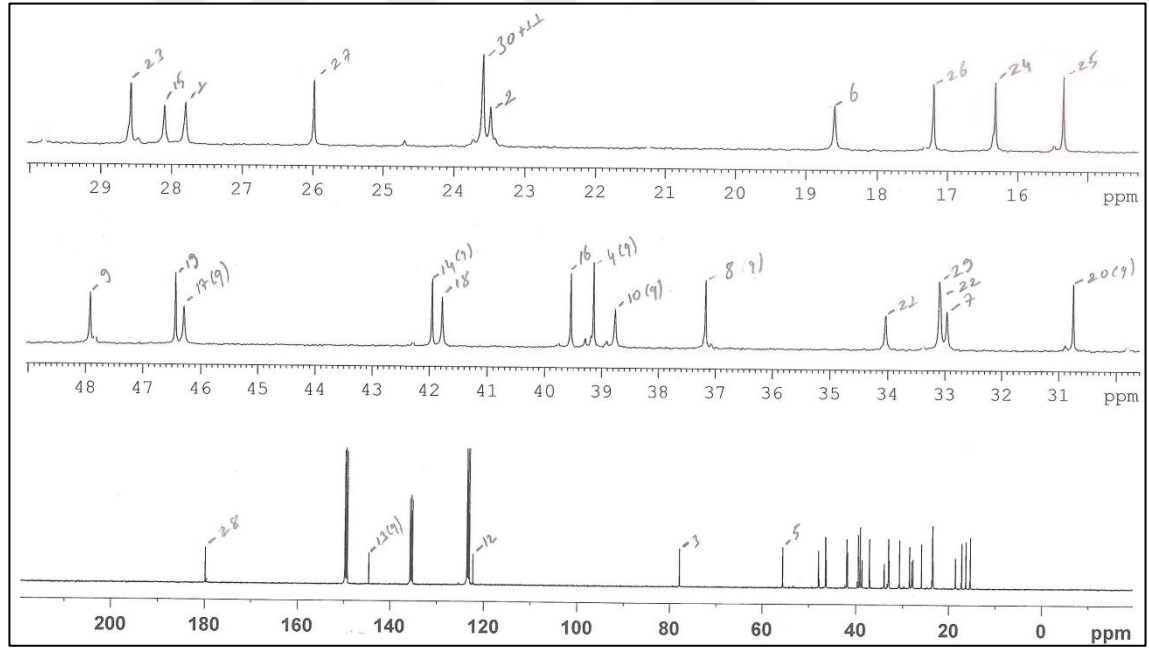


Şekil 3.11. OE-3 (oleanolic asit)' ün ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)

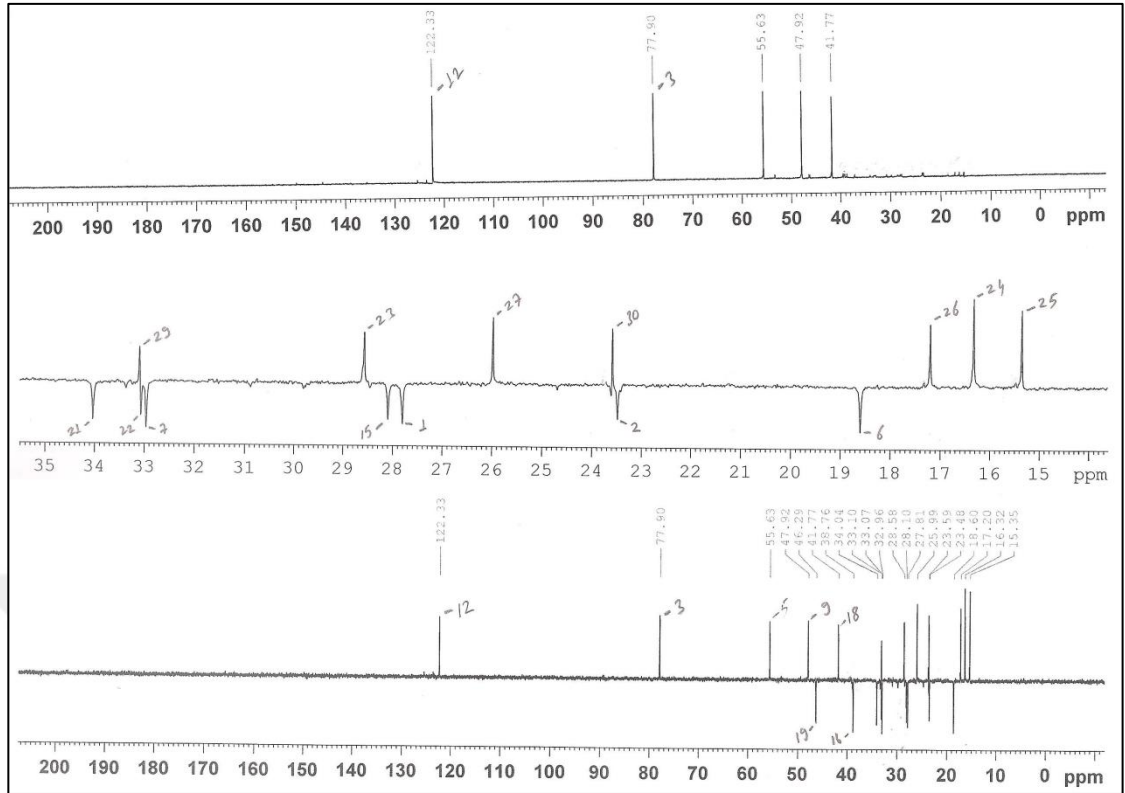
Oleanolic asitin (OE-3) ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.10) 23, 24, 25, 26, 27, 29 ve 30 numaralı –CH₃ metil hidrojenleri beklenildiği gibi $\delta=0,74$ ppm, $\delta=0,77$ ppm, $\delta=0,90$ ppm, $\delta=0,91$ ppm, $\delta=0,93$ ppm, $\delta=0,99$ ppm ve $\delta=1,13$ ppm'de s sinyal vererek rezonans olmuşlardır. Oksijen atomuna komşu olan H-3, komşu H-2 ve H-4 hidrojenleri ile etkileşerek $\delta=3,22$ ppm de multipler sinyal vermiştir. Olefinik hidrojen (H-12) ise $\delta=5,28$ ppm de geniş bir singletimsi sinyal vermiştir (Balcı, 2000; Erdik, 1998).

OE-3 metabolitinin ¹³C-NMR spektrumu (Şekil 3.12.) incelendiğinde bileşiğin bir triterpen olduğu açıkça görülmektedir. Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumunda ikisi olefinik, 25 adet alifatik ve birisi de karbonil karbonu bölgesinde olmak üzere toplam 28 adet karbon sinyali gözlenmiştir. Spektrumdan görüleceği üzere $\delta=183,2$ ppm'de gözlenen sinyal karboksilli asit karbonil karbonuna (C-28) ait olup' molekülün bir karboksilli asit olduğuna doğrulamaktadır. Olefinik karbonlardan kuarterner C-13 karbonu $\delta=143,4$

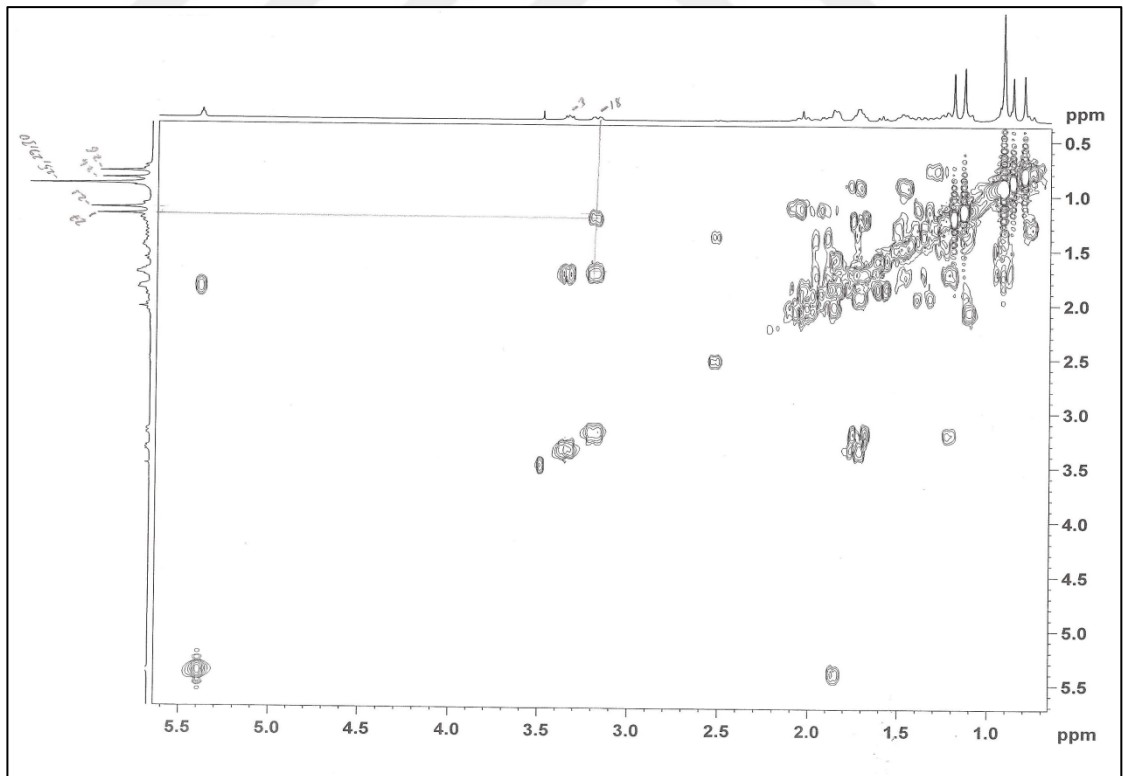
ppm'de rezonans olurken, diğer olefinik metin karbonu (C-12) $\delta=122,6$ ppm de rezonans olmuştur. C-3 karbonu ise bağlı olan oksijen atomunun indüktif etkisinden dolayı alifatik bölgede, daha aşağı alanda, $\delta=79,0$ ppm'de sinyal vermiştir. Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde alifatik bölgede çok fazla sayıda karbon sinyali mevcut olduğu görülmektedir. Bileşiğin kimyasal yapısının oleanolic asit olduğu ayrıca yayınlanmış spektral verilerle de doğrulanmıştır (Silva et al., 2008; Moghaddam et al., 2006). Yapılan literatür taramasında da zeytin yaprağı üzerinde yapılan önceki çalışmalarda zeytin ağacı yapraklarının oleanolic asiti içerdiği rapor edilmiştir (Somova ve ark., 2003, 2004; Guinda ve ark., 2004; Moghaddam et al., 2006; Reyes ve ark., 2006; Sato ve ark., 2007; Silva et al., 2008; Stiti ve Hartmann, 2012; Peragon, 2013). Bileşiğin kimyasal yapısı ayrıca DEPT135 ve DEPT90 (Şekil 3.13) ^1H , ^1H -COSY (Şekil 3.14), HMQC (Şekil 3.15) ve HMBC (Şekil 3.16) spektral verileri ile de doğrulanmıştır.



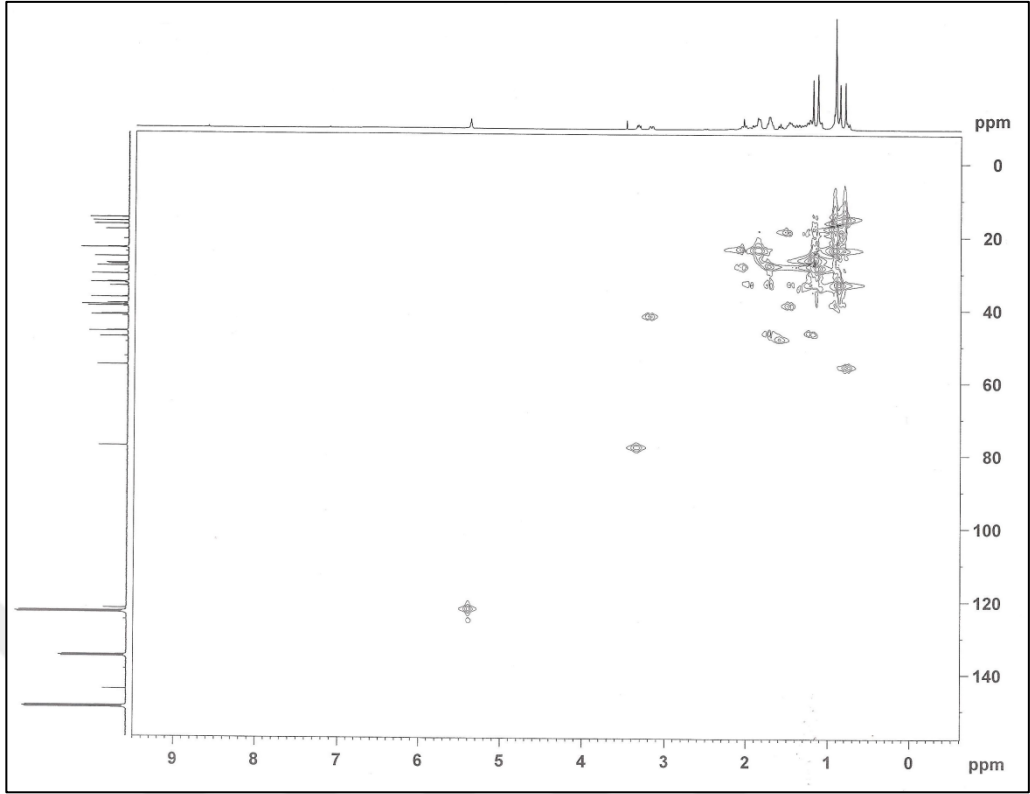
Şekil 3.12. OE-3 (oleanolic asit)' ün ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



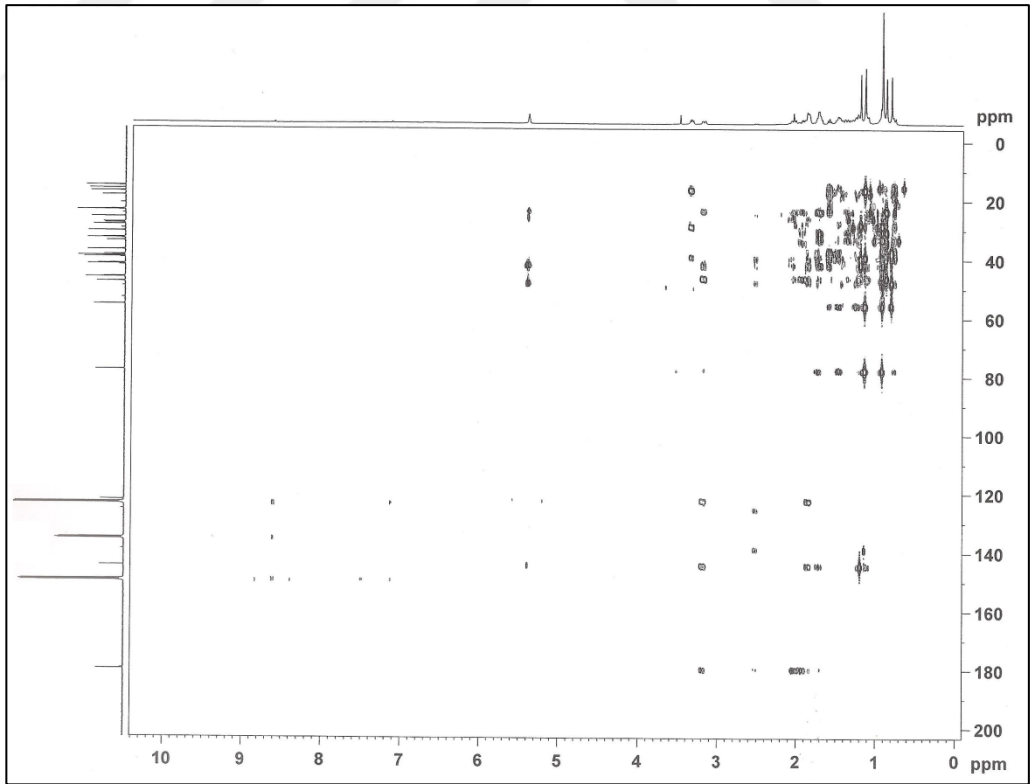
Şekil 3.13. OE-3 (oleanolic asit)' ün APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



Şekil 3.14. OE-3 (oleanolic asit)' in ^1H , ^1H -COSY spektrumu (CDCl_3)

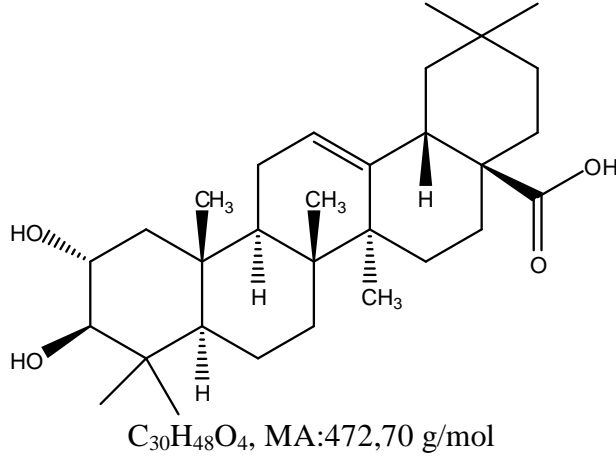


Şekil 3.15. OE-3 (oleanolic asit)' ün HMQC spektrumu (CDCl₃)



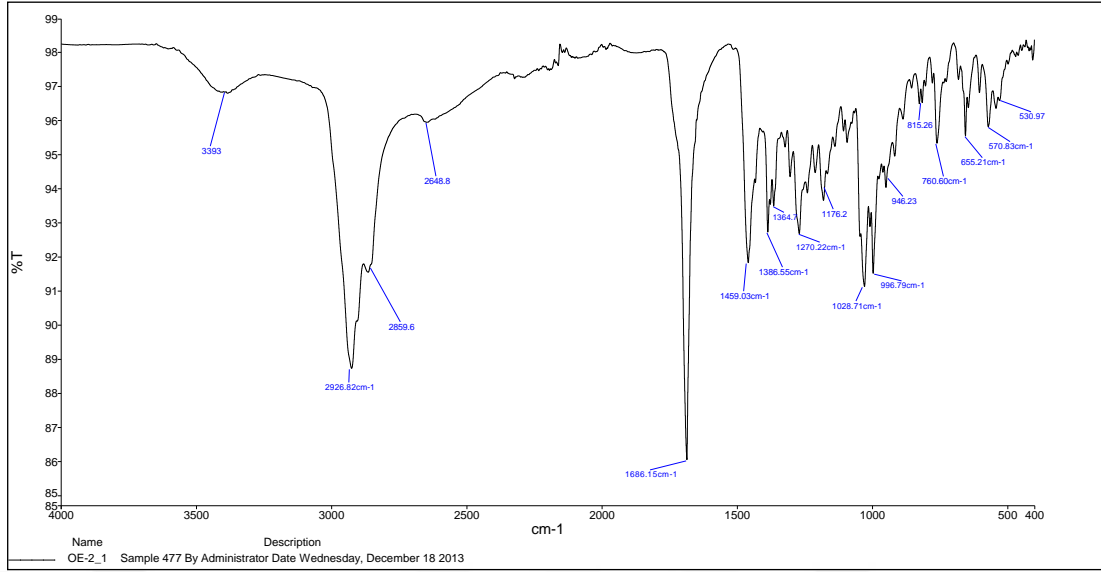
Şekil 3.16. OE-3 (oleanolic asit)' ün HMBC spektrumu (CDCl₃)

3.1.4. OE-4 (Maslinic asit)



OE-4 molekülü beyaz amorf katı görünümünde bir madde olarak saflaştırıldı. Bu madde İTK'da görünür ışıkta, UV_{254} nm ve UV_{366} nm'de renksiz, H_2SO_4 -vanilin (%1) reaktifi püskürtüldüğünde ise pembe-mor bir renk vermektedir. Reaktif püskürtüldükten ve ısıtıldıktan sonra pembe-mor renk vermesi bu maddenin steroid veya terpenik yapılu bir madde olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Bladt, 1996).

OE-4 molekülünün ATR tekniği ile alınmış FT-IR spektrumunda (Şekil 3.17) 3383 cm^{-1} dalga boyu civarında gözlenen kuvvetli ve yaygın absorbands bandı molekülde $-OH$ grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden ve Fessenden, 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990). Moleküldeki fazla sayıdaki C-H titreşim bantları $2925-2850\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında gözlenmiştir. Diğer taraftan, 1687 cm^{-1} de gözlenen güçlü absorbands bandı molekülde $C=O$ grubunun olduğuna işaret etmekte olup moleküldeki $-COOH$ grubundan kaynaklanmaktadır. Moleküldeki $C=C$ ve $C-O$ bağlarına ait absorbands bantları ise 1455 ve 1049 cm^{-1} dalga boylarında gözlenmiştir (Fessenden ve Fessenden, 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990).

