نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۵، ص. ۵۹۵-۵۸۸

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 5, Dec- Jan 2017, p. 588-595

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

نجمه ملااحمدی بهراسمان[۱]، رضا فرهوش[۲*]، سعید جانی[۳]، علی شریف[٤]

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 قرارگرفت. آلفا- توکوفرول به‌عنوان شاهد مثبت در نظرگرفته 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 معیّن از روغن نمونه‌برداری و عدد پراکسید اندازه‌گیری شد. روند اکسایش امولسیون ۱۰درصد 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 ننمود. 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

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 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 قراردادند 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 نشان‌داده‌شد 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 روغن‌کشی

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)

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

مشتقات 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 بنزوییک هستندکه 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 بخشیده‌است (shahidi, 2005).

این ترکیبات کاربرد فراوانی در صنایع غذایی و داروسازی دارند، تاکنون محققان زیادی تاثیر آن را در روغن خوراکی (Marinova, & Yanishlieva, 1994)، امولسیون (Pekkarinen, *et al*. 1999; Bountagkidou *et al*. 2010)، دارو و محصولات آرایشی و بهداشتی (Lu, *et al*. 2006; Itoh, *et al*. 2009; Beekrum, *et al*. 2003) مورد بررسی قرارداده‌اند. اثر درمانی اسید سیرینجیک در ممانعت از تکثیر سلولهای سرطان پوست، روده بزرگ و سینه نیز به اثبات رسیده‌است (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[1]» 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 عمل‌می‌کنند.

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.

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 ۰تا ۵۰ پی‌پی‌ام ، اسید وانیلیک ۰تا ۲۰۰ 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.

$$\%A = 100\ (A_C - A_S)/A_C \qquad (۱)$$

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 مهارکردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است.

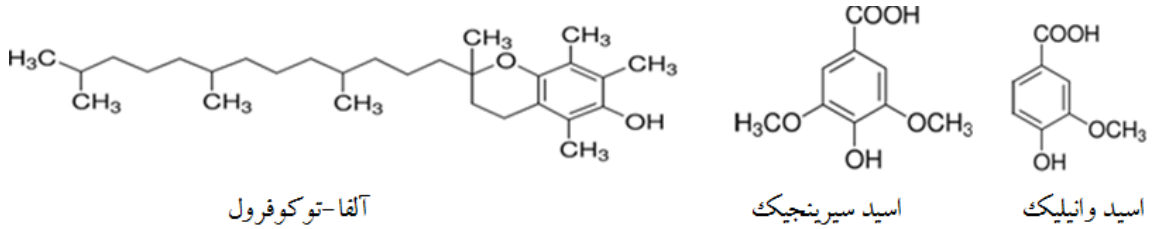
شاخص log p که نشان‌دهنده قطبیت نسبی هر ماده است، نیز به روش Gordon (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد محلول ۰/۳ میلی‌مول از آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه در n- اکتانول تهیه گردید و به مدت یک ساعت درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس طیف جذبی آنها در ناحیه فرابنفش گرفته و حداکثر جذب آنها قرائت شد(A_o).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

$$P = C_{n\text{-}octanol} / C_{water} = A_x / (A_o - A_x) \qquad (۲)$$

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

1 Polar paradox

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 به‌ترتیب ۴/۵ و ۵۰ سانتی‌متر که حاوی ۶۰ گرم اکسید آلومینیوم ۸۰ گرم سیلیکاژل (فعال‌شده 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.



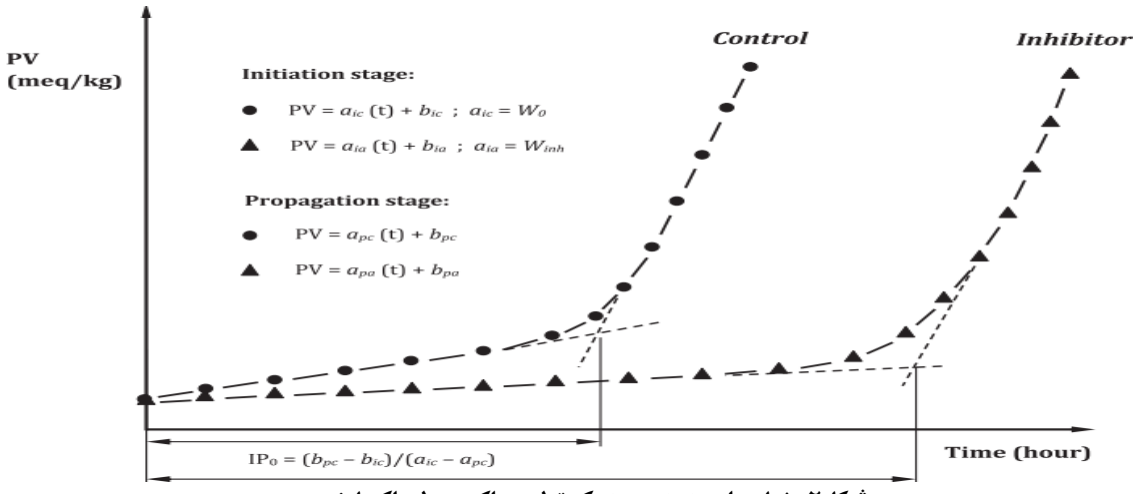
اسید وانیلیک اسید سیرینجیک آلفا-توکوفرول

