مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و یک، شماره دهم، دی ۱۴۰۲
تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۵/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۰۶/۲۷

مقایسه اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اولئوروپین استخراج شده از برگ زیتون واریته آربیکن با عصاره برگ ومیوه آن

معصومه بابائی[۲،۱]، جلال حسن[*۱]، محمدکاظم کوهی[۱]، محمدعلی قاسم‌زاده[۲]

مقاله پژوهشی

مقدمه: برگ زیتون به عنوان برگی همیشه سبز، غنی از ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اولئوروپین فراوان‌ترین نوع از ترکیبات فنولی در برگ آن است. هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اولئوروپین استخراج شده از برگ زیتون با عصاره برگ ومیوه آن می‌باشد.

روش بررسی: نوع مطالعه از نوع تجربی بوده و پس از عصاره‌گیری اتانولی از برگ و میوه زیتون، اولئوروپین از عصاره برگ جداسازی شد. اثرات اولئوروپین استخراج شده از برگ و عصاره‌های میوه و برگ زیتون علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و سودوموناس آئروژینوزا با روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، میزان ترکیبات فنولی به روش فولین سیکالتو و اثرات آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.) تعیین شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS version16 و برای رسم گراف‌ها از برنامه Excel و جهت بررسی تاثیر مداخله ازanova one way استفاده شد.

نتایج: اولئوروپین از برگ زیتون به میزان ۱۴ درصد با خلوص ۷۰ درصد استخراج شد. اولئوروپین حاصل از برگ زیتون بیشترین میزان ترکیبات فنولی، اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی را دارا بوده است و عصاره میوه زیتون کمترین اثر را داشته است. میزان ترکیبات فنولی اولئوروپین استخراج شده برابر (µg GAE/g) ۸۷۹/۱۶، MIC آن علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابربا mg/ml ۳/۲۵، ۱۲/۵ و فعالیت آنتی اکسیدانی آن برابر با µg/ml ۸/۵۹ بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که میزان اولئوروپین دربرگ زیتون رقم آربیکن اسپانیایی با بالاترین مقدار ۱۴٪ بوده و با توجه به نتایج فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون و اولئوروپین استخراج شده پتانسیل افزایش بهبود عملکرد نگهدارنده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را دارند.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، ترکیبات فنولی، حداقل غلظت مهارکنندگی، اولئوروپین، اثرات ضد میکروبی

ارجاع: بابائی معصومه، حسن جلال، کوهی محمدکاظم، قاسم زاده محمد علی. **مقایسه اثرات ضد میکروبی وآنتی‌اکسیدانی اولئوروپین استخراج شده از برگ زیتون واریته آربیکن با عصاره برگ ومیوه آن.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۱۰): ۴۳-۷۱۲۹.

۱- بخش سم شناسی، گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۱۳۶، پست الکترونیکی: jalalhassan@ut.ac.ir، صندوق پستی :۱۴۱۵۵۶۴۵۳

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

مقدمه

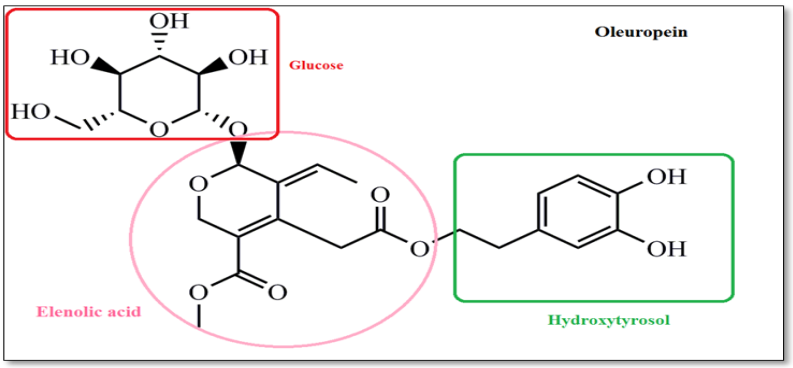
زیتون با نام علمی *Olea europaea* شامل تقریبا ۳۵ تا ۴۰ گونه از خانواده Oleaceae بوده و در جهان از ناحیه دریای مدیترانه، شمال آفریقا، جنوب شرقی آسیا، شمال تا جنوب چین، اسکاتلند و شرق استرالیا پراکندگی زیادی داشته‌اند. زیتون یکی از قدیمی‌ترین گیاهان باغبانی مورد استفاده برای تولید روغن و ترکیبات دارویی است و در دهه‌های اخیر اثرات مفید زیتون در سلامت در موارد مختلفی به‌صورت علمی نشان داده شده است (۱). به دلیل محبوبیت این میوه و روغن‌های استخراج شده آن، مزارع تحت کشت این محصول نه فقط در مدیترانه بلکه در سایر بخش‌های جهان خصوصا آسیای میانه و تا حدی در ایران افزایش یافته است (۲). برگ زیتون به عنوان یک برگ همیشه سبز در تمام فصل‌های سال در دسترس است و نسبت به سایر قسمت‌های گیاه به عنوان یک ماده خام ارزان قیمت و غنی از ترکیبات طبیعی مانند ترکیب‌های فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۳). در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانی، هیپوگلاسمیک، ضد فشار خون، ضد آرترواسکلروز، ضد التهاب، ضد میکروبی و ضد سرطان برگ زیتون گزارش شده است (۴). در برگ زیتون ترکیباتی از جمله پلی‌فنول‌های سکوستروئید (اولئوروپین، ورباسکوسید) و ترکیبات فلاونوئید (لوتئولین-۷-گلوکوسید، آپیجنین-۷-گلوکوسید، دیوسمتین-۷ -گلوکوسید، لوتئولین و دیوسمتین)، فلاونول‌ها (روتین)، ترکیبات فنولی (اسیدکافئیک، تیروزول و هیدروکسی تیروزول)، تری‌ترپنوییدها (ترپنوئیک اسید، بتاسیتوسترول، اولئانولیک اسید، اسید اورسولیک، ماسلینیک اسید)، علاوه بر این، هیدروکربن‌ها، استرها، موم، تری‌گلیسیرید، توکوفرول، استرول، الکل‌ها و الکل‌های ترپنیک نیز گزارش شده است (۵). آنتی‌اکسیدان‌ها در میوه‌های مختلف و انواع سبزی‌ها وجود دارند و نقش دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیوی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را دارند. بر اساس تحقیقات موجود،گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی ارتباط دارند. امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به خاطر قدرت بازدارندگی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. انواع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها شامل: توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی هستندکه دارای پتانسیل محافظت از سلول‌های بدن در مقابل بیماری‌های وابسته به ROS می‌باشند. بنابراین، یک علاقه رو به رشد برای تهیه مواد آنتی‌اکسیدانی طبیعی برای انسان و دام به صورت غذایی و یا دارویی به‌وجود آمده است (۶). این ترکیبات در پسماندهای زیتون نظیر برگ‌ها نیز وجود دارند که به علت خصوصیات بیولوژیکی خاص آن‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. اولئوروپین فراوان‌ترین نوع از ترکیبات فنلی در برگ و میوه زیتون است و عامل مزه تلخ میوه زیتون بوده و بسته به زمان برداشت، میزان آن ۲۳-۱۷ درصد متغیر است. این ترکیب در سال ۱۹۰۸ توسط Bourquelot , Vintilesco شناسایی گردید و در سال ۱۹۶۰ ساختار (شکل۱) آن تعیین شد (۵). مطالعات زیادی نشان داده شده است که اولئوروپین دارای تعدادی فعالیت بیولوژیکی از جمله ضد چاقی، ضد دیابت، آنتی‌اکسیدانی، پیشگیری کننده از بیماری قلبی و عروقی، کاهش دهنده فشار خون بالا، ضد التهاب و محافظ کبدی است و به همین دلیل در تحقیقات برجسته شده است (۳).