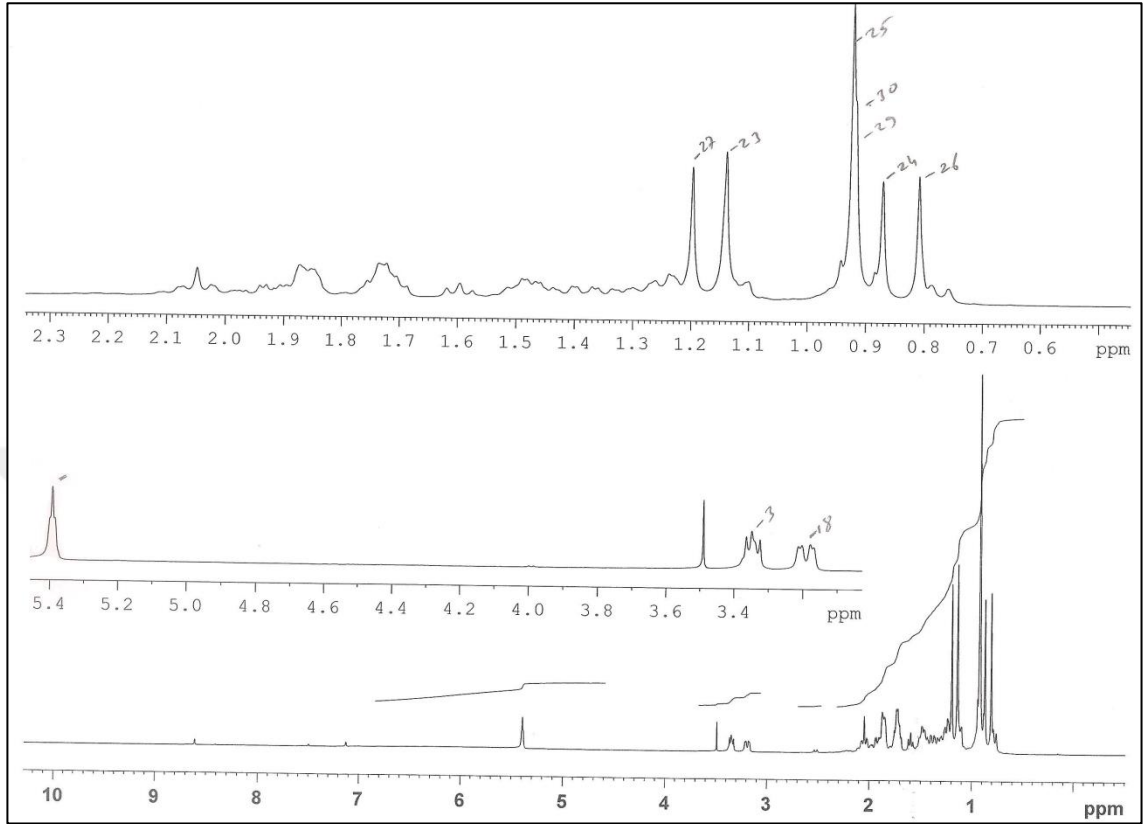


Şekil 3.17. OE-4 (maslinik asit)' ün IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

IR: ν_{\max} : 3384 cm^{-1} (-OH ve COOH titreşim bandı), 2926-2850 cm^{-1} aralığı (alifatik C-H titreşim bantları), 1688 cm^{-1} (C=O titreşim bandı), 1456 cm^{-1} (C=C titreşim bandı), 1049 cm^{-1} (C-O gerilme bandı).

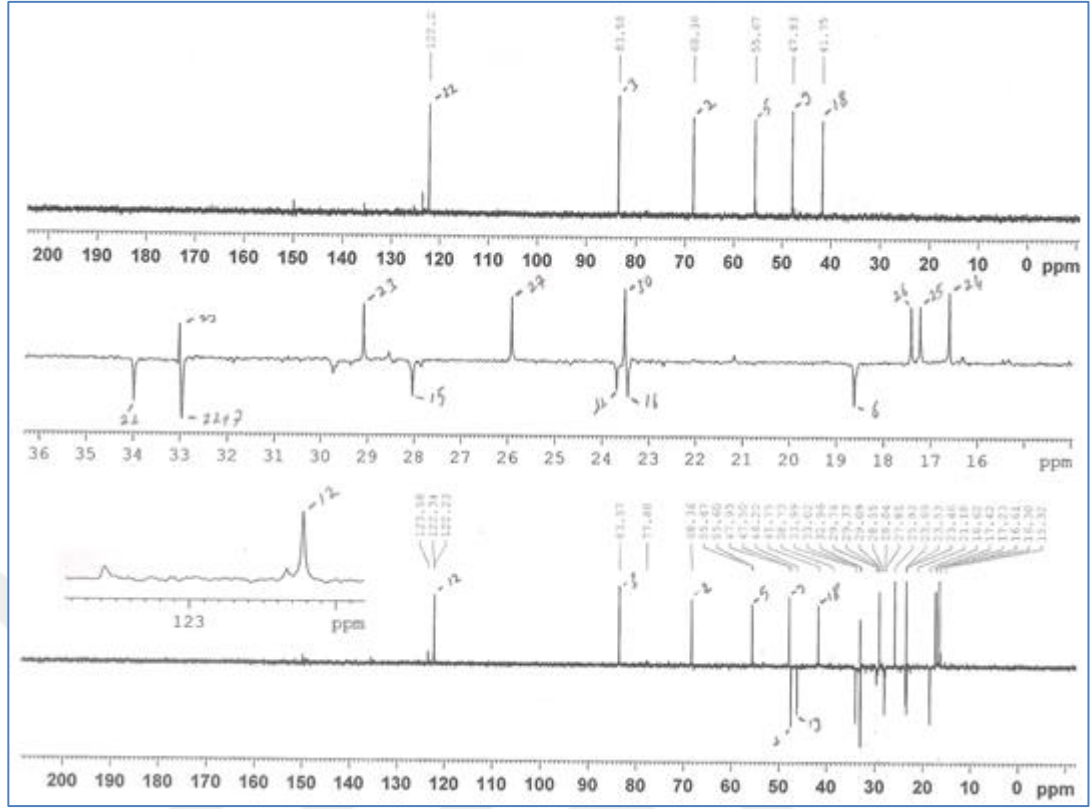
Triterpenler ve steroidlere ait lekeler İTK'da görünür ışıkta ve UV_{254} nm'de renksiz iken H_2SO_4 -vanilin (%1) reaktifi ile aynı pembe-mor renk verirler. Molekülün steroid mi yoksa triterpen mi olduğu $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan kolayca anlaşılabilir. Triterpenlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda yukarı alanda $-\text{CH}_3$ hidrojenlerine ait daha fazla sayıda *s* gözlenirken steroidlerde metil gruplarına ait *s* sinyal sayısı daha azdır. OE-4 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (Şekil 3.18) incelendiğinde CH_3 hidrojenlerine ait yedi adet kuvvetli *s* sinyal gözükmemektedir. Bu sinyaller, bileşiğin bir triterpen olduğuna işaret etmektedir. OE-4 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 3.18), $^{13}\text{C-NMR}$ (Şekil 3.19) spektrumlarındaki veriler yorumlanarak molekülün kimyasal yapısının zeytin yaprağı ve meyveleri için karakteristik triterpen olan maslinik asit olduğu tespit edilmiştir. Bu molekülün oleanolik asitten tek farkı 2 nolu karbondan *trans* pozisyonda bir $-\text{OH}$ grubu taşımasıdır. Bu nedenle NMR spektrumları oleanolik asitin NMR spektrumlarına benzerdir. Moleküldeki $-\text{CH}_3$ sinyalleri $\delta=0,84$ ppm (H-26), $\delta=0,88$ ppm (H-24), $\delta=0,90$ ppm (H-29), $\delta=0,91$ ppm (H-30), $\delta=1,16$ ppm (H-23) ve $\delta=1,16$ ppm (H-27) de gözlenmiştir. H-2 $\delta=3,98$ ppm'de beklenildiği gibi *dt* sinyali ($J_1=10,32$ Hz ve $10,22$ Hz, $J_2=4,32$ Hz ve $4,36$ Hz) vererek rezonans olmuştur. H-3 sinyali $\delta=3,19$ ppm'de *dd* ($J_1=13,68$ Hz ve $J_2=4,24$ Hz) olarak gözlemlenirken, $\delta=3,28$ ppm'de gözlenen *d* sinyal

($J=9,36$ Hz) H-18'e aittir. Olefinik H atomu ise (H-12) $\delta=5,37$ ppm de *m* sinyal vererek rezonans olmuştur.



Şekil 3.18. OE-4 (maslinik asit)' ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3)

OE-4 molekülünün $^{13}\text{C-NMR}$ spektral verileri (Şekil 3.19) de maslinik asit yapısı ile uyumlu olup sinyallerin büyük bir çoğunluğu yukarı alanda $\delta=10-50$ ppm arasında gözlemlenmiştir. Spektrumda toplam 29 adet C sinyali gözlemlenmiş olup bunların 23 adeti $\delta=10-50$ ppm arasında gözlemlenmiştir. Bileşik 30 C atomu içermesine karşın 29 C rezonansı gözlemlenmesi iki C sinyalinin aynı yerde rezonans olmasından kaynaklanmaktadır. $\delta=39,6$ ppm de gözlenen nispeten daha şiddetli C sinyali C-8 ve C-4 atomlarına ait sinyallerdir. C-2 ve C-3 rezonans sinyalleri O atomunun indüktif etkisinden dolayı sırasıyla $\delta=68,4$ ve $\delta=83,6$ ppm'de gözlemlenmiştir. Olefinik C atomları C-12 ve C-13 ise sırasıyla $\delta=122,2$ ppm ve $\delta=144,6$ ppm'de rezonans olmuştur. Moleküldeki karboksilli asit karbonil karbonuna (C-28) ait rezonans sinyali ise $\delta=179,9$ ppm'de tespit edilmiştir.

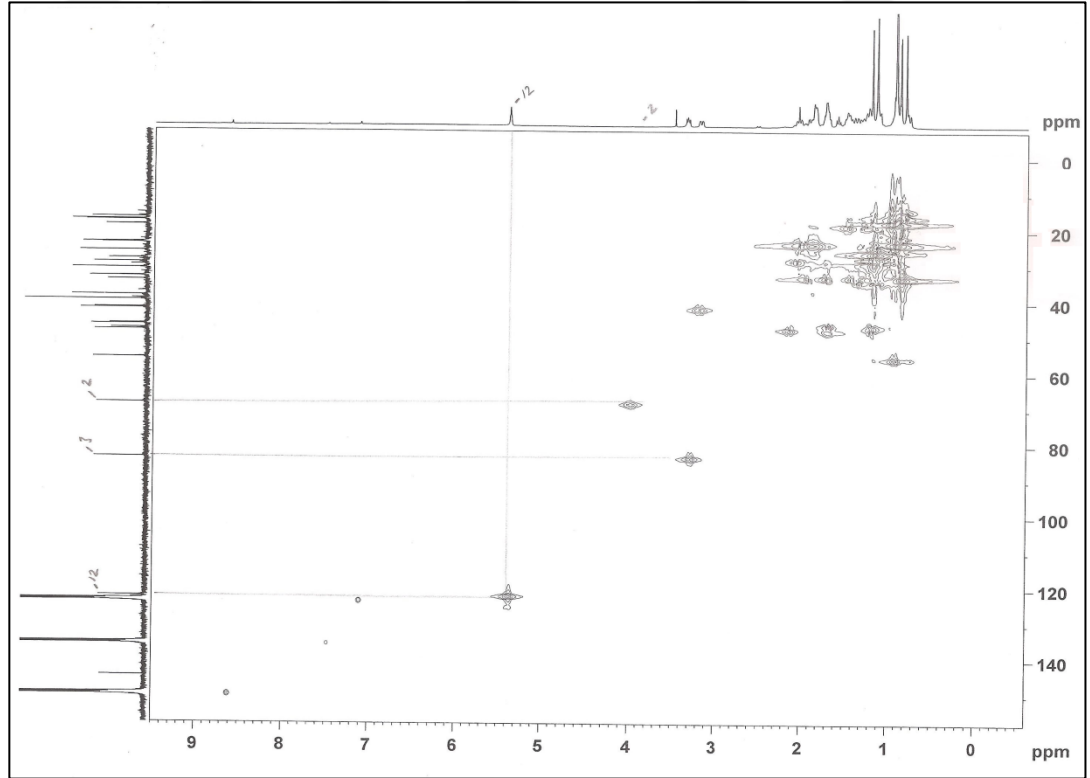


Şekil 3.20. OE-4 (maslinik asit)' ün APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)

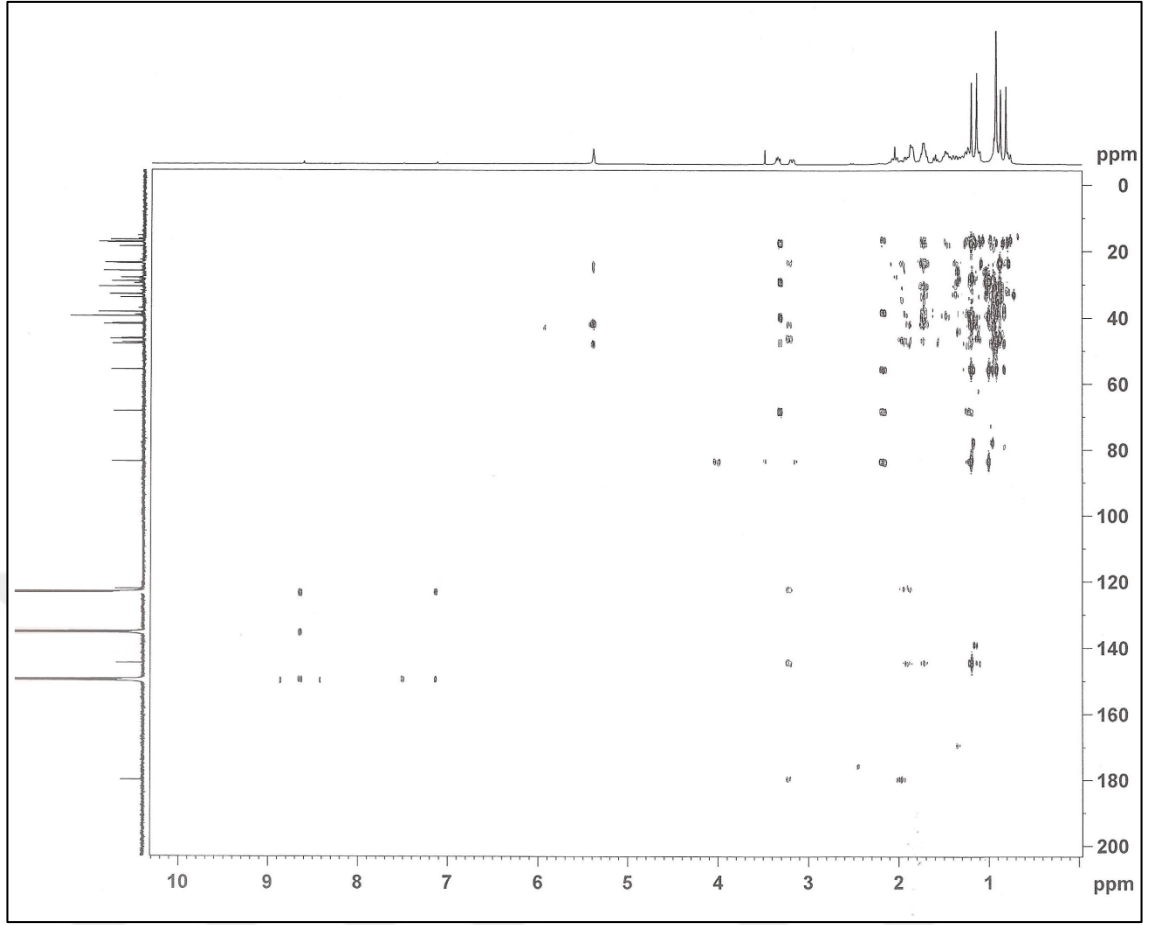
OE-4 molekülünün ^1H , ^1H -COSY (Şekil 3.21), HMQC (Şekil 3.22) ve HMBC spektrumundaki (Şekil 3.23) korelasyonlarda OE-4 molekülün kimyasal yapısının zeytin için karakteristik bir triterpen olan maslinik asit olduğunu doğrulamaktadır. OE-4 molekülünün kimyasal yapısının maslinik asit olduğu literatürde daha önce yayınlanmış spektral veriler ile de doğrulanmıştır (Garcia-Granados ve ark., 1998; Saimaru ve ark., 2007; Reyes-Zurita ve ark., 2009; Khlif ve ark., 2012; Stiti ve Hartmann, 2012; Peragon, 2013).



Şekil 3.21. OE-4 (maslinik asit)' ün ^1H , ^1H -COSY spektrumu (CDCl_3)

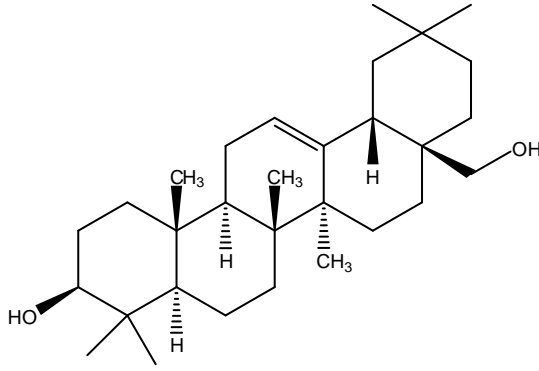


Şekil 3.22. OE-4 (maslinik asit)' ün HMQC spektrumu (CDCl_3)

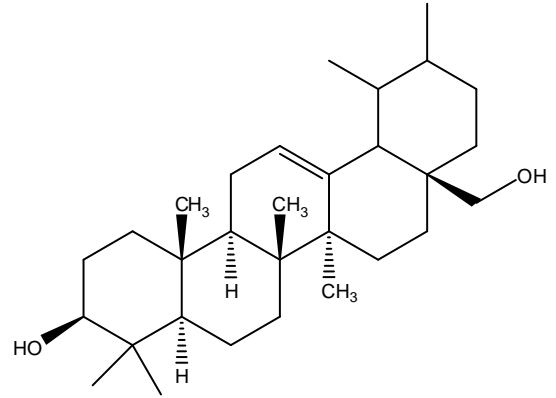


Şekil 3.23. OE-4 (maslinik asit)' ün HMBC spektrumu (CDCl₃)

3.1.5. OE-5 (Eritrodiol ve Uvaol Karışımı)



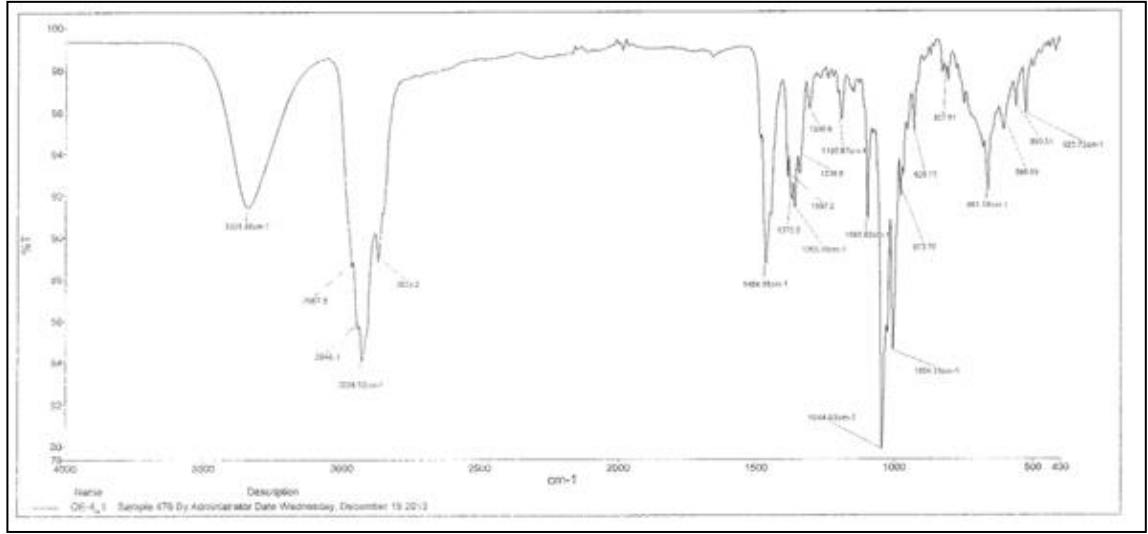
Eritrodiol (erythrodiol), $C_{30}H_{50}O_2$,
MA:442,72 g/mol



Uvaol, $C_{30}H_{50}O_2$, MA: 442,72 g/mol

OE-5 molekülü beyaz amorf katı görünümünde bir madde olarak saflaştırıldı. Bu madde İTK'da görünür ışıkta, UV_{254} nm ve UV_{366} nm de renksiz, H_2SO_4 -vanilin (%1) reaktifi püskürtüldüğünde ise pembe-mor bir renk vermektedir. Reaktif püskürtüldükten sonra ve ısıtıldığında oluşan pembe-mor renk bu maddenin steroid veya terpenik yapılu bir madde olduğunu göstermektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Bladt, 1996).

