

علمی پژوهشی

بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های ضد اکسایشی عصاره متانولی برگ زیتون

لیلا حق جو^۱، حسن برزگر^{۲*}، حسین جوینده^۲^۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران^۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۰۱)

چکیده

مصرف برگ زیتون، از یک سو به علت پتانسیل ضد اکسایشی و از سوی دیگر به علت کاربرد در داروسازی و طب مورد توجه واقع شده است. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن سستی، شامل آون با دماهای ۶۰ و ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، سایه، مایکروویو با توان‌های ۴۰۰ و ۷۰۰ وات، بر ویژگی‌های عصاره متانولی برگ زیتون، بود. فعالیت ضد اکسایشی عصاره برگ زیتون با آزمون‌های سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH، آزمون رادیکال کاتیون ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) انجام شد و مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئید موجود در عصاره‌های برگ زیتون با روش‌های فولین سیوکالتو و کلرید آلومینیوم تعیین گردید. ترکیبات برگ زیتون شامل رطوبت (۵۵/۱۷٪)، خاکستر (۶/۱۲٪)، چربی (۳/۱۸٪)، پروتئین (۸/۲۱٪)، کربوهیدرات نامحلول (۱۸/۷۴٪)، و کربوهیدرات کل (۲۷/۳۲٪) بود. نتایج نشان داد که اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر ویژگی‌های ضد اکسایشی و استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در برگ زیتون اثر معنی‌داری ($p \leq 0.05$) دارند و با افزایش غلظت عصاره‌های مختلف، فعالیت ضد رادیکالی آن‌ها افزایش یافت. مهار رادیکال‌های آزاد برگ زیتون وابسته به غلظت هر کدام بود و بهترین روش خشک کردن، مربوط به خشک کردن توسط مایکروویو با توان ۴۰۰ وات، و ضعیف‌ترین روش خشک کردن، مربوط به خشک کردن توسط آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.

کلید واژگان: فعالیت ضد اکسایشی، برگ زیتون، ترکیبات فنولی، خشک کردن.

* مسئول مکاتبات: hbarzegar@asnruk.ac.ir

۱- مقدمه

در خشک کردن، بر نوع و میزان ترکیبات فعال زیستی استخراج شده از برگ چای مؤثر است [۱۰]. در تحقیقی دیگر، تأثیر روش‌های خشک کردن در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و خشک کردن انجمادی بر استخراج ترکیبات عصاره برگ زیتون بررسی شد و نتایج نشان داد که در اثر خشک کردن در آون، بازیافت فنل و فعالیت ضداکسایشی افزایش یافته است [۱۱]. با توجه به اینکه برگ زیتون جزء ضایعات باغ‌ها بوده و منبع غنی از ترکیبات فنولی است، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر خصوصیات ضداکسایشی عصاره متانولی برگ زیتون و انتخاب بهترین روش خشک کردن جهت استفاده بهینه از ترکیبات ضداکسایشی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: متانول، معرف فولین سیوکالتو، کربنات سدیم، گالیک اسید، نیتريت سدیم، کلرید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم، کوئرتستین، بافر فسفات، پرسولفات پتاسیم، کلرید آهن، ترولوکس، اسیدکلریدریک، بافر سدیم استات، اسیدسولفوریک، کاتالیزور (اکسید سلنیوم، سولفات مس)، اسید بوریک، اسید فرمیک، $ABTS^4$ ، BHT و $DPPH^5$ بودند.

برگ‌های زیتون در مهرماه سال ۱۳۹۵، از درختان زیتون دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جمع‌آوری شد. بعد از تایید اسم علمی، برگ‌های زیتون جمع‌آوری شده به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل گردید.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- خشک کردن نمونه‌ها به روش آون (دمای

۶۰ و ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد)

جهت خشک کردن در آون، نمونه‌های آماده شده بر سینی آون به‌طور یکنواخت گسترده شد. برگ‌هایی که در آون ۱۰۵ قرار داشتند به مدت ۳ ساعت و برگ‌هایی که در آون ۶۰ قرار داشتند به مدت ۶ ساعت در آون قرار گرفتند و

برای جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی، مواد مصنوعی جلوگیری کننده از اکسیداسیون مانند BHT^2 ، BHA^1 ، $TBHQ^3$ اضافه می‌شود، اما استفاده از ضداکسایندهای طبیعی ایمن‌تر از مواد مصنوعی ترکیبی می‌باشد [۱]. برگ درختان که در کشاورزی جزء ضایعات محسوب می‌شود منبع مهمی از ضداکسایندهای طبیعی شامل اسید فنولیک، فلاونوئیدها، لیگنین و شبه اسکروئیدها می‌باشند [۲]. اخیراً، اطلاعات سم شناسی درباره ضداکسایندهای مصنوعی و کاربرد آن‌ها، سمی بودن، بیماری‌زا بودن و سرطان‌زا بودن آن‌ها را نشان می‌دهد [۳]. بنابراین، هدف بسیاری از پژوهش‌های جدید شناسایی ضداکسایندهای جدید دیگر با منشا طبیعی است که خواص مشابهی با ضداکسایندهای مصنوعی داشته باشد [۴].

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. و از تیره *Oleacea* می‌باشد. جنس *Olea* با حدود ۳۰ تا ۳۵ گونه از آفریقا تا اقیانوسیه پراکندگی دارد. [۵]. برگ‌های درخت زیتون حاوی ترکیبات فنلی، ترپنی، ترکیبات محلول در چربی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و مواد معدنی هستند [۶]. برگ‌های این گیاه اثر ضد میکروبی و پتانسیل ضداکسایشی دارد. همچنین برگ‌های این گیاه ملین بوده که سبب بهبود تبخال، سردرد و نیروبختی بدن و دارای فعالیت ضدسرطانی و ضدآترواسکلروز است [۷].