این ترکیب را می‌توان از روش‌های مختلف استاندارد و غیر استاندارد برای چندین منظور استخراج، بازیابی و خالص کرد. در استخراج اولئوروپین از زیتون پارامترهای مختلفی شامل حلال استخراج (نوع، ترکیب، PH و دما) و زمان استخراج، روش استخراج (سوکسله، استخراج سیال فوق بحرانی و استخراج مایع – مایع) برای استخراج با بازده زیاد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۷). فعالیت و غلظت پلی فنل‌ها تحت تأثیر محیط و فاکتورهای پس از برداشت شامل بلوغ میوه، قرارگیری در معرض نور، انبارداری وفرآوری است. از طرف دیگر ژنتیک (رقم) نقش مهمی در کنترل ترکیبات پلی فنلی دارد و توزیع ترکیبات فنلی به‌طور قابل‌توجه‌ای بین ارقام مختلف متفاوت است (۸). با توجه به اینکه ارقام موجود در ایران، از نظر میزان ترکیبات فنلی رتبه‌بندی نشده‌اند و هم‌چنین ارزان و

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]
[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

مقرون به صرفه بودن استخراج ترکیبات فنلی از برگ زیتون و بالاتر بودن میزان این ماده در ارقامی خاص، با توجه به نتایج مطالعات، می‌توان نسبتبه تهیه مواد اولیه دارویی حاوی درصد بالایی از ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی قوی و دارای خواص دارویی متعدد اقدام نمود. بنابراین در راستای بهبود و ارتقاء سلامت انسان و هم‌چنین دام، شناسایی ارقامی که دارای بیشترین مقدار مواد فنلی هستند به منظور استخراج این مواد و استفاده در صنایع داروسازی و غذایی از اهمیت خاصی برخوردار است. برای رسیدن به چنین اهدافی در این پژوهش، رقم آربیکن اسپانیایی کشت شده در شهر قم مورد مطالعه قرار گرفت. این رقم به‌طور وسیعی در کشورهای الجزایر، آرژانتین، اسپانیا و فرانسه کشت می‌شود. جز ارقام زیتون‌های روغنی در اسپانیا است. به دلیل زودباردهی و عملکرد زیاد و ثابت، برای احداث باغ‌های متراکم بسیار مناسب و مقاوم به سرما، خشکی، شوری و رطوبت است. با توجه به اثرات سودمند برگ زیتون و اولئوروپین به عنوان یکی از مواد موثره آن، هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اولئوروپین استخراج شده از برگ زیتون با عصاره برگ و میوه آن می‌باشد.



شکل۱: ساختارشیمیایی اولئوروپین. یک ترکیب فنلی موجود برگ در زیتون

روش بررسی

موادی که برای انجام تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته‌اند عبارتند از: استاندارد اولئوروپین، معرف فولین سیکالتو و DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) که از شرکت سیگما و مواد آزمایشگاهی همچون هگزان، کلروفرم، اتیل‌استات، BHT (Butylated hydroxytoluene)، محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller hinton agar)، براث(Brain Heart Infusion)، متانول و اتانول که از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. تجهیزات آزمایشگاهی شامل سمپلر (شرکت اپندورف، ساخت کشور آلمان)، اسپکتروفتومتر(Unicam مدل۵۶۲۵، ساخت آمریکا)، روتاری (شرکت هایدولف، ساخت کشورآلمان)، فریزدرایر(شرکت ZIRBUS. ساخت کشور آلمان) استفاده گردیده است.

جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی ابتدا میوه و برگ گیاه زیتون از مزرعه فدک در شهر قم جمع‌آوری گردید. در مزرعه زیتون فدک بر روی تمام درختان این مزرعه، شناسنامه ژن، نوع رقم، میزان رطوبت و روغن موجود در زیتون نوشته شده به گونه‌ای که هم اکنون قم به تولیدکننده زیتون شناسنامه دار در کشور تبدیل شده است. علاوه بر این گیاه جمع‌آوری شده به هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی قم منتقل و با کد هرباریوم ۸۰۲۱ شناسایی گردید. سپس برگ و میوه پس از جداسازی از ساقه با آب سرد شسته و خشک گردید. جهت تهیه عصاره گیاه، قسمت‌های خشک شده گیاه با آسیاب برقی پودر شده و ۱۰گرم از پودر حاصله پس از توزین، توسط روش خیساندن با سیصد میلی‌لیتر اتانول (۹۶ ٪) در مدت زمان شش ساعت در دمای ۶۰ درجه

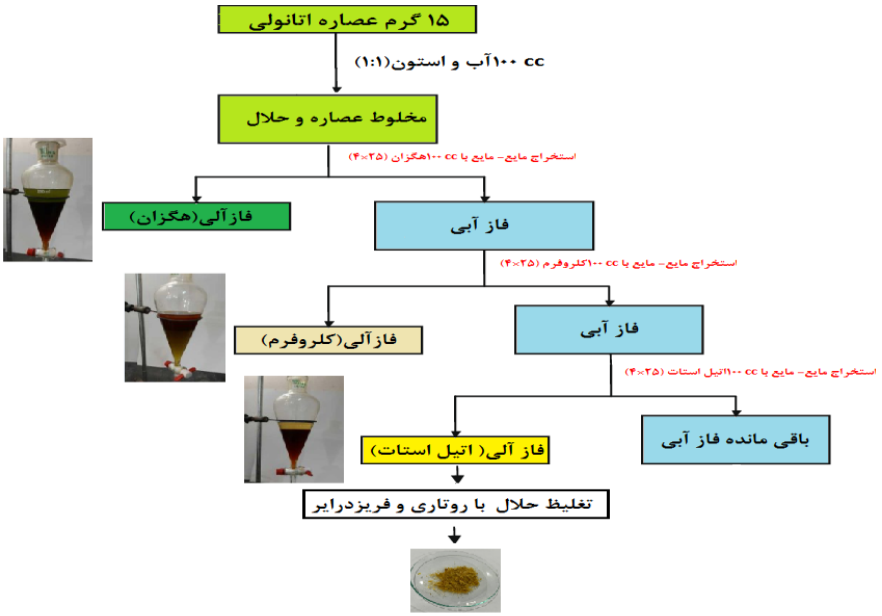
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]
[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

سانتی‌گراد و بر روی شیکر با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه عصاره‌گیری انجام شد. حلال عصاره اتانولی به دست آمده به‌وسیله دستگاه تبخیرکننده دورانی تبخیر شده و در شیشه استریل جمع‌آوری شد. بازده عصاره‌گیری از فرمول زیر به‌دست آمد.