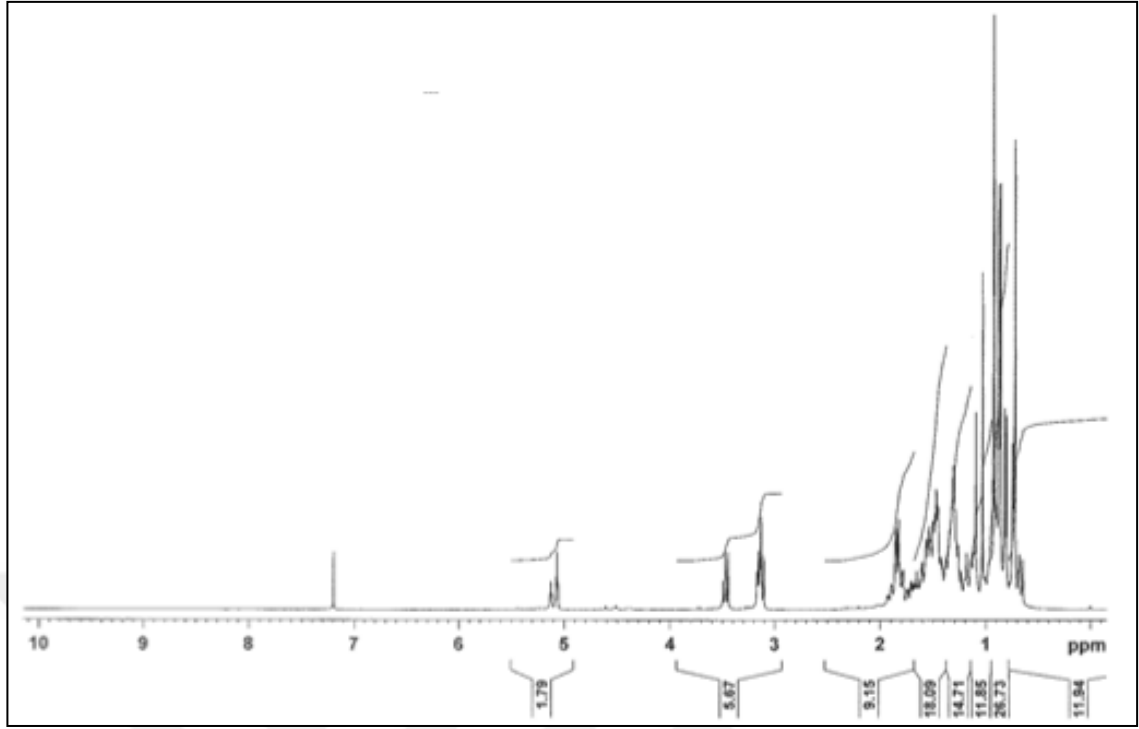
OE-5 molekülünün ATR tekniği ile alınmış FT-IR spektrumunda (Şekil 3.24) 3339 cm^{-1} dalga boyu civarında gözlenen kuvvetli ve yaygın absorbands bandı molekülde $-OH$ grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden ve Fessenden, 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990). Diğer maddelerin (OE-3 ve OE-4) FTIR spektrumuna göre bu absorbands bandının daha şiddetli olarak ölçülmesi molekülde daha fazla sayıda $-OH$ grubunun olduğunun bir delilidir. $2970-2870\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki C-H titreşim bantları molekülde alifatik grupların olduğunu göstermektedir. Bunların yanısıra 1464 ve 1044 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen absorbands bantları da sırasıyla, C=C ve C-O bağlarının varlığına işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 1990; Erdik, 1998; Solomons, 1990). Spektrumda $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında kuvvetli bir absorbands bandının gözlenmemesi molekülün karbonil grubu taşımadığına işaret etmektedir.



Şekil 3.24. OE-5 metabolitinin IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

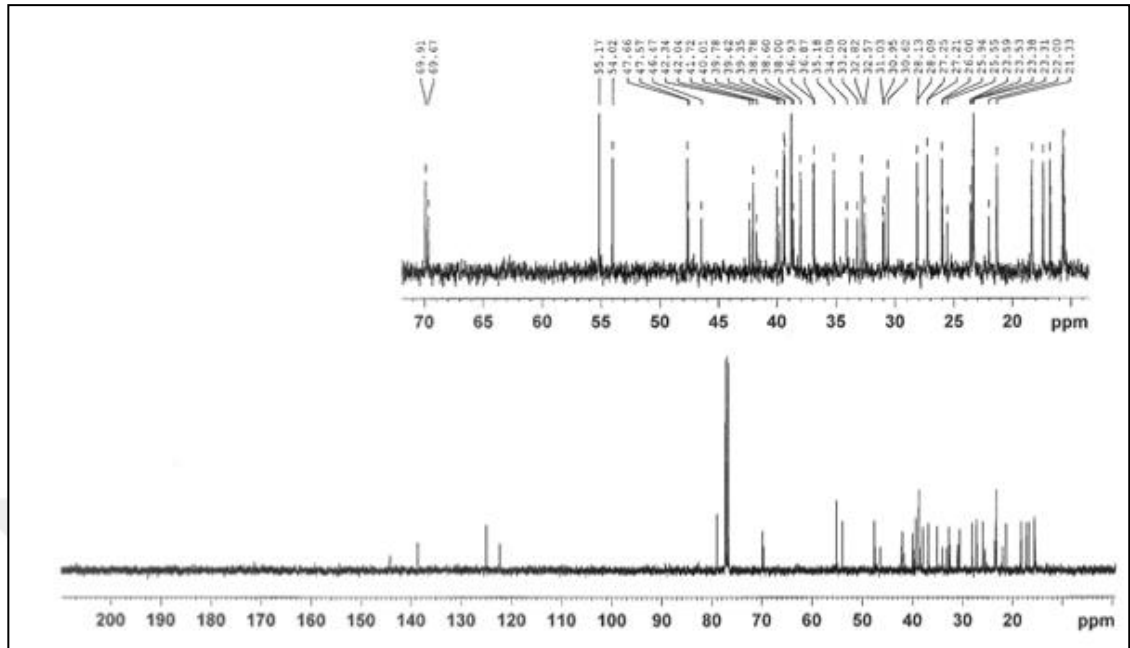
IR: ν_{\max} : 3339 cm^{-1} (-OH titreşim bandı), 2970-2850 cm^{-1} aralığı (alifatik C-H titreşim bantları), 1464 cm^{-1} (C=C titreşim bandı), 1044 cm^{-1} (C-O gerilme bandı).

Triterpenler ve steroidler H_2SO_4 -vanilin (%1) reaktifi ile aynı pembe-mor renkleri verirler. Daha önce de belirtildiği gibi molekülün steroid yapılı mı yoksa triterpen yapılı mı olduğu $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan anlaşılabilir. Triterpenlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda yukarı alanda $-\text{CH}_3$ hidrojenlerine ait daha fazla sayıda s gözlenirken steroidlerde metil gruplarına ait s sinyal sayısı daha azdır. OE-5 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (**Şekil 3.25**) incelendiğinde $-\text{CH}_3$ hidrojenlerine ait beş adet s sinyal gözlenmiştir. Bu sinyaller bileşiğin bir triterpen olduğunu göstermektedir (Saimaru ve ark., 2007; Pollier ve Goossens, 2012; Kotan ve ark., 2014). OE-5 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda $\delta=3,16$ - $3,55$ ppm aralığında gözlenen ve 6 hidrojene ait olduğu belirlenen sinyaller molekülde fazla sayıda $-\text{OH}$ grubunun olduğunu doğrulamaktadır. Moleküldeki iki adet olefinik hidrojenlere ait sinyaller ise $\delta=5,13$ ppm ve $\delta=5,18$ ppm'de gözlenmiştir. Bu sinyaller molekülün iki adet olefinik bağ içerdiğini göstermektedir.

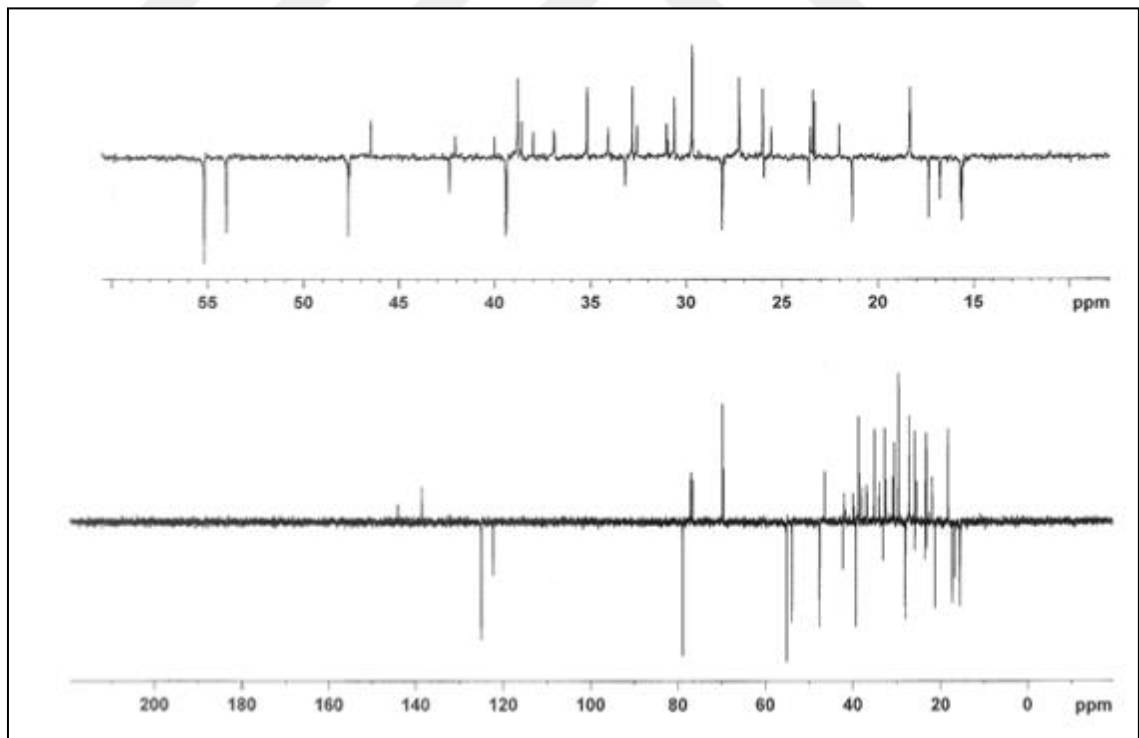


Şekil 3.25. OE-5 (eritriol+uvaol)'in ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

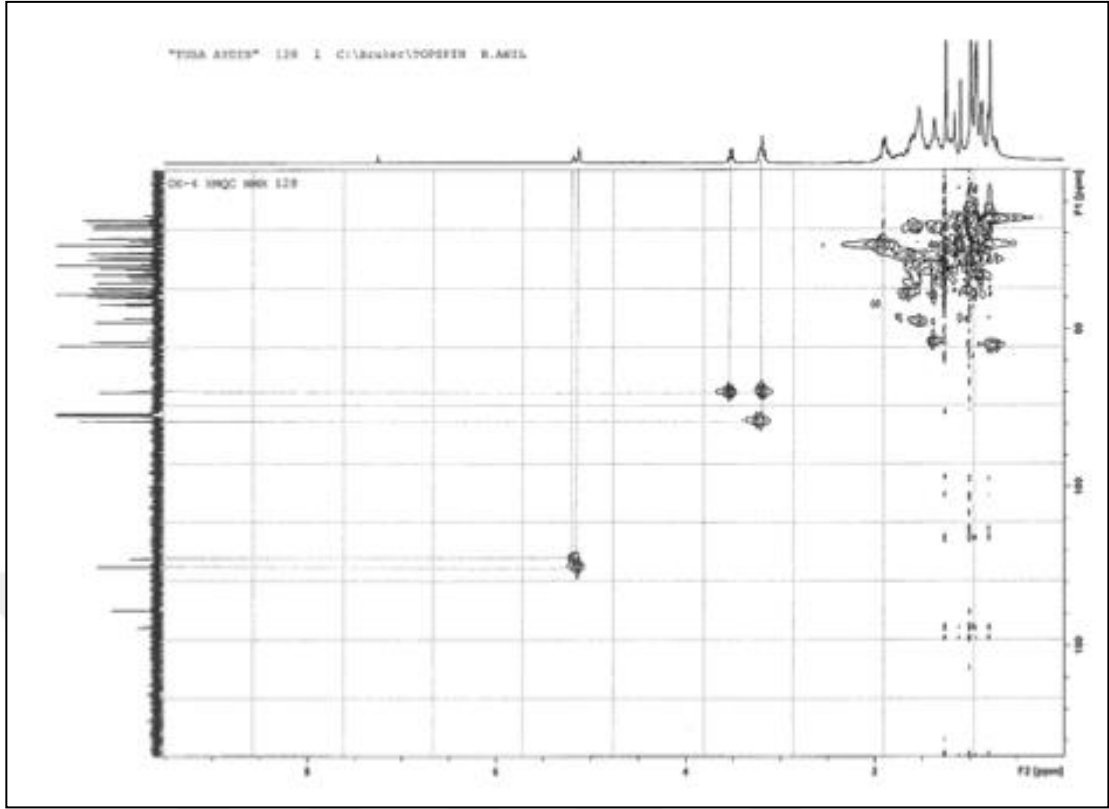
OE-5 metabolitinin ^{13}C -NMR spektrumu (**Şekil 3.26**) incelendiğinde bileşiğin bir triterpen olduğu açıkça görülmektedir. Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda olefinik bölgede gözlenen 4 adet C sinyali molekülün iki adet çift bağ içerdiğini doğrulamaktadır. $\delta=70$ - 80 ppm arasında toplam üç adet c sinyali gözlenmiş olup bu sinyaller C-O grubuna ait sinyallerdir. Bileşiğin APT ^{13}C -NMR spektrumu (**Şekil 3.27**) inceleğinde bu sinyallerden $\delta=79,0$ ppm deki sinyal negatif sinyal, $\delta=69,9$ ppm ve $\delta=69,7$ ppm deki sinyaller ise pozitif sinyaller olarak gözlenmiştir. Negatif C sinyali –CH-OH grubuna aitken pozitif sinyaller ise ya –CH₂-OH ya da kuarterner C atomlarına ait sinyallerdir (Balcı, 2008). Spektrumda alifatik bölgede çok fazla sayıda C sinyali gözlenmiştir. Bu fazla sayıdaki sinyallerin yorumlanması sonucu bu maddenin kimyasal yapı olarak birbirine çok benzeyen eritriol ve uvaol maddelerinin karışımı olduğu anlaşılmıştır. İki molekül arasındaki tek fark, bir –CH₃ grubunun pozisyonunun farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Her iki molekül de birbirinin izomeri olup aynı kimyasal formül ve mol kütesine sahip moleküllerdir. Bu nedenle polariteleri birbirine yakın olup İTK'da ve kolon kromatografisinde birbirinden ayıramamıştır. OE-5 molekülün ^1H , ^1H -COSY, HMQC ve HMBC spektrumları da önerilen yapılar ile uyumlu olup sırasıyla **Şekil 3.28**, **Şekil 3.29** ve **Şekil 3.30** da verilmiştir.



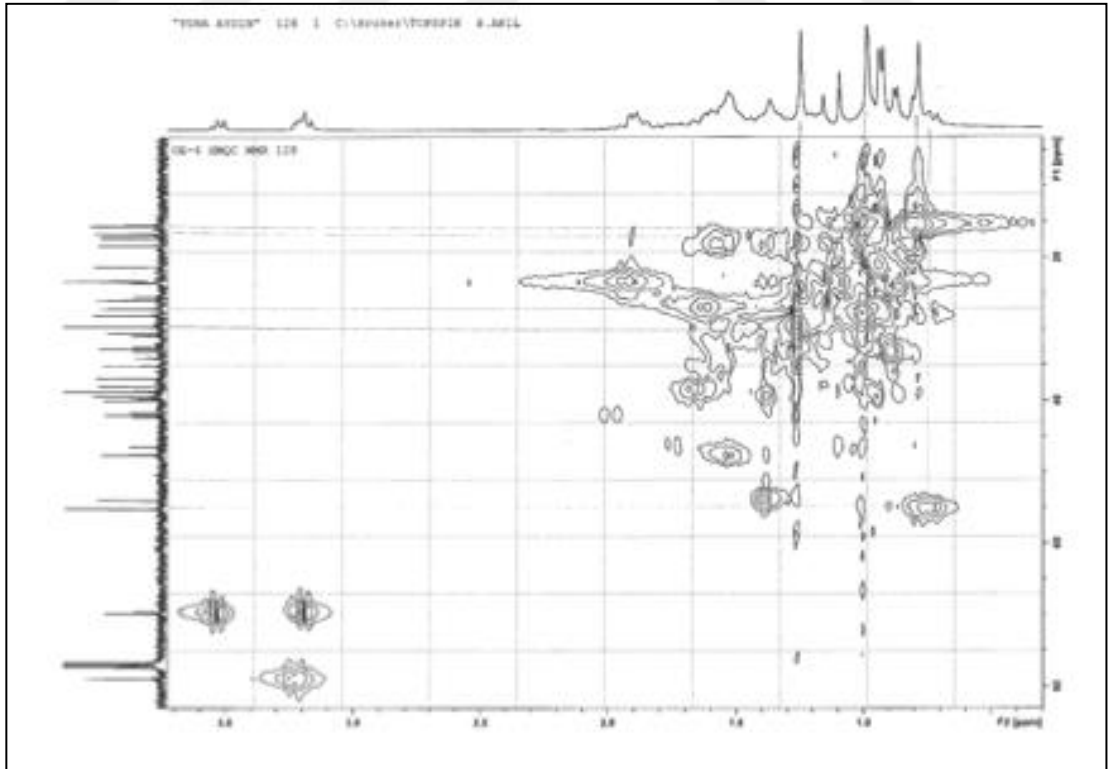
Şekil 3.26. OE-5 (eritriodiol+uvaol)'in ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