خشک کردن یکی از مراحل مهم پس از برداشت گیاهان دارویی می‌باشد که نقش مهمی در کمیت و کیفیت مواد مؤثر آن‌ها دارد [۸]. فرآیند خشک کردن بر درصد و اجزای اسانس اثر قابل توجهی دارد و این تأثیر بر اساس دمای خشک کردن، طول مدت خشک کردن و گونه گیاهی متفاوت است [۹]. از جمله پژوهش‌هایی که روی تأثیر روش خشک کردن بر استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان مختلف انجام شده می‌توان به تحقیق عبدالله و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد، محققان در این پژوهش، اثر روش‌های خشک کردن را بر ظرفیت ضداکسایشی و فنل کل برگ‌های چای مورد ارزیابی قرار داده و دریافتند که روش بکار رفته

1. 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
2. 2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl

1. Butylated Hydroxy Anisol
2. Butylated Hydroxy Toluene
3. Tertiary Butyl Hydro Quinone

۲-۴-آزمایش‌های شیمیایی برگ زیتون

آزمایش‌های شیمیایی برگ زیتون شامل اندازه‌گیری درصد رطوبت (AOAC به شماره ۹۵۲/۰۸)، خاکستر (AOAC به شماره ۹۳۸/۰۸)، درصد پروتئین (AOAC به شماره ۹۶۸/۰۶)، درصد روغن (AOAC به شماره ۹۴۸/۱۶)، کربوهیدرات کل [۱۵] انجام شد. لازم به ذکر است که این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت.

۲-۴-۱-آزمون اندازه‌گیری فنول کل با روش فولین

سیوکالتو

فنول کل عصاره برگ زیتون با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. ۱ میلی لیتر عصاره با غلظت mg/ml ۰/۱ با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (که به نسبت ۱۰ : ۱ با آب مقطر دی یونیزه رقیق شده) مخلوط شده و به مدت ۲/۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه گردید. بعد از یک ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق در مکان تاریک، میزان جذب نوری در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV (WPA Biochrom مدل: E112788 کشور آلمان) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول اسید گالیک با غلظت‌های ۰/۲ تا ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه شده و فعالیت نمونه معادل میلی‌گرم اکی والانت گالیک‌اسید در واحد وزن بیان گردید.

۲-۴-۲-آزمون ترکیبات فلاونوئیدی

محتوای فلاونوئید کل بر اساس رنگ سنجی آلومینیوم تری کلرید به روش حساسین و رحمان [۲۵] و زیشن و همکاران [۲۶] با اندکی اصلاح اندازه‌گیری گردید. در این روش، ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره برگ زیتون mg/ml ۰/۱ که قبلاً تهیه شده، با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده سپس ۷۵ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵٪ به مخلوط افزوده و پس از گذشت ۶ دقیقه ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلرید ۱۰٪ ($pH=5.8$) به آن اضافه نموده و پس از گذشت ۵ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار به آن افزوده (محلول صورتی رنگ) و بلافاصله جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول کوئرستین با غلظت ۰/۰۲۱ تا mg/ml ۰/۱۲۶ استفاده شد و محتوای فلاونوئید کل بر حسب میلی گرم بر اکی والان کوئرستین بیان شد.

پس از گذشت این مدت زمان از آن خارج گردیده و پس از اینکه به دمای محیط رسیدند در پاکت‌های پلی‌اتیلنی زیپ‌دار غیر قابل نفوذ به هوا قرار داده شده و تا زمان عملیات عصاره‌گیری در فریزر $^{\circ}C$ ۱۸- نگهداری شدند [۱۱].

۲-۲-۲-خشک کردن به روش سایه

در این روش، نمونه‌های برگ زیتون پس از شستشو با آب مقطر روی سطح سینی که از قبل یک ورقه آلومینیوم روی سطح آن قرار داده شده بود پهن گردید. نمونه‌ها پس از گذشت مدت زمان یک هفته در دمای اتاق ($^{\circ}C$ ۲۵ درجه سانتی-گراد) و رسیدن به وزن ثابت، در پاکت‌های زیپ‌دار غیر قابل نفوذ به هوا قرار داده شده و تا زمان عملیات عصاره‌گیری در فریزر $^{\circ}C$ ۱۸- نگهداری گردید [۱۲].

۲-۲-۳-خشک کردن به روش مایکروویو (توان ۴۰۰ و ۷۰۰ وات)

در روش خشک کردن با استفاده از دستگاه مایکروویو (پاناسونیک، مدل: NN-ST75W)، نمونه‌های آماده شده بر ظرف مایکروویو قرار گرفته و برای هر کدام از توان‌ها به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت نمونه‌های خشک شده در پاکت‌های پلی‌اتیلنی زیپ‌دار غیر قابل نفوذ به هوا قرار داده شده و تا زمان عملیات عصاره‌گیری در فریزر $^{\circ}C$ ۱۸- نگهداری گردید [۱۳].

۲-۳-عصاره‌گیری

به منظور عصاره‌گیری، برگ‌های خشک شده در مراحل قبل، توسط آسیاب برقی (پارس خزر، مدل: GR)، آسیاب شد و جهت یکنواختی اندازه پودر برگ‌های زیتون از الک با مش ۰/۰۵ میلی‌متر استفاده شد. جهت عصاره‌گیری از محلول متانول / آب (۲۰ : ۸۰) استفاده گردید و پس از اضافه کردن حلال به نسبت ۱:۱۰ و پوشاندن درب، ظرف به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با سرعت rpm ۲۰۰ قرار گرفت و پس از این مدت، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف و توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ (OSK مدل: 13882R Type A) تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده به آن با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از حذف حلال جهت آزمایش‌های بعدی درون ظرف تیره رنگ در یخچال نگهداری شدند [۱۴].