رابطه ۱: $\text{بازده عصاره گیری}(\%) = \frac{\text{وزن عصاره بدون حلال}}{\text{وزن گیاه اولیه}} \times ۱۰۰$

استخراج اولئوروپین از عصاره هیدروالکلی برگ زیتون: استخراج اولئوروپین از عصاره هیدروالکلی برگ زیتون مطابق فلوچارت (شکل۲) بدین صورت انجام شد. ابتدا ۱۵ گرم عصاره خشک اتانولی برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال آب و استون (۵۰:۵۰) حل گردید. جداسازی اولئوروپین از مخلوط حاصل به‌وسیله قیف دکانتور به ترتیب با حلال‌های هگزان، کلروفرم و اتیل استات صورت گرفت. در مرحله اول مخلوط حاصل (فاز آبی) در داخل قیف دکانتور ریخته و با ۲۵ سی‌سی حلال هگزان استخراج مایع - مایع صورت گرفت. بعد از جداسازی دو فاز آبی و آلی مرحله قبل مجدداً روی فاز آبی انجام شد، عمل استخراج تا ۴ بار صورت گرفت. در مرحله آخر بعد از جداسازی فاز آبی و فاز آلی(هگزانی) فاز آلی کنار گذاشته و فاز آبی مجدداً در قیف ریخته، و مراحل بالا با حلال کلروفرم و سپس اتیل استات تکرار شد. در نهایت حلال فاز اتیل استاتی باقی مانده به‌وسیله روتاری تغلیظ و با استفاده از دستگاه فریزدرایر به‌طور کامل خشک و پودری گردید.



شکل ۲: فلوچارت استخراج اولئوروپین از عصاره هیدروالکلی برگ زیتون به روش استخراج مایع-مایع

شناسایی اولئوروپین در نمونه استخراج شده: اولئوروپین در نمونه استخراج شده با استفاده از استاندارد اولئوروپین به روش اسپکتروفتومتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تک پرتوی Unicam مدل ۵۶۲۵ ساخت آمریکا، مجهز به سل نیمه میکرو۱/۵ میلی‌لیتری دارای طول مسیر ۱۰ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نمونه استخراج شده و استاندارد اولئوروپین در متانول حل شده و اسکن تمامی طیف‌ها نیز از صفر تا ۴۰۰ نانومتر انجام شد.

تعیین مقدار اولئوروپین به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع فشار بالا (HPLC): جداسازی با یک ستون C18 دارای ابعاد ۲۵ سانتی‌متر طول و ۴/۶ میلی‌متر قطر داخلی و اندازهٔ ذرات ۵ میکرومتر ساخت شرکت Waters (آمریکا) انجام شد. از نرم‌افزار EZchrom جهت کنترل دستگاه استفاده شد. جهت شناسایی از فاز متحرک (بافرA: تری فلورواستیک اسید ۰/۰۵٪ در آب و بافر B: تری فلورواستیک اسید ۰/۰۵٪ در استونیتریل) با برنامه شویش گرادیانی با سرعت جریان فاز متحرک ml/min

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]
[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

۱، در طول موج آشکارساز ۲۸۲ و ۲۳۲ نانومتر استفاده شد. حجم µL ۲۰ از عصاره‌ها و ماده استخراجی به‌طور جداگانه به دستگاه تزریق شد. غلظت اولئوروپین با استفاده استاندارد و مساحت زیر پیک محاسبه شد. اولئوروپین با غلظت در ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) در متانول تهیه شد و سپس پنج رقت (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برای رسم منحنی کالیبراسیون تهیه شدند.

اندازه‌گیری کل ترکیبات فنلی: مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده، با استفاده از معرف Follin-Ciocalteu و نمودار استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد (۹). به این منظور از عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده، به‌طور جداگانه محلولی با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در متانول تهیه گردید. به mL ۰/۱ عصاره ۰/۲mL معرف فولین - سیکالتو و دو میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد، و مخلوط به مدت سه دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد، سپس یک میلی‌لیتر محلول سدیم بی‌کربنات ۲۰٪ به مخلوط اضافه و توسط شیکر مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. جذب محلول حاصل در طول موج ۷۶۰ nm پس از گذشت یک ساعت اندازه‌گیری و فرآیند یکسانی برای محلول‌های گالیک اسید استاندارد با غلظت‌های مشخص تکرار گردید. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده بر اساس میزان معادل گالیک اسید با استفاده از معادله منحنی استاندارد گالیک اسید مشخص گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: آزمون مهار رادیکال آزاد به روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) توانایی حذف رادیکال توسط عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده به روش بیان شده توسط Blasi و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۰). در این روش برای مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. ابتدا از هر ترکیب غلظت‌های ۴/۷-۹/۳۸-۱۸/۷۵-۳۱/۲۵-۶۲/۵-۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید، سپس جهت سنجش هر ترکیب حدود mL ۰/۱ از آن با mL ۳/۹ با غلظت معینی (۰/۰۶ mmol/L) از DPPH مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. سپس جذب محلول‌های حاصله در طول موج ۵۱۷ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و ثبت شد. درصد مهار رادیکال آزاد محاسبه گردید (۱۱).

فعالیت های ضد میکروبی

سویه‌های باکتری و تهیه تلقیح باکتریایی: در این مطالعه باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*Staphylococcus saprophyticus* PTCC 1440) و باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 به عنوان پاتوژن جهت سنجش فعالیت ضد میکروبی انتخاب شدند. باکتری‌های مورد نظر از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به طور جداگانه تلقیح از کشت ذخیره میکروب و در محیط مولر هینتون آگار و دمای ۳۷ کشت داده شد، بعد از زمان انکوباسیون و ایجاد کلنی‌های مجزا برای هر میکروب تعداد ۴ تا ۵ کلنی انتخاب و به لوله حاوی نرمال سالین انتقال و به نسبت ۱:۲۰ براساس پروتکل (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI رقیق شد. میزان کدورت آن با کدورت نیم مک فارلند مقایسه گردید. جهت بررسی صحیح بودن کدورت از اسپکتروفتومتر استفاده می‌شود. در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب برای استاندارد نیم مک فارلند بین ۰/۱-۰/۰۸ می‌باشد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش MIC(Minimum Inhibitory Concentration): ابتدا جهت تهیه غلظت استوک برای عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده، غلظتی برابر mg/ml ۲۰۰ تهیه و سپس از فیلتر میکروبی ۰/۴۵میکرون برای استریل نمودن عبور داده شد (۱۳). ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتنون براث در داخل تمام چاهک‌ها اضافه شد. سپس سریال رقت (اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر از غلیظ‌ترین عصاره به چاهک اول و دور ریختن ۱۰۰ میکرولیتراز چاهک آخر) در پلیت ۹۶ خانه تهیه و غلظت‌های نهایی به ترتیب ۱۰۰-۵۰-۲۵-۱۲/۵-۶/۲۵-۳/۱۲۵-۱/۵۶۳-۰/۷۸۱-۰/۳۹۱-۰/۰۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

ایجاد شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری رقیق شده به نسبت۱ به۲۰ به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت+ باکتری) و یک چاهک به عنوان کنترل منفی (محیط کشت+ عصاره) و چاهک دیگر (محیط کشت) برای کنترل محیط از لحاظ کدورت و عدم آلودگی استفاده شد، در نهایت میکرو پلیت‌ها به مدت ۵ ثانیه تکان داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون غلظت آخرین چاهک شفاف و بدون کدورت به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود. تشخیص حداقل غلظت مهارکننده از باکتری در عصاره‌ها به علت کدورتی که دارند مشکل است برای بر طرف کردن این مشکل ۵ میکرولیتر نمک تترازولیوم با غلظت ۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر را به هر چاهک اضافه کرده ودو ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار داده واز لحاظ تغییر رنگ مشاهده می‌کنیم. در صورت عدم رشد میکروب تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. آزمایش برای هر کدام سه بار تکرار شد. نتایج هم به‌صورت کیفی مشاهده شد و هم میزان کدورت با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت گردید به این صورت که محیط کشت مولر هینتون براث به عنوان بلانک استفاده و میزان کدورت بقیه چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای نسبت به بلانک سنجیده شد (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای پیوسته به‌صورت انحراف معیار ± میانگین از میانگین ذکر شده است. جهت بررسی تاثیر مداخله از anova one way استفاده شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS version16 و برای رسم گراف‌ها از برنامه Excel استفاده شد.

