ارزیابی ترکیبات موثره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اولئوگم رزین کندر (*Boswellia serrata*)

عادله محمدی[1]، سعیده عربشاهی دلویی[2*]

۱. دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران
۲.استادیار گروه علوم و صنایع غذایی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۹٤/۳/۱۱)

چکیده

کندر یک اولئوگم رزین گیاهی است که از تنه درختان Boswellia بدست می‌آید. در این تحقیق اسانس کندر(*Boswellia serrata*) با روش تقطیر با آب استخراج گردیده و ترکیبات شیمیایی آن با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی- جرمی (GC-MS) شناسایی و درصد ترکیبات اندازه گیری شد. سپس میزان ترکیبات فنولی با استفاده از روش فولین- سیوکالتو و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف۱۰۰۰ – ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با روش‌های مهار رادیکال‌های آزادDPPH، قدرت احیاءکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و آزمون رنسیمت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس به ترتیب شامل هیدروکربن‌های ترپنوئیدی مانند α - پینن (۸/ ۲۹٪)، α– توژن (۵/۹۲ ٪) ، β – پینن (۳/٤۱ ٪) و p– سیمن (۳/۱٦ ٪) می‌باشد، همچنین میزان ترکیبات فنولی ۹٤/۸۸ (میلی‌گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم اسانس) محاسبه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در همه روش‌ها وابسته به غلظت بود و بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل در بالاترین غلظت (۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به ترتیب ۲۲/۲۳٪، ۰/٦۵ و ۱/۱۸ تعیین گردید. در آزمون رنسیمت بالاترین پایداری اکسایشی روغن سویا در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس حاصل گردید. نتایج این مطالعه حاکی از این امر بود که می‌توان از اسانس کندر به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی و بالقوه برای روغن‌ها و فراورده‌های حاوی روغن استفاده نمود.

کلید واژگان: اسانس کندر- ترکیبات فنولی- فعالیت آنتی‌اکسیدانی- رنسیمت

* مسئول مکاتبات: saeedeh_arabshahi@yahoo.com

۱- مقدمه

عدم پذیرش افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی از سوی مصرف‌کنندگان به دلیل سرطان‌زایی و سمیت احتمالی باعث شده است که پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه کشف ترکیبات فعال طبیعی آنتی‌اکسیدانی ایمن و اقتصادی‌تر انجام شود. اسانس‌های روغنی توسط کلیه ارگان‌های گیاهی مانند گل، برگ، پوست درختان، چوب، میوه و ریشه‌ها تولید شده و در سلول‌های ترشحی، حفره، کانال‌ها و سلول‌های اپیدرمی کرک-های غده‌ای ذخیره می‌شوند [۱]. اسانس‌های روغنی، روغن-های فرار و یا روغن‌های اتری نیز نامیده می‌شوند. تصور می-شود که اصطلاح روغن‌های فرار از عبارت *Quinta essentia* که برای اولین بار در قرن ۱۶ توسط یک پزشک سوئیسی جهت نام گذاری ترکیبات موثر دارویی بکار رفته، مشتق شده است

[۲]. جهت استحصال اسانس‌های روغنی از تکنیک‌های زیادی مانند تقطیر با آب و بخار، استخراج با حلال، استفاده از سیال فوق بحرانی و مایکروویو می‌توان بهره برد [۳]. تقطیر به عنوان یکی از روش‌های قدیمی استحصال اسانس‌های روغنی، برای اولین بار در شرق (مصر، ایران و هند) استفاده می‌شده است [۲]. تاکنون حدود ۳۰۰۰ اسانس روغنی شناسایی شده که تقریبا ۳۰۰ مورد آن مصارف تجاری مهمی دارند. در حال حاضر اسانس‌های روغنی در بخش‌های گوناگون صنعت کاربردهای فراوانی دارند، به عنوان مثال در صنعت داروسازی، اسانس‌های روغنی به عنوان عوامل ضد میکروبی و قارچی کاربردهای فراوانی دارند [٤و٥]. در پاپیروس ابرس مصری که از قدیمی‌ترین مکتوب‌های پزشکی جهان است به استفاده از اسانس‌های روغنی جهت درمان برخی از بیماری‌ها اشاره شده است [۳].

