الاستخلاص الكحولي لأوراق الزيتون العراقي وقياس فعاليتها المضادة للأكسدة والميكروبات

رمضان نجم عبد الله وحنين عبد الأمير الأسدي

كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية استخلاص أوراق الزيتون إذ كانت نسبة الاستخلاص 7.24% عند استخدام محلول 80% كحول أثيلي و6% عند استخدام محلول 20% كحول أثيلي وعند تحليل الفعالية المضادة للأكسدة بتقدير كمية الفينولات الكلية بالمستخلص وكانت 34 (ملغم/ غم) كحامض كاليك عند استعمال محلول الاستخلاص 80% كحول أثيلي. وكانت قيمة البيروكسيد PV لمحلول مستخلص 20% و80% كحول أثيلي هي 5.6 و5.8 و4.2 و5.5 (mmoles/Kg) على التوالي عند استعمالها بالتراكيز 50 و100 جزء بالمليون (ppm). وكانت نتائج التحليل الكروموتوكرافي عالي الكفاءة HPLC وجود المركبات الفينولية لمستخلص أوراق الزيتون 80% كحول أثيلي وهي Oleuropein، Luteolin-7-glucoside، Verbascoside، Apigenin-7-O-glocoside وبالكميات التالية 60.2، 16.5، 10.9، 9.8 (mg/g.d.wol) على التوالي. وعند قياس الفعالية المضادة للميكروبات لمستخلص أوراق الزيتون 80% كحول أثيلي ضد بكتريا *Staphlococcus aureus.* الموجبة لصبغة كرام و *E-Coli* و *Pseudomonas sp.* السالبة لصبغة كرام وعلى خميرة *Candida-albicans* لم يظهر المستخلص الكحولي 20% أي فعالية بينما مستخلص ذو التركيز 80% أظهر فعالية مضادة للميكروبات. إذ كان معدل قطر الهالة التثبيطية للبكتريا *Staphlococcus aureus.* 13 (ملم) بينما كانت لبكتريا *E-Coli* 14 (ملم) ولبكتريا *Pseudomonas aeuroginsa.* 14 (ملم) ولخميرة *candida albicans.* 13 (ملم) بالمقارنة مع المضاد الحيوي Gentamycin عند نفس التراكيز.

الكلمات المفتاحية: مستخلص أوراق الزيتون، فعالية مستخلص أوراق الزيتون المضادة للأكسدة، فعالية مستخلص أوراق الزيتون المضادة للميكروبات.

Alcoholic extraction of olive leaf and determination of antioxidant and antimicrobial activities

R. N. A. Al-Saidi and H. A. L. Alasadi

College of Agriculture/ University of Baghdad

Abstract

The aim of this study was to extract olive leaf Where the extraction percentage was 7.24% in the use of solution 80% ethanol, 6% in 20% ethanol. Analyses of antioxidant activity was determine The quantity of the whole phenols in the extraction and it was 34 (mg/kg) as Gallic acid in the use of extraction solution 80% ethanol. The peroxide value (PV) for the extraction solution 20%, 80% ethanol was 5.6, 5.8, 4.2, 5.5 respectively when used in the concentration 50 and 100 (ppm). The result of High pressure liquid chromatography (HPLC) analyses, the phenolic compound for olive leaf extract 80% ethanol were Oleuropein, Apigenin-7-O-glucoside, Verbascoside, Luteolin-7-glucoside, in this study Quantities 60.2, 16.5, 10.9, 9.8 (mg/g.d.wol), respectively. The determinetion of antimicrobial activity to olive leaf extract against gram positive bacteria (*staphylococcus aureus.)* and gram negative bacteria (*Pseudomonas sp.* and *E-coli*) and on Yeast *Candida-albicans* it shown no activity for the 20% ethanol extract while 80% ethanol extract shown antimicrobial activity compare to Gentamycin antibiotic in the same concentration.

Key words: Olive leaf extract, Antioxidant activity of olive leaf extract, Antimicrobial activity of olive leaf extract.

