



فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای وانیلیک و سیرینجیک در روغن ماهی کیلکا و امولسیون روغن در آب آن

نجمه ملاحمدی بهراسمان^۱، رضا فرهوش^{۲*}، سعید جانی^۳، علی شریف^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

پایداری اکسایشی روغن ماهی کیلکا در حضور دو مشتق اسید فنلی (وانیلیک و سیرینجیک) مورد بررسی قرار گرفت. آلفا-توکوفرول به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. دو خصوصیت، مهارکنندگی رادیکال آزاد دی‌پی‌پی‌اچ و قطبیت نسبی آنتی‌اکسیدان‌های مذکور اندازه‌گیری شد. روغن به روش کروماتوگرافی جذبی تخلیص و ۲۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه به آن اضافه شد و شرایط رژیم سینتیکی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برقرار گردید. در طول زمان گرمخانه‌گذاری در فواصل زمانی معین از روغن نمونه‌برداری و عدد پراکسید اندازه‌گیری شد. روند اکسایش امولسیون ۱۰ درصد نیز در همان دما بررسی شد. نتایج نشان داد اسید سیرینجیک با وجود قطبیت نسبی بالا و نیز قدرت مهارکنندگی بالایی که داشت، عملکرد آن در روغن تحت برهمکنش‌های درون مولکولی کاهش یافت و از فرضیه معروف "تناقض قطبی" تبعیت نمود. کارایی آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک در امولسیون نسبت به روغن افزایش قابل توجهی نشان داد و مشابه آلفا-توکوفرول بود. قدرت مهارکنندگی رادیکال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک مشابه هم بود. بطور کلی امولسیفایر و عملیات تهیه امولسیون نسبت به آنتی‌اکسیدان، نقش پررنگ‌تری در پایداری اکسایشی روغن امولسیون شده داشتند.

واژه‌های کلیدی: اسید فنلی، امولسیون، آنتی‌اکسیدان، تناقض قطبی، روغن ماهی

مقدمه

در ساختمان آنها موجب حساسیت بیش از حد به اکسایش می‌شود. اکسایش همچنین عامل محدودکننده کاربرد روغن ماهی در مواد غذایی فراوری شده، مکمل‌های غذایی، غذا- داروها و امولسیون‌ها می‌باشد (Frankel et al., 2002).

امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌عنوان روشی موثر و مفید برای کنترل فساد اکسایشی و عوارض ناشی از آن و بهترین جایگزین برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مطرح است (Maqsood & Benjakul, 2010). Pazos و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت آنتی-اکسیدانی پلی‌فنل‌های انگور را در روغن ماهی و امولسیون آن در آب مورد مطالعه قرار دادند نتایج این تحقیق نشان داد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در انگور در افزایش پایداری روغن ماهی موثر است. در بررسی پایداری اکسایشی روغن ماهی در حضور مقادیر مختلف اسید کارنوسیک نشان داده‌شد اسید کارنوسیک می‌تواند بطور موثری از تولید محصولات اکسایشی در روغن ماهی ممانعت به عمل آورد و همچنین افزودن آنتی‌اکسیدان و نگهداری در دمای پایین سبب بیشترین مقاومت اکسایشی در روغن می‌شود (Wang et al., 2011). اثر اسانس‌های پونه کوهی و جعفری، پساب روغن کشتی

نقش بسیار مفید تغذیه‌ای و طبی اسیدهای چرب امگا-۳ باعث شده‌است پژوهش‌های زیادی روی روغن‌های دریایی انجام بگیرد. روغن کیلکا دارای میزان قابل توجهی اسید چرب امگا-۳ است (Turchini et al., 2010). اهمیت و نقش این اسیدهای چرب در کاهش کلسترول خون، پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، رشد سلول‌های مغز و تقویت سیستم ایمنی بدن انسان به اثبات رسیده است (Fomuso et al., 2002). اسیدهای چرب امگا-۳ از دسته اسیدهای چرب چند غیراشباع هستند و وجود بیش از دو پیوند دوگانه

۱ و ۳- دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲ و ۴- به ترتیب استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: rfarhoosh@um.ac.ir)

مواد و روش‌ها

مواد

اسید سیرینجیک از شرکت مرک، آلفا-توکوفرول و اسید وانیلیک از شرکت سیگما خریداری شدند. سیلیکاژل (نوع ۶۰ با مش ۰/۰۶۳ تا ۰/۲)، اکسید آلومینیوم (نوع ۹۰ فعال خنثی)، دی‌پی‌پی‌اچ، و حلال‌های (متانول، اکتانول، هگزان) مورد استفاده نیز تولیدی شرکت‌های مرک و سیگما با درجه خلوص بالا بودند. روغن خام ماهی کیلکا نیز از شرکت شیلات شمال ایران (بابلسر) تهیه گردید.