کندر یک اولئوگم رزین گیاهی است که از تنه درختان Boswellia که در هندوستان، شمال آفریقا و خاورمیانه می-رویند، بدست می‌آید. این گیاهان متعلق به خانواده *Burseraceae* از راسته افراها می‌باشند. این جنس دارای ۲۵ گونه متفاوت است که عمده‌ترین گونه‌های تولیدکننده کندر شامل *B, carteri*، *B, frereana*، *B, serrata*، *B, papyrifera* است. البته قابل ذکر است که وجود هیچ یک از گونه‌های مولد کندر در ایران گزارش نشده است. تقریبا به مدت ۳۰۰۰ سال اولئوگم رزین کندر کالای تجاری مهم مردم ساکن شمال آفریقا و شبه جزیره عربستان محسوب می‌شده است و علاوه بر مصارف آیینی و مذهبی در طب و عطرسازی نیز کاربرد داشته است. اولئوگم رزین کندر ترکیب پیچیده‌ای مشتمل بر ۹-۵٪ اسانس روغنی، ۸۵ -٦٥٪ رزین محلول در الکل و مقداری صمغ قابل حل در آب می‌باشد [٦]. اسانس شامل مونو وسزکویی ترپن‌ها، بخش رزینی به طور عمده از تری‌ترپن پنتاسیکلیک اسیدهایی مانند بوسولیک اسید تشکیل شده است و صمغ نیز شامل قندهای پنتوز، هگزوز و آنزیم‌های هاضم و اکسیداتیو می‌باشد [۷ و۸]. مطالعات متعدد انجام شده پیرامون خواص بیولوژیکی کندر حاکی از آثار مثبت این اولئوگم رزین در زمینه فعالیت‌های ضد سرطانی، بهبود سیستم ایمنی، بیماری‌های قلبی و عروقی، مهار رادیکال‌های آزاد، مهار پراکسیداسیون لیپیدها و تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی می‌باشد [۹،۱۰و۱۱].

اکسیداسیون لیپیدها یکی از مهمترین دلایل تخریب موادغذایی مانند فراورده‌های گوشتی، لبنی و صنایع روغن می‌باشد. واکنش‌های اکسیداسیون در غذا منجر به توسعه طعم و بوی نامطلوب و در نتیجه افت ویژگی‌های ارگانولپتیک و کیفیت تغذیه‌ای محصولات غذایی خواهد شد. لذا برای جلوگیری یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون موادغذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک افزودنی در فراوری موادغذایی استفاده می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از سرعت واکنش‌های اکسیداسیون می‌کاهند. این مواد بسته به نوع ساختمان‌شان، در واکنش‌های مختلفی از قبیل کند کردن مرحله آغاز و انتشار، مهار کاتالیزورها، پایدار ساختن هیدروپراکسید، تخریب یا ترکیب‌شدن با رادیکال‌ها شرکت می‌کنند. اما به نظر می‌رسد که بیشتر آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق ترکیب با رادیکال‌های پراکسی که در مرحله انتشار یا تجزیه هیدروپراکسید ایجاد می‌شوند، سرعت اتواکسیداسیون را کاهش می‌دهند [۱۲]. لذا هدف از این پژوهش شناسایی ترکیبات اسانس کندر و بررسی فعالیت-های آنتی اکسیدانی و ضدرادیکالی آن می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه اسانس

اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام شد [۱۳].

۲-۲- محاسبه بازده استخراج

پس از اتمام فرایند اسانس گیری، درصد بازده اسانس به کمک فرمول ذیل تعیین گردید[۱۳].

۱۰۰ × (وزن کندر/ وزن اسانس) = درصد بازده

۲-۳- شناسایی و جداسازی ترکیبات اسانس

تفکیک و شناسایی ترکیبات اسانس توسط روش کروماتوگرافی گازی (Varianمدل CP-3800 آمریکا) با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر انجام گردید. دمای اتاقک تزریق ۱۸۰ درجه سانتی-گراد و هلیوم به عنوان گاز حامل انتخاب شد. شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از شاخص‌های بازداری و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آنها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های رایانه‌ای و مراجع معتبر صورت گرفت [۱۳].

۲-٤- اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ٧٦٠ نانومتر نشان می-دهد. به طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از اسانس محلول با ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد) به آن افزوده شد. لوله‌های آزمایش درون حمام آب (Memmert مدل WB14 آلمان) با دما ٤٠ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر(Cecil مدل Aquarius انگلستان) در طول موج ٧٦٠ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در اسانس بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم اسانس بیان شد [١٤].

۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس کندر

۲-۵-۱- ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

اساس این روش بر پایه تغییر رنگ معرف DPPH توسط ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی موجود در اسانس انجام می‌شود. ۲،۲- دی‌فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل، رادیکال چربی دوستی است که دارای بیشینه جذب در طول موج ٥١٧ نانومتر می-باشد. در این آزمون رادیکال‌های بنفش رنگ DPPH توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی یا دیگر گونه‌های رادیکالی احیاء شده و به هیدرازین‌های زرد رنگ تبدیل می‌شوند؛ در نتیجه جذب در طول موج ٥٢٠- ٥١٥ نانومتر کاهش می‌یابد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰-۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر) اسانس در حلال متانول تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) با ۳ میلی-لیتر از نمونه‌ها مخلوط و به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ٥١٧ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه کنترل، نمونه با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط نمونه‌ها با فرمول ذیل محاسبه گردید.

$(Ac-As)/Ac\times100$ = درصد مهار رادیکال آزاد

در فرمول فوق As و Ac ، به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند [١٥].

۲-۵-۲- ارزیابی قدرت احیاءکنندگی

توانایی عصاره‌ها برای احیا آهن سه ظرفیتی توسط روش یلدریم و همکاران تعیین شد. در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از اسانس تهیه گردید.۱ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=٦/٦ و M=۰/۲) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دما ٥٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی: حجمی) به نمونه‌ها اضافه و کاملاً مخلوط شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ١٦٥٠ سانتریفوژ (Sigma مدل K3- 18 آلمان) شدند. از محلول روئی پس از سانتریفوژ ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵

میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن III (۱ گرم در لیتر)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب بالا نشان دهنده قدرت احیاءکنندگی بالا می‌باشد [۱٦].

۲-۵-۳- ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

این روش بر اساس احیای مولیبدن VI به مولیبدن V توسط ترکیبات فعال همراه با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفات مولیبدنوم در محیط اسیدی است. در این روش نیز محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از اسانس تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هریک از غلظت‌های فوق به یک لوله اپندورف منتقل و ۱ میلی‌لیتر از محلول معرف (مخلوطی از اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) به آن اضافه شد و پس از دربندی به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب °C ۹۵ نگهداری گردید. بعد از سرد شدن و رسیدن به دمای اتاق، میزان جذب در طول موج ٦۹۵ نانومتر قرائت شد. محلول شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول معرف و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال استفاده شده برای تهیه غلظت‌های نمونه بود که در شرایط مشابه با بقیه نمونه‌ها قرار داشت [۱۷].

۲-۵-٤- ارزیابی زمان پایداری اکسیداتیو توسط آزمون رنسیمت

تعیین پایداری اکسیداسیونی روغن‌ها بوسیله دستگاه رنسیمت (Metrohm مدل ۷٤۳ سوئیس) برای ۲/۵ گرم نمونه روغن در دمای °C ۱۱۰ اندازه‌گیری گردید [۱۸].

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p < ۰/۰۵$) برپایه طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازده استخراج و مقدار ترکیبات فنولی

نوع روش به کار رفته جهت استخراج ترکیبات فعال گیاهی به عواملی مانند ساختار گیاهی، نوع ماده آنتی‌اکسیدانی و مقاومت ماده استخراج شده به دمای فرایند بستگی دارد، به‌طوریکه با انتخاب روشی مناسب جهت استخراج می‌توان تا حد زیادی از تخریب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در بافت‌های گیاهی ممانعت نمود [۱۹]. بازده وزنی اسانس به دست آمده از اولئوگم رزین کندر ۰/۱۱ ± ۱/٦۲ درصد محاسبه شد. مقدار ترکیبات فنولی به روش فولین- سیوکالتو اندازه‌گیری شد، معادله خط رگرسیونی که رابطه غلظت اسید گالیک را با میزان جذب نشان می‌دهد به صورت ذیل می‌باشد. در این معادله Y مقدار جذب و X مقدار ترکیبات فنولی براساس میلی‌گرم اسید گالیک را مشخص می‌نماید:

$R^۲$=۰/۹۹٤۹

Y= ۰/۰۰۱۱ x – ۰/۰۰۰۱

میزان ترکیبات فنولی موجود در اسانس کندر ۱/۷۸ ± ۹٤/۸۸ میلی‌گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم اسانس محاسبه شد. ترکیبات فنولی، گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این مواد به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل قادرند به عنوان دهنده هیدروژن یا الکترون عمل نمایند، بطوری‌که با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و یا با چلات‌کنندگی فلزات منجر به قطع واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون می‌شوند [۲۰].مطالعه پراکاش و همکاران (۲۰۱۳) مشخص ساخت که میزان ترکیبات فنولی گونه *B. carterii* ۳۵/۸۳ میکروگرم در میلی‌گرم می‌باشد [۲۱]. تفاوت در مقادیر ترکیبات فنولی گونه‌های مختلف به عوامل متعددی نظیر تفاوت ژنتیکی و شرایط محیطی وابسته است.