نتایج

بازده عصاره میوه و برگ: بازده عصاره اتانولی حاصل از برگ و میوه زیتون به میزان ۳۶/۴۱ و ۲۷/۸۳ درصد، تعیین شد. عملکرد عصاره اتانولی به‌دست آمده از برگ زیتون بیشتر از میوه تعیین شد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$).

شناسایی اولئوروپین در نمونه استخراج شده: نمونه استخراج شده و نمونه استاندارد اولئوروپین در متانول حل و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اسکن انجام گردید. هر دو نمونه در طول موج ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر ماکزیمم جذب داشتند (شکل ۴و۳) نتایج نشان داد که نمونه خالص شده دارای یک حلقه بنزن و ساختارهای دیگر بود. بررسی طیف‌های به‌دست آمده در این مطالعه با آنچه قبلا گزارش شده بود مطابقت داشت (۵).

شناسایی و تعیین مقدار اولئوروپین بوسیله HPLC: یکی از روش‌های دقیق جهت شناسایی ترکیب اولئوروپین استفاده از دستگاه HPLC است. ابتدا غلظت های متفاوتی از استاندارد اولئوروپین تهیه و به دستگاه تزریق شد، سپس با رسم منحنی استاندارد (شکل ۵) و با داشتن مساحت سطح زیر پیک نمونه استخراج شده (شکل ۶) غلظت ترکیب به‌دست آمد. با محاسبه مقدار اولیه و نمونه خالص شده و مقایسه با نمودار استاندارد درصد خلوص نمونه استخراج شده ۷۰ درصد مشخص گردید و مقدار اولئوروپین به ترتیب ۶ و ۰/۰۵میلی‌گرم در عصاره برگ و عصاره میوه به‌دست آمد.

مقدار کل ترکیبات فنولی: بر اساس مقادیر جذب به دست آمده از غلظت‌های مختلف از استاندارد گالیک اسید منحنی (نمودار۱) آن رسم گردید و با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد و مقادیر جذب به دست آمده از واکنش عصاره برگ، عصاره میوه و اولئوروپین استخراج شده با معرف فولین-سیکالتو مقدار کل ترکیبات فنولی در ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هریک از ترکیبات استاندارد محاسبه و بر حسب ماکروگرم در گرم (µg GAE/g) ترکیبات مورد آزمایش گزارش شد. مقادیر ترکیبات فنولی کل در ترکیبات مورد مطالعه تعیین گردید (جدول۱) و مشاهده شد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی در اولئوروپین استخراج شده و کمترین آن در عصاره میوه بوده است. تفاوت ترکیبات فنولی کل بین عصاره میوه و برگ با ترکیبات فنولی کل اولئوروپین استخراج شده از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) علاوه بر این تفاوت بین ترکیبات فنولی کل در عصاره میوه و برگ از نظر آماری ناچیز بود ($P>۰/۰۵$).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH: جذب محلول‌های تهیه شده و استاندارد BHT توسط دستگاه

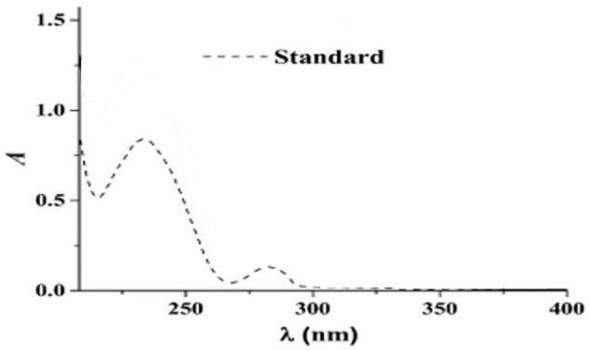
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

UV/Vis خوانده شد و درصد مهار رادیکال آزاد تولید شده توسط DPPH به وسیله رابطه ۲ محاسبه گردید و نمودار درصد مهار برحسب غلظت‌های مختلف رسم گردید (نمودار۲). Inhibition (%)= 100×(Ablank-Asample/Ablank) رابطه ۲ که Ablank و Asample به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه می‌باشند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات به صورت مقدار IC_{50} بیان می شود که نشان‌دهنده غلظتی از ترکیب است که باعث مهار ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد می‌شود. این مقدار، به‌وسیله آنالیز هم بستگی خطی حاصل از مقادیر درصد مهار برای غلظت‌های مختلف نمونه، به‌دست آمده از نمودار ۲ تعیین شد. نتایج به دست آمده با مقادیر IC_{50} آنتی‌اکسیدانی BHT به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید (جدول۲). نتایج نشان داد در اولئوروپین استخراج شده از غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بعد قدرت مهار رادیکال آزاد تغییر چندانی نداشت. اولئوروپین استخراج شده نسبت به سایر عصاره‌ها بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به عبارتی کمترین IC_{50} برابر با ۸/۵۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشت، به‌طوری که با کمترین غلظت بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشد. در حالی‌که مقادیر IC_{50} به ترتیب برای عصاره برگ و میوه ۲۹/۰۹ و ۵۸//۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که این تفاوت از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود ($P<0/01$).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش MIC : در تمامی نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی افزایش یافت. نتایج به‌دست آمده درمورد استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس نشان داد ترکیب اولئوروپین و عصاره‌های میوه و برگ اثر مهاری بر رشد باکتری داشتند. کمترین غلظتی که بر روی آن اثر مهاری وجود داشت (MIC) تعیین گردید. بررسی‌ها نشان داد در عصاره میوه زیتون نسبت به دو ترکیب دیگرکمترین اثر مهارکنندگی دیده شد، در غلظت ۲۵ mg/ml بر روی باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس اثر مهارکنندگی دارد و بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۱۰۰mg/ml این اثر دیده شد. اولئوروپین استخراج شده بهترین اثر ضد میکروبی را نسبت به عصاره‌ها نشان داد، بر روی باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در غلظت mg/ml ۳/۲۵ و در سودوموناس آئروژینوزا در غلظت mg/ml ۱۲/۵ اثر مهارکنندگی داشت. در عصاره برگ بر روی باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در غلظت mg/ml ۱۲/۵ و در سودوموناس آئروژینوزا در غلظت mg/ml ۵۰ اثر مهارکنندگی دارا بود (جدول۳).

