

استخراج و تعیین میزان ترکیب اولئوروپین در رقم زیتون *Olea europaea* L. کشت شده در ایستگاه تحقیقاتی فدک (دزفول)

کامکار جایمند^۱، محمد باقر رضایی^۱، زهرا آبروش^۱، مصطفی گلی پور^۲ و مرتضی شریفی^۳

۱- اعضای هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، e-mail: jaimand@rifr-ac.ir

۲- کارشناس موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

۳- کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

چکیده

در این تحقیق، نسبت به بررسی میزان ترکیب اولئوروپین، که از ترکیبهای مهم دارویی گیاه زیتون محسوب می‌شود، در برگ رقم زیتون *Olea europaea* L. با نامهای زیتون بگنبا، زیتون محلی گرگان، زیتون دزفولی، زیتون خشاوی، زیتون خرم آبادی، زیتون دگل، زیتون بربر، زیتون زاهدی و زیتون قرمز کشت شده در ایستگاه تحقیقاتی فدک در دزفول اقدام گردید. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها در اواسط شهریور ۱۳۸۳، استخراج ترکیب با متانول صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) میزان ترکیب اولئوروپین مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در این بررسی میزان ترکیب اولئوروپین در نمونه برگ رقم زیتون خرم‌آبادی، با $0/08$ mg/ml بیشترین و در نمونه برگ رقم زیتون دگل با $0/04$ mg/ml کمترین مقدار را نشان داد که این مقادیر نشان دهنده اهمیت انتخاب رقم این گونه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زیتون (*Olea europaea*)، اولئوروپین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

مقدمه

جنس زیتون *Olea* از خانواده *Oleaceae* دارای ۳۵ الی ۴۰ گونه است که معروفترین گونه آن، زیتون معمولی یا زیتون خوراکی با نام علمی *Olea europaea* L. است که در بیشتر نقاط دنیا کشت می‌شود. زیتون از جمله درختان بی‌خزان، همیشه سبز و مقاوم است که بدون دخالت انسان بار داده و سالها مورد استفاده بشر قرار گرفته است. در بعضی از کتب قدیمی لفظ درخت جاویدان به آن اطلاق شده، زیرا دارای عمر طولانی با قدمتی معادل دو هزار سال است.

در ایران، سطح زیر کشت باغات آبی بارور، ۱۴۸۴۴ هکتار و آبی غیر بارور، ۴۸۹۴۴ هکتار (باغات غیر بارور حداکثر طی ۵ سال قابلیت باروری پیدا می‌کنند) می‌باشد. سطح زیرکشت باغات دیم بارور، ۶۴۷ هکتار و دیم غیر

بارور، ۳۷۶۲ هکتار است که در مجموع سطح زیر کشت باغات زیتون کشور، معادل ۶۸۱۹۷ هکتار می‌باشد. میزان تولید در باغات آبی، ۴۵۱۳۵ تن و باغات دیم، ۲۸۵ تن می‌باشد. در حال حاضر وزارت جهاد کشاورزی در ۲۴ استان کشور مبادرت به اصلاح باغات زیتون نموده است، از این میان استان فارس با ۱۲۱۸۴ هکتار بیشترین سطح زیر کشت و استان کردستان با ۴ هکتار کمترین سطح زیر کشت را دارا می‌باشند (آمار نامه کشاورزی، ۸۲-۱۳۸۱).

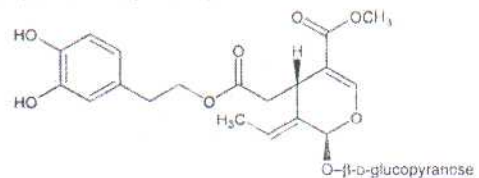
از تاثیرات دارویی و اثر بخشی برگهای گیاه زیتون می‌توان به پایین آوردن قند خون اشاره کرد. عصاره آبی رنگ زیتون که به علت وجود نوعی از ترکیبهای کولین است باعث پایین آوردن فشار خون می‌شود. علاوه بر این، برگ درخت زیتون حاوی یک لاکتون غیر اشباع و النولید (Elenolide) و الئوروپیک اسید (Oleuropeic acid)

است. همچنین در برگ این گیاه مواد قندی، تانن، موم، اسید گالیک و مانیت نیز شناسایی شده است (صانعی، ۱۳۷۸).