۳-۲- شناسایی ترکیبات اسانس کندر

نتایج حاصل از بررسی و شناسایی ترکیبات اسانس کندر با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی در جدول ۳-۱ گزارش شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس به ترتیب شامل هیدروکربن‌های ترپنوئیدی مانند α - پینن (۸/ ۲۹٪)، α – توژن (۵/۹۲ ٪) ، β - پینن (۳/٤۱ ٪) و p – سیمن (۳/۱٦ ٪) می‌باشد. اسانس روغنی اولئوگم رزین کندر ترکیبی از مونو، دی و سزکویی‌ترپن‌ها است، همچنین سایر ترکیبات فنولیک و یک الکل دی‌ترپنی به نام سراتول نیز در اسانس این اولئوگم رزین یافت شده است [۲۲]. به‌طور کلی اغلب ترکیبات شناسایی شده در اسانس کندر ترپن‌ها هستند که جزیی از ترکیبات فنولیک فعال طبیعی محسوب می‌شوند.

Table 1 Main components detected by GC/MS of the essential oil of *Boswelliaserrata* .

Retention time(min)	compound	%
4.231	β-myrcene	0.81
5.021	[3.2.1]Propellane	1.23
5.122	α-thujene	5.92
5.397	α-pinene	29.8
5.586	Thujane-2,4(10)-diene	2.7
5.778	Camphene	1.89
6.135	4,4-Dimethyl-cyclohex-2-en-1-ol	0.26
6.355	γ-Terpinen	0.97
6.531	β-Pinen	3.41
6.868	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	1.05
7.114	1-Isopropylidene-3-methylcyclohexane	0.51
7.451	o-Methylanisol	0.91
7.682	α-Terpinene	1.34
7.782	p-cymene	3.16
8.103	Limonene	2.67
8.192	Borneol	0.89
8.257	Cineole	1.03
8.631	Cis- ocimene	0.86
9.095	Chrithmene	0.59
9.286	Tetrahydro linalool	1.93
9.630	3-chlorooctane	0.85
9.812	Eudesmol	0.91
9.986	Elemol	0.74
10.096	Terpinolen	0.12
10.238	CIS –Verbenol	1.05
10.589	Perillene	0.66
10.680	Linalol	0.67
11.017	thujon(3-thujan-3-one)	0.52
11.667	1-Isopropyl-1-cyclopentene	0.36
11.803	campholenal	1.34
12.405	cis-sabinol	1.55
12.609	2,3- Epoxycarane	0.79
12.792	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl	0.65
13.199	Iso-Pinocamphone	0.56
13.291	Pinocarvone	0.99
13.665	3-methylenecyclohexane	1.23
13.987	CarvoMenthenol	0.93
14.196	Verbenol	1.83
14.320	p-cymenene	1.34
14.675	Myrtenal	0.97
15.358	Methylisoeugenol	1.43
15.671	Cis- Carvenol	1.15
16.931	Geraniol	1.31
17.570	Orcinol dimethyl ether	0.92
18.294	Isomethyl lonone	0.87
21.968	Copaene	0.64
24.921	epi-cubenol	0.72
27.139	Terpinyl isobutyrate	1.87
43.038	Verticiol	0.89

وان وورن و همکاران (۲۰۱۰)، ترکیبات اسانس بیست گونه مختلف کندر را شناسایی نمودند و طبق یافته‌های آنها ترکیبات عمده اسانس در گونه‌های مختلف شامل α- پینن (۶۴/۷-۲٪)، α- توژن (۵۲/۴-۰/۳٪)، β- پینن (۱۳/۱-۰/۳٪)، میرسن (۲۲/۴-۱/۱٪)، p- سیمن (۱۶/۹-۲/۷٪)، لیمونن (۲۰/۴-۱/۳٪)، سابینن (۷-۰/۵٪) و β- کاریوفیلن (۱۰/۵-۰/۱٪) می‌باشد. تفاوت در مقدار و نوع ترکیبات شناسایی شده در اسانس به عوامل متعددی مانند اختلاف گونه، شرایط آب‌وهوایی، نوع خاک منطقه رویش، شرایط نگهداری و مدت زمان نگهداری نمونه‌ها بستگی دارد. بطورکلی تفاوت در ترکیب اسانس‌های مختلف مقدار و نوع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را تحت الشعاع قرار داده و بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آنها را تاثیر دارد [۵ و ۲۳].

