

İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) Meyve ve Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Özellikleri

Serap Berктаş  ✉, Mustafa Çam 

Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

Geliş Tarihi (Received): 16.05.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 10.10.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): berktaserap@gmail.com.tr (S. Berктаş)

☎ 0 352 207 66 66-32757 📠 0 352 437 57 84

ÖZ

Bu çalışma *Elaeagnus angustifolia* L. (iğde) meyve ve yapraklarının antioksidan ve antidiyabetik etkilerini belirlemek ve karşılaştırmak için gerçekleştirilmiştir. Metanol:su (1:1, v/v) ile yapılan iğde meyve ve yaprak ekstraktlarının toplam fenolik, toplam flavonoid ve tanen içerikleri, antioksidan aktiviteleri (DPPH ve ABTS metotları) ve α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Ayrıca ekstraktlarda lipaz inhibisyonu aktivitesi tayini de gerçekleştirilmiştir. İğde meyve ve yapraklarının α -glukozidaz enzimini %50 oranında inhibe ettikleri değerler (IC50) sırasıyla 17.11 μ g/mL ve 124.7 μ g/mL olarak tespit edilirken, α -amilaz enzimini sadece meyvenin inhibe ettiği (21.95 mg/mL) ve hem meyve hem de yaprakların lipaz inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Meyve ve yaprakların ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri incelendiğinde meyvenin biyoaktif içeriğinin yaprağına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). İğdenin meyve ve yapraklarının içerdiği biyoaktif bileşikler sayesinde göstermiş olduğu antidiyabetik aktivitenin *in vitro* çalışmalar sonrası elde edildiği göz önüne alındığında, iğdenin özellikle de meyve kısmının tip 2 diyabet rahatsızlıklarının doğal yoldan tedavisinde destekleyici yönünün olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Elaeagnus angustifolia* L., İğde, Biyoaktivite, Antidiyabet, Tanen

Antioxidant and Antidiabetic Properties of Oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) Fruits and Leaves

ABSTRACT

This study was carried out to determine the antioxidant and antidiabetic activities of *Elaeagnus angustifolia* L. (oleaster) fruits and leaves. The total phenolic, total flavonoid and tannin contents, antioxidant activities (DPPH and ABTS methods), and inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase enzyme were investigated in the oleaster fruit and leaf extracts obtained with methanol:water (1:1, v/v). In addition, lipase inhibition activity was determined in these extracts. The values in which the fruit and leaves of oleaster inhibit the α -glucosidase enzyme by 50% (IC50) were determined as 17.11 μ g/mL and 124.71 μ g/L, respectively. Neither fruits nor leaves displayed a lipase inhibition activity. In terms of the phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant activity values of the extracts of fruits and leaves, the bioactive content of fruits was significantly higher than that of leaves ($p<0.05$). Considering *in vitro* antidiabetic activities of the fruits and leaves of oleaster, the consumption of these natural extracts may have a potential for the treatment of type 2 diabetes.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia* L., Oleaster, Bioactivity, Antidiabetics, Tannin

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkilerin bazı terapötik özelliklere sahip olmaları onların geleneksel kullanımlarını yaygınlaştırarak bu bitkileri alternatif bir ilaç olarak öne çıkarmaktadır. Bitkilerin çiçek, yaprak ve kök gibi kısımlarından infüzyon veya kaynatma yoluyla hazırlanan çaylar gastrointestinal hastalıklar ve tip 2 diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır [1]. Bitkilerde bulunan antioksidanların diyabeti önleme ve kontrol etmede kayda değer etkilerinin olacağı ve dünya çapında yaklaşık 800 bitkinin antidiyabetik özellikler sergilediği belirlenmiştir [2]. Birçok çalışmada, bitkilerin biyoaktif bileşikleri ve pankreatik α -amilaz inhibitör etkileri neticesinde Diabetes mellitus'un tedavisinde umut vaat ettiğini bildirilmiştir. Ayrıca, bitkilerin karbonhidrat sindirim enzimi inhibitörleri olarak diyabeti kontrol ettiği ve ilaçlardan daha az olumsuz etki (örneğin karaciğer problemleri, yüksek dozlarda hipoglisemi, vb.) göstereceği ifade edilmiştir [3]. Bireysel fenoliklerin veya fenolik sınıflarının antioksidan aktivitelerinden bağımsız olarak anahtar enzimlerin aktivitelerini doğrudan etkileyerek, diğer yararlı etkilere neden olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır [4]. Yabanmersini ve frenk üzümü [4], mürver ve boysenberry [5] gibi bazı meyvelerdeki fenoliklerin antidiyabetik özellikler sergilediği gösterilmiştir.

İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) genellikle küçük kırmızımsı-kahverengi, 1.5-2 cm uzunluğunda elips şeklinde meyvelere ve keskin uçlu kısa saplı uzun eliptik yapraklara sahiptir [6, 7]. Zeytin ağacına benzediğinden dolayı Rus zeytini, yabani zeytin ya da en yaygın kullanımı olan ve İngiliz dilinde oleaster olan iğde adı ile de bilinmektedir. Elaeagnaceae (Araliaceae) familyasına üye olan *Elaeagnus* cinsine ait yaprak dökken, dalları gümüş yeşili olan ve genellikle 2-7 m yüksekliğinde büyük çalı türü bir bitkidir [6, 8]. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'nın bazı kısımlarının yarı tropik bölgelerinde geniş bir coğrafi yayılım gösteren *Elaeagnus*' un 90'dan fazla türü bulunmaktadır. Bu tür birçok Avrupa kentinde süs ağacı olarak kullanılmasına rağmen, Orta ve Doğu Anadolu'da yenilebilir meyveleri için yaygın olarak yetiştirilmektedir [9]. Bununla birlikte, kök, ağaç kabuğu, çiçek, yaprak ve meyve gibi bitkinin tüm kısımları tıbbi özelliklere sahiptir ve gıda, ilaç, parfümeri endüstrileri gibi farklı kullanım alanları bulunmaktadır [8].