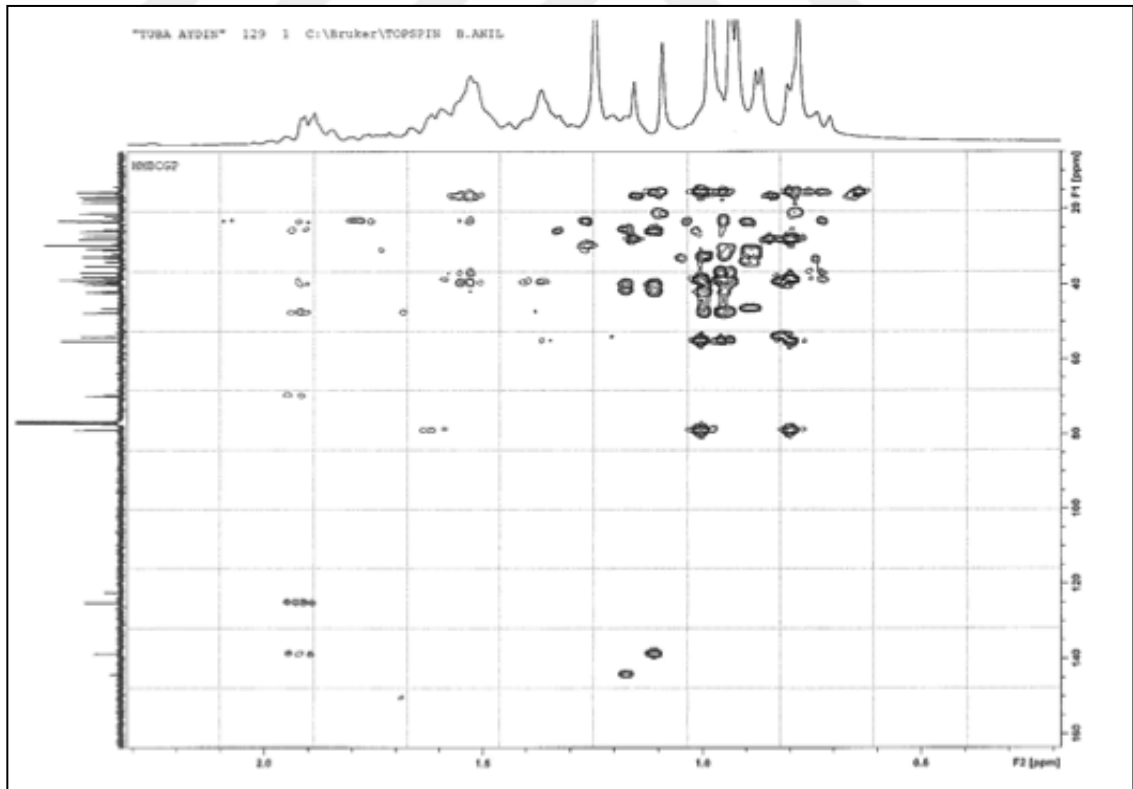
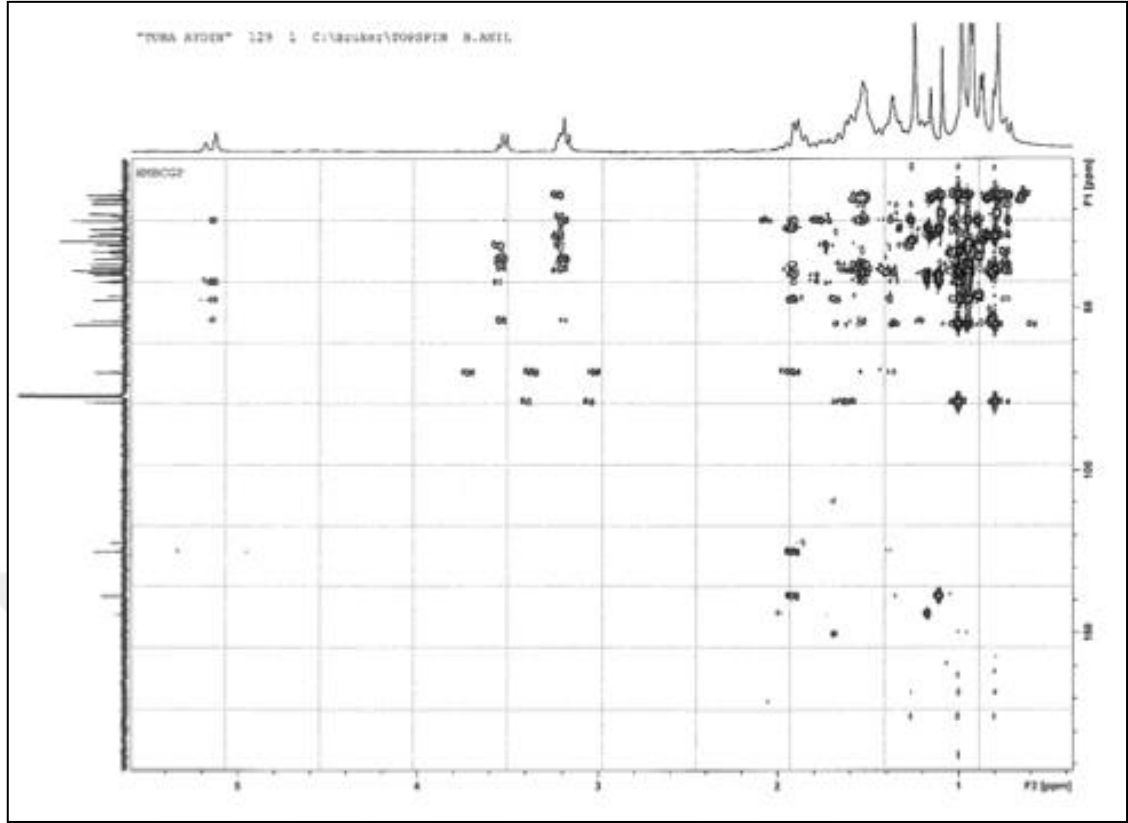
Şekil 3.27. OE-5 (eritriodiol+uvaol)'in APT ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



Şekil 3.28. OE-5 (eritriol+uvaol)'in $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY NMR spektrumu (CDCl_3)



Şekil 3.29. OE-5 (eritriol+uvaol)'in HMQC spektrumu (CDCl_3)



Şekil 3.30. OE-5 (eritriol+uvaol)'in HMBC spektrumu (CDCl₃)

3.2. Balıklarda Biyolojik Aktivite Çalışma Bulguları

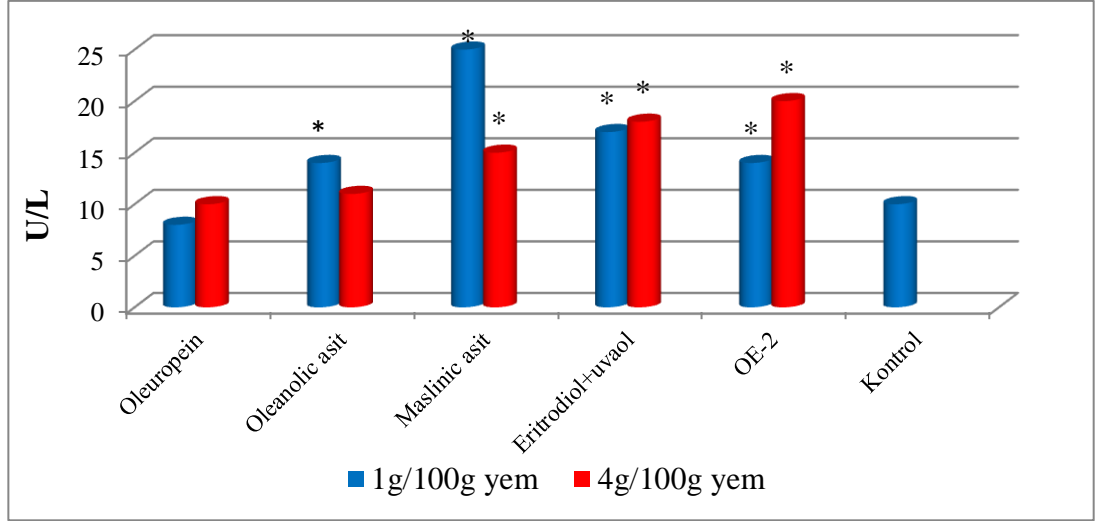
Zeytin Ağacı (*Olea uropea*) bitkisinin yapraklarından kromatografik yöntemlerle **OE-1**, **OE-2**, **OE-3**, **OE-4** ve **OE-5** olarak kodlanan toplam beş madde izole edilmiştir. Saflaştırılan bu saf maddeler iki farklı konsantrasyonda (1 g/100 g yem ve 4g/100 g yem) balık yemlerine katılarak, 96 saat boyunca günde iki kere verilmek üzere balıkların beslenmeleri sağlandı. Bu süre sonunda balıkların kanları 2 grup halinde alındı. Birinci grup iyon düzeyleri için (Na, K, Ca ve Cl), diğer grup ise ALT, AST, ALP ve glikoz gibi biyokimyasal parametrelerin ölçümleri için kullanıldı. Biyokimyasal ve iyon ölçümleri Kilis Devlet Hastanesi merkez laboratuvarında Roche Hitachi P 800 marka cihaz ile gerçekleştirildi. Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “Regresyon analizi ve Student-Newman Keuls Test (SNK)” testleri uygulanarak yapıldı.

Balıklar üzerine yapılan biyolojik aktivite sonuçları aşağıda çizelge ve grafikler halinde sunuldu. Saf metabolitlerin balıklarda bazı enzim ve kan glikoz düzeyi üzerine yaptıkları etkiler Çizelge 3.1. de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Saf metabolitlerin balıklarda enzimler ve glukoz üzerine yaptığı etkiler

Madde	Doz	ALT (U/L)	ALP (U/L)	AST (U/L)	Glukoz (mg/dL)
Oleuropein	1g/100 g yem	8±0	27±2*	311±4*	64±1*
	4g/100 g yem	10±1	24±1	464±6*	66±1*
Oleanolic acid	1g/100 g yem	14±1*	28±2*	319±8*	83±5*
	4g/100 g yem	11±1	24±1	358±6*	79±4*
Maslinic acid	1g/100 g yem	25±2*	25±2	367±5*	64±2*
	4g/100 g yem	15±1*	30±3*	313±4*	63±1*
Eritrodiol+uvaol	1g/100 g yem	17±1*	31±1*	300±2*	69±2*
	4g/100 g yem	18±1*	30±2*	283±5*	65±2*
OE-2 (trisakkarit)	1g/100 g yem	14±1*	32±2*	328±6*	84±5*
	4g/100 g yem	20±2*	26±2*	354±6*	71±5*
Kontrol	Sadece yem	10±1	22±1	265±6	43±2

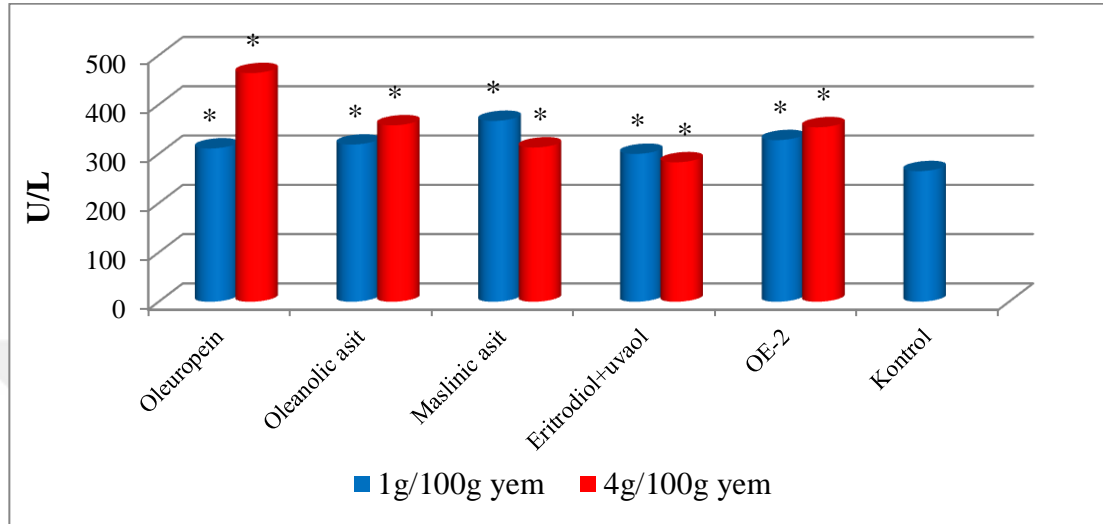
*:Kontrol grubundan istatikselsel olarak farklı



Şekil 3.31. Zeytin saf metabolitlerin ALT enzimi üzerine etkileri
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

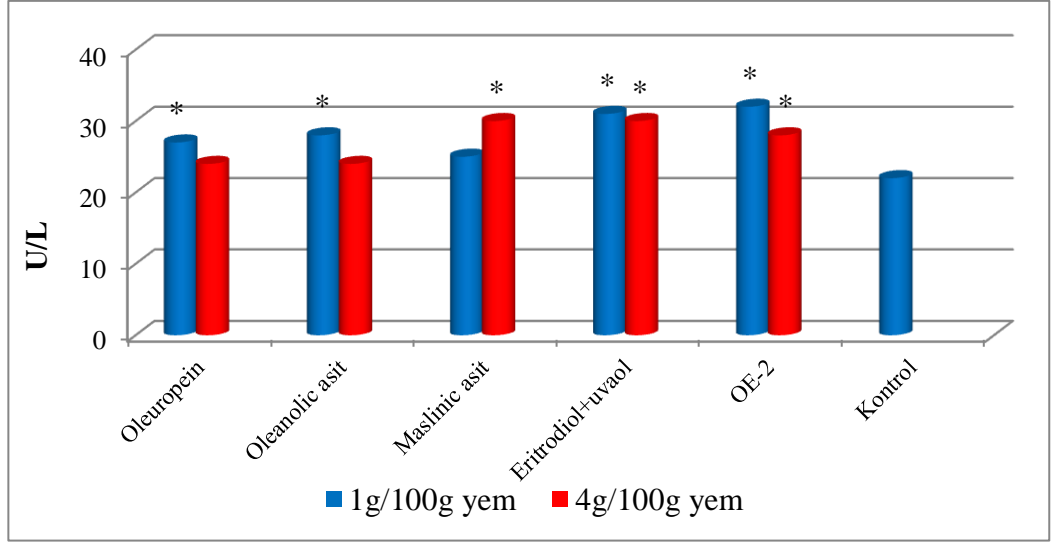
Alanin aminotransferaz enzimi (ALT) aminoasit metabolizmasını düzenleyen önemli bir aminotransferaz enzimidir (Nemcsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988). Bu enzim $-NH_2$ (amino) grubunu oksoasitlere transfer ederek aminoasit sentezinde rol alır. ALT enzimi tepkimeyi geri dönüşümlü olarak katalizleyerek ketoasitleri aminoasitlere, amino asitleri ise keto asitlere dönüştürür. ALT enzimi hücre içerisinde olan bir enzim olmasına karşın, bu enzim düzeyinin kan serumunda yükselmesi, canlılarda karaciğer hasarının veya bir travmanın önemli bir göstergesidir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). ALT enzimi diğer karaciğer enzimlerine göre daha spesifik bir enzim olup, bu enzimin yüksek seviyesi karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kullanılır (Nemcsok ve Boross, 1982; Nemcsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988). **Şekil 3.31** ve **Çizelge 3.1**'den görüleceği üzere saf metabolitlerin ALT enzimi üzerine etkileri konsantrasyona bağımlı değildir. Saf metabolitlerden oleuropein hariç tüm maddeler bu enzim üzerine etki göstermişlerdir. Özellikle maslinic asit düşük konsantrasyonda bu enzimin miktarını en çok artıran metabolit olarak karşımıza çıkmıştır. Oleanolic asit (OE-3)'de düşük konsantrasyonda bu enzimin düzeyini artırırken yüksek konsantrasyonda anlamlı bir etki sergilememiştir. Eritrodiol ve uvaol metabolitlerinin karışımı (OE-5) her iki konsantrasyonda da bu enzimin aktivitesini artırmıştır. Bu sonuçlar bize bu metabolitlerin karaciğer üzerine olan toksik etkilerinin konsantrasyonuna bağımlı olduğunu, bu metabolitlerden maslinic asit,

oleanolik asit, eritrodiol+uvaol bileşikleri ile yapısı belirlenemeyen, ancak bir trisakkarit olduğu belirlenen OE-2'in balıklarda karaciğer üzerine toksik etkilerinin olduğunu göstermektedir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005).



Şekil 3.32. Zeytin saf metabolitlerin AST enzimi üzerine etkileri
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

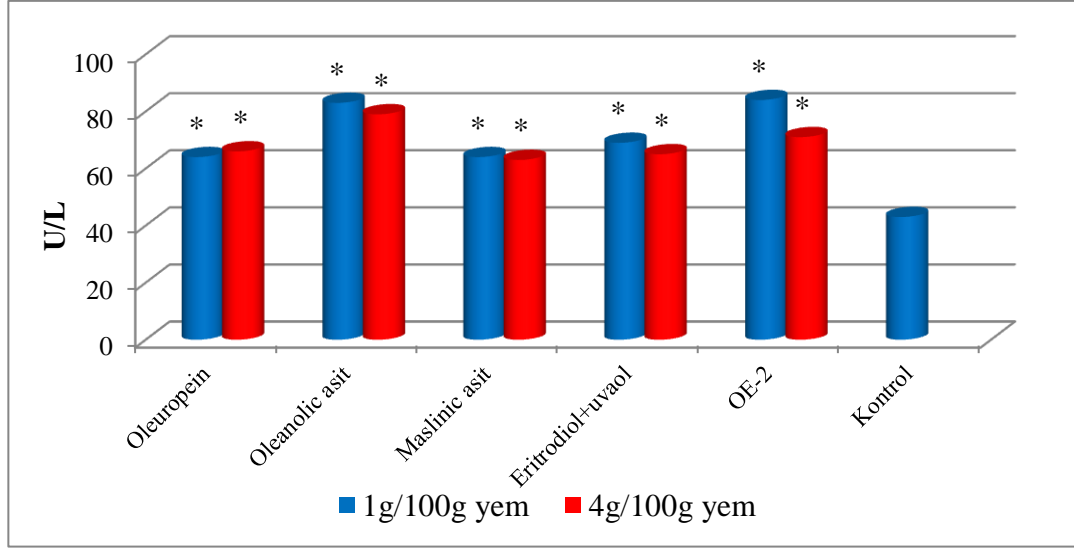
Aspartat aminotransferaz (AST) enzimi de ALT gibi bir aminotransferaz enzimidir. Karaciğer, kalp, kas dokusu, böbrek ve beyinde oluşan hasarlar kan AST düzeyini artıran en önemli etkenlerdir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). **Şekil 3.32.** ve **Çizelge 3.1'**den görüleceği üzere kontrol grubu ile mukayese edildiğinde zeytin yaprağından izole edilen tüm maddelerin balıklarda serum AST düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize tüm metabolitlerin balıkların kalp, böbrek ve karaciğer gibi dokularına hasar verdiğini göstermektedir. En yüksek AST düzeyi oleuropeinin yüksek dozu ile muamele edilmiş olan grupta tespit edildi. Oleuropein, kan ALT enzim değerleri üzerine anlamlı bir etki sergilemezken, kan AST enzim değerlerini yükseltmiştir. Bu verilerin ışığında oleuropeinin karaciğer üzerine toksik bir etki göstermediği; böbrek, kalp vb. organlar üzerine toksik bir etkiye sahip olabileceği söylenebilir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005).



Şekil 3.33. Zeytin saf metabolitlerin ALP enzimi üzerine etkileri

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Alkalin fosfataz (ALP) enzimi bir hidrolaz enzimi olup, nükleotidlerden, proteinlerden ve alkaloitlerden fosfat gruplarının koparılması tepkimelerini katalizleyen bir enzimdir. Bu enzim alkali (bazik) ortamda fonksiyonel işlemlerini sürdürür. ALP insanlarda kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta tarafından sentezlenir ve safra yoluyla vücuttan dışarı atılır. Kan serumunda bu enzimin düzeyinin artması kemik, karaciğer ve safra yollarında doku hasarının olduğuna işaret etmektedir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). **Şekil 3.33** ve **Çizelge 3.1.**'den görüleceği üzere ALP enziminin düzeyi zeytin yaprağından izole edilen tüm metabolitler ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuyla mukayese edildiğinde genellikle yüksek bulunmuştur. Sadece oleuropein ve oleanolik asitin yüksek konsantrasyonu ile maslinik asitin düşük konsantrasyonu bu enzim üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki sergilememiştir. Bu sonuçlara dayanarak bu saf metabolitlerin balıklarda kemik, safra yolları ve karaciğer üzerine patojenik etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005).



Şekil 3.34. Zeytin saf metabolitlerin glikoz üzerine etkileri
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 3.34. ve **Çizelge 3.1.**'den görüleceği zeytin metabolitleri ile muamele edilen tüm gruplarda glikoz düzeyi kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunmuş olup bu değerlerin tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Özellikle oleanolik asit ile yapısı belirlenemeyen ve bir trisakkarit olan OE-2 metaboliti balıklarda glikoz serum düzeyini iki kat civarında artırmıştır. Canlılarda kan şekerinin düzenlenmesi bazı hormon ve enzimlerin rol oynadığı karmaşık bir süreç ile gerçekleşir. Şeker metabolizmasındaki en önemli hormon pankreastan salgılanan insülin hormonudur. Karaciğer canlılarda şeker, yağ ve protein metabolizmasında tol alan oldukça önemli bir organdır (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). Trisakkarit yapılı olan OE-2 metaboliti karaciğerde metabolizmaya uğrayarak kan glikoz düzeyini artırmış olabilir. Diğer taraftan, özellikle karaciğerin altında bulunan safra kesesi safra salgısı ile canlılarda yağ metabolizmasını düzenler. Karaciğer metabolizması sonrası üretilen maddeler süzülme üzere böbreğe taşınır. Karaciğer, safra kesesi veya böbrek gibi organlarda oluşan doku hasarları şeker, yağ ve protein metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Zeytin yaprağından izole edilen saf metabolitler sözü geçen organlardaki doku hasarının indikatörü olan ALT, AST ve ALP gibi enzimleri değişik oranlarda etkilemiştir. Bu dokularda oluşan hasarlardan dolayı balıklarda şeker metabolizması olumsuz yönde etkilenerek kan glikoz düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek çıkmasına da neden olmuş olabilir

(Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005).