۳-۳- ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

شکل ۳-۱ میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف اسانس کندر را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج مشخص شد که در محدوده غلظتی ۱۰۰۰- ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد مهارکنندگی اسانس کندر ۲۲/۲۳-۱۰/۲۱ درصد می‌باشد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA)نشان داد که غلظت اسانس تاثیر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بر مهار رادیکال آزاد دارد، بطوری‌که با افزایش غلظت خاصیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد، با افزایش غلظت یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات فنولی، مهار رادیکال DPPH افزایش یافته که تحت عنوان افزایش در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعریف می‌شود [۲۴].

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط اسانس کندر به علت وجود ترکیبات ترپنی موجود می‌باشد [۲۵]. همچنین قدرت بازدارندگی اسانس را می‌توان با محتوی ترکیبات فنولی موجود در آنها مانند تیمول و کارواکرول مرتبط دانست [۲۶]. طبق تحقیقات موتانا و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس گونه‌های *B.dioscorides*، *B. elongata* و *B. socotrana* به ترتیب ۲۸/۱ ، ۲۳/۸ و ۲۰/۱ درصد گزارش شده است.

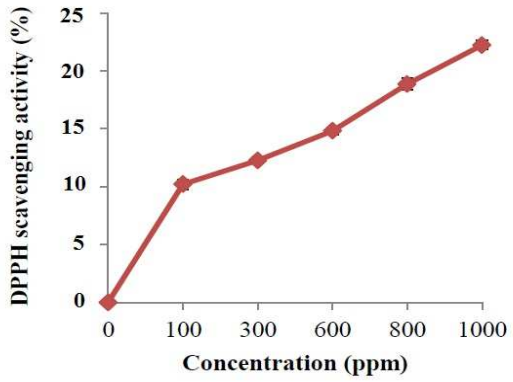

Figure 1 DPPH radical scavenging activities of the essential oil of *Boswelliaserrata* .

بسیاری از اسانس‌ها توانایی بالقوه‌ای در مهار رادیکال‌های آزاد و ممانعت از تغیرات اکسیداتیو ناشی از اکسایش روغن‌ها و آثار مخرب آن مانند کاهش عطر و طعم، تغییرات رنگی و کاهش موادمغذی ترکیبات غذایی دارند [۹]. وزن مولکولی بالا، حلقه‌های آروماتیک بیشتر و همچنین گروه‌های هیدروکسیل زیادتر، شاخص‌های اصلی در میزان توانایی ترکیبات فعال زیستی جهت مهار رادیکال‌های آزاد به شمار می‌آیند [۲۷].

۳-۴- ارزیابی قدرت احیاءکنندگی

قدرت احیاءکنندگی به عنوان شاخصی قابل توجه از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات گیاهی مطرح می‌باشد. در این روش توانایی اسانس جهت احیاء آهن سه ظرفیتی (فریک) و تبدیل آن به فرم دو ظرفیتی (فروس) ارزیابی می‌شود که با توجه به ظرفیت احیاءکنندگی ترکیبات مورد نظر تغییرات رنگی محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز – آبی قابل مشاهده است [۲۸]. روش احیا آهن III به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی نیز به‌کار می‌رود. این امر مکانیسم مهمی را در فرایند اکسیداسیون ترکیب‌های فنولی توجیه می‌نماید، به‌طوری‌که ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد [۲۹]. در محدوده غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان فعالیت احیاءکنندگی اسانس در محدوده ۰/۶۵-۰/۲۹ تعیین گردید (شکل۳-۲). نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که تاثیر غلظت اسانس بر قدرت احیاءکنندگی و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار می-

باشد ($p < ۰/۰۵$). با توجه به نتایج مشخص است که با افزایش غلظت ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی بالاخص ترکیبات فنولی، میزان فعالیت احیاءکنندگی اسانس افزایش یافته است. تحقیقات گوناگونی وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنولی و قدرت احیاءکنندگی یون آهن را گزارش نموده‌اند [۳۱ و ۳۰]. قابل ذکر است که وجود همبستگی زیاد بین محتوی فنولی و قدرت احیاءکنندگی، براساس مکانیسم یکسان این روش‌ها در انتقال تک الکترون استوار است [۳۲].