Rusya'da, *E. angustifolia* (Rus zeytini) çok şifalı bir bitki olarak bilinmekle birlikte değerli terapötik özellikleri sayesinde birçok Asya ve Trans-Kafkasya ülkesinin geleneksel tıbbında kullanılmıştır [10]. Yerel türlerin meyve, çiçek, yaprak ve kabuklarının dekoksionları ve infüzyonları çeşitli hastalıkların ve semptomların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin çiğ ya da pişmiş meyvesinin ve çiçeklerinin infüzyonlarının mide bulantısı, tetanoz, öksürük, soğuk algınlığı, ateş, bulantı, kusma, sarılık, astım, diyare ve diğer semptomların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir [11]. İranlılar geleneksel olarak iğde meyvelerini eklem iltihabından muzdarip hastalar için ağrı kesici olarak kullanırken, çiçeklerini tetanoz tedavisinde kullanmışlardır. Türkiye' de kullanılan tıbbi

bitkilerden birisi olan iğdenin çiçekli dallarından dekoksion ile elde edilen çayın Balıkesir ili Gönen ilçesinde diyabetin tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığı bilinmektedir [2]. Bununla birlikte, yine geleneksel olarak bitkinin meyvesi diüretik, tonik, antipiretik, antidiarreal ve böbrek rahatsızlıklarında kullanılmaktadır [12, 13].

İğde bitkisi flavonoid bileşikler, polisakkaritler, sitosteroller, karotenoidler, kardiyak glikozitler, terpenoidler, kumarinler, fenol karboksilik asitler, aminoasitler, saponinler, karotenoidler, vitaminler ve tanenleri içermektedir. İğde meyveleri proteinler, şekerler, vitaminler (tokoferol, C vitamini, karoten, thiamine B1) ve mineraller (kalsiyum, magnezyum, potasyum (8504 mg/kg), sodyum (1731 mg/kg), fosfor (635 mg/kg), demir ve manganez) ve linoleik asit, palmitoleik asit, palmitik asit, fosfolipitler, glikolipitler ve beta-sitosterol gibi bileşiklerce zengindir [6, 14, 15, 16]. Kök, kök kabuğu, dalları, gövde kabuğu ve yaprakları ise demir, kurşun, bakır, kadmiyum, çinko, krom, nikel ve kobalt içermektedir [6, 7]. Yapılan bir çalışmada iğde meyve yağının sabunlaşmayan kısmında 9.8 mg/100 g karotenoid ve 36.5 mg/100 g tokoferol içerdiğini tespit etmişlerdir [17]. GC-MS ile yapılan analizlerde C16-C34 alkanlar, steroidler ve tokoferollerine içine alan yaklaşık 50 sabunlaşmayan bileşik teşhis edilmiştir [17]. Genotip, iklim şartları ve toprak kompozisyonu farklılıkları bileşimde farklılıklara sebep olmakla birlikte *E. angustifolia* meyvelerinde laurik, tridekanoik, miristik, pentadekanoik, palmitik (%34.31), palmitoleik, heptadekanoik, linoleik, linolenik, oleik (%26.23), lignoserik (%17.47), stearik, eikosanoik ve dokosanoik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Meyve kabuğunda ise palmitoleik asidin bolluğu ve tohumlardaki linoleik ve palmitik asidin yüksek miktarı da rapor edilmiştir [16, 18]. Yapılan bir çalışmada iğde meyvelerinin önemli elementleri, polifenolik içerikleri ve antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır [9]. Başka bir çalışmada ise kurutulmuş iğde meyvesi ununun zengin besinsel içeriği sebebiyle fonksiyonel bir bileşik olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [19]. İğdenin çeşitli kısımlarının yüksek biyoaktif içeriği ile birlikte önemli biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirtilmiştir [20]. Bununla birlikte, bitkinin meyvesinin çeşitli ürünlere katılarak ürünlerin farklı yönlerden desteklenmesi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir [19, 21]. Yapılan bir çalışmada iğdenin çiçek ve yapraklarının yüksek miktarda fenolik ve flavonoid bileşikleri içerdiğini belirlemişlerdir [7]. Bir diğer çalışma ise iğde meyvesinin ve tohumunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur [22]. Son çalışmalar iğdenin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser özelliklerine işaret etmektedir [6]. Ayrıca, iğdenin meyve polifenollerinin konsantrasyonuyla üretilen pshatin adı verilen bir ilaç, uzun yıllar Ermenistan'da kolit ve diğer GI sistem hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır [10].

İğdenin farklı kısımlarının kompozisyonlarının araştırıldığı çalışmalara literatürde sıkça rastlanmaktadır [6, 7, 9, 20]. Ancak iğdenin özellikle sindirim enzimlerinin inhibisyonu yoluyla antidiyabetik aktivite sergilediğine dair veriler birkaç çalışma ile sınırlı bulunmaktadır [23]. Türkiye'nin birçok yerinde doğal olarak yetişen ve

iğdenin meyve, yaprak veya diğer kısımlarının kullanım alanlarının tarım ve gıda endüstrisinde sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu değerli bitkinin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, önemli biyoaktif içeriğe sahip iğde meyve ve yapraklarının in vitro tekniklerle antioksidan aktivite ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Materyali

E. angustifolia'nın yaprak ve meyveleri 2019 yılında meyve hasat döneminde (Eylül ayı) Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi bahçesinde yer alan tek bir iğde ağacından toplanmıştır. Toplanan meyve ve yapraklara herhangi bir kurutma işlemi uygulanmadan ve meyvenin kabuk kısmı geri kalanından çıkarılmayarak çekirdeksiz taze halde analiz edilmiştir. Örnekler analizler gerçekleştirilene kadar kilitli poşetlerde -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar

Kimyasallar analitik standartta olup temin edildikleri yer ve kodları şöyledir: Folin (1.09001.0500 Merck, Almanya), gallik asit (G7384 Sigma-Aldrich, Almanya), DPPH (D9132 Sigma-Aldrich), Trolox (238813 Sigma-Aldrich, Danimarka), ABTS (A1888 Sigma-Aldrich, Çin), quercetin (Q4951 Sigma-Aldrich, Almanya), L-glutatione (G4251 Sigma-Aldrich, Japonya), 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (N1377 Sigma-Aldrich, İsviçre), α -glukozidaz from *S.cerevisiae* (G0660 Sigma-Aldrich, Almanya), tannik asit (T0125 Sigma, Almanya), epikateşin (E1753 Sigma-Aldrich, ABD), α -amilaz (A3176-1MU Sigma, ABD), 3,5-dinitrosalisilik asit (D0550-25G Sigma, Hindistan), tris (hydroxymethyl)aminomenhane (1.08387.0500 Merck, Germany), triton (93427-6X10mL, Merck, İsviçre), lipaz (L3126 Sigma-Aldrich, ABD).

Ekstraktların Hazırlanması

10' ar gram taze iğde meyve ve yaprağı bir havan yardımıyla tamamen homojen bir hale geldiğinden emin oluncaya kadar ayrı ayrı homojenize edilerek, 100 mL metanol-su (%50-50) ile 40°C'de çalkalamalı su banyosunda (NÜVE ST30, Türkiye) 30 dakika boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroalkolik ekstraktlar filtre kağıdından (Whatman no:1) süzülerek analizleri gerçekleştirinceye kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir [24].

Toplam Fenolik İçeriği

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir [25, 26]. Folin-Ciocalteu reaktifi distile su ile 10 kat seyreltilerek 2 mL reaksiyon tüplerine alınmıştır. Üzerine uygun oranlarda seyreltilen ekstraktlardan 0.1 mL eklenmiştir. Daha sonra 1.6 mL %7.5' lik Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek analiz tüpleri karıştırılmış ve reaksiyonun gerçekleşmesi için 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Kör çözelti için örnekle aynı miktarda distile su kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda 765 nm de spektrofotometrede (SHIMADZU UV 1800, Japonya) örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak verilmiştir.

Toplam Flavonoid İçeriği

Toplam flavonoid miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir [27]. 4 mL distile su reaksiyon tüplerine alınmış ve üzerlerine seyreltilmiş örneklerden 1 mL eklenmiştir. 0.3 mL %5' luk NaNO_2 çözeltisinin eklenmesinin ardından 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından tüplere 0.3 mL %10' luk AlCl_3 çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika sonra 1 mL 1M NaOH çözeltisi eklenerek son hacim 10 mL ye distile su ile tamamlanmıştır. Kör çözelti için 1 mL distile su kullanılmıştır. Reaksiyon tüplerindeki örneklerinin absorbans okumaları 510 nm'de spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar hazırlanan kateşin standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak mg kateşin eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak belirtilmiştir.

Antioksidan Aktivite Tayinleri

DPPH serbest radikali kullanılarak antiradikal aktivite tayini gerçekleştirilmiştir [28]. 6.25 mg DPPH tartılarak 250 mL metanolde çözündürülmüştür. Hazırlanan radikal çözeltiden 3.9 mL tüplere alınmış ve üzerine seyreltilen ekstraktlardan 0.1 mL eklenmiştir. Tüpler karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kontrol örnekleri için ekstrakt yerine 0.1 mL distile su, kör çözelti için ise metanol kullanılmıştır. Süre sonunda 515 nm de spektrofotometrede örneklerin okumaları gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Trolox standardına karşılık inhibisyon eğrisi çizilerek elde edilen lineer denklemden faydalanılarak sonuçlar mg Trolox eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak belirtilmiştir.

ABTS radikali kullanılarak gerçekleştirilen antioksidan aktivite tayininde de spektrofotometrik metot kullanılmıştır [29]. 12.25 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ile 12-16 saat karanlıkta inkübe edilerek hazırlanan ABTS radikal çözeltisi, tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile 734 nm de 0.68-0.72 abs verecek şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş radikalden 2 mL alınarak mikroküvete aktarılmış ve üzerine yine PBS ile seyreltilmiş ekstraktlardan 20 μL eklenmiştir. Kontrol örnekleri için 20 μL PBS kullanılmıştır. 6 dakika karanlıkta inkübasyonun ardından spektrofotometrede 734 nm de örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Trolox standardına karşılık çizilen inhibisyon eğrisinden faydalanılarak mg Trolox eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Kondense Tanen ve Toplam Hidroliz Olabilen Tanen İçeriği

iğde taze meyve ve yapraklarının metanol-su karışımı ile alınan ekstraktlarında kondense tanen analizi gerçekleştirilerek epikateşin eşdeğeri cinsinden

hesaplanmıştır [30]. Bunun için 5 mL seyreltilmiş ekstrakt alınarak azot akımı altında çözücü uzaklaştırılmış ve 5 mL metanol eklenmiştir. Hazırlanan bu ekstraktan 1 mL alınarak üzerine %1' lik vanillin çözeltisinden 2.5 mL eklenmiştir. Daha sonra metanolde hazırlanan %25'lik H₂SO₄ çözeltisinden 2.5 mL eklenerek reaksiyon tüpleri 30°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları spektrofotometrede 500 nm'de okunmuştur. Kör çözelti için ekstrakt yerine aynı miktarda metanol kullanılmıştır.

Toplam hidroliz olabilen tanen miktarının belirlenmesi için seyreltilmiş ekstraktlardan 1 mL alınarak üzerine 5 mL %2.5'lik KIO₃ çözeltisi eklenmiştir. 25°C'de 2 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede 550 nm de absorbans okuması yapılmıştır. Kör çözeltilerin hazırlanması için ekstrakt yerine aynı miktarda saf su kullanılmış ve sonuçlar tannik asit eşdeğeri cinsinden verilmiştir [31].