ترکیب اولئوروپین و هیدروکسی تیروزول^۱ دارای خواص بیولوژیک و خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و قابلیت تخلیص کردن رایکال آزاد را دارا می‌باشند (Visioli et al., 1998). وجود ترکیبهای، آنتی‌اکسیدان در روغن زیتون تصفیه نشده و زیتون خام موجب افزایش مقاومت لیپوپروتئین با دانسیته کم، نسبت به اکسید شدن می‌شود (Aruoma et al., 1998; Moon & Terao, 1998). ترکیبهای اولئوروپین و هیدروکسی تیروزول به دارا بودن چندین خواص بیولوژیک شناخته شده‌اند. خیلی از این ترکیبها خواص ضد اکسید کنندگی و قابلیت تخلیص کردن رادیکال آزاد را دارا هستند (Visioli et al., 1998). وجود ضد اکسید کننده‌هایی در روغن زیتون تصفیه نشده و زیتون موجب افزایش مقاومت از لیپوپروتئین با دانسیته کم به اکسید کنندگی می‌باشد. (Aruoma et al., 1998; Moon & Terao, 1998). ترکیب اولئوروپین و هیدروکسی تیروزول افزایش تولیدی از فازهای ماکرو را نشان نداده‌اند (Visioli et al., 1998). همچنین ترکیب هیدروکسی تیروزول مانع آفت peroxynitrite که مرتبط با DNA است می‌شود (Deiana et al., 1999). با محافظت سلولهای قرمز خون انسان بر علیه پراکسید هیدروژن، تناوب اکسید کنندگی (Manna, et al., 1999) و کاهش دفع ادرار از F2-isoprostane 8-iso-PGF-a و یک بیومارکر از استرن اکسید کننده را باعث می‌شود (Visoli et al., 2000). ترکیب اولئوروپین دارای خواص بیولوژیک متعددی است. عصاره برگ درخت زیتون به عنوان منبعی مهم از سکوایریدوئید^۲ در طب سنتی بر علیه بسیاری از میکروبهای بیماریزا بکار می‌رود (Soler-Rivas et al., 2000).

اولئوروپین ترکیب تلخ اصلی در زیتون است که در سال ۱۹۰۸ توسط Bourquelot و Vintilesco شناسایی گردید، و در سال ۱۹۶۰ ساختار آن (شکل ۱) که از یک دی هیدروکسی heterosidic ester elenolic acid و فنیل اتیل الکل^۳ تشکیل شده است، مشخص گردید (Walter et al., 1973).

گلوکوزید الونولیک اسید یک ترکیب فنلی نیست و فقط به بخش secoiridoid از ترکیب اولئوروپین ارتباط دارد. ولی نزدیک به ترکیب قبلی oleoside تجزیه شده از برگ زیتون است (Gariboldi et al., 1980).



شکل ۱: ساختمان ترکیب اولئوروپین

مواد و روشها

روش استخراج

برگ درختان مورد نظر، در اواسط شهریور ماه ۱۳۸۳ از ایستگاه تحقیقاتی فدک در استان خوزستان جمع‌آوری گردید. پس از انتقال برگها به آزمایشگاه و خشک کردن در دمای محیط، ۱ گرم برگ زیتون از هر نمونه، با آسیاب پودر شده و با ۳۰ ml حلال متانول به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم (۵۰°C) حرارت داده شد. سپس محلول صاف شده و به حجم ۳۰ ml رسانده شد تا نمونه جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) آماده شود.