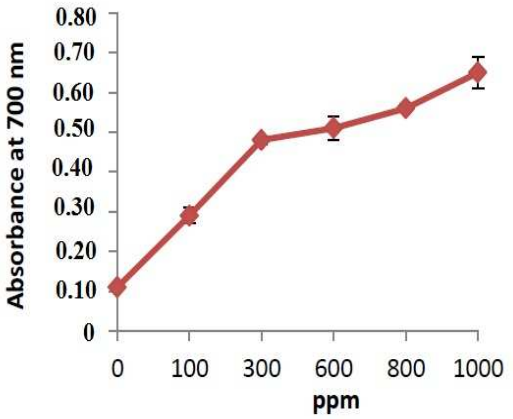

Figure 2 Reducing powers of the essential oil of *Boswelliaserrata* .

۳-۵- ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

روشی کمی جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و چربی است. این روش براساس احیا مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ٥ ظرفیتی در محیط اسیدی همراه با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدون با بیشینه جذب در طول موج ٦٩٥ نانومتر همراه است، به طورکلی عصاره‌هایی که شدت جذب بالاتری دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری نیز دارند [۳۳]. در محدوده غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اسانس در محدوده ۱/۱۸- ۰/۲۱ تعیین گردید (شکل۳-۳). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس وابسته به غلظت بوده، به‌طوری‌که با افزایش غلظت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز به طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) افزایش یافته است. این نتایج بیانگر حضور ترکیبات آنتی-اکسیدانی لیپوفیل و هیدروفیل در اسانس کندر می‌باشد. ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخش هیدروفیل بوده درحالیکه کاروتنوئیدها و توکوفرول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اصلی در عصاره لیپوفیلی می‌باشند. از طرفی حضور همزمان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ممکن است حالت تقویت‌کنندگی ایجاد نموده و موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل گردد [٣٤]. بطوری‌که گزارش شده است، کندر منبعی غنی از تری ترپنوئیک‌هایی مانند اورسان، لوپین و اولئونان می‌باشد که مسئول بسیاری از خواص این اولئوگم رزین می‌باشند [٣٦و٣٥].

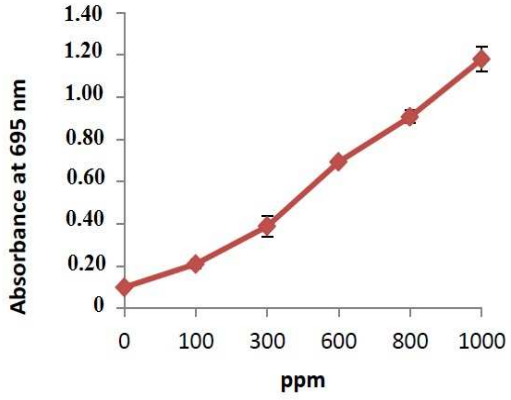

Figure 3 Total antioxidant activities of the essential oil of *Boswellia serrata* .

۳-٦- ارزیابی زمان پایداری اکسیداتیو توسط آزمون رنسیمت

آزمون رنسیمت براساس تغییرات ضریب هدایتی آب دیونیزه پس از جمع‌آوری اسیدهای آلی فرار تولید شده در مرحله نهایی فرایند اکسیداسیون تسریع شده روغن، استوار است [۳۸ و ۳۷]. زمان مورد نیاز جهت یک افزایش ناگهانی در ضریب هدایتی که به علت تشکیل اسیدهای فرار رخ می‌دهد غالبا به عنوان شاخص پایداری اکسیداتیو تعیین می‌شود و مقیاسی تعریف شده جهت مقایسه پایداری روغن و چربی‌ها محسوب می‌شود. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان‌دهنده این امر می‌باشد که همبستگی بالایی بین نتایج حاصل از آزمون رنسیمت و سایر روش‌های تحلیلی وجود دارد [٤٠ و ٣٩].