Alfa Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi

Ekstraktların α-glukozidaz inhibisyon aktiviteleri spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar IC₅₀ olarak ifade edilmiştir [4].

37°C'de ve 6.8 pH'da gerçekleştirilen inhibisyon aktivite tayini için belirli konsantrasyonlarda seyreltilen ekstraktlardan 50 µL alınarak üzerine 67 mM potasyum fosfat tamponundan (pH 6.8) 1250 µL eklenmiştir. Ardından 50 µL 0.4 ünite/mL konsantrasyonlu soğuk tamponda hazırlanan α-glukozidaz enzim çözeltisi eklenmiştir. Üzerine 125 µL 10 mM p-nitrofenil α-D-glukozit eklendikten sonra reaksiyon tüpleri 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 100 mM sodyum karbonat çözeltisinden 2 mL eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 400 nm de spektrofotometrede örneklerin absorbans değerleri okunmuştur. Kontrol örneği için 50 µL, kör için ise 100 µL deiyonize su kullanılmıştır. Ayrıca kör örneği için enzim kullanılmamıştır. Enzimin %50'sini inhibe eden meyve ve yaprak konsantrasyonu IC₅₀ olarak ifade edilmiştir.

Alfa Amilaz İnhibisyon Aktivitesi

Alfa-amilaz inhibisyon aktivitesi denemesi sonrası enzimin %50'sini inhibe eden miktar IC₅₀ olarak ifade edilmiştir [4].

Seyreltilmiş iğde meyve ve yaprak ekstraktlarından 0.25 mL reaksiyon ortamına alınarak üzerine %1 lik nişasta solüsyonundan 0.25 mL eklenmiştir. 1 ünite/mL konsantrasyonlu α-amilaz solüsyonundan 0.25 mL eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından renk solüsyonundan (sodyum potasyum tartarat ve 3.5-dinitrosalisilik asit solüsyonları ile hazırlanan) 0.25 mL eklendikten ve 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra örnek tüpleri oda sıcaklığına soğutulmuştur. 3 mL distile suyun eklenmesinin ardından 540 nm'de spektrofotometrede absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir.

Lipaz İnhibisyonu Aktivitesi

Örneklerin lipaz inhibisyon aktivite değerlendirmeleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak test edilmiştir [4]. 100 mM tris tampon çözeltisinden (pH=8.2) 800 µL reaksiyon tüplerine alınarak üzerine 300 µL tampon çözeltide hazırlanan enzim çözeltisi (10 mg/mL) eklenmiştir. Daha sonra seyreltilmiş ekstraktan 100 µL, substrattan (%0.03'lük p-nitrofenil-laurat) 800 µL eklenerek reaksiyon tüpleri 37°C'deki su banyosuna yerleştirilerek 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 400 nm'de spektrofotometrede örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Kontrol örneği için ekstrakt yerine aynı miktarda saf su, pozitif kontrol için orlistat kullanılmıştır. Kör örnekleri için ise enzim çözeltisi kullanılmamıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Şikago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin tüm verileri Student t testine tabi tutularak ortalamalar arasındaki fark p<0.05 anlamlılık düzeyinde belirlenmiştir.

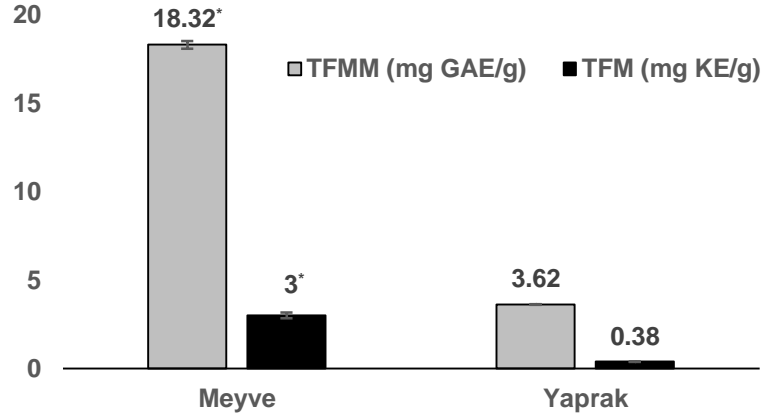
BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplam Fenolik (TFMM) ve Toplam Flavonoid (TFM) Madde Miktarları

Metanol:su (1:1) ile ekstrakte edilen iğde meyve ve yapraklarının toplam fenolik ve toplam flavonoid sonuçları incelendiğinde iğde meyvelerinin TFMM (18.32 mg GAE/g) ve TFM (3.00 mg KE/g) değerlerinin yaprak değerlerine göre anlamlı (p<0.05) şekilde daha yüksek olduğu (Şekil 1) belirlenmiştir. Birçok fenolik ve flavonoid maddeler bitkilerin yaprak, meyve, çiçek ve tohumları gibi çeşitli kısımlarında bulunarak biyoaktif özelliklerine katkıda bulunurlar. İkincil metabolitler olarak bilinen bu biyoaktif özellikli bileşikler alkaloidler, flavonoidler, tanenler ve saponinleri de içine alan ve bitkinin savunma mekanizması sonucu üretilen metabolitlerdir [32]. İklim, toprak ve yükselti gibi ekolojik şartlar bitkilerin ikincil metaboliti olan fenolik maddelerin içeriğini etkilemektedir. Ayrıca, bitkilerin tür içi farklılıkları hatta varyeteleri incelendiğinde de farklı seviyelerde biyoaktif içerik ve miktara sahip oldukları bilinmektedir. İki farklı türdeki (Mashhad ve Fariman) iğde yapraklarının fizikokimyasal özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada etanolik ve metanolik ekstraktlarının TFMM ve TFM değerleri sırasıyla 10.91 (Fariman)-7.78 (Mashhad) mg GAE/100 g ve 5.80 (Fariman) -3.34 (Mashhad) mg QE/100 g olarak tespit edilmiştir [7]. Benzer şekilde kurutulmuş formdaki iğde yapraklarının metanol (%70) ile ekstraktlarının hazırlandığı bir çalışmada ise TFMM ve TFM değerleri sırasıyla 82.64 mg GAE/g ve 33.24 mg RUE/g olarak belirlenmiştir [33]. Bir diğer çalışmada iğde meyvesinin pulp ve kabuk kısımlarının su, aseton ve metanol ile ayrı ayrı ekstraktlarının alınması sonucu 558.52 mg GAE/100 g TFMM değeri ile sulu ekstraksiyonun test edilen numuneler için metanol ve aseton ekstraksiyon prosedürlerine kıyasla antioksidan kapasiteyi ve toplam fenolikleri belirleme konusunda çok daha efektif olduğu tespit edilmiştir [9]. Bununla birlikte,