روش‌ها

قدرت مهارکنندگی رادیکال دی‌پی‌پی‌اچ طبق روش Siger و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد: بدین صورت که ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف اسید سیرینجیک ۰ تا ۵۰ پی‌پی‌ام، اسید وانیلیک ۰ تا ۲۰ پی‌پی‌ام) از آنتی‌اکسیدان در متانول تهیه گردید به لوله آزمایش حامل یک میلی‌لیتر محلول دی‌پی‌پی‌اچ، یک میلی‌لیتر محلول آنتی‌اکسیدان و ۳ میلی‌لیتر حلال متانول اضافه گردید؛ جذب محلول‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در محل تاریک در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهارکنندگی رادیکال طبق رابطه (۱) محاسبه گردید.

$$\%A = 100 (A_C - A_S) / A_C \quad (1)$$

که در آن %A درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد دی‌پی‌پی‌اچ، A_C جذب شاهد (شاهد، نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان است)، و A_S جذب نمونه است. نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت ترکیب آنتی‌اکسیدانی به کمک نرم‌افزار اکسل ترسیم و شاخص IC_{50} محاسبه گردید. IC_{50} بیانگر غلظتی از آنتی‌اکسیدان است که قادر به مهار کردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است.

شاخص $\log p$ که نشان‌دهنده قطبیت نسبی هر ماده است، نیز به روش Gordon (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد محلول ۰/۳ میلی‌مول از آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه در n -اکتانول تهیه گردید و به مدت یک ساعت درون آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس طیف جذبی آنها در ناحیه فرابنفش گرفته و حداکثر جذب آنها قرائت شد (A_0). مقداری برابر از این محلول با بافر استات (۰/۱، ۵/۵ pH) مخلوط و با کمک ورتکس کاملاً هم‌زده شد. فاز آلی مخلوط حاصل پس از نیم ساعت نگهداری در حالت سکون به کمک سانتریفوژ جداسازی و مجدداً طیف جذبی آن در ناحیه فرابنفش گرفته شد (A_x). ضریب حلالیت نسبی طبق رابطه (۲) محاسبه شد:

$$P = C_{n\text{-octanol}} / C_{\text{water}} = A_x / (A_0 - A_x) \quad (2)$$

که (A_0) حداکثر جذب محلول آنتی‌اکسیدان در اکتانول و (A_x) حداکثر جذب فاز آلی جدا شده، در ناحیه فرابنفش می‌باشند. روغن خام ماهی کیلکا با اعمال تغییراتی در روش Marinova &

زیتون، ترولکس و EDTA بر اکسایش امولسیون‌های روغن در آب حاوی ۵ درصد روغن ماهی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۱۴ روز پایش گردید. بهترین عملکرد در بین ترکیبات مزبور به پساب روغن‌کشی زیتون و EDTA اختصاص داشت (Jimenez- Alvarez et al., 2008).

مشقات اسیدهای بنزوئیک و سینامیک، دو گروه عمده از اسیدهای فنولی هستند که از دسته آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی محسوب می‌شوند این ترکیبات به واسطه وجود یک حلقه فنلی و زنجیره‌های جانبی در ساختمان خود، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و شکستن زنجیره اکسایش چربی‌ها را دارند اسیدهای سیرینجیک و وانیلیک از شناخته شده‌ترین مشتقات اسید بنزوئیک هستند که در طیف وسیعی از فراورده‌های گیاهی از جمله زیتون، سویا و وانیل یافت می‌شوند. حضور گروه‌های هیدروکسیل و متوکسی در ساختمان این آنتی‌اکسیدان‌ها، قابلیت مهارکنندگی رادیکال و ممانعت از پیشرفت واکنش اکسایش را به آنها بخشیده است (shahidi, 2005).

این ترکیبات کاربرد فراوانی در صنایع غذایی و داروسازی دارند، تاکنون محققان زیادی تاثیر آن را در روغن خوراکی (Marinova, & Pekkarinen, et al. 1999; Yanishlieva, 1994)، امولسیون (Bountagkidou et al. 2010)، دارو و محصولات آرایشی و بهداشتی (Lu, et al. 2006; Itoh, et al. 2009; Beekrum, et al. 2003) مورد بررسی قرار داده‌اند. اثر درمانی اسید سیرینجیک در ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطان پوست، روده بزرگ و سینه نیز به اثبات رسیده است (Orabi et al. 2013).