شکل ۱- ساختمان شیمیایی آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه

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 نهاده‌شد. 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 ۲کاملا مشهود باشند). از روغن داخل پلیت‌ها نمونه‌برداری شد و عدد پراکسید بر اساس روش Shanthaو Decker (۱۹۹۴) اندازه‌گیری گردید. نمودار تغییرات عدد پراکسید نسبت به زمان ترسیم و دوره القاء و شاخص‌های سینتیکی A، F و ORR (جدول۲) محاسبه گردید (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013).

امولسیون ۱۰درصد روغن کیلکا درآب، حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌اکسیدان‌های مذکور، و پنج درصد پروتئین ایزوله سویا به‌عنوان امولسیفایر تهیه گردید. امولسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ 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 کاملا تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار Mini Tab و بر اساس آزمون توکی در سطح پنج درصد ($P < ۰/۰۵$) انجام پذیرفت.



شکل۲- نمایی از منحنی سینتیک تولید پراکسید طی اکسایش چربی

جدول۱- شاخص‌های سینتیکی اکسایش چربی

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

نتایج و بحث

قدرت مهارکنندگی رادیکال دی‌پی‌پی‌اچ و قطبیت نسبی

در آزمون مهارکنندگی رادیکال، اسید سیرینجیک بیشترین (IC_{50}=۵۴/۲ میکرومول برلیتر) قدرت را نشان داد، فعالیت آلفا-توکوفرول (IC_{50}=۱۰۵/۲۹ میکرومول برلیتر) کمتر از سیرینجیک و بیشتر از وانیلیک (IC_{50}=۴۱۸/۲۲ میکرومول برلیتر) بود. این نتایج با مشاهدات von Gadow و همکاران (۱۹۹۷) همخوانی داشت. آنها قدرت مهارکنندگی سیرینجیک را ۸۵/۵٪ ، آلفا-توکوفرول را ۷۵/۱٪ و وانیلیک را ۲۰/۷٪ 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 (شکل۱).

Log P نماد کمّی قطبیت هر ماده است. Log P بیشتر نشان‌دهنده قطبیت کمتر است. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده-شده‌است اسید سیرینجیک حائز بیشترین قطبیت (Log P= -۰/۶۵) نسبت به وانیلیک (Log P= - ۰/۳۲) و آلفا-توکوفرول (Log P = ۲/۳) است. حضور گروه‌های متوکسی و هیدروکسیل در موقعیت اورتو نسبت به گروه هیدروکسیل در ساختمان اسید سیرینجیک احتمالا تشکیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی را موجب شده و در نتیجه قطبیت نسبی مولکول را افزایش‌داده‌است (Fennema, 1996).

جدول ۲- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (IC_{50}) و LogP

آنتی‌اکسیدان	IC_{50} (میکرومول‌برلیتر)	Log P
اسید وانیلیک	$۴۱۸/۲۲\pm۱۰/۴^a$	$-۰/۳۲\pm۰/۰۲^b$
اسید سیرینجیک	$۵۴/۲\pm۰/۵^c$	$-۰/۶۵\pm۰/۰۵^c$
آلفا-توکوفرول	$۱۰۵/۲۹\pm۰/۲۳^b$	$۲/۳\pm۰/۰۴^a$

فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در روغن

روند تغییرات پراکسید در طول زمان عمدتاً از تابع نمایی تبعیت می‌کند (مطابق شکل۲). زیرا این ترکیبات ناپایدار بوده و به‌سرعت تجزیه می‌شوند. طول دوره القاء (IP) نشان‌دهنده پایداری اکسایشی روغن است که در حضور آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سرینجیک و وانیلیک نشان داد تفاوت آماری معنی‌داری بین نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان و نمونه دارای سیرینجیک وجود ندارد اما وانیلیک اندکی بیش از سیریجیک دوره القا (IP) روغن را افزایش داد در حالیکه که فعالیت آلفا توکوفرول بسیار بیشتر از این دو آنتی‌اکسیدان بود. نتایج در جدول ۳ نشان داده‌شده‌است.