önceki çalışmalar incelendiğinde fenolik içeriğinin bitkinin farklı bölümleri arasında bile anlamlı şekilde değişebileceği belirtilmiştir [34, 35]. Yapılan çalışmalar elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında sonuçlar arasında önemli varyasyonlar görülmektedir. Bitkinin kuru veya yaş formda olması, kullanılan solventin türü, sonuçların verildiği eşdeğer fenolik bileşik ve ekstraksiyon koşulları gibi parametrelere bağlı olarak sonuçlarda varyasyonlar oluşabilmektedir. Bununla

birlikte, bu bileşiklerin kimyasal yapıları ve ekstraksiyona olan hassasiyetleri değişken olduğundan farklı solvent ekstraksiyonları farklı tipte bileşiklerin ekstrakta geçmesini sağlayacaktır. Yapılan çalışmalarda, böylesi alkolle elde edilen ekstraksiyonların bu tür bileşiklerin ekstrakta edilmesini sağlayarak daha fazla antioksidan özelliğın ortaya çıkmasına katkı sağlayacağı belirtilmektedir [36].

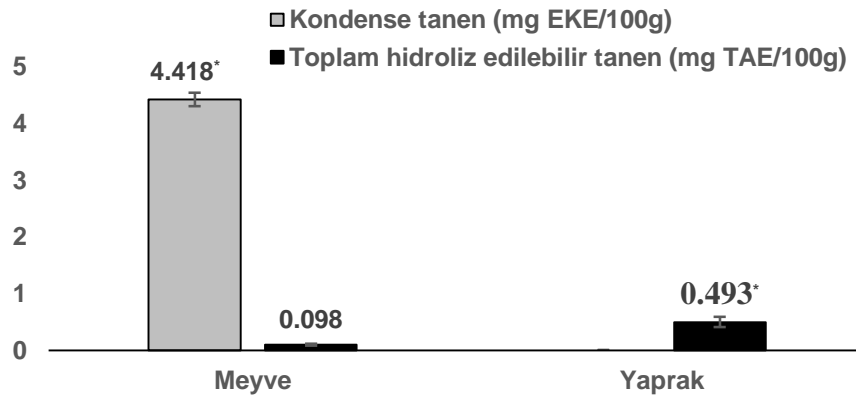


Şekil 1. İğde meyve ve yapraklarının toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri (¹GAE: gallik asit eşdeğeri, KE: kateşin eşdeğeri, ²Şekil üzerinde gösterilen veriler analiz sonuçlarını, hata barları ise standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve şekil üzerinde "*" işareti ile belirtilmiştir.)

Kondense ve Hidroliz Olabilen Tanen Miktarları

İğdenin biyolojik özelliklerine katkı sağlayan aktif bileşiklerden bir diğeri de tanenlerdir. Tanenler hidroliz olabilen ve kondense tanen olarak iki grupta incelenmektedir. Hidroliz olabilen tanenler gallik asitin ve heksahidroksi difenik asitin esterlerinden meydana gelirken, kondense tanenler polihidroksi flavan-3-ol türevleridir [31]. İğde meyve ve yapraklarının tanen

sonuçları incelendiğinde meyvedeki kondense tanen içeriğinin yaprağa göre yüksek olduğu hatta yaprakta tespit edilemediği, hidroliz olabilen tanen içeriğinin ise yaprakta daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Elde edilen toplam fenolik, flavonoid ve tanen içeriği sonuçları da göz önüne alındığında iğde meyve ve yapraklarının daha çok fenolik asitlerce zengin olduğu sonucuna varılabilir.

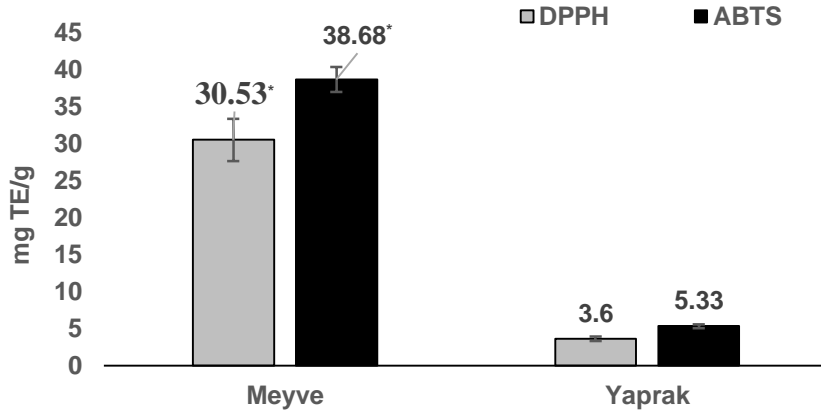


Şekil 2. İğde meyve ve yapraklarının kondense tanen ve toplam hidroliz edilebilir tanen içerikleri (¹EKE: (-) epikateşin eşdeğeri, TAE: tannik asit eşdeğeri, ²Şekil üzerinde verilen değerler ortalama \pm standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve fark şekil üzerinde "*" işareti ile belirtilmiştir.)