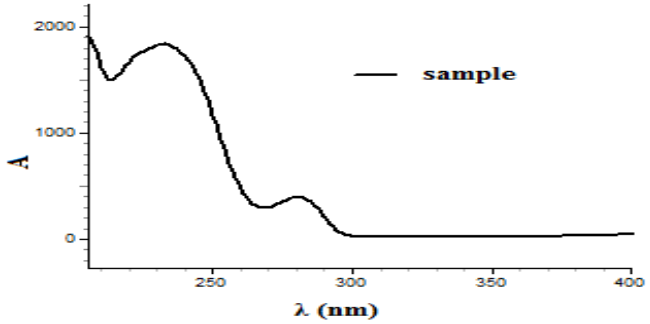


شکل۳: طیف اسپکتروفتومتری استاندارد اولئوروپین در ناحیه ۰ تا ۴۰۰ نانومتر. حداکثر جذب اولئوروپین درطول موج ۲۳۰ نانومتر و ۲۷۰ نانومتر

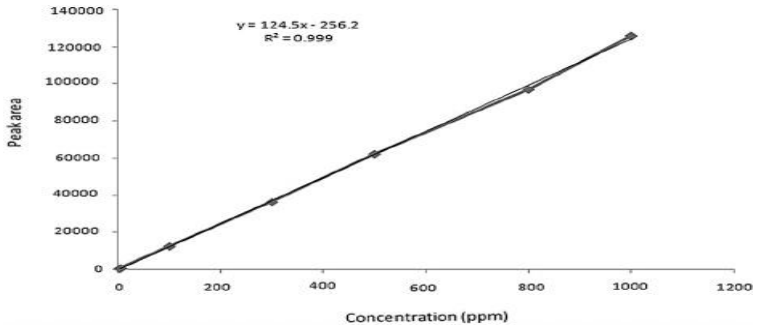
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

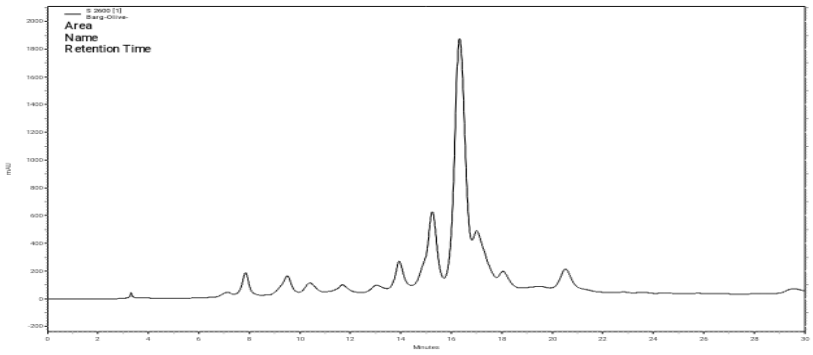
CC BY-NC 4.0



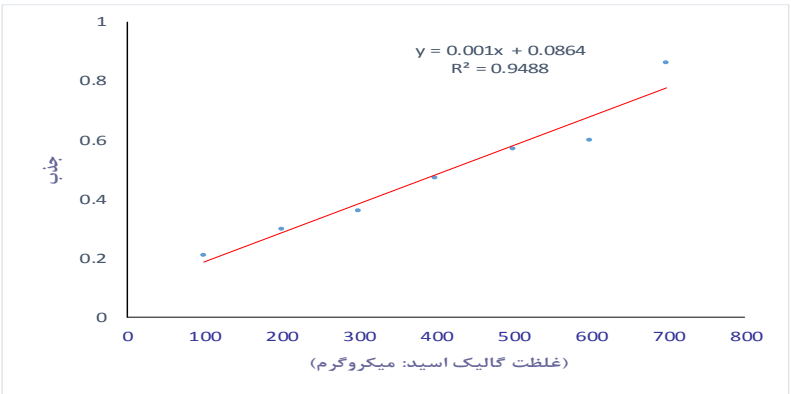
شکل۴: طیف اسپکتروفتومتری نمونه اولئوروپین استخراج شده در ناحیه ۰ تا ۴۰۰ نانومتر حداکثر جذب اولئوروپین در طول موج ۲۳۰ نانومتر و ۲۷۰ نانومتر



شکل ۵: منحنی کالیبراسیون استاندارد اولئوروپین در HPLC



شکل ۶: کروماتوگرام HPLC در نمونه استخراج شده



نمودار ۱: منحنی استاندارد گالیک اسید با دستگاه اسپکتروفتومتر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

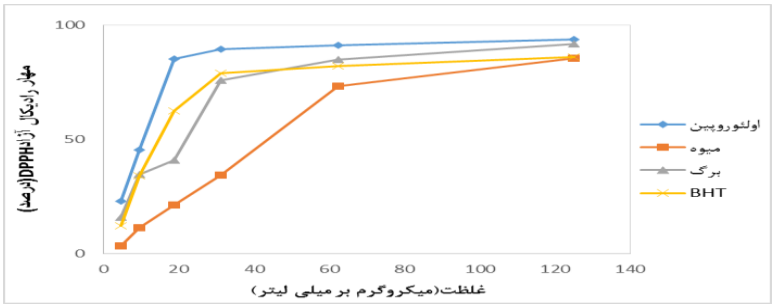
[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

جدول۱: میزان کل فنول در ترکیبات مورد مطالعه. اولئوروپین: اولئوروپین استخراج شده از عصاره اتانولی برگ زیتون،

نام ترکیب	میزان کل فنولی (µg GAE/g)
عصاره میوه	۴۲۳ ± ۰/۰۷
عصاره برگ	۵۹۸±۰/۲۳
اولئوروپین	۸۷۹/۱۶ ±۰/۹۸

میوه: عصاره اتانولی میوه زیتون، برگ: عصاره اتانولی برگ زیتون.



نمودار۲: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورد مطالعه و BHT به عنوان استاندارد

اولئوروپین: اولئوروپین استخراج شده از عصاره اتانولی برگ زیتون، میوه: عصاره اتانولی میوه زیتون، برگ: عصاره اتانولی برگ زیتون، BHT: بوتیل هیدروکسی تولوئن به عنوان کنترل مثبت و استاندارد فعالیت آنتی‌اکسیدانی. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف محاسبه شده است.

جدول۲: IC_{50} ترکیبات مورد مطالعه.

نام ترکیب	IC_{50} (µg/mL)
عصاره میوه	۵۸/۸۲ ± ۲/۱
عصاره برگ	۲۹/۰۹ ± ۱/۱
اولئوروپین	۸/۵۹ ± ۳/۲
BHT	۲۲/۴۸ ± ۱/۷

اولئوروپین: اولئوروپین استخراج شده از عصاره اتانولی برگ زیتون، عصاره میوه: عصاره اتانولی میوه زیتون، عصاره برگ: عصاره اتانولی برگ زیتون، BHT: بوتیل هیدروکسی تولوئن به عنوان کنترل مثبت و استاندارد فعالیت آنتی اکسیدانی. IC_{50}: غلظتی از ترکیب است که باعث مهار ۵۰٪ از رادیکالهای آزاد می‌شود.

جدول۳: حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/mL) ترکیبات مورد مطالعه.