Zeytin saf metabolitlerinin (oleuropein, OE-2, oleanolic asit, maslinic asit ve eritrodiol+uvaol) balıklarda bazı iyonların derişimi üzerine yaptıkları etkiler **Çizelge 3.2.**'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Saf metabolitlerin balıklarda iyon derişimleri üzerine yaptığı etkiler

Madde	Doz	Na (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Fe (µg/L)	Ca (mg/dL)	K (mmol/L)
Oleuropein	1g/100 g yem	149±2	128±2	80±1	14,0±1,2	5,10±0,2
	4g/100 g yem	147±2	126±2	84±2	11,1±1,3	6,34±0,2
Oleanolic acid	1g/100 g yem	147±2	125±3	68±2*	13,6±2,1	5,28±0,1
	4g/100 g yem	141±1*	122±3*	64±1*	9,20±0,1*	4,01±0,1*
Maslinic acid	1g/100 g yem	151±2	133±1	50±2*	11,1±1,1	5,47±0,1
	4g/100 g yem	150±2	130±2	70±2	14,6±0,1*	5,18±0,2
Eritrodiol+uvaol	1g/100 g yem	153±1	132±2	80±2	11,1±0,1	5,15±0,2
	4g/100 g yem	152±2	130±3	65±1*	11,1±0,1	4,70±0,2
OE-2 (Trisakkarit)	1g/100 g yem	155±2	134±5	77±1	13,7±1,1	5,40±0,1
	4g/100 g yem	152±2	133±4	78±2	10,2±1,2	5,46±0,2
Kontrol	Sadece yem	152±3	137±2	78±2	12,4±1,1	5,45±0,2

*:Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı

Kan plazması ya da serumun biyokimyasal analizi, karaciğer ve böbrek gibi iç organlar, proteinler, besleyici ve metabolik parametrelerin yanı sıra elektrolitler hakkında da araştırmacılara önemli bilgiler sağlamaktadır (Jain, 1986; Duncan ve ark., 1994). Na, Cl, K ve Ca gibi elektrolitler balıkların büyümeleri ve iyon dengeleri için gerekli olan mineraller olup sudan solungaçlar vasıtasıyla alınmaktadır (Eddy, 1982). Dışarıdan alınan farklı ajanlar bu elektrolitlerle etkileşerek balıklarda iyon değişimlerine neden olmaktadır (McDonald ve Wood, 1993). Çizelge 3.2. den görüleceği üzere zeytin metabolitleri, kan iyon derişimleri üzerine düzenli bir etki sergilememiştir. Örneğin uygulamalar arasında oleanolic asitin 4g/100 g yem uygulaması tüm iyon değerlerini etkileyerek kontrol grubuna göre iyonların derişimini azaltmıştır ($p<0.05$). Oleuropein, eritrodiol+uvaol ve trisakkarit yapıları OE-2 metaboliti genelde bu iyonların üzerine

istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir azaltıcı veya artırıcı etki sergilememiştir. Maslinic asit ile (1g /100 g yem) beslenmiş olan balıklarda kontrol grubuna göre Fe oranı düşük bulunurken, maslinic asitin 4g/100 g yem konsantrasyonu ile beslenmiş olan balıklarda Ca düzeyi kontrol grubuna göre yüksek oranda tespit edilmiştir.

3.3. Ekstreler ve Saf Metabolitlerin Depo Zararlısı Böceklerle Karşı Toksik Etkileri

İnsektisidal aktivite çalışmaları Erzurum Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi ve toksisite çalışmalarında üç önemli depo zararlısı olan *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* ve *A. canthoscelides obtectus* (Fasülye tohum böceği) erişkinleri kullanıldı. Laboratuvar şartlarında beslenen böcekler uygun besi ortamı ile Petri kaplarına onar erişkin olarak yerleştirildi. Üç farklı konsantrasyonda (2,5 mg, 5,0 mg ve 7,5 mg/Petri kabı) hazırlanan ekstre ve yeterli miktarda saflaştırılan saf metabolitler, petri kaplarına ilave edilerek kapların ağzı kapatıldı. Aynı şartlarda hazırlanan insektisit ilacı DDVP (dichlorvos) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise sadece maddeleri çözmek üzere kullanılan destile su-etanol (%10 hacimce) kullanıldı. Ölü böcek sayıları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayılarak kaydedildi. Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “ANOVA” (LSD ve Duncan testleri) ve “ Probit Regresyon Analizi” testleri uygulanarak yapıldı. Sonuçlar aşağıda çizelge ve grafikler halinde sunuldu.

Zeytin yaprağından elde edilen ekstre ve saf metabolitlerin buğday biti olarak bilinen *S. granarius* türüne karşı toksik etkileri **Çizelge 3.3.**'de özetlenmiştir. Bu türe karşı 96. saatte toksik etkileri % ölüm oranlarına göre grafik olarak sunuldu (**Şekil 3.35**). **Çizelge 3.3.** ve **Şekil 3.35.**'den görüleceği üzere ekstreler ve maddelerin uygulama konsantrasyonu arttıkça toksik etkileri de genellikle artmıştır. Bu veriler bize ekstre ve maddelerin toksik etkilerinin genellikle doza bağlı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan zaman ilerledikçe uygulanan ekstre ve saf metabolitlerin toksik etkileri artmış ve en yüksek toksik etkiler maslinic asit ve uvaol+eritrodiol için bulunmuştur. Uygulamalar arasında *S. granarius* türüne karşı uvaol+eritrodiol uygulaması dikkat çekmektedir. Bu madde karışımı ilk başlarda diğer maddelere göre toksik değilken 48. saatten sonra toksik etkisi birden artış göstermiş ve toksik etkisi diğer maddelerden yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan ekstreler ve saf metabolitlerin toksik etkisi bir insektisidal olan DDVP (dichlorvos) den daha düşük oranda bulunmuştur. Aynı

dozlarda uygulanan pozitif kontrol 24. Saatte % 93,33-98,33 oranında buğday bitini öldürmüştür (Çizelge 3.3). Zeytin yaprağından elde edilen metanol ekstresi oleuropein ve bir trisakkarit olan OE-2 bakımından zengindir. Çizelge 3.3.'den de görüleceği üzere **oleuropein** (OE-1) ve metanol ekstresinin toksik etkileri birbirine yakın değerde olmasına karşın metanol ekstresinin daha toksik olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar bize metanol ekstresinde bulunan diğer az orandaki metabolitlerin toksik etkiyi artırdığını göstermektedir.

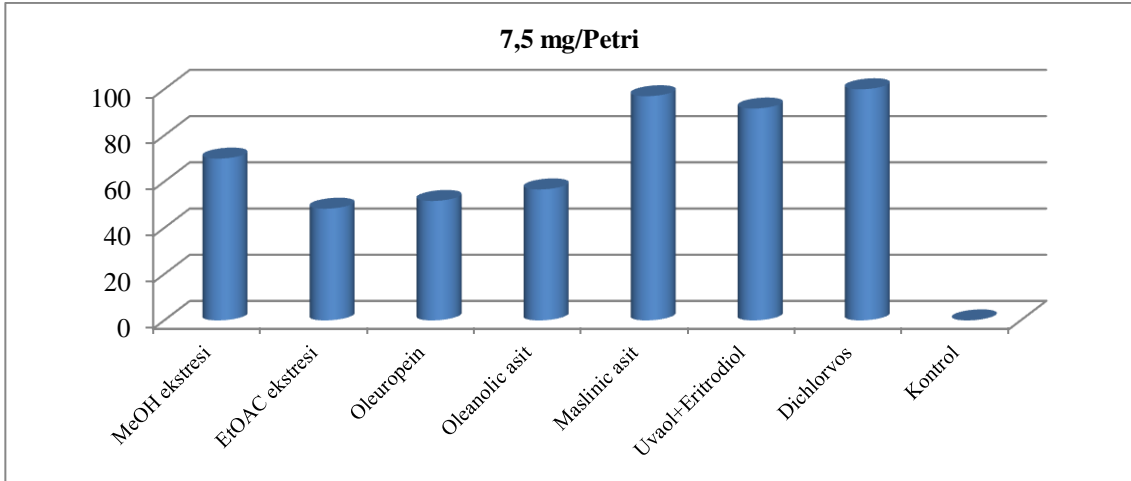
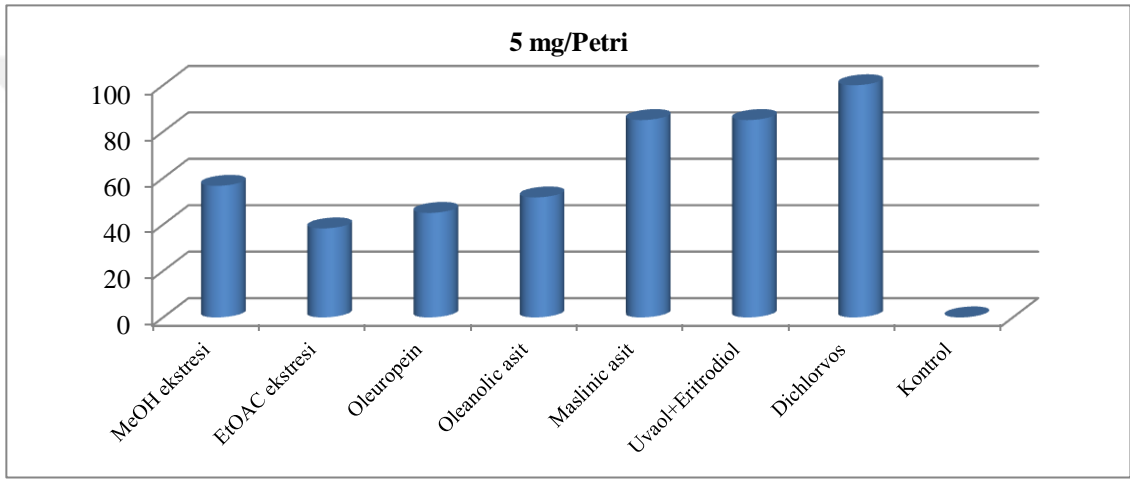
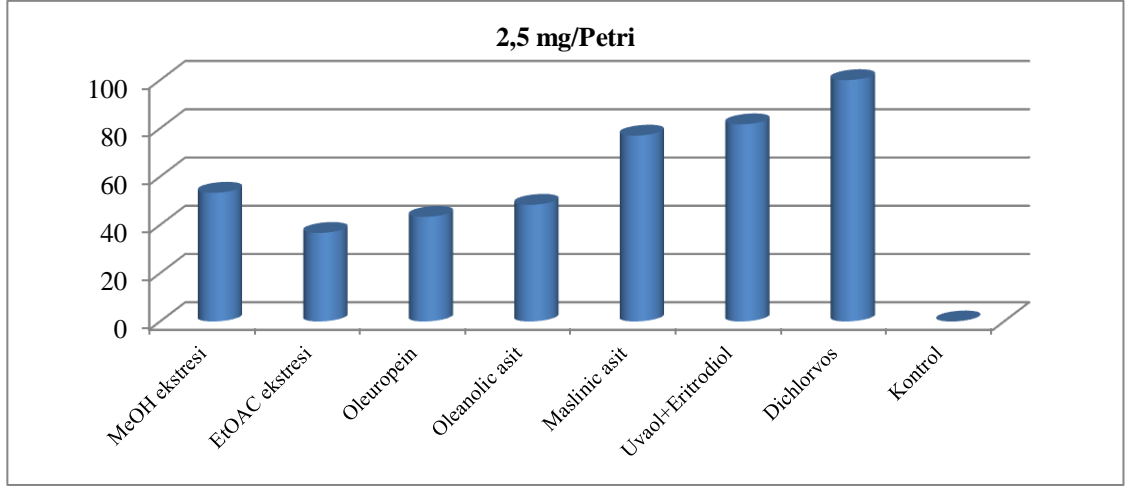
Çizelge 3.3. Ekstreler ve saf metabolitlerin *S. granarius* türüne karşı toksik etkileri

Uygulama	Kon. (mg/Petri)	% ölüm (Ortalama ± standart hata)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
MeOH ekstresi	2,5	30,0±7,6*def	40,0±5,8*cd	46,7±3,3*cd	53,3±1,7*bc
	5	35,0±5,0*ef	43,3±1,7*cd	50,0±0,0*cde	56,7±1,7*bc
	7,5	40,0±0,0*f	53,3±7,3*d	63,3±7,3*de	70,0±5,0*cd
EtOAc ekstresi	2,5	13,3±3,3abc	16,7±4,4*b	21,7±4,4*b	36,7±4,4*b
	5	21,7±4,4*bcde	28,3±6,0*bc	36,7±4,4*bc	38,3±3,3*b
	7,5	25,0±7,6*cdef	30,0±7,6*bc	35,0±5,8*bc	48,3±7,3*b
Oleuropein	2,5	6,7±1,7ab	16,7±1,7*b	38,3±5,3*bc	43,3±5,9*b
	5	33,3±4,4*def	41,7±1,7*cd	45,0±5,0*cd	45,0±5,0*b
	7,5	33,3±7,7*def	45,0±13,2*cd	50,0±5,6*cde	51,7±3,7*bc
Oleanolic asit	2,5	13,3±1,7abc	28,3±3,3*bc	36,7±3,3*bc	48,3±3,3*b
	5	21,7±7,3*bcde	38,3±4,4*cd	45,0±8,7*cd	51,7±7,7*bc
	7,5	26,7±6,0*cdef	41,7±6,0*cd	48,3±7,3*cde	56,7±6,0*bc
Maslinic asit	2,5	19,0±1,0*bcde	47,0±1,0*cd	69,0±0,0*e	77,0±1,0*cde
	5	33,0±1,7*def	55,0±2,7*d	74,0±1,0*e	85,0±1,0*de
	7,5	41,0±1,0*f	63,0±1,7*de	83,0±1,0*ef	97,0±2,0*e
Uvaol + eritrodiol	2,5	1,7±1,7a	28,3±3,3*bc	50,0±2,9*cde	81,7±6,0de
	5	11,7±1,7abc	31,7±1,7*bc	51,7±1,7*cde	85,0±5,8*de
	7,5	18,3±1,7*bcd	38,3±1,7*cd	66,7±1,7*e	91,7±1,7*e
Dichlorvos	2,5	93,3±1,7*g	100,0±0,0*f	100,0±0,0*g	100,0±0,0*e
	5	95,0±0,0*g	100,0±0,0*f	100,0±0,0*g	100,0±0,0*e
	7,5	98,3±1,7*g	100,0±0,0*f	100,0±0,0*g	100,0±0,0*e
Kontrol	-	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a

Kon.: Konsantrasyon.

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı.

Sütunlardaki aynı harfler istatistiksel olarak farksız olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.35. Ekstreler ve saf metabolitlerin *S. granarius*' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları

Zeytin yaprağından elde edilen ekstre ve saf metabolitlerin buğday biti olarak bilinen *T. confusum* türüne karşı toksik etkileri **Çizelge 3.4.**'de özetlenmiştir. Bu türe karşı 96. saatte toksik etkileri % ölüm oranlarına göre grafik olarak ayrıca sunuldu (**Şekil 3.36.**). **Çizelge 3.4.** ve **Şekil 3.36.** dan görüleceği üzere ekstreler ve maddelerin toksik etkileri konsantrasyona bağlı olarak artmıştır. Diğer taraftan zaman ilerledikçe uygulanan ekstre ve saf metabolitlerin toksik etkileri de artmıştır. Uygulamalar arasında *T. confusum* depo zararlısına karşı metanol ekstresinin üç dozunun da, 96 saat sonra % 90-92 ölüm oranı ile daha etkili olduğu dikkat çekmektedir (**Şekil 3.36.**). Metanol ekstresi çoğunlukla oleuropein içermektedir. Ancak oleuropein, metanol ekstresine göre 96 saat sonra % 65-83 ölüm oranı ile daha az toksik bulunmuştur. Diğer taraftan ekstre ve saf metabolitlerin toksik etkisi bir insektisidal olan DDVP (dichlorvos) den daha düşük oranda bulunmuştur. Aynı dozlarda uygulanan pozitif kontrol 48. saatte böceklerin tamamen ölümüne neden olmuştur (**Çizelge 3.4.**). Zeytin yapraklarının etil asetat ekstresi oleanolic asit, maslinic asit, uvaol ve eritrodiol içermektedir. Bu maddelerden uvaol ve eritrodiol yeterli miktarda saflaştırılmadığı için bu böcek türüne karşı test edilememiştir. Ancak *T. confusum* depo zararlısına karşı etil asetat ekstresinin ana bileşeni olan maslinic asit ve oleanolic asit etil asetat ekstresine göre daha toksik bulunmuştur. Etil asetat ekstresi 72 saat sonra % 45-55 oranında ölüme neden olurken, oleanolic asit 72 saat sonra % 48-78 oranında, maslinic asit ise %73-85 oranında ölüme neden olmuştur (**Çizelge 3.4.**). Bu veriler maslinic asitin bu böcek türüne karşı daha toksik olduğunu göstermektedir.

Uygulamaların *T. confusum* ve *S. granarius* depo zararlılarına karşı toksik etkileri mukayese edildiğinde, hem ekstre hem de saf metabolitlerin *T. confusum* türüne karşı toksik etkilerinin daha fazla olduğu görülmektedir.

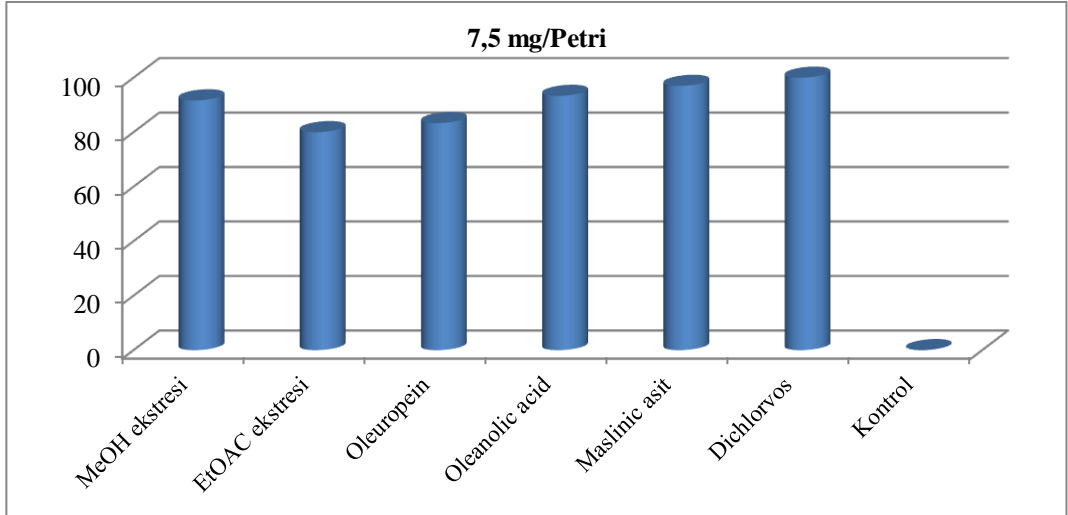
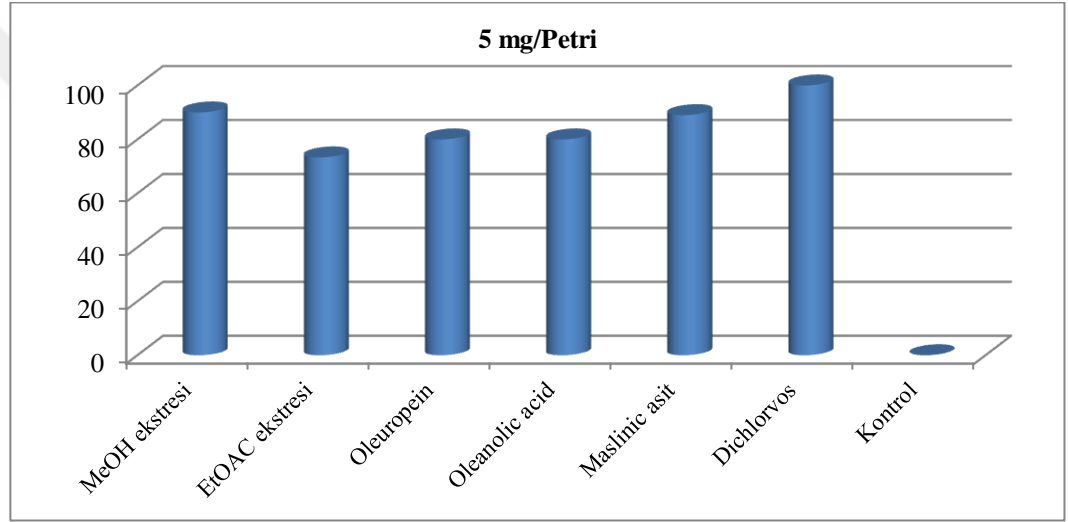
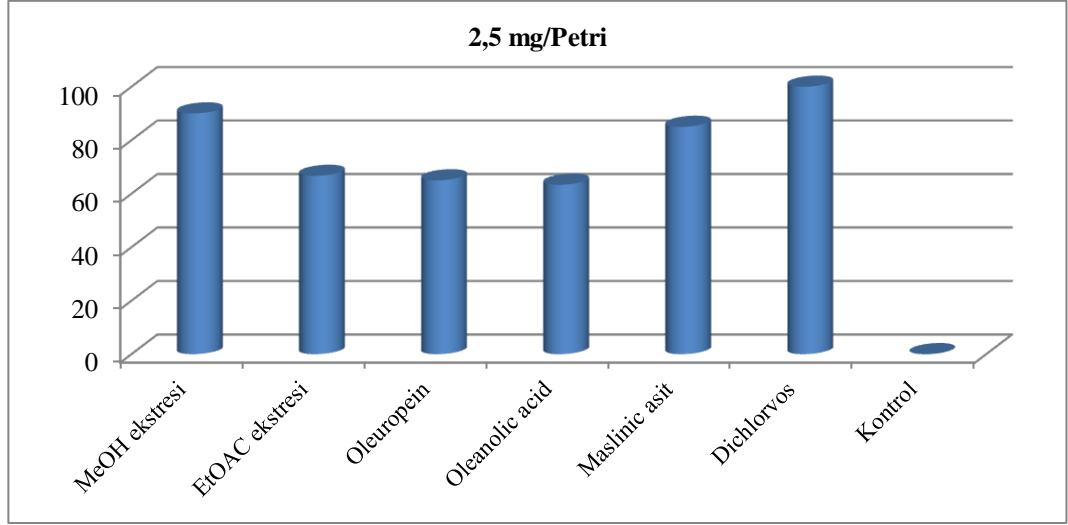
Çizelge 3.4. Ekstreler ve saf metabolitlerin *T. confusum* türüne karşı toksik etkileri