شرایط دستگاهی HPLC

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تکنیک مناسبی برای جداسازی و اندازه‌گیری محصولات طبیعی،

^۱ Hydroxytyrosol

^۲ Secoiridoid

^۳ Dihydroxyphenyl ethyl alcohol

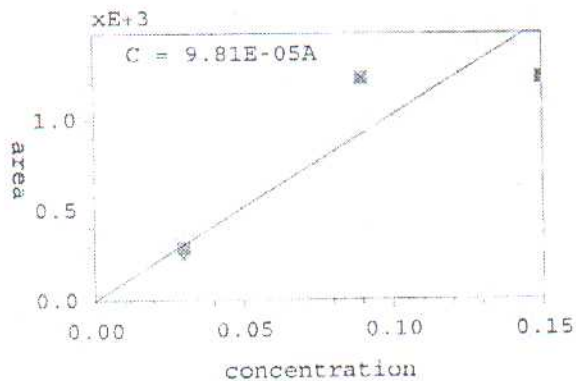
استخراج و تعیین میزان ترکیب

اولئوروپین در رقم ۹ زیتون *Olea europaea* L.

مواد دارویی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از روشهای دقیق جهت اندازه‌گیری ترکیب اولئوروپین استفاده از HPLC است. دستگاه مورد استفاده ساخت شرکت Knauer مدل Well Chrom 2000، دارای پمپ مدل Maxi-star K-1000 و دکتور مدل spectrophotometer K-2500 بود که در ۲۷۸ نانومتر تنظیم گردید. ستون مورد استفاده Erospher 100 C₁₈ به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۴ میلیمتر بود. به عنوان فاز متحرک از متانول، آب و اسید استیک (۸۰ : ۱۸ : ۲) با شدت جریان یک میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ μl بود و مدت زمان انجام آزمایش ۲۰ دقیقه به طول انجامید.

رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

اندازه‌گیری میزان اولئوروپین با تهیه منحنی استاندارد به صورت زیر انجام شد. غلظتهای متفاوتی از نمونه استاندارد (سه نمونه با غلظتهای ۰/۰۳، ۰/۰۹ و ۰/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه و به دستگاه تزریق شد. بعد با داشتن مساحت سطح زیر پیک ماده مجهول و انطباق آن با نمودار کالیبراسیون غلظت ماده مجهول به دست آمد (شکل ۲).



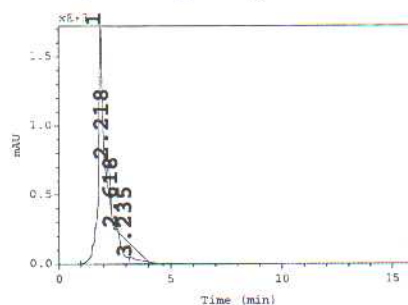
شکل ۲: منحنی کالیبراسیون

نتایج

در این بررسی، میزان ترکیب اولئوروپین، به تفکیک در برگ رقم ۹ نمونه زیتون *Olea europaea* L. بدست آمد. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، به ترتیب برای زیتون بگنیا ۰/۰۵ mg/ml، زیتون محلی گرگان ۰/۰۷ mg/ml، زیتون دزفولی ۰/۰۶ mg/ml، زیتون خشاوی ۰/۰۷ mg/ml، زیتون خرم بادی ۰/۰۸ mg/ml، زیتون دگل ۰/۰۴ mg/ml، زیتون بربر ۰/۰۷ mg/ml، زیتون زاهدی ۰/۰۶ mg/ml و زیتون قرمز ۰/۰۶ mg/ml بدست آمد. نمونه برگ زیتون خرم آبادی با ۰/۰۸ mg/ml بیشترین و نمونه برگ زیتون دگل با ۰/۰۴ mg/ml کمترین مقدار ترکیب اولئوروپین را دارا بودند. با توجه به اینکه نمونه‌ها در ۳۰ میلی لیتر حلال رقیق شده بود می‌توان میزان اولئوروپین در برگ نمونه‌های مورد بررسی را بر حسب میلی گرم در یک گرم برگ گیاه به صورت زیر محاسبه کرد (جدول ۱)



شکل ۳: نمونه استاندارد



شکل ۴: نمونه خرم آبادی

جدول ۱: میزان ترکیب اولئوروپین در برگ ۹ رقم زیتون *Olea europaea* L.