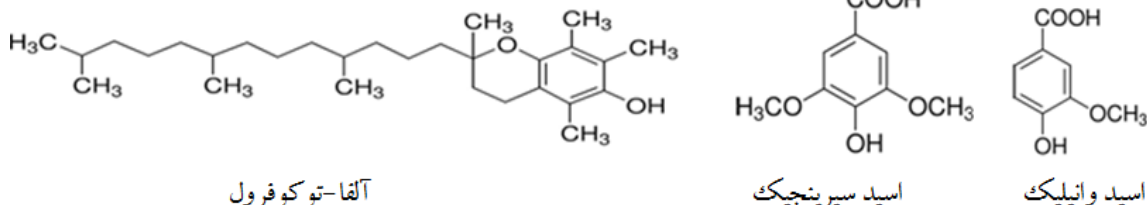
عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها به عوامل مختلفی از جمله ساختمان شیمیایی، برهم‌کنش با محیط اکسایشی، میزان آبگریزی و خصوصیات سطحی روغن یا امولسیون بستگی دارد (Frankel et al., 1996; Marinova & Yanishlieva, 2003).

porter و همکاران (۱۹۸۹) مشاهدات خود در زمینه رفتار آنتی-اکسیدان‌ها را تحت عنوان «تناقض قطبی^۱» بیان نمودند. این پدیده بیانگر آن است که آنتی‌اکسیدان‌های قطبی در محیط‌های روغنی و آنتی‌اکسیدان‌های غیرقطبی در سیستم‌های امولسیون‌ی روغن در آب بطور معمول موثرتر عمل می‌کنند.

تحقیق حاضر با هدف بررسی پایداری اکسایشی روغن کیلکا و امولسیون روغن در آب آن، در حضور اسیدهای وانیلیک و سیرینجیک، یافتن ارتباط بین ساختمان شیمیایی و فعالیت آنتی-اکسیدانی ترکیبات مذکور و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با آلفا توکوفرول صورت پذیرفت.

سیلیکاژل (فعال شده در دمای به ترتیب ۲۰۰ و ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت) بود، ریخته شد و ستون مذکور بمنظور ممانعت از اکسایش روغن، توسط فویل آلومینیوم پوشیده شد.

Yanishlieva (۲۰۰۳) تخلیص، مواد آنتی و پروکسیدانی آن حذف و تری‌آسیل گلیسرول‌های آن استحصال شد: ۱۲۰ گرم روغن خام کیلکا درون ستون شیشه‌ای کروماتوگرافی با قطر و ارتفاع به ترتیب ۴/۵ و ۵۰ سانتی‌متر که حاوی ۶۰ گرم اکسید آلومینیوم ۸۰ گرم