المقدمة

يعود نبات الزيتون Olea europea إلى العائلة الزيتونية Oleaceae (1، 2) تستخدم خلاصة أوراق هذا النبات في علاج العديد من الأمراض مثل الأنفلونزا، وضغط الدم وداء السكري (3) والأمراض السرطانية ومضاد للبكتريا والفيروسات والطفيليات والفطريات وذلك يعود لاحتواء أوراق الزيتون على العديد من المركبات الكيميائية Phytochemicals (4، 5)، إذ تشير الدراسات إلى وجود مركب فينولي يسمى (Oleuropein) وهو مركب مضاد للأكسدة Antioxidant ومثبط للجذور الحرة ومؤكسد جيد للبروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة فضلا عن احتواء أوراق الزيتون فلافونات أخرى مثل Apigenin-7-O-glucoside, Lutolin-7-glucoside, Verbascoside (6، 7) وهي مركبات أيضية ثانوية تبنى في النبات كاستجابة لإصابة ميكروبية أو نتيجة الجروح وهي تتكون من حلقة أروماتية واحدة أو أكثر ومجموعة واحدة من OH− (8). في السنين الأخيرة لوحظت الفائدة من المنتجات الطبيعية وبالأخص الحاوية على الفينولات والفينولات المتعددة حيث يعتقد أن لها دور في الصحة وتخفيف احتمال الإصابة بالأمراض المزمنة حيث يوجد أكثر من 6000 مركب فينولي مكتشف لحد الآن (9، 10) بعد إن كان 800 مركب في فترة السبعينات من القرن الماضي ولذلك فقد استهدفت الدراسة الحالية احد النباتات الحاوية على الفينولات المستعملة على نطاق واسع في بلدنا وتأثير هذا النبات كمضاد أكسدة طبيعي فضلا عن تأثيره على بعض أنواع البكتريا الشائعة.

المواد وطرائق العمل

- **الاستخلاص:** تم استخلاص أوراق الزيتون إذ جمع من منطقة بغداد واتبعت الطريقة المذكورة من قبل (11) وسلقت أورق الزيتون بخاريا لمدة 10 دقيقة بعدها برد بماء الحنفية 17 مْ أزيل الماء الزائد بورق النشاف ثم جففت لمدة 4 ساعة عند 60 مْ بعدها طحنت ونخلت لتبقى الأجزاء بحجم 0.1 ملم بعدها أجريت عملية الاستخلاص تحت الظروف التالية (تحضير محلول مائي من الكحول الأثيلي 20%، تحضير محلول مائي من الكحول الأثيلي 80%) وذلك بمزج الورق مع المحلول المائي من الكحول الأثيلي بنسبة 10/1 بعدها عدل الـ pH إلى 3 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك ثم نقلت إلى المحرك المغناطيسي على سرعة 4000 (rpm) وعلى درجة حرارة 40 مْ لمدة 2 ساعة وتم إجراء الطرد المركزي له على 6000 (rpm) لمدة 5 دقيقة بعدها أخذ الراشح و تم ترشيحه باستعمال ورق Whatman No: 1 ونقل إلى الفرن الهوائي على درجة حرارة 60 مْ للتخلص من الكحول وللحصول على مسحوق ورق الزيتون (تمت جميع الخطوات تحت ظروف مظلمة). وقد تم وزن مسحوق مستخلص أوراق الزيتون وقدرت نسبة الاستخلاص تبعا للطريقة المذكورة من قبل (1) وذلك بوزن المستخلص الجاف إلى وزن المسحوق الورقي المستعمل في الاستخلاص كنسبة مئوية كما في المعادلة التالية:

نسبة الاستخلاص = وزن المستخلص الجاف/ وزن مسحوق أوراق الزيتون × 100

- **قياس الفعالية المضادة للأكسدة:** تم قياس الفعالية المضادة للأكسدة من خلال:

أولا: تقدير كمية الفينولات في مستخلص أوراق الزيتون: أتبعت طريقة (12) في تقدير كمية الفينولات والنتائج وضحت كحامض كملغم من حامض الكاليك يعادل غم من مستخلص أوراق الزيتون (mg GAE/gm).