ردیف	گونه	اولئوروپین (میلی گرم در میلی لیتر)	درصد اولئوروپین
۱	زیتون بگنیا	۰/۰۵۱۸۶	۰/۱۵۵۵۸
۲	زیتون محلی گرگان	۰/۰۷۴۱۹	۰/۲۲۲۵۷
۳	زیتون دزفولی	۰/۰۶۱۹۱	۰/۱۸۵۷۵
۴	زیتون خشاوی	۰/۰۷۰۵۱	۰/۲۱۱۵۳
۵	زیتون خرم آبادی	۰/۰۸۰۱۲	۰/۲۴۰۳۶
۶	زیتون دگل	۰/۰۴۴۷۵	۰/۱۳۴۲۵
۷	زیتون بربر	۰/۰۷۵۵۶	۰/۲۲۶۶۸
۸	زیتون زاهدی	۰/۰۶۱۸۵	۰/۱۸۵۵۵
۹	زیتون قرمز	۰/۰۶۱۶۰	۰/۱۸۴۸

بحث

محققان در اروپا خواص ترکیب اولئوروپین را ارزیابی کرده‌اند و می‌گویند که این ترکیب بوسیله حل کردن آستر خارجی میکروپها، باعث غیر فعال شدن آنها می‌شود. مطالعات جدید نشان می‌دهد که ترکیب اولئوروپین باعث محافظت لیوپروتئین‌های با دانسیته کم از اکسیداسیون می‌شود. بنابراین باعث کاهش LDL (کلسترول بد) می‌شود. مطالعه تحقیقاتی دیگری در فرانسه مشخص کرده که عصاره برگ زیتون خاصی آنتی اکسیدانی بالایی را از خود نشان می‌دهد.

با توجه به اینکه در حال حاضر در ۲۴ استان کشور مبادرت به اصلاح باغات زیتون شده است، بنابراین از تاثیرات دارویی و اثر بخشی این گیاه می‌توان جهت صنایع دارویی در کشور استفاده نمود. در حال حاضر گونه‌های مختلفی از زیتون در شرایط آب و هوایی متفاوت ایران کشت می‌شود. با توجه به اینکه زیتون در طول سال همیشه سبز است، میزان ترکیب اولئوروپین آن می‌تواند در طول سال در گیاه متفاوت باشد.

طبق آزمایشهای انجام شده، ترکیب Calcium elenolate (که از ترکیب اولئوروپین مشتق شده است) با تداخل در مراحل تولید اسید آمینه، باعث مرگ ویروسها می‌شود. این موضوع باعث جلوگیری از اجتماع ویروس در غشاء سلولی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که این ترکیب با

رخنه کردن و آلوده کردن سلولهای مهمان، مانع تغییرپذیری دفاع ویروسی می‌شود. برای مثال در عمل ویروسها، این ترکیب تولید از رونوشت معکوس آنزیم را خنثی می‌کند و همچنین اعتقاد به خنثی کردن آنزیم پروتئاز است. این آنزیمها برای عمل ویروسهایی مثل HIV با تغییر دادن RNA از یک سلول سالم ضروری است.

عصاره برگ زیتون همچنین دارای فلاونوئیدهای طبیعی و استر می‌باشد. بعضی تحقیقات کاربردهای جدیدی را برای ترکیب اولئوروپین و برخی فلاونوئیدها مثل روتین، آپی جنین و لوتئولین (Luteolin) نشان داده است. برای مثال، در یک بررسی، تزریق وریدی ترکیب اولئوروپین به حیوان باعث کم شدن فشار خون و باز شدن شریانهای مسدود اطراف قلب شده است. این قابلیت برای پایین آوردن فشار خون، ممکن است کاربرد سنتی برگ زیتون را که به این منظور صورت می‌گرفت، تصدیق کند. اما به هر حال برای استفاده از آن در بیماریهای انسانی، احتیاج به بررسی بیشتر می‌باشد.

در بررسی که توسط Ryan و همکاران (۲۰۰۳) در استرالیا بر روی روند تغییر میزان ترکیب فنلی اولئوروپین در میوه و برگ گونه‌ای از درخت زیتون انجام گردید، مشخص شد که میزان این ترکیب در برگ و میوه در ماههای مختلف سال یکسان نیست. (جدول ۲)

جدول ۲: تغییرات ترکیب اولئوروپین در میوه و برگ زیتون (برحسب میلی گرم بر گرم وزن ماده خشک)

Dec 30	Jul 24	Jun 15	May 31	May 18	May 3	Apr 20	Apr 6	Mar 23	Mar 8	Feb 11	Feb 1	
۴۴۴	۱۴	۲۰	۲۴	۲	۱۵	۳	۳	۲	۲	۴	۳	میوه
۱۳۸	۶۷	۱۶۰	۱۸۶	۱۹۶	۱۸	۱۵۶	۶۴	۹۴	۳۱	۶	۲۰	برگ

and tyrosine nitration by extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol., Free radical Biol. Med., 26: 762-769.