آلفا-توکوفرول

اسید سیرینجیک

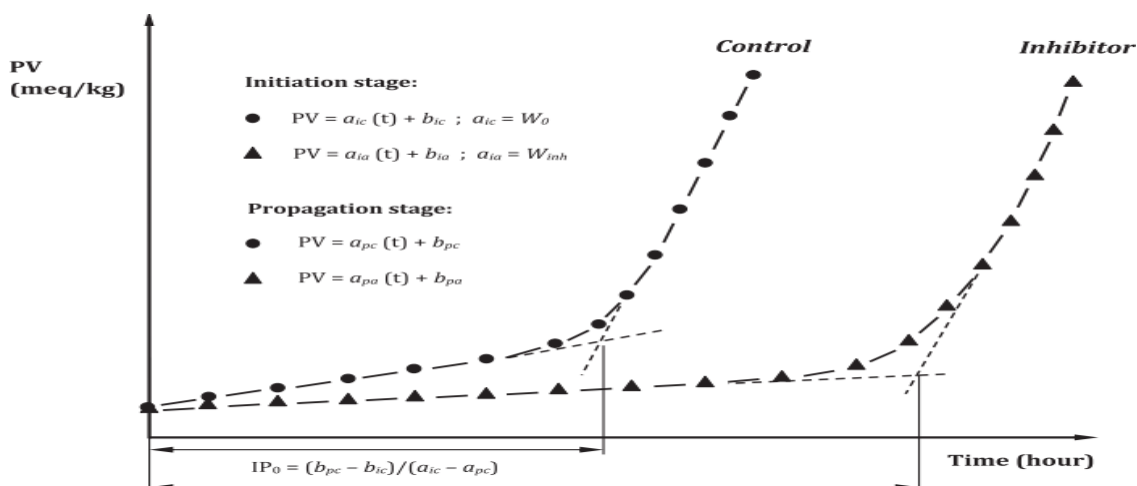
اسید وانیلیک

شکل ۱- ساختمان شیمیایی آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه

محاسبه گردید (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013). امولسیون ۱۰ درصد روغن کیلکا در آب، حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌اکسیدان‌های مذکور، و پنج درصد پروتئین ایزوله سویا به‌عنوان امولسیفایر تهیه گردید. امولسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه دستگاه اولتراتوراکس (دی کاتی ۲۵ دیجیتال) تهیه شد. و سپس ۴ دقیقه توسط سونیکاتور (اکس ال ۲۰۲۰) تحت فراصوت قرار گرفت. عملیات اخیر در حمام آب یخ و با هدف پایدارسازی امولسیون انجام گرفت. امولسیون حاصل درون لوله‌هایی با حجم ۱۰ میلی‌لیتر ریخته و داخل آون با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد نهاده شد.

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار Mini Tab و بر اساس آزمون توکی در سطح پنج درصد ($P < 0.05$) انجام پذیرفت.

به ۴ گرم روغن تخلیص شده ۲۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌اکسیدان‌های مذکور اضافه شد و درون پلیت‌هایی با قطر ۸ سانتی‌متر که ضخامت روغن درون آنها کمتر از یک میلی‌متر بود داخل آون در معرض دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد نهاده شد. بمنظور پایش مداوم وضعیت اکسایش و بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها، در طول گرمخانه‌گذاری، در فواصل زمانی معین (زمان‌های نمونه برداری برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف، بسته به قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها و میزان افزایشی که در دوره القا روغن ایجاد می‌کنند، متفاوت است. به‌طور تقریبی زمان‌ها طوری انتخاب شد که پس از رسم منحنی، مراحل اکسایش، مطابق شکل ۲ کاملاً مشهود باشند). از روغن داخل پلیت‌ها نمونه‌برداری شد و عدد پراکسید بر اساس روش Shantha و Decker (۱۹۹۴) اندازه‌گیری گردید. نمودار تغییرات عدد پراکسید نسبت به زمان ترسیم و دوره القاء و شاخص‌های سینتیکی F، A، و ORR (جدول ۲)



شکل ۲- نمایی از منحنی سینتیک تولید پراکسید طی اکسایش چربی

جدول ۱- شاخص‌های سیپتیکی اکسایش چربی

توضیحات	فرمول	شاخص
شیب منحنی دوره آغازین		سرعت واکنش (W_{inh})
حاصل نسبت دوره القاء با و بدون آنتی‌اکسیدان	$F = IP_{inh}/IP_o$	شاخص پایدارسازی (F)
نسبت سرعت اکسایش در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان	$ORR = W_{inh}/W_o$	نسبت سرعت اکسایش
توانایی آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال و کاهش سرعت اکسایش	$A = F/ORR$	فعالیت

نتایج و بحث

قدرت مهارکنندگی رادیکال دی‌پی‌بی‌اچ و قطبیت نسبی

در آزمون مهارکنندگی رادیکال، اسید سیرینجیک بیشترین IC_{50} (میکرومول برلیتر) قدرت را نشان داد، فعالیت آلفا-توکوفرول $IC_{50} = 105/29$ میکرومول برلیتر) کمتر از سیرینجیک و بیشتر از وانیلیک $IC_{50} = 418/22$ میکرومول برلیتر) بود. این نتایج با مشاهدات von Gadow و همکاران (۱۹۹۷) همخوانی داشت. آنها قدرت مهارکنندگی سیرینجیک را $85/5\%$ ، آلفا-توکوفرول را $75/1\%$ و وانیلیک را $20/7\%$ گزارش کردند. تعداد، نوع و موقعیت قرارگیری گروه‌های الکترون‌دهنده متصل به حلقه فنلی بر قدرت آنتی-اکسیدانی اسیدهای فنلی و مشتقات آنها موثر است (Pekkarinen *et al*, 1999). بی‌تردید اسید سیرینجیک با دارا بودن دو گروه متوکسی توانایی بیشتری در دادن اتم هیدروژن و مهار رادیکال را

دارد. در واقع حضور گروه‌های الکترون‌دهنده، روی حلقه فنلی جدا شدن اتم هیدروژن و انتقال آن به رادیکال را آسان‌تر نموده، و به پایداری رادیکال فنوکسی کمک می‌کند. آلفا-توکوفرول با داشتن یک گروه هیدروکسیل در ساختمان خود، قدرت مهارکنندگی بیش از اسید وانیلیک و کمتر از اسید سیرینجیک داشت (شکل ۱).