شکل۳-٤ نتایج پایداری اکسیداتیو اسانس کندر در چهار سطح غلظتی (۱۰۰۰ و ۸۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ (۱۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر) در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد را مشخص می‌نماید. با توجه به نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) همانطور که در نمودار نیز مشخص می‌باشد بین کلیه تیمارها اختلاف معنی‌دار

وجود دارد، لیکن در سطح ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بین تیمارهای اسانس و شاهد، اختلافی مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$)، که این امر را می‌توان با محتوی فنولی پائین و ضعیف‌تر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی این تیمار مرتبط دانست. طبق نتایج بالاترین پایداری اکسایشی به آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ و سپس به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس تعلق گرفت، قابل ذکر است که آنتی‌اکسیدان TBHQ قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان سنتزی در صنعت روغن محسوب می‌شود، چرا که به علت ساختار مولکولی ویژه‌اش و با در اختیار داشتن دو گروه هیدروکسیل در موقعیت پارا، براحتی می‌تواند اتم هیدروژن را در اختیار رادیکال‌های آزاد قرار داده و به واکنش-های زنجیره‌ای اکسیداسیون سریع‌تر خاتمه دهد [۷ و ٤١].

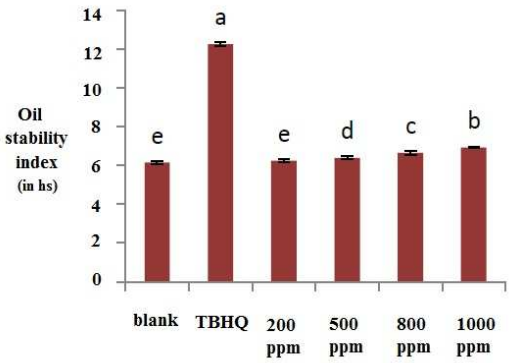

Figure 4 Rancimat analysis of soybean oil samples containing different concentrations of the essential oil of *Boswellia serrata*, and tbhq at 110 °c. values denoted by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

آنتی‌اکسیدان‌های فنولی با به دام انداختن رادیکال آلکوکسی روغن‌ها از فرایند اکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌نمایند. این فعالیت با ساختار مولکولی ترکیبات فنولی، تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل آنها ارتباط مستقیم دارد [٤٢]. کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری اکسیداتیو در دمای بالای رنسیمت احتمالا با فراریت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اسانس مرتبط می‌باشد، به‌طوری‌که در دمای بالا بر فراریت ترکیبات فعال افزوده شده و از فعالیت و کارایی آنتی‌اکسیدانی آنها کاسته می‌شود.

٤- نتیجه‌گیری

بوسولیک اسیدها و ترکیبات ترپنوئیدی موجود در اولئوگم رزین کندر خواص بیولوژیکی اثبات شده فراوانی دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نیز حاکی از آن است که ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی موجود در اسانس این اولئوگم رزین از توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و همچنین فعالیت‌های ضد اکسایشی در روغن برخوردارند، لذا غلظت‌های بالای این اسانس گزینه مناسبی جهت جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی محسوب می‌شود که علاوه بر خواص بیولوژیکی سودمند توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را نیز به‌همراه دارند.

٥- منابع

[1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food Chemistery*, 46, 446–475.

[2] Guenther, E. (1948). The Essential Oils. *D. Van Nostrand*, New York.

[3] Bassolé, I. H. N. and Juliani,H. R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.

[4] Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Research*, 21, 308–323.

[5] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods –a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

[6] Tucker, A. O. (1986). Frankincense and myrrh. *Economic Botany*,40, 425–433.

[7] Ying, Z., Lei, Y., Yuangang, Z., Xiaoqiang, C., Fuji, W. and Fang, L. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistery*, 118,656–662.

[8] Schade, U.F., Engel, R. and Jackobs, D. (1991). Differential protective activities of site specific lipoxygenase inhibitors in endotoxic shock and protection of tumor necrosis factor. *International Journal Immunopharmacol.*
13, 565-71.

[9] Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. and Dubey, N. K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and in vivo efficacy in food system.*Food Research International*, 49,201-208.

[10] Mothana, R. A. A., Hasson, S. S., Schultze, W., Mowitz, A. and Lindequist, U. (2011). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqotraen Boswellia species.*Food Chemistry*,126,1149-1154.

[11] Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. and Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580-2595.

Fatemi, H. (1999). Food Chemistry.Tehran, Enteshar co,480.] 12[

[13] Sefidkon, F. and Rahimi Bidgoli, A. (2001). Study of quality/quantity variation of oil in the Thymus kotschyanus in the period of plant growth and different methods of distillation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 15, 1-22 .

[14] Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

[15] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion.*Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.

[16] Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. *Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.

[17] Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

[18] AOCS. (2007). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society (5th ed.) Champaign.

[19] Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition Analysis*, 19, 531-7.

[20] Fukumoto, L. R. and Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal Agricultural Food Chemistry*,48,3597-3604.