- Gariboldi, P., Jommi, G. and Verotta, L. 1986. Secoridoids from *Olea europaea*. phytochemistry, 25(4): 865-869.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G. and Zappia, V., 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. J. Nutr. Biochem., 10: 159-165.
- Moon, J.H. and Terao, J., 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. J. Agric. Food Chem., 46: 5062-5065.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. J. Sci. Food Agric., 80: 1013-1023.
- Visioli, F., Bellomo, G. and Galli, C., 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochem. Biophys. Res. Commun., 247: 60-64.
- Visioli, F., Bellosta, S., and Galli, C., 1998. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macro-phages. Life Sci., 62: 541-546.
- Visioli, F., Caruso, D., Galli, C., Viappiani, S. and Sala, A. 2000. Olive oils rich in catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. Biochem. Biophys. Res. Commun., 278: 797-799.
- Walter, W.M., Fleming, J.R.H.P. and Etchells, J.L., 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olive. Appl. Microbiol., 26: 773-776.

اولئوروساید (Oleuroside)، به عنوان ایزومر اولئوروپین یک ترکیب فنلی دیگر است که به مقدار قابل ملاحظه‌ای در برگ زیتون، به ویژه برگهای مسن تر، یافت می‌شود. تغییرات میزان اولئوروساید اغلب به موازات تغییرات اولئوروپین صورت می‌گیرد. این موضوع نشان می‌دهد که این دو ترکیب در تعادل نیستند. اما به نظر می‌رسد که اولئوروساید از تبدیل ساختمانی اولئوروپین بدست می‌آید زیرا همیشه میزان اولئوروپین بیش از اولئوروساید است (Ryan et al., 2003).

منابع مورد استفاده

- آمار نامه کشاورزی سال ۸۲ - ۱۳۸۱. انتشارات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۳.
- صانعی، ص، ۱۳۷۸. همیشه لاغر باشید. انتشارات کنکاش، انتشارات زمان، تهران، ۸۵ صفحه.
- Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corongiu, F.P., Assunta D.M. and Aeschbach, R., 1998. Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. J. Agric. Food Chem., 46: 5181-5187.
- Bourquelot, E. and Vintilesco, J.C.R., 1908. Hebd. Seances Acad. Sci., 147: 533-535.
- Deiana, M., Aruoma, O.I., Bianchi, M., Spencer, J.P.E., Kaur, H., Halliwell, B., Aeschbach, R., Banni, S., Assunta D.M. and Corongiu, F.P., 1999. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification

Extraction and Determination of Oleuropein in Nine Varieties of *Olea europaea* L. Cultivated in Fadak Research Station (Dezful)

K. Jaimand¹, M.B. Rezaee¹, Z. Abravesh¹, M. Golypour¹ and M. Sharifee²

- 1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran. e-mail: Jaimand@rifr-ac.ir
- 2- Research Center of Agriculture and Natural Resources of Khuzistan

Abstract

Oleuropein, a compound that cause the bitter taste of olive, has many pharmacological properties. It is a natural antioxidant. In this study, the leaves of nine cultivars of *Olea europaea* L. named: Olive Begonia, Olive Gorgan, Olive Dezful, Olive Khshavy, Olive Khoramabady, Olive Dagal, Olive Barbar, Olive Zahedy and Olive Red were collected from Fadak station in Dezful city (Khozestan province, western south of Iran) at September 2004. After extraction of leaves by methanol, the oleuropein contents of extracts were determined by HPLC. Maximum amount of oleuropein was found in Olive Khoramabady (0.08 mg/ml, 0.24% w/w) and minimum in Olive Dagal (0.04 mg/ml, 0.13% w/w).

Key words: *Olea europaea*, Oleuropein, HPLC.