سیرینجیک به رغم آنکه از قدرت مهارکنندگی رادیکال قابل توجهی برخوردار است اما در افزایش پایداری اکسایشی روغن کیلکا عملکرد قابل ملاحظه‌ای از خود نشان نداد. علت این امر احتمالا 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 دست‌آمده‌است. 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}/IPo) و A حاصل تقسیم F به شاخص نسبت سرعت اکسایش است (F/ORR) (جدول۱) تفاوت

آماری معنی‌داری بین مقدار کمّی شاخص‌های یاد شده برای دو مشتق اسید بنزوییک 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 آنتی اکسیدان‌ها 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 نشان‌دهنده‌ی 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 می‌باشن (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 امولسیون‌شده اثر بازدارندگی داشته‌باشد. پروتئین‌ها با مکانیسم‌های مختلفی اثر ضداکسایشی نشان می‌دهند: ایجاد نیروی دافعه و راندن فلزات پروکسیدان به‌واسطه بار مثبت، مهار رادیکال‌های آزد، 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 آب، در حضور سه امولسیفایر پروتئین ایزوله آب پنیر، کازئینات سدیم و پروتئین ایزوله سویا مشاهده کردند امولسیون حاوی پروتئین ایزوله سویا در مقایسه با دو امولسیفایر دیگر بیشترین پایداری اکسایشی را نشان داد. آنها علت این امر را قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد و توانایی غیرفعال‌سازی فلزات بیان کردند (Faraji *et al*, 2004).

علاوه بر این، Patei و همکاران (۲۰۰۱) گزارش‌کردند 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 احتمالا به مهار رادیکال‌های آزاد توسط برخی اسیدهای آمینه و ایجاد لایه‌ی محافظ اطراف ذرات روغن مرتبط است.

ارتباط قدرت بالای مهارکنندگی رادیکال (IC_{50} =۵۴/۲) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک، در سامانه امولسیونی مشهودتر است. افزایش در IP و شاخص A موئد 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 شده‌است (zou *et al*, 2002). علاوه براین، 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 = ۲/۳) تمایل آن‌را به سمت فاز روغنی امولسیون، جایی که مسلما 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 رادیکال های آزاد مرتبط باشد (IC_{50}= ۴۱۸/۲۲).

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.

آنتی اکسیدان	IP	شاخص‌های سینتیکی			
		W_{inh}	F	ORR	A
سامانه روغنی					
شاهد	۲/۱۷±۰/۲۱^{c}	۴/۴۶±۰/۴۳^{a}	_	_	_
اسید وانیلیک	۳/۵۷±۰/۴۸^{b}	۵/۴۶±۰/۹۲^{a}	۱/۷±۰/۲۴^{b}	۱/۲۲±۰/۲۴^{a}	۱/۳۹±۰/۳۶^{b}
اسید سیرینجیک	۲/۶۱±۰/۱۲^{c}	۴/۲۲±۰/۲۸^{a}	۱/۰۲۴±/۱۴^{b}	۰/۹۵±۰/۱۱^{b}	۱/۳۱±۰/۲۱^{b}
آلفا-توکوفرول	۱۳/۵۲±۰/۶۸^{a}	۱/۸±۰/۱۱^{b}	۶/۴۴±۰/۷۲^{a}	۰/۴±۰/۰۵^{b}	۱۶/۱±۲/۷^{a}
سامانه امولسیونی					
شاهد	۳۱/۳۳±۰/۲۴^{c}	۰/۲۳±۰/۰۱^{a}	_	_	_
اسید وانیلیک	۳۴/۴۷±۲/۳۷^{c}	۰/۲۱±۰/۰۰^{b}	۱/۱۴±۰/۱۲^{c}	۰/۸۶±۰/۰۶^{a}	۱/۳۲±۰/۲۴^{b}
اسید سیرینجیک	۵۵/۹۸±۱/۴۵^{b}	۰/۱۳±۰/۰۱^{c}	۱/۷۹±۰/۰۴^{b}	۰/۵۸±۰/۰۲^{b}	۳/۱±۰/۲^{a}
آلفا-توکوفرول	۶۵/۶۵±۴/۹۱^{a}	۰/۱۳±۰/۰۳^{c}	۲/۰۹±۰/۱۵^{a}	۰/۶±۰/۱۳^{b}	۳/۵۶±۰/۵۲^{a}

نتیجه‌گیری

عملکرد آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک و سیرینجیک در پایدارسازی روغن ماهی کیلکا و امولسیون آن در آب به روش شال آون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بررسی و با آلفا-توکوفرول مقایسه شد. نتایج نشان داد اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد نمی‌تواند معیارکافی برای پیش بینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد؛ اسید سیرینجیک به رغم قدرت مهارکنندگی رادیکال بالایی که داشت، عملکرد آن در روغن تحت برهم‌کنش‌های درون مولکولی کاهش یافت. آلفا-توکوفرول هم در سامانه روغنی و هم امولسیونی فعالیتی با اختلاف چشمگیر نسبت به اسید وانیلیک داشت. اما عملکرد آن در امولسیون تقریبا شبیه اسید سیرینجیک بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید سیرینجیک در سامانه امولسیونی نسبت به روغنی افزایش ۲/۵ برابری داشت.

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. J*ournal 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.

Jimenz-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-Attiyah, 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 peroxyl radical scavenging. F*ree 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.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 5, Dec- Jan 2017, p. 588-595

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۵، ص. ۵۹۵-۵۸۸

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

N. Molaahmadibahraseman[1], R. Farhoosh[*2], S. Jhony[3], A. Sharif[4]

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-picrylhdrazyl (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 (IC_{50}) 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 Kilkafish 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)