ثانياً: تقدير قيمة البيروكسيد: أتبعت طريقة (13) في تقدير قيمة البيروكسيد إذ قدرت بأتباع المعادلة الآتية:

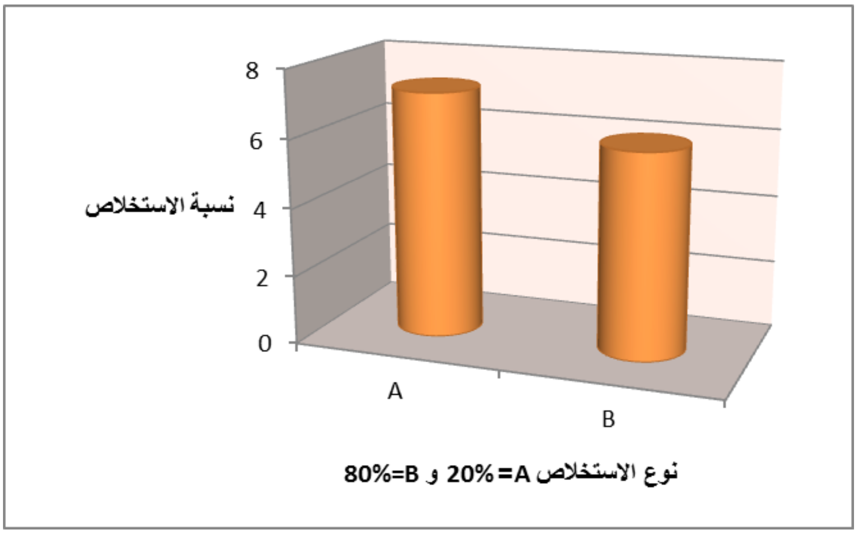
$$PV\ (m\ moles/\ Kg) = [(V - V_0) \times T \times 1000] /\ m$$

ثالثاً: تحليل كروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC: أتبعت طريقة (14) في تحليل HPLC وحسبت النتائج (mg/g.d.wol).

- **قياس الفعالية المضادة للميكروبات:** استخدمت طريقة الانتشار بالحفر حسب ما ذكره (15) لقياس تأثير مستخلص أوراق الزيتون (20% كحول أثيلي، 80% كحول أثيلي) على نمو الميكروبات (*Staphylococcus-aureus, Pseudomonas-aeuroginosa, E-coli, Candida-albicans*) إذ لقح وسط مولر هنتون الصلب المضاف أليه الدم حسب الحاجة (بوساطة قطنة معقمة من العالق البكتيري الحاوي على 1.5×10^{8} (خلية/ مل) بعدها عملت حفر على سطح الوسط الزرعي بوساطة الثاقب الفليني ووضعت التراكيز المحضرة من المستخلص بمقدار 0.1 مل لكل حفرة. استخدم المضاد الحيوي الجنتامايسين كنموذج للمقارنة، وكذلك الكحول الأثيلي للتأكد بأن ليس له تأثير تثبيطي على نمو البكتريا. تركت الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وبمعدل ثلاث مكررات لكل عزلة، حددت فعالية المستخلص بقياس قطر منطقة التثبيط (الهالة) حول كل حفرة. وتم حساب معدل المكررات الثلاثة.

النتائج والمناقشة

- **نسبة الاستخلاص:** بينت عملية الاستخلاص الكحولي لأوراق الزيتون بوساطة كحول الأثيلي شكل (1)، إن النسبة المئوية لكمية المستخلص 80% كحول الأثيلي إلى الوزن الجاف بلغت 7.24%، أما المستخلص 20% كحول الأثيلي 6% وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (16) بأن استخلاص أوراق الزيتون العراقي بالاستخلاص الكحولي البارد كان 7%.



شكل (1) نسبة الاستخلاص (%)

- **الفعالية المضادة للأكسدة:**

أولاً: كمية الفينولات الكلية في مستخلص أوراق الزيتون: كانت كمية الفينولات في المستخلص 80% ميثانول 34 (mg.GAE/g) وهذه النتيجة مطابقة لما ذكره (12) إذ أشار إلى أن الحصيلة من الفينولات تتراوح بين 22.36 إلى 38.25 (mg.GAE/g) وهذه القيمة تعتمد على ظروف الاستخلاص.