نام ترکیب / نام باکتری	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	سودوموناس آئروژینوزا
عصاره میوه	۲۵	۱۰۰
عصاره برگ	۱۲/۵	۵۰
اولئوروپین	۳/۲۵	۱۲/۵

اولئوروپین: اولئوروپین استخراج شده از عصاره اتانولی برگ زیتون، میوه: عصاره اتانولی میوه زیتون، برگ: عصاره اتانولی برگ زیتون. حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

بحث

برگ زیتون منبع خوبی از مواد فعال زیستی مانند ترکیبات فنلی در نظر گرفته می‌شود. استخراج این ترکیبات با ارزش افزوده بالا موضوعی بسیار مورد توجه است. با این‌حال، مقدار استخراج این ترکیبات می‌تواند بین ارقام و روش استخراج متفاوت باشد. دراستخراج انتخاب‌پذیری حلال اهمیت زیادی دارد. در فرآیند استخراج برای به‌دست آوردن راندمان بالا از ترکیب مورد نظر، ترکیب استخراج شده و حلال باید خواص قطبی مشابهی داشته باشند. اولئوروپین، فراوان ترین ماده فنلی موجود در برگ زیتون، یک ماده قطبی است و برای استخراج موثر اولئوروپین به یک حلال با قطبیت بالا نیاز است (۱۴). حلال قطبی هیدروژن را در محیط آزاد می‌کند و هیدروژن از طریق پیوندهای OH- منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود (۱۵). مقدار اولئوروپین استخراج شده علاوه بر روش استخراج به نوع رقم، منطقه جغرافیایی و فصل برداشت زیتون بستگی دارد. در مطالعات دیگر در مورد رقم آربیکن اسپانیایی در گذشته بازده‌های مختلف گزارش شده است (۱۶). رقم زیتون در مطالعه حاضر آربیکن اسپانیایی از شهر قم بود که تاکنون مطالعه‌ای مشابه مطالعه حاضر بر آن انجام نشده است. در این مطالعه عصاره‌گیری به روش هضم و با حلال اتانول ۹۶ درصد انجام شد. بازده عصاره اتانولی حاصل از برگ و میوه زیتون به میزان ۳۶/۴۱ و ۲۷/۸۳ درصد، تعیین شد. در مطالعه‌ای بازده عصاره متانولی حاصل از برگ را در رقم‌های مختلف ۴۵-۲۷ درصد به‌دست آوردند (۱۳). علاوه بر این، در مطالعات دیگر نیز بیان شده است حلال، روش خشک‌کردن (۱۷)، منشاء جغرافیایی، و روش استخراج (۱۸) ممکن است بر بازده عصاره برگ زیتون تأثیر داشته باشد. بازده عصاره برگ در مطالعه‌ای که نوع حلال و پیش تیمار را بررسی کرد از ۱۸ تا ۳۲ درصد متغییر بود و در مطالعه بررسی اثر منشا جغرافیایی و روش استخراج ۹ تا ۴۴ درصد تعیین گردید. مقدار اولئوروپین در برگ زیتون می‌تواند تحت تاثیر عوامل بسیاری قرار گیرد. اولئوروپین در عصاره‌های رقم‌های مختلف بین ۹٪ تا ۱۴/۳٪ و بسته به زمان برداشت بین ۱۲/۴و ۱۴/۲٪ تعیین شد (۱۹) علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که عواملی مانند زمان استخراج و نوع حلال ممکن است بر مقدار اولئوروپین در عصاره برگ زیتون تأثیر بگذارد (۲۰). برای استخراج و خالص‌سازی اولئوروپین حلال‌های متفاوتی استفاده می‌شود در مطالعه ما با روش استخراج مایع - مایع اولئوروپین موجود در عصاره برگ زیتون استخراج شد، با به کار بردن حلال‌های آلی هگزان، کلروفرم، اتیل استات و آب نتایج نشان داد که اتیل استات، حلال با بالاترین راندمان استخراج بود. در مطالعه‌ای مقدار اولئوروپین استخراج شده از عصاره متانولی با حلال اتیل استات mg/g ۷۸۱/۹۸ تعیین کرد. در مطالعه‌ای که در چین بر روی ۲۹ رقم زیتون انجام شد مقدار اولئوروپین از ۱/۵۶٪ تا ۱۳/۷۸٪ به‌دست آمد و رقم آربیکن ۷/۵ ٪ مشخص گردید (۱۳). اما مطالعه ما نشان داد که مقدار اولئوروپین در رقم آربیکن در منطقه جغرافیایی قم بالاتر و برابر ۱۴٪ می باشد. در مطالعه مقدار ترکیبات فنولی برگ زیتون در رقم آربیکن در اسپانیا حاصل دو مزرعه mg GAE/g ۳۰۰/۹ و ۳۳۹/۵ گزارش شده است. نتایج نشان داده که روش‌های متفاوت استخراج و رقم منجر به اختلاف زیادی در داده‌ها شده‌اند (۲۱). علاوه بر نوع رقم و روش استخراج مقدار ترکیبات فنولی در مراحل مختلف رشد متفاوت است. محتوای فنولی برخی ارقام خصوصا آربیکن در مرحله رشد کاهش می‌یابد. مقدار ترکیبات کل فنولی در منطقه شمال ایران رقم آربیکن mg GAE/g ۴۲/۳۵ (۲۲) و هم‌چنین در نواحی دیگر mg GAE/g ۴۰ و mg GAE/g ۲۴/۹۳-۱۶/۵۲ در برگ خشک شناسایی شد که وابسته به فاکتورهای مختلف است (۲۳). لی و همکارانش گزارش دادند که ترکیبات فنلی می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق تعدادی از مسیرهای بالقوه اعمال کنند. اصل کار احتمالاً از طریق مهار رادیکال‌های آزاد است که در آن مولکول‌های فنلی می‌توانند واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را بشکنند (۲۴). روش‌های مختلف در چند رقم زیتون مورد بررسی قرار گرفت خاصیت آنتی‌اکسیدانی در رقم آربیکن برابر با mmol ۲۶۷/۷TE/kg مشخص گردید (۲۱). در مطالعه‌ای در ایران گزارش شد IC_{50} عصاره برگ در رقم آربیکن برابر با µg/mL ۶۲/۵ می‌باشد با توجه به استاندارد این نتیجه در محدوده مطالعه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