غلظت ۰/۲ تا ۲ (mg/ml) تهیه شده، و فعالیت نمونه با هم ارزی (معادل) ظرفیت ضد اکسایشی ترولوکس (TEAC) بر حسب mg/ml trolox/g ارزیابی گردید.

۲-۴-۵-آزمون ABTS

آزمون ABTS مطابق روش ری و همکاران [۱۸] با کمی تغییر و اصلاح انجام شد. در این آزمون ابتدا محلول با غلظت ۷ میلی مولار ABTS در آب مقطر تهیه شد. سپس یک محلول ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات نیز تهیه شده و هر دو محلول به نسبت ۱:۱ با یکدیگر مخلوط شدند و مخلوط حاصل در دمای اتاق و در جای تاریک به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. سپس این محلول توسط محلول بافر فسفات ۴ میلی مولار (pH=۷/۴) رقیق شده تا میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر به 0.02 ± 0.07 برسد. $3/9$ میلی لیتر محلول ABTS (با مشخصات بالا) به 0.1 میلی لیتر عصاره رقیق شده (با غلظت $8.00 - 0.25$ mg/ml) افزوده شده و توسط ورتکس کاملاً مخلوط شد. بعد از ۶ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای اتاق، میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه گیری گردید. درصد بازدارندگی توسط معادله ۲ محاسبه شد

معادله ۲: $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100 =$ درصد بازداری

۲-۴-۶-روش آماری

آنالیز داده آزمون‌ها به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. میانگین حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0² و آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ مقایسه شدند. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱-نتایج آزمون‌های شیمیایی برگ زیتون

نتایج اندازه گیری ترکیبات شیمیایی برگ زیتون در جدول ۱ آورده شده است.

۲-۴-۳-آزمون تعیین قدرت مهار رادیکالی DPPH

برای سنجش فعالیت ضد اکسایشی عصاره های استخراج شده، از روش به دام اندازی رادیکال های آزاد ۲-۲ دی فیل-۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH)، که در آن خاصیت آنتی رادیکالی عصاره استخراج شده بر اساس توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره آبی و یا میزان بی رنگ کردن محلول بنفش DPPH و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر استفاده می شود. ۳ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره تهیه شده به ۱ میلی لیتر محلول متانولی ۲۰۲-دی-فیل-۱-پیکریل-هیدرازیل (۰/۰۰۴٪) اضافه و برای مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. میزان جذب نمونه ها در سه تکرار به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری و درصد بازداری DPPH در هر یک از نمونه ها محاسبه گردد [۱۶]. فرمول درصد مهار رادیکالی معادله ۱ محاسبه شد.

معادله (۱)

$$RSA\% = \frac{Abs\ of\ blank - Abs\ of\ sample}{Abs\ of\ blank} \times 100$$

به روش مشابه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی BHT به عنوان یک آنتی اکسیدان سنتزی مورد استفاده در مواد غذایی اندازه گیری شد. در پایان میزان ۵۰٪ مهار رادیکال های آزاد کلیه عصاره ها^۱ و آنتی اکسیدان سنتزی مورد مقایسه قرار گرفت.

۲-۴-۳-آزمون قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP)

آزمون FRAP مطابق روش بنزی و استراین [۱۷] با کمی تغییر و اصلاح انجام شد. معرف FRAP متشکل از سدیم استات بافر (sodium acetate buffer 300 mM, pH=3.6) با اسید کلریدریک (HCl) ۴۰ میلی مولار و کلرید آهن (FeCl₃) ۲۰ میلی مولار به نسبت ۱:۱۰:۱ (v/v/v) است. معرف FRAP روزانه و به طور تازه تهیه شد و در حمام آب ۳۷ °C قبل از استفاده گرم شد. ۱۰ میکرو لیتر نمونه آزمایشی با ۳۰۰ میکرو لیتر معرف FRAP تازه، مخلوط شده و میزان جذب در ۵۹۳ نانومتر پس از ۸ دقیقه یادداشت شد. منحنی استاندارد با محلول ترولوکس با

اسید)، روش خشک کردن در سایه ($61/013 \mu\text{g}/\text{mg}$) معادل گالیک اسید) و آون 105°C ($59/876 \mu\text{g}/\text{mg}$) معادل گالیک اسید) از لحاظ آماری اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) نداشتند و میزان استخراج ترکیبات فنولی آن‌ها در درجه دوم قرار داشته و روش خشک کردن مایکروویو با توان ۷۰۰ وات ($78/376 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل گالیک اسید) و خشک کردن مایکروویو با توان ۴۰۰ وات ($74/699 \mu\text{g}/\text{mg}$) معادل گالیک اسید) بیش‌ترین راندمان استخراج ترکیبات فنولی را داشتند هر چند بین دو توان مایکروویو اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) وجود نداشت. نتیجه اینکه در استخراج با حلال متانول کمترین راندمان ترکیبات فنولی مربوط به خشک کردن با آون 60°C و بالاترین راندمان مربوط به خشک کردن با مایکروویو با توان ۷۰۰ وات بود.