ثانياً: قيمة البيروكسيد PV: تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى إن استخلاص أوراق الزيتون بنسبة 80% ميثانول تكون قيمة البيروكسيد 5.6 (mmoles/kg) عند استعمال تركيز المستخلص 50 بالمليون وهي لا تختلف معنويا عن المستخلص 20% ميثانول. أما عند استعمال تركيز 100 بالمليون من المستخلص الكحولي كانت قيمة البيروكسيد أقل من تركيز 50 بالمليون إذ كانت القيمة 5.5 (mmoles/kg) للمستخلص 80% كحول

أما المستخلص 20% أيثانول فكانت 4.2 (mmoles/kg) وهذا يتفق مع ما وجده (17)، يعزى الانخفاض في قيم البيروكسيد إلى أن مستخلص أوراق الزيتون يمنع تكوين البيروكسيدات (7).

جدول (1) قيمة البيروكسيد لمستخلص أوراق الزيتون (mmoles/Kg)

نوع المستخلص	تركيز المستخلص بالمليون	
	50	100
20	5.6	4.2
80	5.8	5.5

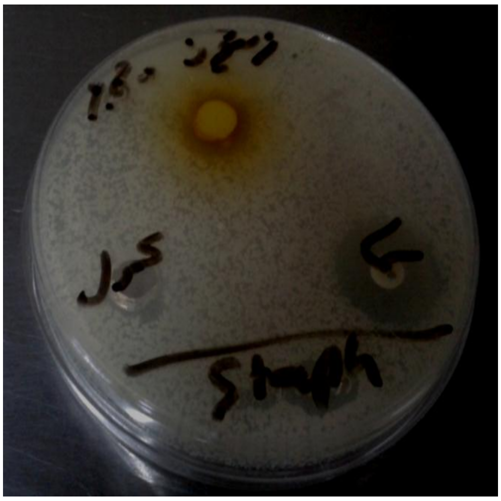
ثالثاً: تحليل الكروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC: كروموتوغرافي السائل عالي الأداء هي تكنولوجيا لفصل المركبات التي تتوزع بين الطور المتحرك والثابت. HPLC يستخدم طور متحرك سائل لفصل المركبات في الخليط، الطور الثابت يمكن أن يكون سائل أو صلب. المركبات أولا تذوب في المذيب وبعدها تدفع من خلال عمود الكروموتوغرافي تحت الضغط. كمية الانحلال مهمة تعتمد على طول التفاعل بين المركبات المذابة والطور الثابت. الجدول (2) يوضح المركبات الفينولية الموجودة في مستخلص أوراق الزيتون 80% ميثانول. Oleuropein هو المركب الفينولي الأساسي الذي يسهم في القابلية المضادة للأكسدة في مستخلص أوراق الزيتون، فعالية عملية الاستخلاص تعتمد على كميته الموجودة في المستخلص. إذ يلاحظ من الجدول (2) كمية Oleuropein عالية 60.2(mg/g.d.wol)، تلاها المركب الفينولي Luteolin-7-glucoside كميته 16.5 (mg/g.d.wol)، بعدها المركب Verbascoside كميته 10.9 (mg/g.d.wol)، وأخيرا المركب Apigenin-7-O-glucoside كميته 9.8 (mg/g.d.wol). هذه الكميات مقاربة مع ما وجده (11) إذ وجد أن كمية Oleuropein 67.3 (mg/g.d.wol)، أما المركب الفينولي Luteolin-7-glucoside كميته 17.6 (mg/g.d.wol) ، المركب الفينولي Verbascoside فأن كميته 10.5 (mg/g.d.wol) والمركب الفينولي Apigenin-7-O-glucoside كميته 10.5 (mg/g.d.wol).