Uygulama	Kon. (mg/Petri)	% ölüm (Ortalama ± standart hata)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
MeOH ekstresi	2,5	33,3±1,7*g	51,7±1,7*f	65,0±2,9*e	90,0±2,9*fg
	5	40,0±0,0*h	53,3±1,7*f	68,3±1,7*ef	90,0±2,9*fg
	7,5	43,3±1,7*h	61,7±1,7*g	76,7±1,7*fg	91,67±1,7*fgh
EtOAc ekstresi	2,5	6,7±1,7bc	26,7±4,4*cd	43,3±4,4*b	66,7±1,7*bc
	5	13,3±1,7de	26,7±3,3*cd	43,3±4,4*b	73,3±4,4*cd
	7,5	23,3±4,4*f	41,7±3,3*e	63,3±1,7*de	80,0±5,0*de
Oleuropein	2,5	3,3±1,7abc	21,7±1,7*c	45,0±2,7*b	65,0±2,9*b
	5	8,3±1,7cd	31,7±1,7*d	55,0±2,9*cd	80,0±2,9*de
	7,5	16,7±1,7*e	33,3±1,7*d	55,0±3,7*cd	83,3±4,4*ef
Oleanolic asit	2,5	1,7±1,7ab	13,3±1,7b	48,3±1,7*bc	63,33±1,7*b
	5	31,7±1,7*g	53,3±4,4*f	71,7±1,7*efg	80,0±2,9*de
	7,5	33,3±1,7*g	58,3±4,4*fg	78,3±4,4*g	93,3±1,7*gh
Maslinic asit	2,5	34,0±2,0*g	58,0±2,0*fg	73,0±5,6*fg	85,0±1,0*efg
	5	38,0±1,0*h	62,0±1,0*g	76,0±1,0*fg	89,0±1,0*fg
	7,5	44,0±1,0*h	67,0±2,0*gh	85,7±6,7* g	97,0±2,0*h
Dichlorvos	2,5	91,7±1,7*i	100,0±0,0*i	100,0±0,0*h	100,0±0,0*h
	5	96,7±1,7*ij	100,0±0,0*i	100,0±0,0*h	100,0±0,0*h
	7,5	100,0±0,0*j	100,0±0,0*i	100,0±0,0*h	100,0±0,0*h
Kontrol	-	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a

Kon.: Konsantrasyon.

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı.

Sütunlardaki aynı harfler istatistiksel olarak farksız olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.36. Ekstreler ve saf metabolitlerin *T. confusum*' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları

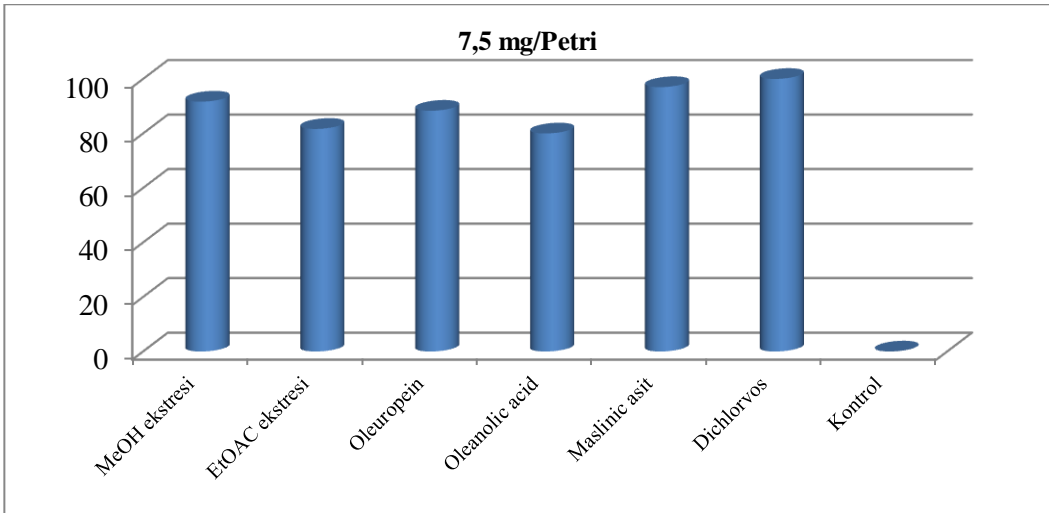
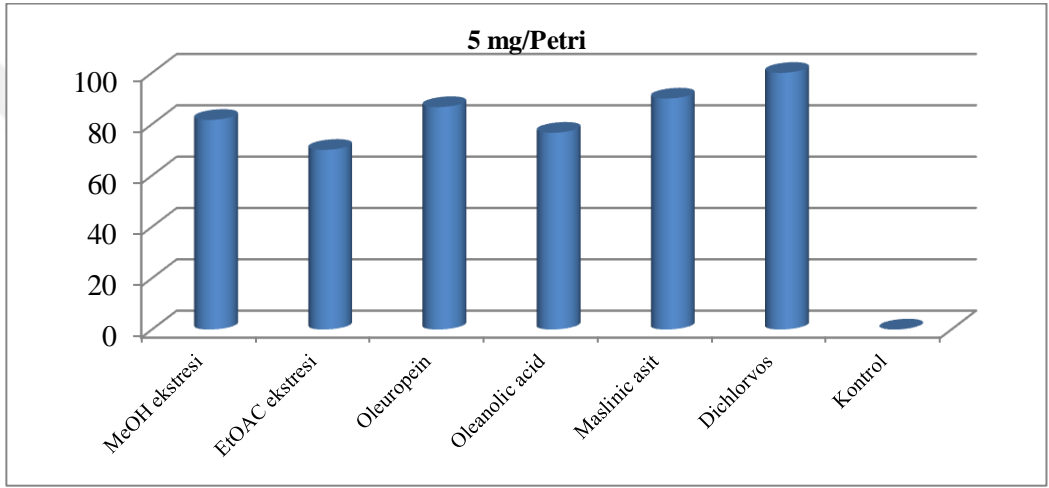
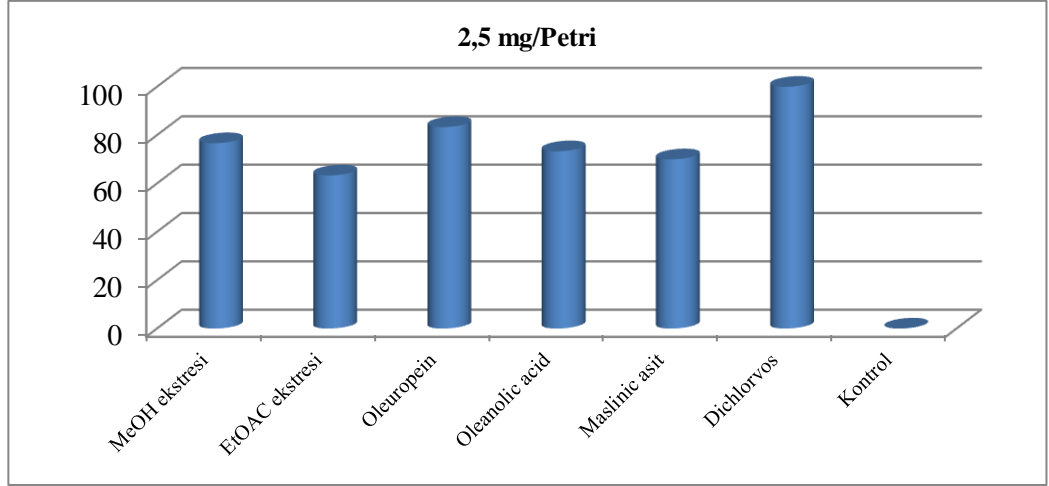
Çizelge 3.5. Ekstreler ve saf metabolitlerin *A. obtectus* türüne karşı toksik etkileri

Uygulama	Kon. (mg/Petri)	% ölüm (Ortalama ± standart hata)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
MeOH ekstresi	2,5	18,3±1,7*c	35,0±2,9*bc	61,7±1,7*de	76,7±1,7*cde
	5	26,7±1,7*d	43,3±1,7*cd	63,3±1,7*e	81,7±4,4*efg
	7,5	30,0±0,0*d	53,3±4,4*e	71,7±1,7*f	91,7±1,7*h
EtOAc ekstresi	2,5	18,3±3,3*c	30,0±5,0*b	41,7±6,7*b	63,3±1,7*b
	5	20,0±2,9*c	33,3±6,0*b	53,3±3,3*c	70,0±2,9*c
	7,5	31,7±1,7*d	46,7±3,3*de	65,0±2,9*ef	81,7±1,7*efg
Oleuropein	2,5	28,3±3,3*d	43,3±3,3*cd	66,7±1,7*ef	83,3±1,7*efg
	5	28,3±1,7*d	43,3±1,7*cd	68,3±1,7*ef	86,7±1,7*fgh
	7,5	30,0±2,9*d	46,7±1,7*de	68,3±1,7*ef	88,3±3,3*gh
Oleanolic asit	2,5	11,7±1,7b	26,7±4,4*b	55,0±2,9*cd	73,3±1,7*cd
	5	26,7±1,7*d	46,7±1,7*de	61,7±1,7*de	76,7±1,7*cde
	7,5	28,3±1,7*d	51,7±1,7*de	68,3±1,7*ef	80,0±2,9*def
Maslinic asit	2,5	26,0±1,0*d	40,0±2,0*cd	56,0±1,0*cd	70,0±1,0*c
	5	38,0±1,0*e	54,0±0,0*e	68,0±1,0*ef	90,0±1,7*h
	7,5	43,0±1,0*ef	59,0±1,0*ef	77,0±1,0*fg	97,0±1,0*hi
Dichlorvos	2,5	91,7±3,3*g	100,0±0,0*g	100,0±0,0*h	100,0±0,0*i
	5	96,7±1,7*h	100,0±0,0*g	100,0±0,0*h	100,0±0,0*i
	7,5	98,3±1,7*h	100,0±0,0*g	100,0±0,0*h	100,0±0,0*i
Kontrol	-	0,0±0,0a	0,0±0,0	0,0±0,0a	0,0±0,0a

Kon.:Konsantrasyon

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı

Sütunlardaki aynı harfler istatistiksel olarak farksız olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.37. Ekstreler ve saf metabolitlerin *A. obtectus*' a karşı 96. saatteki % ölüm oranları

Zeytin yaprağından elde edilen ekstre ve saf metabolitlerin fasülye böceği olarak bilinen *A. obtectus* türüne karşı toksik etkileri **Çizelge 3.5.**'de sunulmuştur. Bu türe karşı 96. saatte toksik etkileri % ölüm oranlarına göre grafik olarak ayrıca **Şekil 3.37. de** verildi. **Çizelge 3.5.** ve **Şekil 3.37.** den de görüleceği üzere ekstreler ve maddelerin toksik etkileri konsantrasyona ve de uygulama zamanına bağlı olarak artmıştır. Uygulamaların *A. obtectus* depo zararlısına karşı toksik etkileri birbirine yakın olmasına karşın uygulamalar arasında en yüksek aktivite insektisidal ilaçtan sonra metanol ekstresi, oleuropein ve maslinic asit için gözlemlenmiştir. Metanol ekstresinin üç dozunun da, 96 saat sonra % 76,67-91,67 ölüm oranına neden olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresi çoğunlukla oleuropein içermektedir ve oleuropein ile metanol ekstresi birbirine yakın ölüm oranları ile benzer toksik etki sergilemişlerdir. Oleuropeinin 2,5, 5 ve 7,5 mg/Petri dozları sırasıyla 96 saat sonra % 86,7, % 83,3 ve % 88,3 oranında ölüme neden olmuşlardır (**Şekil 3.37**). Maslinic asit ise aynı dozlarda 96 saat sonra % 70-97,0 oranında ölüme neden olmuştur. Diğer taraftan ekstre ve saf metabolitlerin toksik etkisi bir insektisidal olan DDVP (dichlorvos) den daha düşük oranda bulunmuş olup aynı dozlarda uygulanan pozitif kontrol 48. saatte böceklerin tamamen ölümüne neden olmuştur (**Çizelge 3.5**). Zeytin yapraklarının etil asetat ekstresi oleanolic asit, maslinic asit, uvaol ve eritrodiol içermektedir. Bu maddelerden uvaol ve eritrodiol yeterli miktarda saflaştırılmadığı için bu böcek türüne karşı test edilememiştir. Bununla beraber *A. obtectus* depo zararlısına karşı etil asetat ekstresinin ana bileşeni olan oleanolic ve maslinic asitler etil asetat ekstresine göre diğer böcek türlerinde olduğu gibi daha toksik etki sergilemişlerdir. Etil asetat ekstresi 72 saat sonra % 41,7-65,0 oranında ölüme neden olurken, oleanolic asit 72 saat sonra % 55,0-68,3 oranında, maslinic asit ise % 56,0-77,0 oranında ölüme neden olmuştur (**Çizelge 3.5**).

Çizelge 3.6. Uygulamalar için LC₅₀ değerleri (72. saat için hesaplanmış değerler)

Uygulama	LC ₅₀ (mg/Petri)		
	<i>S. granarius</i>	<i>T. confusum</i>	<i>A. obtectus</i>
MeOH ekstresi	3,58	0,25	0,78
EtOAC ekstresi	16,73	4,54	3,70
Oleuropein	7,69	3,82	0,34
Oleanolic asit	8,39	2,57	1,73
Maslinic asit	0,66	0,61	1,71
Uvaol + eritrodiol	2,92	-	-
Dichlorvos*	0,11	0,87	0,32

-: Belirlenmedi

*: LC değerleri 24. saatteki ölüm oranlarına göre belirlendi.

Tüm uygulamalar için LC₅₀ (mg/Petri) değerleri ekstraler ve saf metabolitlerin uygulanmasından 72 saat sonra elde edilen ölüm oranları sonuçlarına SPSS programında Probit analizi uygulanarak belirlenmiş ve Çizelge 3.6. da sunulmuştur. Diğer taraftan, ticari insektisit, diclororvos 48 saat sonra tüm böcek türlerinde tam ölüme neden olduğundan 24 saat sonra elde edilen değerlere probit uygulanarak LC₅₀ (mg/Petri) değerleri elde edilmiştir. Buna rağmen dichlorvos için çok küçük LC₅₀ (mg/Petri) değerleri belirlenmiş olup, *S. granarius*, *T. confusum* ve *A. obtectus* için sırasıyla LC₅₀=0,11 mg/Petri, LC₅₀=0,87 mg/Petri ve LC₅₀=0,32 mg/Petridir. Bu verilere dayanarak insektisit diclorvosun zeytin yaprağı ekstraleri ve saf metabolitlerine karşı çok daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Saf metabolitlerin LC₅₀ değerleri incelendiğinde maslinic asit daha çok dikkat çekmektedir. Maslinic asitin *S. granarius* ve *T. confusum* türlerine karşı daha düşük LC₅₀ değerlerinin daha toksik olduğu açıkça görülmektedir. *A. obtectus* böcek türüne karşı ise en düşük LC₅₀ değeri oleuropein için bulunmuştur. (Çizelge 3.6.)'daki değerler incelendiğinde en düşük LC₅₀ (mg/Petri) değerleri *A. obtectus* ve de *T. confusum* türlerine karşı belirlenmiştir. Bu sonuçlar diğer depo zararlısı böceklerine nazaran zeytin yaprağı ekstraleri ile saf metabolitlerinin *A. obtectus* ve de *T. confusum* türlerine karşı *S. granarius*'a nazaran daha toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Uygulamalar arasında en yüksek LC₅₀ değerleri ise daha düşük toksik etki sergileyen etil asetat ekstresi için belirlenmiştir

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bitkiler (Latince: *Plantae*), fotosentez yapan, ökaryotik, ağaçlar, çiçekler, otlar, yosunlar ve benzeri organizmaları içinde bulunduran çok büyük bir canlılar alemidir. Bitkiler, topluluk halinde yaşarlar. Bitkilerin bir bölgede oluşturdukları örtüye bitki örtüsü denirken, bir bölgede yetişen bütün bitki türlerinin tümüne ise flora denir.

Dünya florasında bitkiler aleminin 350.000' e yakın türü mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Günümüze kadar yapılan taksonomik çalışmaların sonucunda 2004 yılı sonu itibariyle 287.655 bitki türünün tanımı yapılmıştır. Bunlardan 258.650' si çiçekli bitkiler, 15,000' i ise yosun türleridir. Bu sayının 2014 yılı itibariyle daha da arttığı bilinmesine rağmen kesin araştırma sonuçlarına ulaşamamıştır. Bitkiler genelde ototrof (kendi besinini üretebilen) organizmalardır ve temel enerji kaynakları şüphesiz güneştir. Bitkiler hücrelerindeki kloroplastları sayesinde fotosentez yaparlar ve güneş ışığını klorofil vasıtasıyla tutarak kendi organik bileşiklerini üretirler (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Bitki>).

Zeytin (*Oleaeuropaea*), zeytingiller (*Oleaceae*) familyasından olup meyvesi yenen, Akdeniz iklimine özgü kültürü yapılan önemli bir ağaç türüdür (**Şekil 1.6.**). *Olea* cinsine ait türler Afrika'nın güneyi, Güney Asya, Doğu Avustralya ve Yeni Kaledonya' da yayılış gösteren türlerdir ve dünya florasında yaklaşık olarak 16 tür karakterize edilmiştir. Zeytin 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her dem yeşil yapraklı bir ağaç türüdür. Geniş, kıvrımlı ve yumru yumru bir gövdeye sahiptir. Ağaç yaşlandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Uzun ömürlü bir ağaç türüdür, yaklaşık 2000 yıl kadar yaşayabilmektedir. Anadolu'da anıt ağaç olarak birçok zeytin ağacı vardır. Verimli topraklarda taç açık ve asimetric, verimsiz topraklarda ise daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve hemen hemen üç köşelidir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Olea>).

Zeytinin yaprağında tanen, uçucu yağlar, organik asitler ve rezin bulunur. Yapraklar ve gövde kabuğu % 5 çay (infüzyon) halinde iştah açıcı, idrar söktürücü ve ateş düşürücü olarak kullanılır. Şeker hastalığında kullanım alanı olduğu gibi, tansiyon düzenleyici olarak da bilinir. Dermokozmetik amaçlı da kullanılmaktadır. Zeytinyağı şampuanlar

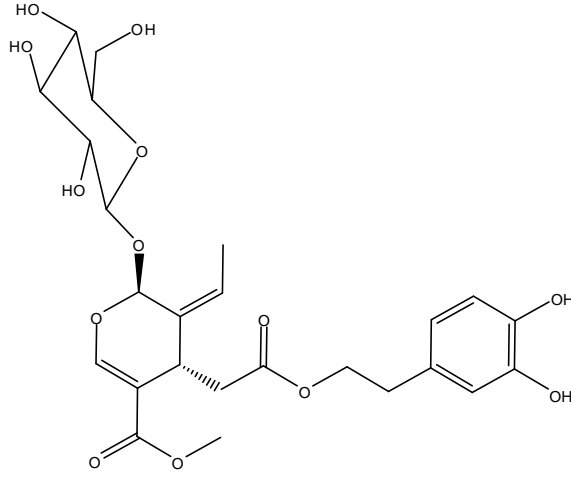
saç dökülmesini engeller, saçın çabuk uzamasını sağlar, lezyonlu saçlı deriyi onarmaya yardımcı olur ve kepek oluşumunu engeller. Zeytinyağlı sıvı sabun, duş jelleri, katı sabun, bebek şampuanları cildi olumsuz dış etkenlere karşı korurlar. Cildi güzelleştirip yaşlanmasını geciktirerek ciltteki kırışıklık oluşumunu engeller. Zeytin aynı zamanda dayanıklılığın da sembolüdür. Doğal zeytinyağlı dermokozmetik ürünler cildimizde kimyasal kalıntılar bırakmadığından dünyada kullanımları giderek artmaktadır. Yüzyıllardır Akdenizlilerin sağlık ve güzellik kaynağı olmuştur. Kutsal metinlerde de şifa kaynağı olduğu belirtilmiştir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Zeytin>).