Antioksidan Aktivite Değerleri

Bitkiler içerdikleri aktif bileşikler sayesinde birçok biyoaktif özellikler sergilemektedir. Bu bileşiklerden olan fenolik bileşikler sahip oldukları hidroksil grupları sebebiyle elektron ve serbest radikal süpürücü aktivite veya hidrojen atomu verme özelliğine sahiptir. Dolayısıyla, fenolik bileşikler antioksidan aktiviteye doğrudan katkı sağlayabilir [37]. Bu çalışmada bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemede yaygın olarak kullanılan yöntemlerden ikisi olan DPPH ve ABTS metotları örneklerin antioksidan aktivitelerini tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. DPPH metodu radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesinde basit, hızlı ve stabil bir yöntem iken [28], ABTS metodu hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidan bileşiklerin aktivitesini belirlemede etkin bir yöntemdir [29]. Hem ABTS hem de DPPH metotlarından elde edilen antioksidan aktivite sonuçları değerlendirildiğinde aynı bitkinin farklı kısımlarının ekstraktları için önemli ölçüde farklı antioksidan etkiler gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Buna göre meyve ekstraktlarının yaprak ekstraktlarından daha yüksek aktivite sergilediği görülmektedir (Şekil 3). Fenolik maddelerin iğdenin yaprağından çok meyvesinde yoğunlaşması sebebiyle daha güçlü antioksidan aktivite sergilemesine katkı sağlamıştır. Ancak her zaman antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriği arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmeyebilir. Bitkinin antioksidan aktivitesine katkı sağlayan sadece fenolik bileşikler değildir. Bununla birlikte, tokoferoller, pigmentler, C vitamini, karotenoidler ve flavonoidler de

antioksidan aktiviteden sorumludur [38, 39]. İğdenin farklı bölümlerinin antioksidan aktivite değerlerinin incelendiği bir çalışmada, bitkinin yaprak kısmının ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri 0.385-1.955 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS) ve 0.713-1.620 $\mu\text{g TE/g}$ (DPPH) olarak tespit edilirken, meyve kısmının aktivitesi 0.031-4.642 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS) ve 1.109-4.450 $\mu\text{g TE/g}$ (DPPH) olarak belirlenmiştir [20]. Çalışmamızdaki antioksidan aktivite sonuçları yaprak değerlerinin meyve değerlerinden düşük bulunması açısından bu çalışmanın bulguları ile uyumludur. Ancak, tespit ettiği değerler bizim sonuçlarımızdan oldukça düşük görünmektedir. Bu farklılık ekstraksiyon koşulları ve bitki materyalinin fiziki durumundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca iğde meyvesinin dış kabuğunun ayrılmadan ekstraksiyon işlemine dahil edilmesi ile de antioksidan aktiviteye ayrıca katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Sonuç olarak meyvenin antioksidan kapasitesi kullanılan antioksidan aktivite yöntemine bakılmaksızın her durumda yaprağından daha üstün bulunmuştur. Diğer yandan, antioksidan aktiviteden sorumlu fonksiyonel gruplar bitkinin farklı kısımlarında çeşitli oranlarda bulunabilmektedir. Bu durum için türlerdeki popülasyon varyasyonları ve bitkinin farklı kısımlarının ışığa erişilebilirlik derecelerinin farklı olmaları gibi çeşitli faktörler vardır. Ek olarak, fonksiyonel grupların aynı yönenin farklı bölgelerinde yetişen aynı bitki kısımlarındaki dağılımı bile farklı olabilir. Dolayısıyla, fenolik bileşiklerin miktarı ve aktivitesi olgunluk derecesine ve ışık alma durumuna da bağlıdır [40].



Şekil 3. İğde meyve ve yapraklarının antioksidan aktivite değerleri (¹TE: Trolox eşdeğeri, ²Şekil üzerinde gösterilen veriler analiz sonuçlarını, hata barları ise standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve şekil üzerinde “*” işareti ile belirtilmiştir.)

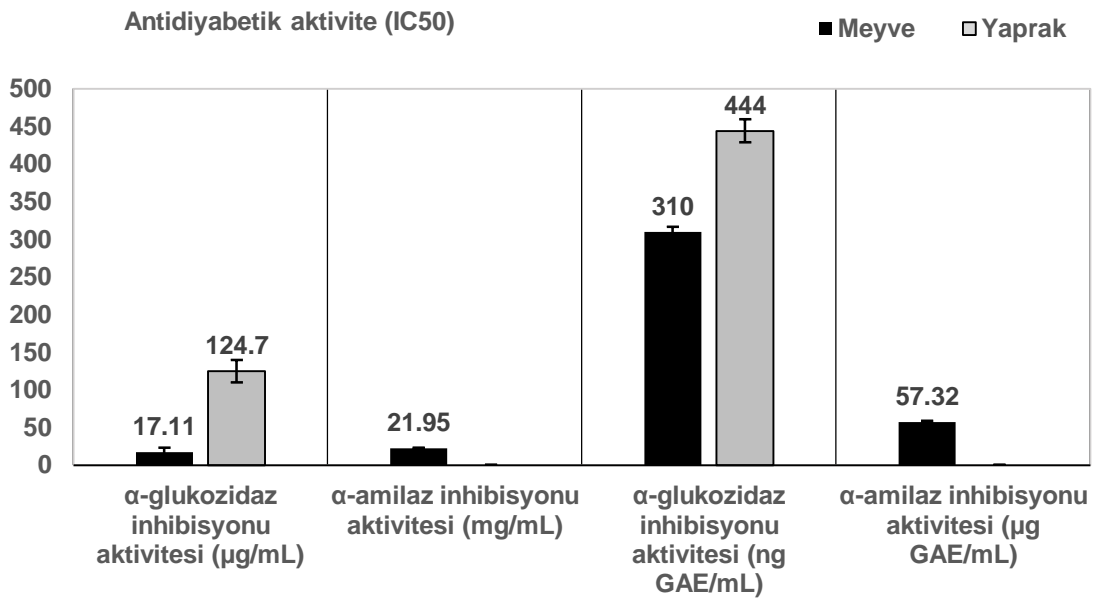
Antidiyabetik Aktivite Değerleri

Bitkiler ve ürünleri dünya çapında yaygın hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için yeni bir çağ açmaktadır. Bu nedenle *E. angustifolia* L.'nin tip 2 diyabet rahatsızlığında önemli olan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerine inhibe edici etkileri bu çalışmada değerlendirilmiştir. Bu amaçla iğdenin taze meyve ve yapraklarından metanol:su ekstraktları hazırlanarak α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerindeki inhibe edici