$\log P$ نماد کمی قطبیت هر ماده است. $\log P$ بیشتر نشان‌دهنده قطبیت کمتر است. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است اسید سیرینجیک حائز بیشترین قطبیت ($\log P = -0/65$) نسبت به وانیلیک ($\log P = -0/32$) و آلفا-توکوفرول ($\log P = 2/3$) است. حضور گروه‌های متوکسی و هیدروکسیل در موقعیت اورتو نسبت به گروه هیدروکسیل در ساختمان اسید سیرینجیک احتمالاً تشکیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی را موجب شده و در نتیجه قطبیت نسبی مولکول را افزایش داده است (Fennema, 1996).

جدول ۲- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (IC_{50}) و $\log P$

آنتی‌اکسیدان	IC_{50} (میکرومول برلیتر)	$\log P$
اسید وانیلیک	$418/22 \pm 10/4^a$	$-0/32 \pm 0/02^b$
اسید سیرینجیک	$54/2 \pm 0/5^c$	$-0/65 \pm 0/05^c$
آلفا-توکوفرول	$105/29 \pm 0/23^b$	$2/3 \pm 0/04^a$

عملکرد قابل ملاحظه‌ای از خود نشان نداد. علت این امر احتمالاً با برهمکنش‌های درون مولکولی مرتبط است. برهمکنش‌های درون مولکولی ممکن است عملکرد آنتی‌اکسیدانی را دستخوش تغییر نماید. حضور گروه‌های متوکسی در موقعیت اورتو نسبت به گروه هیدروکسیل امکان تشکیل پیوند هیدروژنی را افزایش داده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد (De Heer, 1999). نتایج مشابهی در تحقیقات Torres و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی فعالیت آنتی-اکسیدانی چند ترکیب فنلی در روغن زیتون به روش رنسیمت به دست آمده است. در حقیقت عدم وجود ترکیبات قطبی در محیط روغنی احتمال تشکیل و قدرت پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی را افزایش می‌دهد (Fennema, 1996).

طبق تعریف، شاخص F نشان‌دهنده نسبت IP نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان به نمونه شاهد (IP_{inh}/IP_o) و A حاصل تقسیم F به شاخص نسبت سرعت اکسایش است (F/ORR) (جدول ۱) تفاوت

فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در روغن

روند تغییرات پراکسید در طول زمان عمدتاً از تابع نمایی تبعیت می‌کند (مطابق شکل ۲). زیرا این ترکیبات ناپایدار بوده و به سرعت تجزیه می‌شوند. طول دوره القاء (IP) نشان‌دهنده پایداری اکسایشی روغن است که در حضور آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک و وانیلیک نشان داد تفاوت آماری معنی‌داری بین نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان و نمونه دارای سیرینجیک وجود ندارد اما وانیلیک اندکی بیش از سیرینجیک دوره القاء (IP) روغن را افزایش داد در حالیکه که فعالیت آلفا-توکوفرول بسیار بیشتر از این دو آنتی‌اکسیدان بود. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

سیرینجیک به رغم آنکه از قدرت مهارکنندگی رادیکال قابل توجهی برخوردار است اما در افزایش پایداری اکسایشی روغن کیلکا

آب، در حضور سه امولسیفایر پروتئین ایزوله آب پنیر، کازئینات سدیم و پروتئین ایزوله سویا مشاهده نشد بیشترین مقدار این شاخص‌ها مربوط به آلفا-توکوفرول بود (جدول ۳). این بدان معنی است که آلفا-توکوفرول نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌های این تحقیق، بهترین عملکرد را در روغن کیلکا داشته است. انرژی پایین و عدم تمایل رادیکال حاصل از آنتی‌اکسیدان (پس از جدا شدن اتم هیدروژن) به شرکت در واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایش یکی از دلایل عملکرد بالای آنتی‌اکسیدان در محیط اکسایشی است، این خصوصیت در مورد آلفا-توکوفرول صدق می‌کند (Marinova & Yanishlieva, 1992).

فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در امولسیون

عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه در امولسیون نسبت به روغن تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشت. مقایسه W_{inh} و IP نمونه شاهد روغن و امولسیون (جدول ۳) به‌وضوح نشان‌دهنده تفاوت شگرف پایداری اکسایشی روغن در دو سامانه‌ی روغنی و امولسیونی است. آنچه مسلم است این است که نمی‌توان نقش امولسیفایر و عملیات تهیه امولسیون را در پایداری اکسایشی امولسیون نادیده گرفت.

بطور کلی، مکانیسم اکسایش چربی در سامانه‌ی روغنی و امولسیونی متفاوت است (Frankel et al, 1996). محققان پیشین همواره بر این مسئله اتفاق نظر داشته‌اند که اکسایش در امولسیون‌ها پدیده‌ی پیچیده‌ای است و عوامل موثر بر آن پیچیده‌تر و متنوع‌تر هستند؛ قطر قطرات روغن، بارالکتریکی امولسیون، نوع و اندازه امولسیفایر، رفتار امولسیفایر در فصل مشترک آب-روغن از جمله عوامل موثر بر واکنش‌های اکسایش چربی در امولسیون‌ها می‌باشند (McClements & Decker, 2000; Frankel et al, 1996; Schwarz & Frankel, 1996).

نتایج محققان نشان می‌دهد پروتئین که به‌عنوان امولسیفایر در تهیه امولسیون بکاربرده می‌شود، می‌تواند بر اکسایش چربی امولسیون شده اثر بازدارندگی داشته‌باشد. پروتئین‌ها با مکانیسم‌های مختلفی اثر ضداکسایشی نشان می‌دهند: ایجاد نیروی دافعه و راندن فلزات پروکسیدان به‌واسطه بار مثبت، مهار رادیکال‌های آزاد، مهار فلزات پروکسیدان و برهمکنش با محصولات اکسایش از جمله این مکانیسم‌ها هستند (Wu et al, 2003; McClements & Decker, 2000; Frankel et al, 1996; McClements, 1999).

محققان در بررسی پایداری اکسایشی امولسیون روغن ماهی در

علاوه بر این، Patei و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند پروتئین سویا حاوی ایزوفلاوون است که در مهار رادیکال‌های پراکسیل موثر است. نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های گذشتگان همخوانی دارد؛ پروتئین ایزوله سویا اثر محافظت‌کنندگی قابل ملاحظه‌ای بر امولسیون روغن کیلکا داشت. اثر ضداکسایشی پروتئین ایزوله سویا احتمالاً به مهار رادیکال‌های آزاد توسط برخی اسیدهای آمینه و ایجاد لایه‌ی محافظ اطراف ذرات روغن مرتبط است.

ارتباط قدرت بالای مهارکنندگی رادیکال ($IC_{50} = 54/2$) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک، در سامانه امولسیونی مشهودتر است. افزایش در IP و شاخص A موثراً این مسئله است. فعالیت اسید سیرینجیک در امولسیون نسبت به روغن ۲/۵ برابر افزایش یافته‌است. مهار رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^{\cdot}) که رادیکال‌های قوی هستند و احتمال تشکیل آن‌ها در محیط آبی نیز بیشتر است، توسط اسید سیرینجیک می‌تواند یکی از دلایل عملکرد خوب اسید سیرینجیک در امولسیون باشد، در این خصوص نتایج مشابهی برای اسید سیناپیک (از دسته اسیدهای فنلی) گزارش شده- است (Zou et al, 2002). علاوه بر این، Galano و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند دو عامل قطبیت محیط و دپروتونه شدن اسید سیناپیک قابلیت آنرا در مهار رادیکال پراکسیل افزایش می‌دهد. همین محققان گزارش کردند قدرت مهارکنندگی رادیکال اسید سیناپیک در محیط آبی ۶/۳۲ برابر بیش از محیط روغنی است. به رغم فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر آلفا-توکوفرول در سامانه امولسیونی نسبت به روغن (شاخص A به ترتیب ۳/۵۶ و ۱۶/۱)، فعالیت آن بیش از سایر آنتی‌اکسیدان‌های مورد آزمون بود. احتمالاً طبیعت چربی دوست آلفا-توکوفرول ($\log p = 2/3$) تمایل آنرا به سمت فاز روغنی امولسیون، جایی که مسلماً احتمال وقوع اکسایش بیشتر است، افزایش می‌دهد. وانیلیک در مقایسه با دو ترکیب دیگر عملکرد ضعیفی داشته است. بنظر می‌رسد علت عملکرد ضعیف آن، با قابلیت کم این آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال‌های آزاد مرتبط باشد ($IC_{50} = 418/22$).