بحث درباره تغییر فنل کل و فعالیت ضداکسایشی در روش خشک کردن با آون، ممکن است این‌گونه بیان شود که آنزیم‌ها در روش خشک کردن با دمای پایین تحریک می‌شوند، همچنین در آون 60°C ، رنگ برگ‌ها قهوه‌ای شده در حالی‌که در آون 105°C رنگ برگ‌ها سبز روشن باقی می‌ماند. این واکنش قهوه‌ای شدن در دمای پایین ممکن است باعث فعال شدن آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز شود، زیرا این آنزیم در دمای ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد فعال می‌شود [۱۸]. همچنین خشک کردن با دمای بالا سرعت تخریب آنزیم‌ها را در زمان کمتر انجام داده، همچنین انتظار می‌رود که باعث کاهش ضایعات ترکیبات فرار، تخریب حرارتی و بسپارش شود [۲۰].

عملکرد ترکیبات فنولی از طریق ساز و کارهای متفاوتی از جمله مهار رادیکالی، خاصیت کی‌لیت کنندگی فلزات، قدرت احیاکنندگی و دفع اکسیژن یگانه می‌باشد [۲۱].

کامران و همکاران (۲۰۱۵)، برگ زیتون را به سه روش آون 105°C ، آون 60°C و خشک کردن انجمادی خشک نموده و به این نتیجه رسیدند که خشک کردن برگ زیتون به مدت ۳ ساعت در دمای 105°C درجه سانتیگراد، میزان راندمان ترکیبات فنولی و ظرفیت ضداکسایشی بیش‌تری از دو روش دیگر دارد که با آزمون‌های فوق مطابقت دارد [۱۸]. احمد-قاسم و همکاران (۲۰۱۳)، برگ زیتون را به سه روش خشک کردن انجمادی، هوای داغ 70°C درجه سانتیگراد و هوای داغ 120°C درجه سانتیگراد خشک نموده و به این نتیجه رسیدند که در

Table 1 Chemical composition of olive leaf

Constituents (g/100g)	
Moisture	55.17 ± 0.99
Ash	6.12 ± 0.11
Lipid	3.18 ± 0.075
Protein	8.21 ± 0.32
Total carbohydrate	27.32 ± 0.00

کامران و همکاران (۲۰۱۵)، درصد رطوبت برگ زیتون را $50/7 \pm 0/8$ بیان کردند که کمتر از نتایج آزمون حاضر بود [۱۱]. کاواله‌پرو و همکاران (۲۰۱۵) ترکیبات شیمیایی پنج وارته برگ زیتون در جنوب برزیل را بررسی کردند. درصد رطوبت برگ‌های این پنج وارته از $39/30 \pm 0/3$ تا $39/30 \pm 0/3$ درصد خاکستر بین $4/37 \pm 0/5$ تا $6/80 \pm 0/21$ و درصد چربی بین $9/18 \pm 0/2$ تا $9/80 \pm 0/24$ و درصد کربوهیدرات کل بین $8/74 \pm 0/53$ تا $32/63 \pm 0/30$ بیان کردند [۱۹].

۲-۳- مقایسه میانگین محتوای فنول کل در

روش‌های مختلف خشک کردن

نتایج اندازه‌گیری محتوای فنول کل عصاره‌های حاصل از روش‌های مختلف خشک کردن برگ زیتون در شکل ۱ نشان داده شده است.

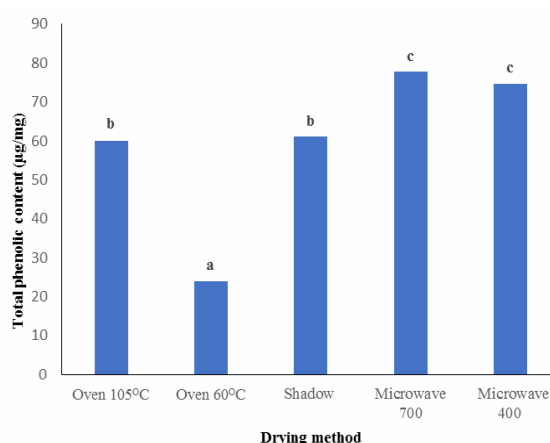


Fig 1 Effect of drying method on the total phenolic content of extraction

نتایج شکل ۱ نشان می‌دهد که در استخراج با حلال متانول، روش خشک کردن آون 60°C ، کم‌ترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را داشته است ($23/992 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل گالیک

($1069/33 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل کوئرستین)، هر چند بین دو توان مایکروویو اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) وجود نداشت. نتیجه اینکه در استخراج با حلال متانول کمترین راندمان ترکیبات فلاونوئید مربوط به خشک کردن با 60°C و بالاترین راندمان مربوط به خشک کردن با مایکروویو با توان 700 وات بود.

فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنولی در گیاهان را شامل می‌شود، و بیشتر گروه‌های هیدروکسیلی در فلاونوئیدها شامل دو حلقه کربنی در ساختار خود بوده و کربن‌های $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ در هر دو حلقه بنزنی دارای اکسیژن نامتجانس می‌باشد [۲۴].