etkileri belirlenmiştir. Test edilen ekstraktların enzim inhibisyon potansiyelleri, IC50 değeri olarak ifade edilmiştir. IC50 deneyde kullanılan ekstraktların enzim aktivitesini %50 oranında inhibe ettiği standart veya numune ekstraktlarının konsantrasyonunu belirtmektedir. Bir test örneğinin düşük IC50 değeri daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu işaret etmektedir [4]. Ekstraktların α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe ettikleri değerler Şekil 4'te verilmiştir. Ekstraktların IC50 değerleri hem meyve ve yaprak

miktarı hem de içerdiği fenolik miktarına eşdeğer olarak verilmiştir. Alfa-glukozidaz enzimini üzerinde meyve ekstratlarının kayda değer inhibe etme potansiyelinin olduğu ve bunun aksine yaprakların α -amilaz enzimine karşı inhibitör aktivite sergilemediği görülmektedir. İğdenin sergilediği bu antidiyabetik özellik sahip olduğu fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarına atfedilebilir. İki farklı ekstraksiyon yönteminin (Soxhlet ve ASE) kullanıldığı bir çalışmada metanol ile ekstrakte edilen iğde yaprağının α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi doza bağlı olarak (10-50 μ L) %35-65 aralığında bulunurken, α -amilaz inhibisyon aktivitesi %26-40 olarak belirlenmiştir [23]. Bu sonuç çalışmamızla karşılaştırıldığında, yapraklarda α -amilaz inhibisyon etkisinin bulunmaması yönünden farklılaşmaktadır. Bunun nedeni olarak ekstraksiyon metotlarının farklılığı ve kullanılan solvent ve materyalin fiziki durumu

(kurutulmamış olması) gibi çeşitli faktörler gösterilebilir. Ancak, bulgularımız bitki fenolik asitlerinin hafif α -amilaz inhibitörleri ve güçlü α -glukozidaz inhibitörleri olduğu iddiaları ile uyumludur. İğdenin α -glukozidaz ve α -amilaz inhibe edici etkilerinin yanı sıra lipaz inhibisyon aktivitesi de test edilmiştir. Ancak, iğdenin hem meyve hem de yapraklarının belirtilen ekstraksiyon koşulları altında lipaz inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak ise, meyve ve yaprağın zaten lipaz inhibe edici özelliğinin olmaması veya bizim kullandığımız ekstraksiyon yönteminin eğer mevcutsa lipaz inhibe edici bileşikleri ekstrakte edememiş olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Literatürde *E. angustifolia*'nın in vitro yöntemlerle antidiyabetik ve antiobezite aktivitesi ile ilgili başka bir bulguya rastlanılmamıştır.



Şekil 4. İğde meyve ve yapraklarının α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon aktivite değerleri (¹IC50: enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe eden miktar (Şeklin ilk iki sütunundaki değerler iğde yaş ağırlığı, son iki sütunundaki değerler ise iğdenin fenolik miktarına eşdeğer cinsinden verilmiştir). ²Şekil üzerinde verilen değerler ortalama±standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiştir ve fark şekil üzerinde “*” işareti ile belirtilmiştir.)

SONUÇ

E. angustifolia L.'nin farklı kısımlarının (meyve ve yaprak) fenolik içerikleri, antioksidan aktivite ve antidiyabetik özelliklerinin incelendiği bu çalışmada iğde meyvesinin yaprağına göre fenolik bileşenlerce zengin olduğu ve bu özelliğinin antioksidan ve antidiyabetik aktivitesine de yansıdığı görülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde de görülmüştür ki aslında güçlü fenolik içerik güçlü antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. Ayrıca bitkinin farklı kısımlarında baskın olan fenolik profilinin değişmesi de bu aktiviteler üzerinde önemli etkiye sahip olacaktır. İğde meyvesinin, zengin ve faydalı besin kompozisyonlarına dayanan değerli bir bahçe ürünü olduğu oldukça fazla yapılan bileşim analizleri neticesinde önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ancak iğde meyve ve yaprağının özellikle tanen içeriğinin ve antidiyabetik potansiyelinin

karşılaştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Türk Halk Tıbbında *Elaeagnus angustifolia* yapraklarının diyabet üzerine olumlu etkiler gösterebileceğini iddia eden bilgiler mevcuttur. Ancak bu geleneksel kullanımın doğruluğu *in vitro* ve *in vivo* denemeler ile test edilerek ispatlanmalıdır. Bununla birlikte iğdenin antidiyabetik özelliklerinin test edildiği *in vitro* çalışma sayısı oldukça sınırlı olup, bu çalışmaların farklı koşullar altında gerçekleştirilerek literatüre kazandırılması önem az etmektedir. Sağlıklı gıdalara olan tüketici talebinin artmasına paralel olarak geliştirilen fonksiyonel ürünlere yenilerinin eklenmesiyle kullanımı sınırlı fakat değerli içeriğe sahip materyallerden elde edilecek olan bu bileşenler gıda sektöründe giderek daha da fazla kullanılacaktır.