Olea europea (zeytin) bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstre ve saf metabolitlerinin antioksidan ve radikal süpürücü (Benavente-Garcia ve ark., 2000; Cervellati ve ark., 2002; Katsiki ve ark., 2007; Fernandez-Bolanos, 2008; Lee ve Lee, 2010; Cumaoglu ve ark., 2011a,b; Amoo ve ark., 2012; Botsoglou ve ark., 2012, 2013, 2014; Fistoncic ve ark., 2012), UV ışınları koyucusu ve antiinflamatuvar (Amro ve ark., 2002; Cervellati ve ark., 2002; Bitler ve ark., 2005; Bianco ve ark., 2006; Fernandez-Bolanos ve ark., 2008; Katsiki ve ark., 2007), sitotoksik (Reyes ve ark. (2006; Bouallagui ve ark., 2011; Cumaoglu ve ark., 2011b; Belcack-Cvitanovic ve ark., 2014) ve insektisidal (Zia ve ark., 2011) gibi bir çok değişik biyolojik aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir. Zeytin yaprağının en karakteristik bileşeni şüphesiz oleuropein molekülüdür. Katsiki ve ark. (2007) oleuropein maddesinin insan bağ dokusundaki fibroblastların ömrünü artırdığını, hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeyini ve protein oksidasyonunu önemli oranda azalttığını belirlemişlerdir. İnsanlarda bağ dokularında bulunan fibroblast hücreler, yaraların iyileşmesinde önemli görevler alan kollajen proteininin yapımından sorumlu hücrelerdir.

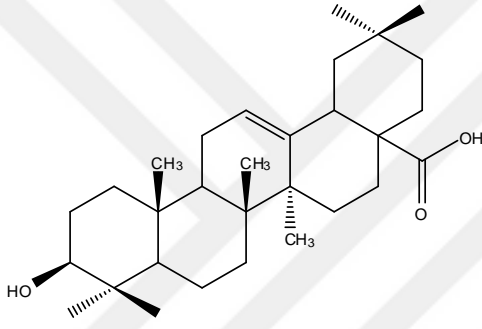
Hidroksitirozol ve türevi bileşikler zeytin yaprağında ve meyvelerinde bulunan oleuropein maddesinin hidrolizi ile oluşan fenolik bileşiklerdir. Zeytin meyveleri ve yaprağı bu maddelerce zengindir. Yapılan araştırmalardan bu maddelerin apoptoz olayını uyararak kanser koruyucu özelliğinin yanı sıra kalp koruyucusu, antioksidan, radikal süpürücü, antiaterojenik (kan sulandıran), UV ışınları koyucusu ve antiinflamatuvar aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir (Amro ve ark., 2002; Cervellati ve ark., 2002; Bitler ve ark., 2005; Bianco ve ark., 2006; Fernandez-Bolanos ve ark., 2008; Katsiki ve ark., 2007).

Mevcut çalışmada da zeytin yaprağının etanol ve etil asetat ekstratlarından kolon ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile toplam 5 metabolit saflaştırılmıştır. Bu metabolitlerin kimyasal yapıları UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D- ve 2D-NMR spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmaya çalışılmış ve **OE-1**, **OE-3**, **OE-4** ve **OE-5** bileşiklerinin kimyasal yapıları spektroskopik verilerle aydınlatılmıştır (**Şekil 4.1**). Spektroskopik verilerin yorumlanması sonucu **OE-1** molekülünün kimyasal yapısı zeytin yaprağı ve meyvelerinin yaygın bir sekoiridoit sınıfı bir metabolit olan **oleuropein** olarak aydınlatılmıştır (Katsiki ve ark., 2007; Benavente-Garcia ve ark., 2000; Lee ve Lee, 2010). **OE-3**'ün kimyasal yapısı ise yine spektroskopik verilerle bitkiler aleminde yaygın bir triterpen olan **oleanolic asit** olarak karakterize edilmiştir. Oleanolik asit ayrıca zeytin meyvelerinin de karakteristik bir metabolitidir. **OE-4** molekülünün kimyasal yapısı spektroskopik yöntemlerle yine zeytin meyveleri ve yaprakları için karakteristik bir triterpen olan **maslinic asit** olarak aydınlatıldı (Garcia-Granadas ve ark., 1998; Saimaru ve ark., 2007; Reyes-Zurita ve ark., 2009). Literatürde daha önceleri yapılan çalışmalarda zeytin yaprağının oleanolic, ursolic ve maslinic asit gibi triterpenleri içerdiği tespit edilmiştir (Somova ve ark., 2003; Reyes ve ark., 2006; Reyes-Zurita ve ark., 2009; Khlif ve ark., 2012; Stiti ve Hartmann, 2012; Peragon, 2013). Çalışmamızda ursolic asit molekülüne rastlanmamasına karşın oleanolic asit ve maslinic asit izole edilmiş ve yapısı karakterize edilmiştir. Bu sonuçlar literatür ile uyum içerisindedir (Garcia-Granadas ve ark., 1998; Somova ve ark., 2003; Reyes ve ark., 2006; Saimaru ve ark., 2007; Reyes-Zurita ve ark., 2009; Khlif ve ark., 2012; Stiti ve Hartmann, 2012; Peragon, 2013).

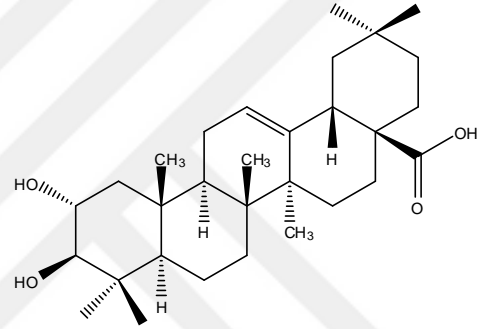
Diğer taraftan OE-5 olarak kodlanan madde İTK'da tek leke halinde izole edilmiştir. Maddenin NMR spektrumları incelendiğinde maddenin tek bir madde olmadığı kimyasal yapı bakımından birbirine çok benzeyen iki maddeyi içerdiği gözlemlendi. Bu maddeler sadece bir adet -CH₃ grubunun yerinin değiştiği **eritrodiol** ve **uvaol** molekülleridir (**Şekil 4.1**). Her iki molekül de kimyasal yapı bakımından birbirine benzediğinden Kromatografik yöntemlerle ayrılamamış ve karışıma ait lekeler İTK'da tüm denenen mobil faz sistemlerinde tek leke olarak görünmüştür. **OE-5** in **eritrodiol** ve **uvaol** karışımını içerdiği daha önce yayınlanmış bu moleküllere ait spektral verilerle de doğrulanmıştır (Saimaru ve ark., 2007; Poller ve Goossens, 2012; Kotan ve ark., 2014).



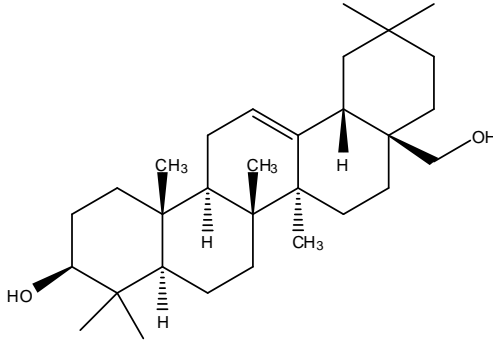
Oleuropein (OE-1)



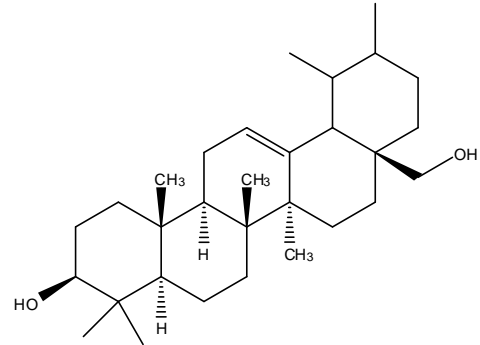
Oleanolic asit (OE-3)



Maslinic asit (OE-4)



Eritrodiol (OE-5)



Uvaol (OE-5)

Şekil 4.1. Saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapıları

Mevcut çalışma ile zeytin yaprağından elde edilen etanol ekstresinin etil asetat ile muamele edilmesi durumunda etil asetat fazına hem triterpenlerin hem de oleuropein maddesinin geçtiği belirlenmiştir. Zeytin yaprağının ilk önce etil asetat ile ekstrakte edilmesi durumunda ise oleuropein ve OE-2 (trisakkarit) moleküllerinin etil asetat

fazına geçmediği ve bitkide kaldığı bilgisine de bu çalışma ile ulaşılmıştır. Mevcut çalışma bulgularına dayanarak oleuropeinin kolay bir şekilde saflaştırılması için bitki örneğinin önce etil asetat, sonra metanol veya su ile ekstraksiyonun daha uygun olacağı ortaya konmuştur.

Zeytin Ağacı (*Olea europaea*) bitkisinin yapraklarından kromatografik yöntemlerle **OE-1**, **OE-2**, **OE-3**, **OE-4** ve **OE-5** olarak kodlanan toplam beş madde izole edilmiştir. Saflaştırılan bu saf maddeler iki farklı konsantrasyonda (1 g/100 g yem ve 4g/100 g yem) balık yemlerine katılarak 96 saat boyunca günde iki kere verilmek üzere balıkların beslenmeleri sağlandı. Bu süre sonunda balıkların kanları 2 grup halinde alındı, birinci grup iyon düzeyleri için (Na, K, Ca ve Cl), diğer grup ise ALT, AST, ALP ve glikoz gibi biyokimyasal parametreleri, ölçümleri için kullanıldı. Biyokimyasal parametreler ve iyon ölçümleri Kilis Devlet Hastanesi merkez laboratuvarında Roche Hitachi P 800 marka cihaz ile gerçekleştirildi. Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “Regresyon analizi ve Student-Newman Keuls Test (SNK)” testleri uygulanarak yapıldı. Zeytin metabolitlerinin Nil sazanı balıklarının serumundaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi ilk defa bu çalışma ile literatüre kazandırılmıştır.

Alanin aminotransferaz enzimi (ALT) aminoasit metabolizmasını düzenleyen önemli bir aminotransferaz enzimidir (Nemcsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988). Bu enzim $-NH_2$ (amino) grubunu oksoasitlere transfer ederek aminoasit sentezinde rol alan bir enzimdir. ALT tepkimeyi geri dönüşümlü olarak katalizleyerek ketoasitleri aminoasitlere, amino asitleri ise keto asitlere dönüştüren bir enzimdir. ALT enzimi hücre içerisinde olan bir enzim olmasına karşın bu enzim düzeyinin kan serumunda yükselmesi canlılarda karaciğer hasarının veya bir travmanın önemli bir göstergesidir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). Saf metabolitlerle beslenmiş balık serumlarındaki ALT enzim düzeyleri incelendiğinde (**Şekil 3.31.** ve **Çizelge 3.1.**) saf metabolitlerin ALT enzimi üzerindeki etkilerinin konsantrasyonuna bağımlı olmadığı görülmektedir. Saf metabolitlerden **oleuropein (OE-1)** hariç diğer tüm metabolitlerin bu enzim üzerine etki göstermiştir. Özellikle **maslinic asit (OE-4)** düşük konsantrasyonda bu enzimin miktarını en çok artıran metabolit olarak tespit edilmiştir (**Şekil 3.31.**). **Oleanolic asit (OE-3)** düşük konsantrasyonda bu enzimin düzeyini

artırırken, yüksek konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir etki sergilememiştir. **Eritrodiol ve uvaol** metabolitlerinin karışımı (**OE-5**) her iki konsantrasyonda da bu enzimin aktivitesini artırmıştır. Bu sonuçlar bize maddelerin karaciğer üzerine olan toksik etkilerinin konsantrasyona bağımlı olduğunu, bu maddelerden **oleanolik asit (OE-3)**, **maslinik asit (OE-4)**, **eritrodiol+uvaol (OE-5)** bileşikleri ile yapısı belirlenemeyen, ancak bir trisakkarit olduğu belirlenen **OE-2**'in ise balıklarda karaciğer üzerine toksik etkilerinin olduğunu göstermektedir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Bucher ve Hofer, 1990; Cajaravilleve ark., 2000; Kalender ve ark., 2005).

Aspartat aminotransferaz (AST) enzimi de ALT gibi bir aminotransferaz enzimidir. Karaciğer, kalp kas dokusu, böbrek ve beyinde oluşan hasarlar kan AST düzeyine artıran en önemli etkenlerdir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark., 2005). Araştırma sonuçları bize zeytin yaprağından izole edilen tüm metabolitlerin balıklarda serum AST düzeyini kontrol grubu ile mukayese edildiğinde artırdığını göstermiştir (**Şekil 3.32.** ve **Çizelge 3.1**). Bu sonuçlara dayanarak zeytin yaprağı metabolitlerinin balıklarda kalp, böbrek ve karaciğer gibi dokulara hasar verici bir etkisinin olduğu söylenebilir. AST düzeyi en yüksek oleuropeinin yüksek dozu ile muamele edilmiş olan grupta tespit edilmiştir (**Şekil 3.32.**). **Oleuropein (OE-1)** ALT enzim düzeyi üzerine anlamlı bir etki sergilemezken kan AST değerlerini yükseltmiştir. Bu verilerden oleuropeinin (**OE-1**) karaciğer üzerine toksik etki göstermediği ancak böbrek, kalp vb. organlar üzerine toksik etkiye sahip olabileceği sonucu çıkarılabilir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Hamed ve ark., 2003; Kalender ve ark., 2005).

Alkalin fosfataz (ALP) enzimi bir hidrolaz enzimi olup nükleotidlerinden, proteinlerden ve alkaloidlerden fosfat gruplarının koparılması tepkimelerini katalizleyen bir enzimdir. Bu enzim alkali (bazik) ortamda fonksiyonel işlemlerini sürdürür. ALP insanlarda kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta tarafından sentezlenir ve safra yoluyla vücuttan dışarı atılır. Kan serumunda bu enzimin düzeyinin artması kemik, karaciğer ve safra yollarında doku hasarı olduğuna işaret etmektedir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Kalender ve ark.,

2005). **Şekil 3.33.** ve **Çizelge 3.1.**'deki araştırma sonuçlarından görüleceği üzere ALP enziminin düzeyi tüm metabolitler ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna göre mukayese edildiğinde genellikle yüksek bulunmuştur. Sadece **oleuropein (OE-1)** ve **oleanolik asitin (OE-3)** yüksek konsantrasyonu ile **maslinik asitin (OE-4)** düşük konsantrasyonu bu enzim üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki sergilememiştir. Bu sonuçlara dayanılarak bu saf metabolitlerin balıklarda kemik, safra yolları ve karaciğer üzerine patojenik etkilerinin olduğu söylenebilir (Nemcsok ve Boross, 1982; Nencsok ve ark., 1987; Cowey ve Walton, 1988; Nemcsok ve Hughes, 1988; Hamed ve ark., 2003; Kalender ve ark., 2005).

Zeytin metabolitleri ile muamele edilen tüm gruplarda glikoz düzeyi kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunmuş olup bu değerlerin tümü istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (**Şekil 3.34.** ve **Çizelge 3.1**). Özellikle **oleanolik asit (OE-3)** ile yapısı belirlenemeyen ve bir trisakkarit olan **OE-2** metaboliti, balıklarda serum glikoz düzeyini kontrol grubuyla kıyaslandığında yaklaşık iki kat artırmıştır (**Şekil 3.20**). Canlılarda kan şekerinin düzenlenmesi bazı hormon ve enzimlerin rol oynadığı karmaşık bir süreç ile gerçekleşir (Jain, 1986; Duncan ve ark., 1994). Şeker metabolizmasındaki en önemli hormon pankreastan salgılanan insülin hormonudur (Kalaycıoğlu ve ark., 2000; Champe ve ark., 2007). Karaciğer canlılarda şeker, yağ ve protein metabolizmasında oldukça önemli bir organdır. Trisakkarit yapılı olan OE-2 metaboliti karaciğerde metabolizmaya uğrayarak kan glikoz düzeyini artırmıştır. Diğer taraftan, özellikle karaciğerin altında bulunan safra kesesi safra salgısı ile canlılarda yağ metabolizmasını düzenler. Karaciğer metabolizması sonrası üretilen maddeler süzülme üzere böbreğe taşınır. Karaciğer, safra kesesi veya böbrek gibi organlarda oluşan doku hasarları şeker, yağ ve protein metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Zeytin yaprağından izole edilen saf metabolitler sözü geçen organlardaki doku hasarının indikatörü olan ALT, AST ve ALP gibi enzimleri değişik oranlarda etkilemiştir. Bu dokularda oluşan hasarlardan dolayı balıklarda şeker metabolizması olumsuz yönde etkilenecek kan glikoz düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek çıkmasına da neden olmuş olabilir (Kalaycıoğlu ve ark., 2000; Champe ve ark., 2007).

Kan plazması ya da serumun biyokimyasal analizi karaciğer ve böbrek gibi iç organlar, proteinler, besleyici ve metabolik parametrelerin yanı sıra elektrolitler hakkında da

araştırmacılara önemli bilgiler sağlamaktadır (Jain, 1986; Duncan ve ark., 1994). Na, Cl, K ve Ca gibi elektrolitler balıkların büyümeleri ve iyon dengeleri için gerekli olan mineraller olup sudan solungaçlar vasıtasıyla alınmaktadır (Eddy, 1982). Dışarıdan alınan farklı ajanlar bu elektrolitlerle etkileşerek balıklarda iyon değişimlerine neden olmaktadır (McDonald ve Wood, 1993). Çizelge 3.2. den görüleceği üzere zeytin metabolitleri kan iyon derişimleri üzerine düzenli bir etki sergilememiştir. Örneğin uygulamalar arasında oleanolic asitin 4g/100 g yem uygulaması tüm iyon değerlerini etkileyerek kontrol grubuna göre iyonların derişimini azaltmıştır ($p<0.05$). Oleuropein, eritrodiol+uvaol ve trisakkarit yapılı OE-2 metaboliti genelde bu iyonların üzerine istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir azaltıcı veya artırıcı etki sergilememiştir. Maslinic asit ile (1g /100 g yem) beslenmiş olan balıklarda kontrol grubuna göre Fe oranı düşük bulunurken, maslinic asitin 4g/100 g yem konsantrasyonu ile beslenmiş olan balıklarda Ca düzeyi kontrol grubuna göre yüksek oranda tespit edilmiştir.

Ekstre ve saf metabolitlerin üç farklı depo zararlısı olan, *S. granarius* (buğday biti), *T.confusum* (kıрма biti, un biti) ve *A.obtectus* (fasülye böceği) erişkinlerine karşı toksik etkileri Erzurum Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Laboratuvar şartlarında beslenen böcekler uygun besi ortamı ile Petri kaplarına 20 erişkin olarak yerleştirildi. Üç farklı konsantrasyonda (2,5 mg, 5 mg ve 7,5 mg/Petri kabı) hazırlanan ekstre ve yeterli miktarda saflaştırılan saf metabolitler petri kaplarına ilave edilerek kapların ağzı kapatıldı. Aynı şartlarda hazırlanan insektisit ilacı DDVP (dichlorvos) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve ekstreler ve saf metabolitlerin toksik etkisi ile mukayese edildi. Ölü böcek sayıları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayılarak kaydedildi ve deney verilerine ANOVA” (LSD ve Duncan testleri) ve “ Probit Regresyon Analizi” testleri uygulanarak istatistiksel olarak analiz edildi. Zeytin yaprağından elde edilen metanol ve etil asetat ekstreleri ile saf metabolitlerin buğday bitine karşı 96. saatteki toksik etkileri % ölüm oranlarına göre grafikler oluşturularak **Şekil 3.35-3.37**'de sunuldu. Bu çizelge ve grafiklerden görüleceği üzere ekstreler ve maddelerin uygulama konsantrasyonu arttıkça üç böcek türüne karşı toksik etkileride genellikle artmıştır. Bu veriler bize ekstre ve metabolitlerin toksik etkilerinin genellikle doza bağlı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan uygulama zamanı arttıkça da ekstreler ile saf metabolitlerin toksik etkileride artmıştır. Diğer taraftan ekstre ve saf metabolitlerin toksik etkileri bir insektisidal olan DDVP

(dichlorvos) den daha düşük oranda bulunmuştur. Ticari insektisit ilacı uygulandığı dozda 48 saat sonra tüm böceklerin ölümüne neden olurken, ekstraler ve saf metabolitler 48 saat sonra genellikle uygulanan böcek türüne ve konsantrasyona bağlı olarak % 13,3-61,7 oranında ölümlerine neden olarak orta derecede toksik etki sergilemiştir. Bu sonuçlar bize zeytin yaprağından elde edilen ekstraler ve saf metabolitlerin depo zararlısı böcekler için insektisit ilacına göre çok daha az toksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Uygulamalar arasında *S. granarius* türüne karşı uvaol+eritrodiol uygulaması dikkat çekmektedir. Bu madde karışımı ilk başlarda diğer maddelere göre toksik değilken 48. saatten sonra toksik etkisi birden artış göstermiş ve diğer maddelerden daha yüksek toksik etki göstermiştir.