حاضر است (۲۲). برگ‌های زیتون، به عنوان ضایعات کشاورزی، دارای پتانسیل بالایی به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی هستند. اولئوروپین به عنوان یکی از ترکیبات فنلی برگ نیز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در غلظت ۱۰۰µM دیده شد (۲۳). بر اساس نتایج ضد میکروبی مطالعه حاضر ترکیب اولئوروپین استخراج شده از برگ زیتون نسبت به عصاره میوه و برگ آن اثر مهاری بهتری در برابر باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از خود نشان داد. در سودوموناس آئروژینوزا اثرات ضد میکروبی کمتری دیده شد. در مطالعه اثر عصاره برگ زیتون که توسط همدانی و همکارانش انجام شد، نشان دادند که MIC عصاره برگ بر روی باکتری اشرشیاکلی برابر ۴۰ mg/mL و بر روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس mg/mL ۲۰ می‌باشد (۲۵). در برخی تحقیقات مشخص شد که اثر ضد میکروبی اولئوروپین بر باکتری‌های گرم مثبت قوی تر از اثر آن بر باکتری‌های گرم منفی است. این مورد با تفاوت در ساختار سلولی همراه است. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره سلولی ضخیم هستند که عمدتاً از پپتیدوگلیکان تشکیل شده است، در حالیکه باکتری‌های گرم منفی یک دیواره سلولی نازک متشکل از پپتیدوگلیکان و یک غشای خارجی متشکل از لیپوپلی‌ساکاریدها دارند (۲۶). همانطور که درصد کل ترکیبات فنلی افزایش دارد فعالیت ضد میکروبی افزایش داشت. بنابراین نتیجه می‌شود گروه‌های هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنلی بر غشای سلولی باکتری‌ها اثر گذاشته و در نتیجه ساختار غشایی تخریب شده و اجزای سلولی به بیرون از سلول نشت می‌کنند (۲۷). مطالعات متعددی اثرات بیولوژیکی گیاه زیتون را نشان داده است که نشان‌دهنده ارزش دارویی آن است. Aurelia و همکاران فعالیت ضد میکروبی عصاره تجاری برگ زیتون را بررسی کرد، نشان دادند که MIC عصاره برگ بر روی سودوموناس آئروژینوزا برابر ۵۰-۲۵ ٪(v/v) و بر روی باکتری *Staphylococcus epidermidis* برابر ٪(v/v) ۳/۱-۱/۶ می‌باشد (۲۸). در مطالعه دیگر اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون و اولئوروپین بررسی شد و نتایج قطر بازدارندگی رشد اولئوروپین (۳۰/۱۸ میلی‌متر) S.aureus و عصاره آبی (۱۶/۳۳ میلی‌متر)S.aureus گزارش و مشخص گردید اولئوروپین فعالیت ضد میکروبی قوی دارد (۲۹). این با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد، اولئوروپین در برابر باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با MIC برابر mg/mL ۳/۲۵ قوی‌ترین اثر را داشت و هم‌چنین اثر ضد میکروبی عصاره‌ها و اولئوروپین استخراج شده بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر از اثر بر باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. در این تحقیق زیتون رقم آربیکن انتخاب شد، عصاره برگ و میوه زیتون به دست آمد. پس از آن، ترکیب اولئوروپین از عصاره برگ زیتون استخراج شد. ترکیبات کل فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌ها و اولئوروپین مورد مطالعه قرار گرفتند. عصاره برگ زیتون عموماً به‌صورت تجاری در دسترس است و بدون نسخه استفاده می‌شود و مردم از آن برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌کنند. اثر استفاده طولانی‌مدت از عصاره برگ زیتون به طور جدی مورد بررسی قرار نگرفته است. مطالعات زیادی نشان داده شده است که اولئوروپین به عنوان یکی از ترکیبات برگ زیتون، دارای تعدادی فعالیت بیولوژیکی از جمله ضد چاقی، ضد دیابت، آنتی‌اکسیدانی، پیشگیری‌کننده از بیماری قلبی و عروقی، کاهش دهنده فشارخون بالا، ضد التهاب و محافظ کبدی است و به همین دلیل در تحقیقات برجسته شده است (۱۳). با توجه به مقدار اولئوروپین، وربا‌سکوزید و هیدروکسی تیروزول در برگ زیتون مشخص شد این ترکیبات می‌توانند مسئول فعالیت بیولوژیکی برگ باشند که می توانند تضعیف یا از علائم برخی بیماری‌ها جلوگیری کنند با این حال، مطالعات در مورد اثرات سمی آن‌ها محدود است (۳۰).

نتیجه‌گیری

دراین تحقیق اولئوروپین از برگ زیتون استخراج و مطالعه نشان داد که میزان اولئوروپین در رقم آربیکن اسپانیایی با بالاترین مقدار ۱۴٪ به‌دست آمد. با توجه به نتایج فعالیت ضد میکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره برگ زیتون و اولئوروپین استخراج شده پتانسیل افزایش بهبود عملکرد نگهدارنده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را دارند. علاوه بر این برگ زیتون به عنوان پسماند در صنایع روغن زیتون، هرس درختان زیتون و برداشت و تمیز کردن زیتون به مقدار زیاد یافت می شود، بنابراین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

صنعتی کردن روش‌های استخراج با توجه به اهمیت خواص این ترکیب می‌تواند مورد توجه قرار گیرد و ترکیب اولئوروپین استخراج و استفاده شود.

سپاس‌گزاری

از مزرعه فدک بابت در اختیار قرار دادن گیاه زیتون بدین وسیله قدرانی می‌شود. این مقاله حاصل بخش از پایان نامه دکتری تخصصی می‌باشد.

حامی مالی: نویسندگان مقاله، مراتب قدردانی خود را از آزمایشگاه سم‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به‌واسطه تأمین هزینه و انجام این پایان‌نامه اعلام می‌دارند.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه قم تایید شده است (کد اخلاق IR.IAU.QUM.REC.1402.142)

مشارکت نویسندگان

آقای جلال حسن و محمد کاظم کوهی در ارائه ایده و خانم معصومه بابایی و محمدعلی قاسم‌زاده در جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

1-Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. ***Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste.*** J Agric Food Chem 2005;53(4):823-37.

2-Boland Nazar SZ, Servili M, Ghavami M, Hosseini SE, Safafar H. ***Evaluation of Changes in Fatty Acid Composition in Three Different Varieties of Olives during the Course of Maturation.*** J FBT IAU 2012; 2: 23-6.

3-Ahamad J, Toufeeq I, Khan MA, Ameen MSM, Anwer ET, Uthirapathy S, et al. ***Oleuropein: A Natural Antioxidant Molecule in the Treatment of Metabolic Syndrome.*** Phytother Res 2019; 33(12): 3112-28.

4-Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. ***Polyphenols Benefits of Olive Leaf (Olea Europaea L) to Human Health.*** Nutr Hosp 2014; 31(3): 1427-33.

5-Benavente-Garcıa O, Castillo J, Lorente J, Ortuño AJ, Del Rio JA. ***Antioxidant Activity of Phenolics Extracted From Olea Europaea L. Leaves.*** Food Chemistry 2000; 68(4): 457-62.

6-Lee OH, Lee BY, Lee J, Lee HB, Son JY, Park CS, et al. ***Assessment of Phenolics-Enriched Extract and Fractions of Olive Leaves and their Antioxidant Activities.*** Bioresour Technol 2009; 100(23): 6107-13.

7-Otero DM, Oliveira FM, Lorini A, Antunes BDF, Oliveira RM, Zambiazi RC. ***Oleuropein: Methods for Extraction, Purifying and Applying.*** Rev Ceres 2020; 67(4): 315-29.

8-Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, Yang R, Charles MT, Rupasinghe HPV. ***Polyphenol Composition and Total Antioxidant Capacity of Selected Apple Genotypes for Processing.*** Journal of Food Composition and Analysis 2008; 21(5): 396-401.

9-Putnik P, Barba FJ, Španić I, Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Kovačević DB. ***Green Extraction***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

Approach for the Recovery of Polyphenols from Croatian Olive Leaves (Olea Europea). Food and Bioproducts Processing 2017; 106: 19-28.

10-Blasi F, Urbani E, Simonetti MS, Chiesi C, Cossignani L. ***Seasonal Variations in Antioxidant Compounds of Olea Europaea Leaves Collected from Different Italian Cultivars.*** Journal of Applied Botany and Food Quality 2016; 89.

11-Rezaei Seresht H, Cheshomi H, Aldaghi LS, Kaskani A. ***Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Various Extracts of Sclerorhachis Platyrachis on the Human Breast Adenocarcinoma Cells.*** SJKU 2020; 25(1): 33-42.

12-Tavakoli F, Emami A, Ranjbar AM, Beyk M. ***Synergistic Activity of Three Iranian Medicinal Plants In Combination with Ceftazidime and Neomycin Against Bacterial Strains Causing Nosocomial Infections.*** Res J Pharmacogn 2022; 9(3): 51-9.