براحمی و همکاران (۲۰۱۲)، چهار حلال هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانول را جهت استخراج عصاره برگ زیتون به کار برده و مشاهده نمودند که حلال متانول به طور معناداری ($p \leq 0.05$) بازده فلاونوئید بالاتری نسبت به سه حلال دیگر داشت و به این نتیجه رسیدند که نوع حلال تاثیر معناداری ($p \leq 0.05$) در میزان بازده ترکیبات فلاونوئیدی دارد [۲۵]. همچنین ناشوا و همکاران (۲۰۱۴)، دو حلال آب و متانول 80% متانول را جهت استخراج عصاره برگ زیتون بکار بردند و به این نتیجه رسیدند که حلال متانول 80% به طور معناداری ($p \leq 0.05$) بازده فلاونوئید بالاتری نسبت به آب دارد و در نهایت عنوان کردند که نوع حلال تاثیر معناداری ($p \leq 0.05$) در میزان بازده ترکیبات فلاونوئیدی دارد، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۶]. کامران و همکاران (۲۰۱۵)، طی تحقیقی به این نتیجه رسیدند که راندمان ترکیبات فلاونوئیدی در برگ زیتون در خشک کردن با 60°C نسبت به خشک کردن با 105°C و خشک کردن انجمادی پایین تر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۱۱]. همچنین عبدالله و همکاران (۲۰۱۲)، به این نتیجه رسیدند که راندمان ترکیبات فلاونوئیدی در برگ چای جاوا در روش خشک کردن با سایه نسبت به روش‌های خشک کردن در 60°C و 40°C و آفتاب بالاتر بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۳].

۳-۴- نتایج مربوط به آزمون DPPH

نتایج آزمون درصد مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد، در شکل ۳ بیان شده است.

روش خشک کردن با هوای داغ با دمای 120°C درجه سانتیگراد اولتروپین بالاتری یافت می‌شود [۲۲]. همچنین عبدالله و همکاران (۲۰۱۲)، به این نتیجه رسیدند که راندمان ترکیبات فنولی در برگ چای جاوا در روش خشک کردن با سایه نسبت به روش‌های خشک کردن در 60°C و 40°C آفتاب بالاتر می‌باشد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۳].

۳-۳- مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید کل

در روش‌های مختلف خشک کردن

محتوای فلاونوئید کل عصاره‌های حاصل از روش‌های مختلف خشک کردن برگ زیتون در شکل ۲ نشان داده شده است.

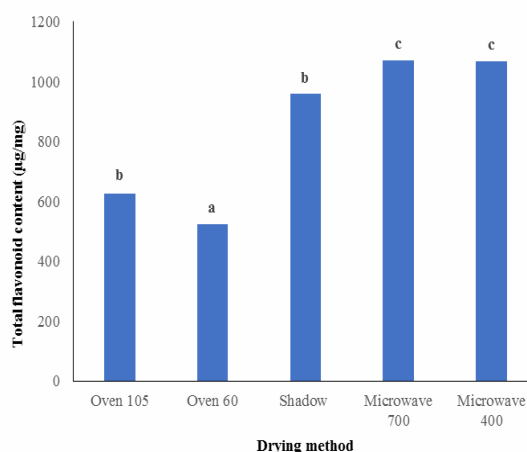


Fig 2 Effect of different drying methods on total flavonoid content

نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که در استخراج با حلال متانول، روش خشک کردن 60°C کم‌ترین میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را داشت ($522/667 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل کوئرستین)، روش خشک کردن در سایه ($958/33 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل کوئرستین)، و 105°C ($626/33 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل کوئرستین)، از لحاظ آماری اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) باهم نداشتند و میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی آن‌ها در درجه دوم قرار داشت و روش خشک کردن مایکروویو با توان 700 وات ($1072/33 \mu\text{g}/\text{mg}$ معادل کوئرستین)، بیشترین راندمان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی را داشت و روش خشک کردن مایکروویو با توان 400 وات

ضداکسایشی در برگ چای جاوا در روش خشک کردن با سایه نسبت به روش‌های خشک کردن در 40°C و آفتاب بالاتر می‌باشد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۱۰].

ژائو و همکاران (۲۰۱۷) اثر خشک کردن هوای داغ، مایکروویو و ترکیبی از مایکروویو با هوای داغ بر روی نوعی توت بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که روش ترکیبی و سپس مایکروویو جهت استخراج ترکیبات ضداکسایشی بهتر از روش هوای داغ می‌باشد [۲۷]. هم‌چنین والادز-کارمونا و همکاران (۲۰۱۷)، اثر خشک کردن مایکروویو، هوای داغ و خشک کردن انجمادی را بر روی غلاف پوسته کاکائو بررسی کرده و مشاهده کردند که روش خشک کردن با مایکروویو جهت استخراج ترکیبات فنولی بهتر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۸]. گرناس و همکاران (۲۰۱۴)، به این نتیجه رسیدند که ظرفیت ضداکسایشی برگ سنجید تلخ که توسط روش مایکروویو خشک گردیده از روش‌های معمولی بالاتر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۹].

ناشوا و همکاران (۲۰۱۵)، به این نتیجه رسیدند که فعالیت ضداکسایشی عصاره برگ زیتون از BHT بالاتر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۸].

۳-۵- نتایج درصد مهار رادیکال‌های آزاد (ABTS) در روش‌های مختلف خشک کردن

در روش مهار رادیکال آزاد ABTS، رادیکال سوپر اکساید، با روش متابولیسم یا گرفتن اکسیژن فعال‌سازی می‌شود. رادیکال اکسیژن فعال، شامل $\text{O}_2^{\cdot -}$ بوده که مانع گسترش آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون می‌شود (مثل سرطان و....). بنابراین، ارزیابی کردن مهار رادیکال سوپراکساید موثر می‌باشد. پیروگالیک اسید در شرایط قلیایی به‌طور خودبه‌خود اکسید می‌شود و مستقیماً $\text{O}_2^{\cdot -}$ تولید می‌کند و سرعت اکسیداسیون بستگی به غلظت $\text{O}_2^{\cdot -}$ دارد.