Ekstreler ve saf metabolitlerin üç böcek türüne karşı gösterdikleri % ölüm oranları dikkate alındığında ekstraler ve saf metabolitlerin *T. confusum* türüne karşı daha toksik etki gösterdikleri dikkat çekmektedir. Tüm uygulamaların 72 saat sonraki % ölüm oranları dikkate alındığında *S. granarius* için % 21,7-66,7, *A. obtectus* için % 41,7-71,7 oranında ölüm gözlenirken, bu oran *T. confusum* için % 43,3-76,7 olarak belirlenmiştir. Benzer sonuçlar uygulamaların LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri için de tespit edilmiştir (**Çizelge 3.6.**). **Çizelge 3.6.** daki 72 saat sonraki verilere probit analizi uygulanarak elde edilen LC₅₀ değerleri incelendiğinde en düşük LC₅₀ değerlerinin (0,25-4,54 mg/Petri) *T. confusum* türüne karşı olduğu görülmektedir. *A. obtectus* türüne karşı LC₅₀ değerleri incelendiğinde LC₅₀=0,78-3,70 mg/Petri, *S. granarius* türüne karşı ise LC₅₀=2,92-16,73 mg/Petri olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre ekstraler ve uygulamalar en az toksik etkiyi *S. granarius* türüne karşı sergilemiştir. Pozitif kontrol için ise LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri ilk 24. saat için hesaplanmış olup oldukça düşük değerler tespit edilmiştir. *S. granarius* için LC₅₀=0,11 mg/Petri, *T. confusum* için LC₅₀=0,87 mg/Petri ve *A. obtectus* için ise LC₅₀=0,32 mg/Petri olarak hesaplanmıştır. Oldukça düşük olan LC₅₀ değerleri de pozitif kontrol, insektisit ilacının zeytin yaprağı ekstraleleri ve saf metabolitlerine kıyasla çok daha toksik olduğunu ispatlamaktadır.

Üç böcek türüne karşı tüm uygulamaların toksik etkileri kendi aralarında mukayese edildiğinde kullanılan böcek türüne göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Üç böcek türünün erişkinlerine karşı test edilen metanol ve etil asetat ekstralelerinin toksik etkileri mukayese edildiğinde metanol ekstresinin daha toksik olduğu tespit edilmiştir.

Kromatografik çalışma sonuçları bize metanol ekstresinin oleuropein ve yapısı aydınlatılamayan ve bir trisakkarit olduğu tespit edilen OE-2 bakımından zengin olduğunu göstermektedir. Metanol ekstresi oleuropein bakımından zengin bir ekstre dir. Üç böcek türüne karşı metanol ekstresi ile oleuropeinin (OE-1) toksik etkileri mukayese edildiğinde metanol ekstresinin daha toksik olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar metanol ekstresinde oleuropeinin yanı sıra diğer metabolitlerinde toksik etkiyi artırdığına işaret etmektedir. Mevcut çalışmadaki kromatografik ve spektroskopik verilere göre zeytin yaprağından elde edilen etil asetat ekstresi ise oleanolic asit (OE-3), maslinic asit (OE-4), eritrodiol (OE-5) ve uvaol (OE-5) içermektedir. Kromatografik veriler etil asetat ekstresinin daha çok oleanolic asit (OE-3) içerdiğini göstermiştir. Etil asetat ekstresinin toksik etkisi ile oleanolic asit (OE-3) ve maslinic asit (OE-4) metabolitlerinin toksik etkileri mukayese edildiğinde genellikle saf metabolitlerin daha toksik olduğu belirlenmiştir. Bu metabolitler içerisinde en düşük LC₅₀ değerleri ile toksik etkiyi maslinic asit (OE-4) sergilemiştir. Bu veriler göz önüne alındığında etil asetat ekstresinde bulunan metabolitlerin birbirinin toksik etkilerini baskıladığı söylenebilir. Diğer taraftan yeterli miktarda saflaştırılamayan eritrodiol-uvaol karışımı (OE-5) *T. confusum* ve *A. obtectus* türüne karşı toksik etkileri bakımından test edilememiştir. Üç böcek türüne karşı probit analizi ile elde edilen LC₅₀ değerleri incelendiğinde metanol ekstresi için elde edilen LC₅₀ değerleri (*S. granarius*, *T. confusum* ve *A. obtectus* için sırasıyla 3,58 mg/Petri, 0,25 mg/Petri ve 0,78 mg/Petri) etil asetat ekstresi için elde edilen LC₅₀ değerlerinden (*S. granarius*, *T. confusum* ve *A. obtectus* için sırasıyla 16,73 mg/Petri, 4,54 mg/Petri ve 3,70 mg/Petri) daha düşüktür. Bu sonuçlar da metanol ekstresinin etil asetat ekstresine göre daha toksik olduğuna delil oluşturmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Al-azzawi, H.F.S., “Biochemical and biological studies on oleuropein and its hypoglycemic effect”, PhD thesis, Department of Chemistry college of Science of Baghdad University, 2004.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L., Dal Pai Silva, M., Alveas, J.R., 2001. Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution 114, 169-175.
- Amoo, SO., Aremu, AO., Moyo, M., Van Staden, J., 2012. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants BMC Complementary and Alternative Medicine 12, 87-92.
- Amro, B., Aburjai, T., Ai-Khalil, S., 2002. Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. Fitoterapia 73, 456-461.
- Balçı, M., 2000. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim yayınları, Ankara.
- Barnhoorn, I.E.J., Van Vuren, J.H.J., 2004. The use of different enzymes in feral freshwater fish as a tool for the assessment of water pollution in South Africa. Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 180-185.
- Belscak-Cvitanovic, A., Durgo, K., Busic, A., Franekic, J., Komes, D., 2014. Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2). Cells Journal of Medicinal Food 17, 206-217.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, J.A., Rio D., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. Food Chemistry 68, 457-462.
- Bergdahl, I.A., Schütz, A., Gerhardson, L., Jensen, A., Skerfving, S., 1997. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health 23, 359–363.

- Bianco, A., Chiacchio, MA., Grassi, G., Iannazzo, D., Piperno, A., Romeo, R., 2006. Phenolic components of *Olea europea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry* 95, 562-565.
- Bitler, CM., Viale, TM., Damaj, B., Crea, R., 2005. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *Journal of Nutrition* 135, 1475-1479.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., 2012. Lipid and protein oxidation of alpha-linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europea L.*) or alpha-tocopheryl acetate. *Meat Science* 92, 525-532.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Fletouris, D., Iliadis, S., 2013. Olive leaves (*Olea europea L.*) and -tocopheryl acetate as feed antioxidants for improving the oxidative stability of -linolenic acid-enriched eggs *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 740-753.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., Papageorgiou, G., 2014. Effect of olive leaf (*Olea europea L.*) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 227-234.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S., 2011. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 49, 179-184.
- Bouaziz, M., Hammami, H., Bouallagui, Z., Jemai, H., Sayadi S., 2008. Production of antioxidants from olive processing by-products. *EJEAFChe.- Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7, 3231-3236.
- Bucher, F., Hofer, R., 1990. Effect of domestic wastewater on serum enzyme activities of Brown Trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 97C, 385-391.

- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a Practical approach. *Science of the Total Environment* 247, 295–311.
- Castro, S.B.R., Leal, C.A.G., Freire, F.R., Carvalho, D.A., Oliveira, D.F., Figueiredo, H.C.P., 2008. Antibacterial Activity of plant Extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 756-760.
- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, MC., Speroni, E., 2002. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7504-7509.
- Chakraborty, S.B., Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture* 3, 103-119.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2007. *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden; Biyokimya (Çeviri editörü: Ulukaya, E.). Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı, İstanbul.*
- Çoğun, H.Y., Yuzereroglu T. A., Kargin, F., 2003. Accumulation of copper and cadmium in small and large Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 1265-1271.
- Çoğun, H.Y., Kargin, F., 2004. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* 55, 277–282.
- Çoğun, H.Y., Şahin, M., 2012. The effect of zeolite on reduction of lead toxicity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18, 135-140.
- Cowey, C. B., Walton, M. J., 1988. *Intermediary Metabolism in Fish Nutrition* 2nd Edition. Academic Press, San Diego.

- Cumaoglu, A., Rackova, L., Stefek, M., Kartal, M., Maechler, P., Karasu, C., 2011a. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting beta-cells. *Acta Biochimica Polonica* 58, 45-50.
- Cumaoglu, A., Ari, N., Kartal, M., Karasu, C., 2011b. Polyphenolic Extracts from *Olea europea* L. Protect Against Cytokine-Induced beta-Cell Damage Through Maintenance of Redox Homeostasis *Rejuvenation Research* 14, 325-334.
- Davies, S.J., Abdel-Warith, A.A., Gouveia, A., 2011. Digestibility characteristics of selected feed ingredients for developing bespoke diets for Nile Tilapia culture in Europe and North America. *Journal of the World Aquaculture Society* 42(3), 388-398.
- Drew, M.D., Borgeson, T.L., Thiessen, D.L., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology* 138(2), 118-136.
- Duncan, R. J., Prasse, K. W., Mahaffey, E.A., 1994. *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*, 3rd Edition. Iowa State Press, Ames, IA.
- Eddy, F.B., 1982. Osmotic and ionic regulation in captive fish with particular reference to salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 125–141
- Erdik, E., 1998. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*. Gazi Kitapevi Yayınları, (ISBN 975- 7313-0401). Ankara.
- Fernandez-Bolanos, JG., Lopez, O., Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez-Gutierrez, G., 2008. Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties. *Current Organic Chemistry* 12, 442-463.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., Logue, M.W., 2001. *Organik Kimya* (Çeviri editörü. Uyar, T.) Güneş Kitapevi Ltd .Şti .yayınları, Ankara.
- Fistonik, I., Itum, M., Bulat, V., Harapin, M., Fistonik, N., Verbanac, D., 2012. Olive oil biophenols and women's health. *Medicinski Glasnik* 9, 1-9.

- Freccia, A., de Negreiros Sousa, S.M., Meurer, F., Butzge, A.J., Mewes, J.K., Bombardelli, R.A., 2014. Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* 43(1), 1-7.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L., Jeney, Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(4), 669-676.
- Garcia-Granodos, A., Martinez, A., Moliz, J.N., Perra, A., Rivas, F., 1998. 2-a,3-b-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (maslinic acid). *Molecules* 3, M88.
- Ghosh, A., Chowdhury, N., Chandra, G., 2008. Laboratory evaluation of a phytosteroid compound of mature leaves of Day Jasmine (Solanaceae:Solanales) against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) and nontarget organisms. *Parasitology Research* 103(2), 271-277.
- Guinda, A., Pérez-Camino M.C., Lanzón, A., 2004. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 22-26.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.E., Abdalla, A.M., 2003. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist* 23, 313-322.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317(1-4), 1-15.
- Hossain, E., Rawani, A., Chandra, G., Mandal, S.C., Gupta, J.K., 2011. Larvicidal activity of *Dregea volubilis* and *Bombax malabaricum* leaf extracts against the filarial vector *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4, 436-441.
- <http://tibbivearomatikbitkiler.blogcu.com/tibbi-ve-aromatikbitkiler/4232103>(Erişim tarihi: Mart 2016).

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Bitki> (Erişim tarihi: Mart 2016).

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Olea> (Erişim tarihi: Ocak 2016).

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Zeytin> (Erişim tarihi: şubat 2016).

<http://www.bilgiustam.com/turkiyenin-bitki-ortusu/> (Erişim tarihi: şubat 2016).

<http://www.nedir-nedir.com/plato-nedir.html> (Erişim tarihi: şubat 2016).

[http://www.reyhaber.com/yerel-haberler/odemiste-zeytin-agaci-yuzunden-5-kisi-
oldu.html](http://www.reyhaber.com/yerel-haberler/odemiste-zeytin-agaci-yuzunden-5-kisi-
oldu.html) (Erişim tarihi: Ocak 2016).

http://www.tarimkutuphanesi.com/BAKLAGIL_TOHUM_BOCEKLERI_00567.html
(Erişim tarihi: Nisan 2016).

Jain, N.C., 1986. Schalm's Veterinary Hematology, 4th Edition. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, pp. 20-87.

Japon-Lujan, R., Luque-Rodríguez, J., Luque de Castro, M., 2006. Dynamic ultrasoundassisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A* 1108, 76–82.

Kalaycıoğlu, L., Serpak, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2000. *Biyokimya*. Nobel yayın Dağıtım, 2. Baskı, ISBN:975-591-131-6, Ankara.

Kanani, H.G., Nobahar, Z., Kakoolaki, S., Jafarian, H., 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40(2), 481-490.

Kalender, S., Oğutcu, A., Uzunhisarciki, M., Acikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y., Kalender, Y., 2005. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin e on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology* 211, 197–206.

Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A.J., Gonos, ES., 2007. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and

- confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Research* 10, 157-172.
- Khelif, I., Hamden, K., Damak, M., Allouche, N., 2012. A new triterpene from *Olea europea* stem with antidiabetic activity. *Chemistry of Natural Compounds* 48, 799-802.
- Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dadasoglu, F., Dikbas, N., Aydin, T., Kazaz, C., 2014. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae* 172, 210-220.
- Lee, O.K., Lee, B.Y., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology* 101, 3751-3754.
- Lu, C.X., Luo, X.L., Luo, R.F., Chen, X., Xing, L.J., Tang, Z.G., Li, H.M., 2013. Assessment of antibacterial properties and the active ingredient of plant extracts and its effect on the performance of Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio* var. E'erqisi, Bloch). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(4), 902-909.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal* 1(9), 1371-1391.
- Malik, N.S.A., Bradford, J.M., 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae* 110, 274-278.
- McDonald, D.G., Wood, C.M., 1993. Branchial Mechanism of Acclimation to Metals in Freshwater Fish. In *Fish Ecophysiology* (Edited by Rankin, J. C. and Jensen, F. B.). *Fish and Fisheries Series* 9, pp. 297-321, Chapman and Hall, London.
- Metts, L.S., Rawles, S.D., Brady, Y.J., Thompson, K.R., Gannam, A.L., Twibell, R.G., Webster, C.D., 2011. Amino acid availability from selected animal- and plant-

derived feedstuffs for market-size sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture Nutrition* 17(2), E123-E131.

Moghaddam, F.M., Farimani, M.M., Salahvarzi, S., Amin, G., 2006. Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 4(1), 95-98.

Nemcsok, J., Orban, L., Asztalos, B., Vig, E., 1987. Accumulation of pesticides in the organs of Carp (*Cyprinus carpio* L.) at 4 °C and 20 °C. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39(3), 370–378.

Nemcsok, J., Boross, L., 1982. Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta. Biol.* 33, 23-27.

Nemcsok, J., Hughes, G.M., 1988. The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of Rainbow Trout. *Environmental Pollution* 49, 77–85.

Nergiz, C., Engez, Y., 2000. Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chemistry* 69,55-59.

Ocakoglu, D., Tokatli, F., Ozen, B., Korel, F., 2009. Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry* 113, 401-410.

Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., Rattanachaiakunsopon, P., 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(5), 419-424.

Pan, T.S., Yan, M.C., Chen, S.B., Wang, X.P., 2013. Effects of ten traditional Chinese herbs on immune response and disease resistance of *Sciaenops ocellatus* (Actinopterygii: Perciformes: Sciaenidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 43(1), 41-49.

Patumi, M., d'Andria, R., Fontanazza, G., Morelli, G., Giorio, P., Sorrentino, G., 1999. Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea*

- europaea* L.) under different irrigation regimes. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74, 729-737.
- Patumi M., d'Andria R., Marsilio V., Fontanazza G., Morelle G., Lanza B., 2002. Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. Food Chemistry 77, 27-34.
- Peragon, J., 2013. Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 6671-6678.
- Pirarat, N., Rodkhum, C., Ponpornpisit, A., Suthikrai, W., 2012. In vitro efficacy of Red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) extract against Streptococcal bacteria isolated from diseased Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thai Journal of Veterinary Medicine 42(1), 101-105.
- Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. Phytochemistry 77, 10-15.
- Rajendiran, A., Natarajan, E., Subramanian, P., 2008. Control of *Aeromonas hydrophila* infection in spotted snakehead, *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a medicinal plant. Journal of the World Aquaculture Society 39(3), 375-383.
- Reyes, F.J., Centelles, J.J., Lupianez, J.A., Cascante, M., 2006. (2 alpha,3 beta)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. FEBS Letters 580 , 6302-6310.
- Reyes-Zurita, F.J., Rufino-Palomares, E.E., Lupianez, J.A., Cascante, M., 2009. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. Cancer letters 273, 44-54.
- Saglamtimur, B., Cicik, B., Erdem, C., 2003. Effects of different concentrations of Cu alone and Cu+Cd mixture on the accumulation of Cu in the gill, liver, kidney and muscle tissues of *Oreochromis niloticus*. (In Turkish). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 27, 813-820.

- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y.H., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 2007. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55, 784-788.
- Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., Kallel, H., 2008. α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry* 108, 833-839.
- Salas, J.J., Williams, M., Harwood, J.L., Sanchez, J., 1999. Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 76, 1163-1168.
- Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobsteinc, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., Saladin, R., 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 793-798.
- Silva, M.G.V., Vieira, I.G.P., Mendes, F.N.P., Albuquerque, I.L., dos Santos, R.N., Silva, F.O., Morais, S.M., 2008. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from Northeastern Brazil. *Molecules*, 13, 2482-2487.
- Solomons, T.W.G., 1990. *Fundamentals of Organic Chemistry*. (3th. Editörü), John Wiley & Sons, Inc. Yayınları, USA.
- Somova, L.I., Shode, F.O., Mipando, M., 2004. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine* 11, 121-129.
- Somova, L.I., Shodeb, F.O., Ramnanana, P., Nadara A, 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africanaleaves. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 299-305.
- Stiti, N., Hartmann, M.A., 2012. Nonsterol triterpenoids as major constituents of *Olea europaea*. *Journal of Lipids*, article ID 476595, 13 pages.

- Tanahashi, T., sakai, T., takenaka, Y., Nagakura, N., chen, C.C., 1999. Structure elucidation of two secoiridoid glucosides from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* (L.) Kobuski. Chemical and pharmaceutical Bulletin 47, 1582-1586.
- Tanker, M., Sakar, M.K., 1991. Fitokimyasal Analizler. Hacetepe Üniv. Eczacılık Fak. Yay., Ankara.
- Tokusoglu O., Bozoglu F.T., 2010. Citrinin risk in black and green table olives : Simultaneous determination with ochratoxin-a by optimized extraction and IAC-HPLC-FD. Italian Journal of Food Science 22, 284-291.
- Trosvik, K.A., Rawles, S.D., Thompson, K.R., Metts, L.A., Gannam, A., Twibell, R., Webster, C.D., 2012. Growth and body composition of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fry fed organic diets containing yeast extract and soybean meal as replacements for fish meal, with and without supplemental lysine and methionine. Journal of the World Aquaculture Society 43, 635-647.
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D., Serraiocco, A., 2007. Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europea* L.) and correlations with oxidative stability. Scientia Horticulturae 112, 108-119.
- Turker, H., Takemura, A., 2011. Effects of environmental contaminants and natural substances on Vitellogenesis in Tilapia primary hepatocytes. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 11(4), 539-545.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant Drug Analyses. 2nd ed., Springer, 58, p. 204.
- Verma, V.K., Rani, K.V., Sehgal, N., Prakash, O., 2013. Immunostimulatory effect of artificial feed supplemented with indigenous plants on *Clarias gariepinus* against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 35, 1924-1931.
- Zia, A., Aslam, M., Naz, F., Illyas, M., 2011. Bio-efficacy of some plant extracts against chickpea beetle, *Callosobruchus chinensis* Linnaeus (Coleoptera: Bruchidae) attacking chickpea. Pakistan Journal of Zoology 43, 733-737.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet KISA

Doğum Yeri : KİLİS

Doğum Tarihi : 06.06.1990

E posta : ahmetkisa79@hotmail.com

Yabancı Dili : İngilizce

Lisans : Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen-Ede Fak. Kimya Bölümü 2010-2013 , KİLİS

Yüksek Lisans : Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı 2014-2016 , KİLİS

Diğer : Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Biochemistry and Biotechnologies department , 2013 , KAUNAS/Lithuanian– Erasmus+