جدول ۳- شاخص‌های سنتیکی (A: میزان فعالیت، ORR: نسبت سرعت اکسایش، F: کارایی، W_{inh} : سرعت اکسایش در دوره القاء در حضور آنتی‌اکسیدان) و IP: دوره القاء (ساعت) روغن و امولسیون در حضور ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌اکسیدان.

شاخص‌های سینتیکی					
A	ORR	F	W_{inh}	IP	آنتی‌اکسیدان
					سامانه روغنی
					شاهد
۱/۳۹+۰/۳۶ ^b	۱/۲۲+۰/۲۴ ^a	۱/۷+۰/۲۴ ^b	۵/۴۶+۰/۹۲ ^a	۲/۱۷+۰/۲۱ ^c	اسید وانیلیک
۱/۳۱+۰/۲۱ ^b	۰/۹۵+۰/۱۱ ^b	۱/۰۲۴+۰/۱۴ ^b	۴/۲۲+۰/۲۸ ^a	۲/۶۱+۰/۱۳ ^c	اسید سیرینجیک
۱۶/۱+۲/۷ ^a	۰/۴+۰/۰۵ ^b	۶/۴۴+۰/۷۲ ^a	۱/۸+۰/۱۱ ^b	۱۳/۵۲+۰/۶۸ ^a	آلفا-توکوفرول
					سامانه امولسیونی
					شاهد
۱/۳۲+۰/۳۴ ^b	۰/۸۶+۰/۰۶ ^a	۱/۱۴+۰/۱۳ ^c	۰/۲۱+۰/۰ ^b	۳۱/۳۳+۰/۲۴ ^c	اسید وانیلیک
۳/۱+۰/۳ ^a	۰/۵۸+۰/۰۲ ^b	۱/۷۹+۰/۰۴ ^b	۰/۱۳+۰/۰۱ ^c	۵۵/۹۸+۱/۴۵ ^b	اسید سیرینجیک
۳/۵۶+۰/۵۲ ^a	۰/۶+۰/۱۳ ^b	۲/۰۹+۰/۱۵ ^a	۰/۱۳+۰/۰۳ ^c	۶۵/۶۵+۴/۹۱ ^a	آلفا-توکوفرول

نتیجه‌گیری

داشت، عملکرد آن در روغن تحت برهم‌کنش‌های درون مولکولی کاهش یافت. آلفا-توکوفرول هم در سامانه روغنی و هم امولسیونی فعالیت با اختلاف چشمگیر نسبت به اسید وانیلیک داشت. اما عملکرد آن در امولسیون تقریباً شبیه اسید سیرینجیک بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک در سامانه امولسیونی نسبت به روغنی افزایش ۲/۵ برابری داشت.

عملکرد آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک و سیرینجیک در پایدارسازی روغن ماهی کیلکا و امولسیون آن در آب به روش شال آن در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بررسی و با آلفا-توکوفرول مقایسه شد. نتایج نشان داد اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد نمی‌تواند معیار کافی برای پیش بینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد؛ اسید سیرینجیک به رغم قدرت مهارکنندگی رادیکال بالایی که

منابع

- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T., & Odhav, B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Additives & Contaminants*, 20(5), 490-493.
- Bountagkidou, O. G., Ordoudi, S. A., & Tsimidou, M. Z. (2010). Structure-antioxidant activity relationship study of natural hydroxybenzaldehydes using in vitro assays. *Food Research International*, 43(8): 2014-2019.
- De Heer, M.I., Korth, H.G., & Mulder, P. (1999). Polymethoxy phenols in solution: O-H bond dissociation enthalpies, structures, and hydrogen bonding. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(19): 6969-6975.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4558-4564.
- Farhoosh, R., & Hoseini-Yazdi, S.-Z. (2013). Shelf-life prediction of olive oils using empirical models developed at low and high temperatures. *Food Chemistry*, 141(1):557-565.
- Fennema, O.R. 1996. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Fomuso, L. B., Corredig, M., & Akoh, C. C. (2002). Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10):2957-2961.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(5), 1054-1059.
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Prior, E., & Aeschbach, R. (1996). Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(2): 201-208.
- Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7): 2094-2099.
- Galano, A., Francisco-Marquez, M., & Alvarez-Idaboy, R. (2011). Mechanism and kinetics studies on the antioxidant activity of sinapinic acid. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(23): 11199-11205.