جدول (2) المركبات الفينولية الموجودة في مستخلص أوراق الزيتون وكميتها (mg/g.d.wol)

الكمية (mg/g.d.wol)	المركب الفينولي
60.2	Oleuropein
16.5	Luteolin-7-glucoside
10.9	Verbascoside
9.8	Apigenin-7-O-glucoside

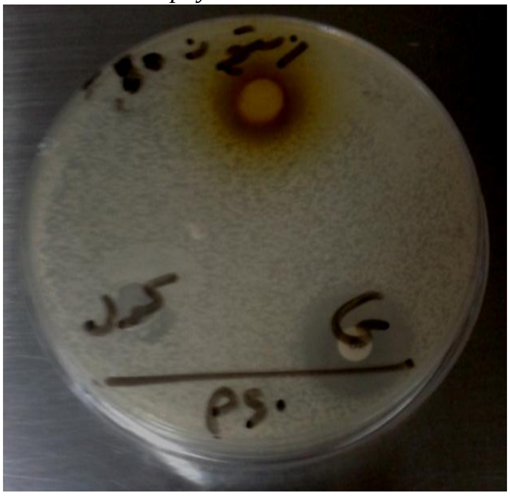
- **الفعالية المضادة للميكروبات:** بينت النتائج أن مستخلص أوراق الزيتون 80% كحول أثيلي يثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام شكل (2). إذ بلغ معدل قطر هالة التثبيط لنمو بكتريا *Staphylococcus aureus* 13 ملم جدول (3) وهذا يطابق مع ما وجده (8، 18)، كما أنه تأثير المستخلص 80% كحول أثيلي على البكتريا السالبة لصبغة كرام *E. coli* و *Pseudomonas* sp. ، أكثر من تأثيره على البكتريا الموجبة لصبغة كرام إذ إن قطر الهالة 14 ملم، كانت هالات التثبيط أكثر من ما وجده (16) إذ أن هالة التثبيط لبكتريا *Staphylococcus aureus.* 14 ملم ولبكتريا *Pseudomonas* sp. 10 ملم أما بكتريا *E. coli* 10 ملم. أما مستخلص أوراق الزيتون 20% كحول لم يظهر أي تأثير تثبيطي سواء على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع ما ذكره (19)، أعزي ذلك إلى ارتفاع نسبة Rutin و Oleuropein المضادة للميكروبات في مستخلص أوراق الزيتون وهذا يتطابق مع ما ذكره (6) أما تأثير المستخلص 80% كحول على

خميرة *Candida albicans.* فكان قطر هالة التثبيط 15 ملم وهذا يتفق مع ما ذكره (20) إذ كانت قطر الهالة التثبيط 14.5 ملم. أستعمل المضاد الحيوي Gentamycin كنموذج مقارنة إيجابي إذ كان تأثير المستخلص 80% كحول مقارب إلى المضاد الحيوي، أما الكحول فأستعمل كنموذج مقارنة سلبي ولم يظهر أي تأثير على الميكروبات.

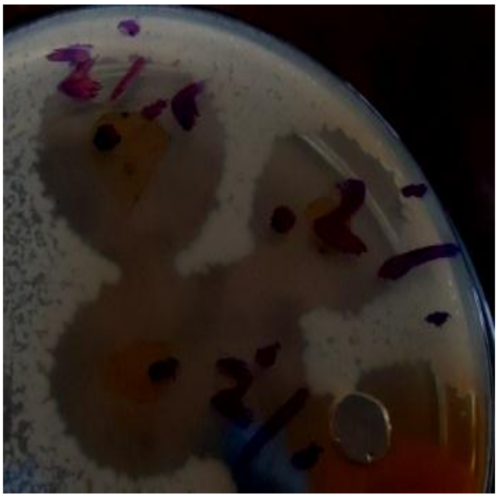


Staphylococcus-aureu

E-coli



Pseudomonas-aeuroginasa



Candida- albicans

شكل (2) قطر هالة التثبيط لمستخلص أوراق الزيتون

جدول (3) تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط لمستخلص أوراق الزيتون (ملم)