13-Topuz S, Bayram M. ***Oleuropein Extraction from Leaves of Three Olive Varieties (Olea Europaea L.): Antioxidant and Antimicrobial Properties of Purified Oleuropein and Oleuropein Extracts.*** Journal of Food Processing and Preservation 2022; 46(6): e15697.

14-Demirkaya E, Dal O, Yüksel A. ***Liquefaction of Waste Hazelnut Shell by Using Sub-And Supercritical Solvents as a Reaction Medium.*** J of Supercritical Fluids 2019; 150: 11-20.

15-Mazaheri H, Lee KT, Bhatia S, Mohamed AR. ***Sub/Supercritical Liquefaction of Oil Palm Fruit Press Fiber for the Production of Bio-Oil: Effect of Solvents.*** Bioresource technology 2010; 101(19): 7641-7.

16-Martínez-Navarro ME, Cebrián-Tarancón C, Salinas MR, Alonso GL. ***Evolution of Oleuropein and other Bioactive Compounds in Arbequina Olive Leaves Under Different Agronomic Conditions.*** Horticulturae 2022; 8(6): 530.

17-Zeitoun MA, Mansour HM, Ezzat S, El Sohaimy SA. ***Effect of Pretreatment of Olive Leaves on Phenolic Content and Antioxidant Activity.*** American Journal of Food Technology 2017; 12(2): 132-9.

18-Bilgin M, Şahin S. ***Effects of Geographical Origin and Extraction Methods on Total Phenolic Yield of Olive Tree (Olea Europaea) Leaves.*** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 2013; 44(1): 8-12.

19-Bouaziz M, Sayadi S. ***Isolation and Evaluation of Antioxidants from Leaves of a Tunisian Cultivar Olive Tree.*** European Journal of Lipid Science and Technology 2005; 107(7-8): 497-504.

20-Japón-Luján R, Luque-Rodríguez J, De Castro ML. ***Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Oleuropein and Related Biophenols from Olive Leaves.*** Journal of Chromatography A 2006; 1108(1): 76-82.

21-Lama-Muñoz A, del Mar Contreras M, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. ***Content of Phenolic Compounds and Mannitol in Olive Leaves Extracts from Six Spanish Cultivars: Extraction with the Soxhlet Method and Pressurized Liquids.*** Food Chemistry 2020; 320: 126626.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

22-Ghasemi S, Koohi DE, Emmamzadehhashemi MS, Khamas SS, Moazen M, Hashemi AK, et al. ***Investigation of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Leaves Extracts from Seventeen Cultivars of Iranian Olive (Olea Europaea L.).*** Journal of Food Science and Technology 2018; 55: 4600-7.

23-Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. ***Phenolic Compounds in Olive Leaves: Analytical Determination, Biotic and Abiotic Influence, and Health Benefits.*** Food Research International 2015; 77: 92-108.

24-Lee OH, Lee BY. ***Antioxidant and Antimicrobial Activities of Individual and Combined Phenolics in Olea Europaea Leaf Extract.*** Bioresource Technology 2010; 101(10): 3751-4.

25-Shariatifar N, Pirali-Hamedani M, Moazzen M, Ahmadloo M, Yazdani D. ***Study if the Antimicrobial Effects of Aqueous Extract of Olea Europaea, Solanum Nigrum, Artemisia Sieberi, Teucrium Polium, Glycyrrhiza Glabra on Some Food-Borne Pathogenic Bacteria.*** Journal of Medicinal Plants 2019; 18(72): 264-73.[Persian]

26-Casas-Sanchez J, Alsina MA, Herrlein MK, Mestres C. ***Interaction between the Antibacterial Compound, Oleuropein, and Model Membranes.*** Colloid and Polymer Science 2007; 285: 1351-60.

27-Şengün İY, Öztürk B. ***Bitkisel Kaynakli Bazi Doğal Antimikrobiyaller.*** Anadolu University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology 2018; 7(2): 256-76.

28-Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, et al. ***Antimicrobial Activity of Commercial Olea Europaea (Olive) Leaf Extract.*** International journal of antimicrobial agents 2009; 33(5): 461-3.

29-Djenane D, Yangüela J, Derriche F, Bouarab L, Roncales P. ***Extrait De Feuilles D'olivier; Tests in Vitro Vis-À-Vis De Staphylococcus Aureus, Salmonella Enteritidis et Pseudomonas Aeruginosa; Application Sur La Viande De Dinde.*** Phytothérapie 2012; 10(1): 10-8.

30-Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M, Rasoulian B, Hajializadeh Z, et al. ***Olive (Olea Europaea L.) Leaf Extract Attenuates Early Diabetic Neuropathic Pain Through Prevention of High Glucose-Induced Apoptosis: In Vitro and in Vivo Studies.*** Journal of ethnopharmacology 2011; 136(1): 188-96.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 31| NO 10 | Jan 2024
Received: 12 Aug 2023
Accepted: 18 Sep 2023

Comparison of the Antimicrobial and Antioxidant Effects of Oleuropein Extracted from Arbequina Olive Leaves with the Extracts of its Leaf and Fruit

Masomeh Babaei[1,2], Jalal Hassan[†1], Mohammad Kazem Koohi[1], Mohammad Ali Ghasemzadeh[2]

Original Article

Introduction: Olive leaf is an evergreen plant and enriched in phenolic compounds and antioxidants. Oleuropein is the most common type of phenolic compounds can found in Olive leaves. The aim of this study was to compare the antimicrobial and antioxidant effects of Oleuropein extracted from olive leaf with the extracts from its leaf and fruit.

Methods: The type of study was experimental and after ethanol extraction from olive leaf and fruit, oleuropein was isolated from the leaf extract. Antimicrobial effects of Oleuropein obtained from olive fruit and leaf extracts against *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were determined using minimum inhibitory concentration (MIC) method. Amounts of phenolic compounds were derived by the Folin-Ciocalteu assay and the antioxidant effects were determined by the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical inhibition method. SPSS version 16 software was used for statistical calculations, Excel program used to draw graphs and one-way ANOVA was used to evaluate the effect of the intervention.

Results: Oleuropein was extracted from olive leaf in the amount of 14% with a purity of 70%. The highest and lowest amount of phenolic compounds and the antimicrobial and antioxidant effects were observed for Oleuropein obtained from olive leaf and olive fruit extracts, respectively. The amount of oleuropein phenolic compounds was equal to 879.16 (µg GAE/g), its MIC against S. *saprophyticus* and *P.aeruginosa* bacteria was equal to 3.25 and 12.5 mg/ml, respectively. Its antioxidant activity was equal to 8.59 µg/ml.

Conclusion: In the present study, oleuropein was extracted from olive leaves and the study showed that the amount of oleuropein in the Spanish Arbican variety was obtained with the highest value of 14%. According to the results of antimicrobial activity and antioxidant, it can be concluded that olive leaf extract and extracted oleuropein have the potential to increase and improve the performance of preservatives and antioxidants.

Keywords: Olive leaf, Phenolic compounds, Minimum inhibitory concentration, Oleuropein, Antimicrobial effects.

Citation: Babaei M, Hassan J, Koohi M.K, Ghasemzadeh M.A. **Comparison of the Antimicrobial and Antioxidant Effects of Oleuropein Extracted from Arbequina Olive Leaves with the Extracts of its Leaf and Fruit.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 31(10): 7129-43.

[1]Division of Toxicology, Department of Comparative Bioscience, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 02161117136**, email:** jalalhassan@ut.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-07-17]

[DOI: 10.18502/ssu.v31i10.14565]

CC BY-NC 4.0