در این پژوهش از غلظت‌های $50 - 1000 \mu\text{g/ml}$ عصاره‌های مختلف استفاده گردید و نتایج نشان داد که در غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ ، آون 105°C درصد مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر روش‌ها داشت، اما در غلظت‌های $500 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ روش خشک کردن مایکروویو با توان ۷۰۰ وات درصد بازدارندگی بالاتری

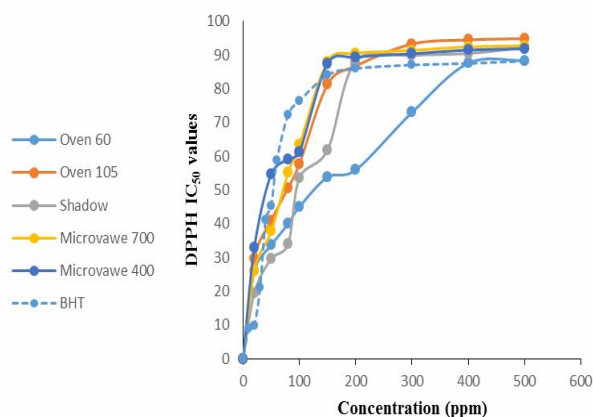


Fig 3 Effect of different drying methods on scavenging activity of olive leaf extracts

میزان ۵۰ درصد مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH- IC_{50}) در روش‌های مختلف خشک کردن در استخراج حلال متانول به این ترتیب به دست آمد
آون 60°C < سایه < آون 105°C < مایکروویو با توان ۷۰۰ وات < مایکروویو با توان ۴۰۰ وات.

همان‌طور که در شکل نشان داده شده است در استخراج با حلال متانول، خشک کردن با مایکروویو با توان ۴۰۰ وات دارای پایین‌ترین IC_{50} بوده، روش سایه در درجه بعدی و آون 105°C و مایکروویو ۷۰۰ تفاوت معناداری ($p \leq 0.05$) با سایه و مایکروویو ۴۰۰ نداشته و آون 60°C دارای بالاترین IC_{50} می‌باشد. بنابراین در استخراج با حلال متانول، روش خشک کردن با مایکروویو با توان ۴۰۰ وات پایین‌ترین IC_{50} و بالاترین قدرت مهار رادیکالی را دارا می‌باشد.

براحمی و همکاران (۲۰۱۲)، چهار حلال هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانول را جهت استخراج عصاره برگ زیتون به‌کار بردند و به این نتیجه رسیدند که حلال متانول به‌طور معناداری ($p \leq 0.05$) ظرفیت ضداکسایشی بالاتری نسبت به سه حلال دیگر داشته و نوع حلال تاثیر معناداری ($p \leq 0.05$) در میزان بازده ترکیبات ضداکسایشی دارد، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۲۵]. کامران و همکاران (۲۰۱۵)، در تحقیقی نشان دادند که راندمان ترکیبات ضداکسایشی در برگ زیتون در خشک کردن با آون 60°C نسبت به خشک کردن با آون 105°C و خشک کردن انجمادی پایین‌تر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۱۱]. هم‌چنین عبدالله و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش کردند که راندمان ترکیبات

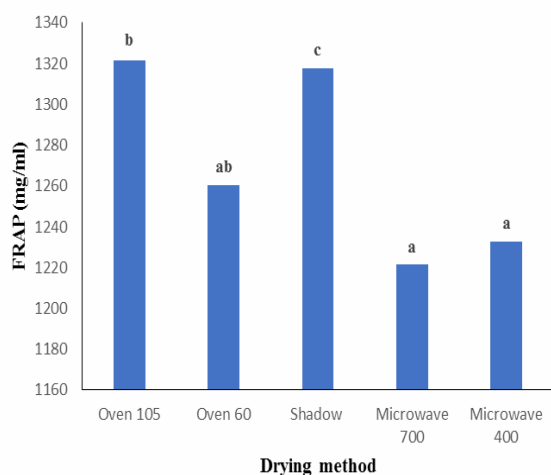


Fig 5 Effect of drying methods on ferric reducing ability of different extracts

دو مکانیسم سنجش ضد اکسایشی جهت مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد وجود دارد. جابه‌جایی اتم هیدروژن و جابه‌جایی الکترون تکی. در روش‌های DPPH و ABTS جابه‌جایی اتم هیدروژن شرکت می‌کند، در حالی‌که روش FRAP شامل جابه‌جایی الکترون اختصاصی است که پایه روش سنجش احیا آهن فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به کمپلکس لیگاند رنگ آبی تیره آهن فرو (Fe^{2+}) بوده که این کمپلکس در محیط اسیدی پایدار می‌باشد. روش FRAP در شرایط اسیدی ($pH=3.6$) که حلالیت آهن را حفظ کرده و به‌طور مهمی نقش حامل الکترون را بازی می‌کند رخ می‌دهد [۲].

زی و همکاران (۲۰۱۵)، در تحقیقی به این نتیجه رسیدند که بین رباینده‌های DPPH و FRAP تفاوت وجود دارد که احتمالاً به‌واسطه دو مکانیسم متفاوت و تأثیری که بر ترکیبات مختلف فنلی دارند، می‌باشد. هیدروکسی تیروزول (با ساختار کاتچین) دارای فعالیت ضد اکسایشی به شدت قوی‌تری نسبت به تیروزول (فاقد ساختار کاتچین) می‌باشد، به علت توانایی دهنده هیدروژن بالاتر و پایداری رادیکالی حلقه‌های آروماتیک زمانی‌که اتم هیدروژن مزدوج جدا می‌شود. هم‌چنین اولئوروپین و ورباسکوساید که دارای ساختار هیدروکسی تیروزول می‌شوند که فعالیت ضد اکسایشی بالایی به‌واسطه داشتن اکسیژن-دی هیدروکسی (کاتچول) دارند.