[21] Prakash,B., Mishra, P. K., Kedia, A. and Dubey, N. K. (2013). Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized Boswellia carterii Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of Piper nigrum L. fruits. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 240-247.

[22] Sharma, A., Ghodekar, S. N., Bhatia, S., Kharya, M. D., Gajbhiye,V., Mann, A. S., Namdeo, A. G. and Mahadik, K. R. (2009). Phytochemical and Pharmacological investigations on Boswellia serrata. *Pharmacognocy Reviews*, 3, 206-215.

[23] Van Vuuren, S. F., Kamatou, G. P. P. and Viljoen, A. M. (2010). Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African Journal of Botany*, 76, 686–691.

[24] Zhou, K. and Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT Food Science Technology*, 37,717–721.

[25] Al-Harrasi, A. and Al-Saidi, S. (2008). Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of Boswellia sacra (Omani Luban).*Molecules* , 13, 2181-2189.

[26] Ruberto, G. and Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167–174.

[27] Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G.A., Sovik, K. N., Ritchard, N.T. and Hartzfeld, P. W. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,46,1887-1892.

[28] Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira,J. A. and Baptista, P. (2009). Scavenging Capacity of Strawberry Tree (Arbutus unedo L.) Leaves on Free Radicals. *Food ChemisteryToxicol*, 47, 1507–1511.

[29] Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chemistry*,102, 1233-1240.

[30] Tsao, R. R. Yang, S. X., Sockovie, E., and Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4989–4995.

[31] Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R. and Keen, C. L. (2002). Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,50, 6929–6934.

[32] Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistery*,53,4290−4302.

[33] Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269,337-41.

[34] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus Coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. *Food Chemistry*.105,1126-1134.

[35] Büchele, B., Zugmaier, W. and Simmet, T. (2003). Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. *Journal of Chromatography B*, 791, 21–30.

[36] Singh, S., Khajuria, A., Taneja, S. C., Johri, R. K., Singh, J. and Qazi, G. N. (2008). Boswellic acids: A leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. *Phytomedicine*, 15, 400–407.

[37] García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez , R., Guadix, A. and Guadix, E. M. (2012). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51 ,303-308.

[38] Méndez, E., Sanhueza, J., Speisky, H. and Valenzuela, A. (1996). Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability offish oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 73, 1033-1037.

[39] Anwar, F., Bhanger, M. I. and Kazi, T. G. (2003). Relationship between Rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 80, 151-155.

[40] Coppin, E. A. and Pike, O. A. (2001). Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 78,13-18.

[41] Jiang, A. L. and Wang, C. H. (2006). Antioxidant properties of natural components from Salvia plebeia on oxidative stability of ascidian oil. *Process Biochemistry*. 41,1111-1114.

[42] Milic, B. L., Djilas, S. M. and Canadanovic-Brunet, J. M. (1998). Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, 61, 443–447.

Evaluation of active components and antioxidant activity of essential oil of *Boswellia serrata*

Mohammadi, A. [1], Arabshahi- Delouee, S. [2*]

1. Former M.Sc.Studentof Food Science and Technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
2. Assistant professor,Department of Food Science and Technology,Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

(Received: 93/7/9 Accepted: 94/3/11)

Frankincense is an oleo-gum-resin obtained from Boswellia trees. In this study, *Boswellia serrata* essential oil was extracted by Clevenger apparatus, then segregation and recognition of components was performed by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods. The follin-ciocalteu method was used for estimating total phenol content and the antioxidant activity was evaluated by several methods including, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging, total antioxidant capacity, reducing power, and rancimat test in different concentrations (100-1000 ppm). Components identification revealed that α-pinene (29.8%), α-thujene (5.92%), β-Pinen (3.41%) and p-cymene (3.16%) had the highest percentage in the essential oil, and the total phenolic content was 94.88 mg GAE equivalents/100g of essential oil. The antioxidant activity of essential oil was dose-dependent in all tests and the highest inhibition of DPPH radicals, reducing power and total antioxidant capacity was detected at a concentration of 1000 ppm, which were 22.23%, 0.65 and 1.18, respectively. In rancimat test, the highest oxidative stability of the oil was also recorded for concentration of 1000 ppm of the essential oil. Results of the present study demonstrated that *Boswellia serrata* essential oil could be used as a potential source of natural antioxidants for oil and oil-containing foods.

Keywords: Frankincense essential oil, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Rancimat test

*Corresponding Author E-Mail Address: saeedeh_arabshahi@yahoo.com