Antioksidan ve enzim inhibitör aktivitelerin bitkinin farklı bölümlerine göre değiştiği ve bitkinin ürettiği olduğu

fenolik ve uçucu bileşikler gibi metabolitlerinin bitkinin bölümlerine göre farklılaşması sonucu tanımlanan bileşiklerin biyolojik rollerini değiştirdiği bilinmektedir. Bu çalışma, iğde meyvesinin α -amilaz ve α -glukozidaz, yaprağının ise α -glukozidaz enzimini inhibe edici özellikleri olduğunu göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalar, bu bileşiklerin bireysel olarak α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine etkisini belirleyecek şekilde dizayn edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] McCune, L.M., Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *Journal Ethnopharmacology*, 82(2-3), 197-205.
- [2] Sarıkaya, S., Öner, H., Harput, U.Ş. (2010). Türkiye florasında diyabet tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39, 317-342.
- [3] Büyükbacı, A., El, S.N. (2008). Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 27-33.
- [4] McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2760-2766.
- [5] Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. (2001). Alpha-glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins 1: Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1948-51.
- [6] Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamidpour, M., Shahlari, M., Sohraby, M., Shahlari, N., Hamidpour, R. (2016). Russian olive (*Elaeagnus angustifolia* L.): From a variety of traditional medicinal applications to its novel roles as active antioxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic and analgesic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 24-29.
- [7] Saboonchian, F., Jamei, R., Hosseini, S.S. (2014). Phenolic and flavonoid content of *Elaeagnus angustifolia* L. (leaf and flower). *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 231-8.
- [8] Hassanzadeh, Z., Hassanpour, H. (2018). Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant properties of *Elaeagnus angustifolia* L. *Scientia Horticulturae*, 238, 83-90.
- [9] Cansev, A., Sahan, Y., Celik, G., Taskesen, S., Ozbey, H. (2011). Chemical properties and antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruits. *Asian Journal of Chemistry*, 23, 2661-2665.
- [10] Abizov, E.A., Tolkachev, O.N., Mal'tsev, S.D., Abizova, E.V. (2008). Composition of biologically active substances isolated from the fruits of Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) introduced in the European part of Russia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42, 696-698.
- [11] Ahmadiani, A., Hosseiny, J., Semnianian, S., Javan, M., Saeedi, F., Kamalinejad, M., Saremi, S. (2000). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 287-292.
- [12] Ayaz, F.A., Bertoft, E. (2001). Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(5), 505-511.
- [13] Gürbüz, I., Üstün, O., Yesilada, E., Sezik, E., Kutsal, O. (2003). Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 93-97.
- [14] Goncharova, N.P., Plugar', V.N., Rashkes, Y.V., Isamukhamedov, A.S., Glushenkova, A.I. (1995). Oxygenated fatty acids of the seeds of *Elaeagnus angustifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(6), 661-665.
- [15] Okmen, G., Turkcan, O. (2014). A study on antimicrobial, antioxidant and antimutagenic activities of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11, 116-120.
- [16] Sahan, Y., Gocmen, D., Cansev, A., Celik, G., Aydin, E., Dundar, A.N., Dulger, D., Kaplan, H.B., Kilci, A., Gucer, S. (2015). Chemical and techno-functional properties of flours from peeled and unpeeled oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 34-41.
- [17] Bekker, N.P., Glushenkova, A.I. (2001). Components of certain species of the Elaeagnaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 97-116.
- [18] Yıldırım, I., Gökçe, Z., Yılmaz, Ö. (2015). The investigation of biochemical content of *Elaeagnus angustifolia*. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 2(1), 34-41.
- [19] Sahan, Y., Dundar, A.N., Aydin, E., Kilci, A., Dulger, D., Kaplan, F.B., Gocmen, D., Celik, G. (2013). Characteristics of cookies supplemented with oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour. I Physicochemical, sensorial and textural properties. *Journal of Agricultural Science*, 5, 160-168.
- [20] Incilay, G. (2014). Volatile composition, antimicrobial and antioxidant properties of different parts from *Elaeagnus angustifolia* L. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17, 1187-1202.
- [21] Çakmakçı, S., Topdaş, E.F., Kalin, P., Han, H., Şekerci, P., Köse, L., Gülçin, I. (2015). Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 472-481.
- [22] Wang, Y., Guo, T., Li, J., Zhou, S., Zhao, P. (2012). Four flavonoid glycosides from the pulps of *Elaeagnus angustifolia* and their antioxidant activities, in: *Proceedings of the 2012 2nd International Conference on Computer and Information Applications (ICCIA 2012)*. Atlantis Press, Paris, France.
- [23] Saltan, F.Z., Okutucu, B., Canbay, H.S., Ozel, D. (2017). In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects in *Elaeagnus angustifolia* leaves extracts. *Eurasian Journal of Analytical*

- Chemistry*, 12, 117-126.
- [24] Yalcin, G., Sogut, O. (2014). Antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. and investigation of eosin y as the fluorescent probe in ORAC method. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12(2), 51-54.
- [25] Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- [26] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- [27] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- [28] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.
- [29] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98), 1231-1237.
- [30] Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.
- [31] Willis, R.B., Allen, P.R. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123, 435-439.
- [32] Kliebenstein, D.J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*, 27, 675-684.
- [33] Amini, M.H., Ahmady, A., Zhakfar, A.M. (2019). Preliminary phytochemical profile, in vitro antioxidant and sun protective activities of *Alhagi pseudalhagi* and *Elaeagnus angustifolia* L. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 31(4), 1-13.
- [34] Zengin, G., Aktumsek, A. (2014). Investigation of antioxidant potentials of solvent extracts from different anatomical parts of *Asphodeline anatolica* E. Tuzlaci: an endemic plant to Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(2), 481-488.
- [35] Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.
- [36] Harborne, J.B. (1973). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Edited by Chapman and Hall, Springer Netherlands, 278p.
- [37] Gupta, D. (2013). Comparative analysis of spices for their phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity. *American International Journal of Research in Formal, Applied and Natural Sciences*, 4(1), 38-42.
- [38] Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S.K., Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 287-291.
- [39] Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M.Y., Baser, K.H.C. (2008). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19(12), 1159-1164.
- [40] Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism chemistry and structure of the flavonoids. *Nutrition*, 18(1), 75-81.