نسبت به سایر روش‌ها داشت. در تمام غلظت‌ها BHT درصد مهارکنندگی بالاتری دارد.

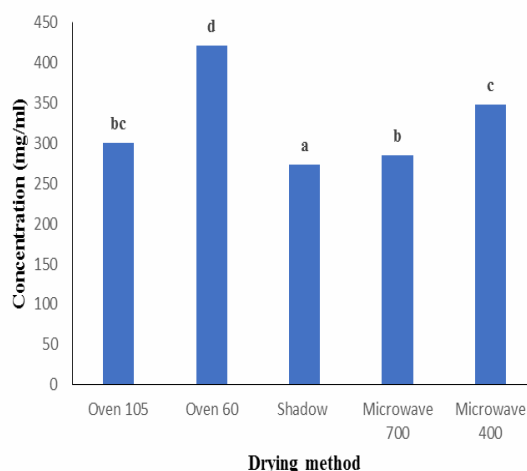


Fig 4 Effect of drying methods on ABTS-IC₅₀ of methanolic extracts

در استخراج با حلال متانول، روش خشک کردن در سایه دارای پایین‌ترین IC₅₀ و در نتیجه بالاترین قدرت مهار رادیکالی بود، روش خشک کردن با آون $105^{\circ}C$ اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) با روش خشک کردن مایکروویو با توان ۷۰۰ وات و خشک کردن در سایه نداشته، و خشک کردن در آون $60^{\circ}C$ بالاترین IC₅₀ و در نتیجه کمترین قدرت مهار رادیکالی را دارا بود.

۳-۶- مقایسه میانگین آزمون FRAP در

روش‌های مختلف خشک کردن

نتایج شکل ۵ نشان می‌دهد که در استخراج با حلال متانول روش خشک کردن مایکروویو با توان ۷۰۰ $\mu g/mg$ (۱۲۲۱/۳۳ معادل ترولوکس) و خشک کردن با مایکروویو با توان ۴۰۰ $\mu g/mg$ (۱۲۳۲/۸۳ معادل ترولوکس) کمترین قدرت احیا کنندگی آهن را داشت، روش خشک کردن با آون $60^{\circ}C$ (۱۲۶۰/۲۷۸ $\mu g/mg$ معادل ترولوکس) در رتبه بعد، و روش خشک کردن در آون $105^{\circ}C$ (۱۳۲۱/۲۲۲ $\mu g/mg$ معادل ترولوکس) و روش خشک کردن در سایه (۱۳۱۷/۶۱ $\mu g/mg$ معادل ترولوکس) که از لحاظ آماری اختلاف معناداری ($p \leq 0.05$) نداشتند و دارای بالاترین قدرت احیا کنندگی آهن بود.

۴- نتیجه گیری کلی

در این پژوهش فعالیت ضد اکسایشی، محتوای فنول کل و فلاونوئید عصاره حاصل از برگ خشک شده زیتون تحت تاثیر روش‌های مختلف خشک کردن بررسی گردید. نتایج نشان داد که اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر خصوصیات ضد اکسایشی، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در برگ زیتون در سطح ۵٪ معنادار بود. در استخراج با حلال متانول کم‌ترین و بیش‌ترین میزان استخراج فنول کل و ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب مربوط به برگ‌های خشک شده با آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مایکروویو با توان ۷۰۰ وات بود. اثر روش‌های مختلف بر مهار رادیکالی DPPH نشان داد خشک کردن با مایکروویو با توان ۴۰۰ وات دارای پایین‌ترین IC₅₀ و بالاترین قدرت مهار رادیکالی بوده، آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد دارای بالاترین IC₅₀ و پایین‌ترین قدرت مهار رادیکالی بود. در مجموع نتایج نشان داد که روش خشک کردن با مایکروویو بهترین و خشک کردن با آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد ضعیف‌ترین روش خشک کردن برگ زیتون است.

۵- سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- F. (2000). Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*. 48, 2755-2759.
- [4] Hossain, M. B., Brunton, N. P., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B. and Wilkinson, M. (2008). Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan Journal of Chemistry*. 1, 751-756.
- [5] Hassanzadeh, K., Akhtari, K., Hassanzadeh, H., Zarei, S.A., Fakhraei, N., Hassanzadeh, K. (2014). The role of structural CAH comared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropein and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: a DFT study. *Food Chemistry*. 164, 251- 258.
- [6] Ataei, F., Keramat, J., Hojjatoleslami, M. and Mirlohi, M. (2013). Oleuropein content in olive leaves extract of sponge cake, *Journal of Plant Medicines*, 3(4): 257-262.
- [7] Khalil, M. M. H., Ismail, E. H. and El-Magdoub, F. (2010). Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 5, 431-437.
- [8] Azizi, M., Rahmati, M., Ebadi, M. T. and Hasanzadeh khayyat, M. (2009). The effect of different drying methods on weight loss rate essential oil and chamazulene contents of chamomile (*Matricaria recutita*) flowers. *Iranian Journal of Medicinal & Aromatic Plants*. 25(2): 182-192.
- [9] Yazdani, D., Shahnazi, S., Jamshidi, A., H., Rezazadeh, Sh., A. and Mojab, F. (2005). Study on variation of essential oil quality and quantity in dry and fresh herb of Thyme and Tarragon. *Journal of Medicinal Plants*, 5(17): 7-15.
- [10] Abdullah, S., Shaari, A. R. and Azimi, A. (2012). Effect of drying methods on metabolites composition of Misai Kucing (*Ortosiphon stamineus*) leaves. *Sciverse Science Direct*. 2: 178-182.
- [11] Kamran, M., Hamlin, A. S., Scott, C. and Obied, H. (2015). Drying at high temperature for a short time maximizes the recovery of olive leaf biophenols. *Industrial crops and products*. 78: 29-38.
- [12] Dao-Mao, Y. and Ming-An, O. (2012). Antioxidation and anti-tyrosinase activity from Olea leaf extract depended on seasonal variations and chromatography
- [1] Park, Y. K., Lee, W. K., Park, S. Y., Ahu, J. K. and Han, M. S. (2005). Antioxidant activity and total phenolic content of callistemon citrinus extract. *Food Science & Biotechnol*. 14, 212-215.
- [2] Chen, G. L., Zhang, X., Chen, S. G., Han, M. D. and Gao, Y. Q. (2017). Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. *Journal of Functional Foods*. 30, 290-302.
- [3] Amarowicz, R., Nacz, M. and Shahidi,