نوع البكتيريا	أوراق الزيتون 20% أيثانول	أورق الزيتون 80% أيثانول	نموذج سيطرة إيجابي (Mg/ml) Gentamycin
E-Coli	N.Z	14	14
Staphylococcus aureus	N.Z	13	14
Pseudomonas aeuroginosa	N.Z	14	16
Candida-albicans	N.Z	13	15

No Zone : N.Z

المصادر

1. Karakaya, A. (2011). Purification of polyphenolic compounds from crude olive leaf extract. MSc., Thesis, Izmir Institute of Technology.
2. Klen, J. K. (2014). Olive fruit phenols in olive oil processing the fat and antioxidant potential. University of Nova Gorica, 55: 22-32.
3. Julio, W.; Tali, G.; Mona, B.; Yosefa, B.; Eran, D.; Zohar, K. & Zecharia, M. (2012). Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. J. Med. Food Med. Food, 15 (7): 1-6.
4. Michele, H. & Andrew, V. (2012). Olive Leaf Extract Potent Antibacterial, Antiviral and Antifungal Agent.
5. Vicente, M.; Nuria, C.; Laura, P.; Vicente, M.; Luis, P. & Amparo, E. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). Antiviral Res., 66: 129-136.
6. Buren, O. (2014). Immobilization of olive leaf extract on chitosan nanoparticals and investigation of their effects on cancer cell lines. Doctoral thesis.
7. Kerem, K. A. (2010). Antimicrobail and antioxidant activities of olive leaf extract and its food application. Master thesis.
8. Syed, H. O. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Sci. Pharm., 78: 133-154.

9. الحلو، رازان محمد؛ البكري، إيمان مصطفى والصباغ، محمد ماجد. (2013). استخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون بمحلات مختلفة ودراسة فعالية المستخلصات كمضادات أكسدة. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، 29 (2)

10. Amani, T. (2012). Characterization of poly phenols in tunisian olive with anticancer capacity using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Doctoral thesis, University of Ezmir.
11. Konstantinos, S.; Archontoula, C. & Evangelos, K. (2014). Optimization Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times. Food, 3: 66- 81.
12. Chloe, D. G.; Quan, V. V.; Costas, E. S.; Paul D. R. & Christopher J. S. (2014). Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from olive leaves. Food Sci., 81:1884-1892.
13. Mohammad, A.; Mehdi, G.; Mohammad, G. & Pegah, D. (2015). Effect of Aerial parts of uritiea dioica (uriticaecae) on stability of soya bean oil. J. Pharmaceutical Res., 10(1): 125-131.
14. Ayana, B. & Turihan, K. N. (2009). Use of antimicrobial methyl cellulose films to control staphylococcus aureus. during storage of kasar cheese. Packaging Technology and Science, 22: 461- 469.

15. النعيمي، حنان عدنان؛ الثويني، أمنة نعمة والطحان، فريد جميل. (2008). تأثير فعالية المستخلصين المائي والكحولي لأوراق اليوكالبتوس في تثبيط نمو البكتريا المرضية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من مرضى مصابون بالتهاب البلعوم واللوزتين، المجلة العراقية للعلوم. 29 (2): 82–89.

16. Alhamd, A. K. (2014). Improvement extraction of crude compounds from Iraqi olive leaves by appling water-base and alcoholic-base extraction and their biological application. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, 4 (1): 183-200.

17. Theodora, I.; Andriana, E.; Vassilia, J. & Evangelos, S. (2013). Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential. Foods, 2: 18-31.
18. Morteza, A.; Reza, K.; Mahdiyeh, L.; Maryam, N. & Golnaz, R. (2012). Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. Scholars Research Library Annals of Biological Research, 3 (8):4189-4191
19. Khadija, M.; Nazar, T. & Tagreed, A. (2013). Olive Leaf Extract as a New Topical Management for Oral Mucositis Following Chemotherapy: A Microbiological Examination, Experimental. Pharmaceut Anal Acta, 4: 1-18.
20. Sudjana, A. N.; D'Orazio, C.; Ryan, V.; Rasool, N.; Ng, J.; Islam, N.; Riley, T. V. & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial Olea europapaea (olive) leaf extract. Int. J. Antimicrob. Agents, 33(5): 461-463.