- Gordon, M. H., Paiva-Martins, F., & Almeida, M. (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5): 2480-2485.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., & Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(7), 1215-1219.
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P.A., Cotting, C., Lardeau, A., Keely, B.J. (2008). Antioxidant activity of oregano, parsley and olive mill wastewaters in bulk oils and oil in water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16): 7151-7159.
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. (2006). Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48(4), 263-274.
- Maqsood, S. & S. Benjakul (2010). Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*, 119(1): 123-132.
- Marinova, E. M. & N. V. Yanishlieva (1992). Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(3): 313-318.
- Marinova, E. M., & Yanishlieva, N. V. (1994). Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(4), 427-434.
- Marinova, E. M. & N. V. Yanishlieva (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, 81(6): 189-197.
- McClements, D. & Decker, E. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65(8): 1270-1282.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practices and techniques*, CRC press.
- Orabi, K. Y., Abaza, M. S., El Sayed, K. A., Elnagar, A. Y., Al-Attayah, R., & Guleri, R. P. (2013). Selective growth inhibition of human malignant melanoma cells by syringic acid-derived proteasome inhibitors. *Cancer cell international*, 13(1): 82.
- Patel, R. P., Boersma, B. J., Crawford, J. H., Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., ... & Darley-USmar, V. (2001). Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12), 1570-1581.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J.L., and Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3): 547-557.
- Pekkarinen, S. S., Stöckmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., & Hopia, A. I. (1999). Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(8): 3036-3043.
- Porter, W. L., Black, E. D., & Drolet, A. M. (1989). Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 37(3): 615-624.
- Shahidi, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6 Volume Set, Chapter.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421.
- Siger, A., nogala- kalucka, M., & lampart-szczapa E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15(2), 137-149.
- Turchini, G. M., Ng, W. K., & Tocher, D. R. (Eds.). (2010). *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. CRC Press.
- von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(3): 632-638.
- Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., & Zhang, Y. (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, 128(1), 93-99.
- Wu, H.-C., Chen, H.-M., & Shiau, C.-Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9): 949-957.
- Zou, Kim, Y. n. A., Kim, A. R. n. A., Choi, J. E. n. A., Chung, J. S. n. A., & Young, H. (2002). Peroxynitrite Scavenging Activity of Sinapic Acid (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic Acid) Isolated from Brassica juncea. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21): 5884-5890.



Antioxidant activity of syringic and vanillic acids in Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion

N. Molaahmadibahraseman¹, R. Farhoosh^{*2}, S. Jhony³, A. Sharif⁴

Received: 2014.09.26

Accepted: 2015.04.23

Introduction: Medical benefits of omega-3 fatty acids have led to a lot of research on fish oil. Among marine fish, Kilka has the highest industrial applications. Kilka oil contains significant amounts of omega-3 fatty acids. In the present study, oxidative stability of Kilka fish oil based on the Schaal oven test and the use of two phenolic acid derivatives (syringic and vanillic acids) was investigated.

Materials and methods: Crude Kilka fish oil was supplied by Khazar company (Babolsar, Iran). All chemicals and solvents used in this study were of analytical reagent grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Free radical scavenging activities of phenolic compounds was measured by reading the absorbance of methanolic solutions of the antioxidants containing 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) at 517 nm. The partition coefficient (log P) of the antioxidants was measured in terms of the maximal UV absorbance of aqueous (0.3 mM) and 50:50 aqueous/acetate buffer (0.1M, pH =5.5) solutions. In order to study the antioxidant activity in lipid systems, peroxide value of the chromatographically purified Kilka fish oil as well as its 10% oil-in-water emulsion containing 200 mg/kg of antioxidants was monitored at 55 °C.

Results and discussion: Syringic acid with two methoxy groups showed higher scavenging activity (IC₅₀) than vanillic acid with one methoxy group (54.2 vs. 418.2). Radical scavenging activity in phenolic acids had direct relationship with the type and number of electron donor groups on phenolic ring. Peroxide values changed exponentially. Despite the relatively high polarity (Log P = - 0.65) and high scavenging activity, the performance of syringic acid in Kilka fish oil was degraded as affected by inter-molecular interactions and was not in accordance with the "polar paradox" hypothesis. Antioxidant activity of syringic acid in emulsion increased significantly as compared with oil and it was similar to α -tocopherol. It was concluded that the type of emulsifier and also the way of emulsion preparation as compared with antioxidant had a more prominent role in the oxidative stability of Kilka fish oil.

Keyword: Antioxidant, Fish oil, O/W Emulsion, Phenolic acid, Polar paradox

1 and 3. Former Msc students, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad.
2 and 4. Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad.

(*Corresponding Author Email: rfarhoosh@um.ac.ir)