- [21] Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M. and Khomeiri, M. (2012). Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. *Journal of Agriculture Science Technology*. 14: 1497-1509.
- [22] Ahmad-Qasem, M. H., Barrajo'n-Catala'n, E., Micol, V., Mulet, A. and Garcia-Perez, J. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*. 50: 189-196.
- [23] Abdullah, S., Shaari, A. R. and Azimi, A. (2012). Effect of drying methods on metabolites composition of Misai kucing (*Orthosiphon stamineus*) leaves. *Sciverse Science Direct*. 2: 178-182.
- [24] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2008). Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727-747.
- [25] Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., Hammami, M. (2012). The effect of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial crops and products*. 38, 146-152.
- [26] Nashwa, F., Morsy, S. and Abdel-Aziz, M. E. (2014). Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *Journal of Agroalimentary Processes & Technology*. 20(1): 46-53.
- [27] Zhao, G., Zhang, R., Liu, L., Deng, Y., Wei, Z., Zhang, Y., Ma, Y. and Zhang, M. (2017). Different thermal drying methods effect the phenolic profiles, their bioaccessibility and antioxidant activity in *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait). Hassk berries. *LWT-Food Science & Technology*. 79, 260-266.
- [28] Valadez-Carmona, L., Pazola-Jacinto, C. P., Herna'ndez-Ortega, M., Herna'ndez-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necoechea-Mondrago'n, H., Ortiz-Moreno, A. and Ceballos-Reyes, G. (2017). Effect of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 41: 378-386.
- treatment. *International Journal of Organic Chemistry*. 2: 391-397.
- [13] Torki-Harchegani, M., Ghanbarian, D., Ghasemi Pirbalouti, A. and Sadeghi, M. (2016). Dehydration behavior, mathematical modeling, energy efficiency and essential oil yield of peppermint leaves undergoing microwave and hot air treatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 58: 407-418.
- [14] Ahmad-Qasem, M. H., Ahamad-Qasem, B. H., Barrajo'n-Catala'n, E., Micol, V. and Garcia-Perez, J. V. (2015). Drying and storage of olive leaf extrscts. Influcnce on poly phenols stability. *Industrial Crops & Products*. 74: 1-274.
- [15] Taskin, M. and Erdal, S. (2011). Utilization of waste loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) kernel extract for a new cheap substrate for fungal fermentations. *Rom Biotechnol Lett*. 16: 5872-5880.
- [16] Shen, S., Chen, D., Li, X., Li, T., Yuan, M., Zhou, Y. and Ding, C. (2014). Optimization of extraction process and antioxidant activity of poly saccharides from of paris polyphylla. *Carbohydrate polymers*. 104:80-86.
- [17] Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-79.
- [18] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. A. (1999). Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26:1231-1237.
- [19] Cavaleiro, C. V., Picoloto, R. S., Cichoski, A. J., Wagner, R., Ragagnin de Menzes, C., Queiroz Zepka, L., Da Croce, D. M. and Smanioto Barin, J. (2015). Olive leaves offer more than phenolic compounds – fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil. *Industrial crops and products*. 71: 122-127.
- [20] Keinänen, M. and Julkunen-Tiitto, R. (1996). Effect of sample preparation method on Birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*. 44: 2724–2727.

The effect of different drying methods on chemical composition and antioxidant properties of methanolic extract of olive leaf

Haghjou, L.¹, Barzegar, H.^{2*}, Jooyandeh, H.²

1. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 2019/05/17 Accepted:2019/10/23)

Olive leaf consumption due to its antioxidant properties and several applications in medicine and pharmaceutical sciences is considered from ancient time. In this research effect of different drying methods including oven drying at 60 °C and 105 °C, microwave drying at 400 W and 700 W and shadow on methanolic extraction of olive leaf were evaluated. Antioxidant properties were assayed using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ABTS, and ferric reducing ability of plasma (FRAP) and also total phenolic and flavonoid content were measured using Folin-Ciocalteu and aluminum chloride respectively. Olive leaf contains 55.17% moisture, 6.12% ash, 3.18% fat, 8.21% protein, 8.58% polysaccharide, 18.48% insoluble carbohydrate, and 27.32% total carbohydrate. Results showed that drying method affect antioxidant properties and phenolic and flavonoid extraction significantly. By increasing the concentrations of extracts, their anti-radical activity increased and the radical scavenging ability of extracts depended on their concentration. Highest antioxidant property were seen in 400 W microwave and the lowest results were in oven drying at 60 °C.

Keywords: Antioxidant activity, Olive leaf, Phenolic compounds, Drying.

* Corresponding Author E-Mail Address: hbarzegar@asnruk.ac.ir