

## مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در پایداری روغن‌های زیتون و سویا

آزاده مردانی قهفرخی<sup>۱</sup>، رضا فرهوش\*<sup>۲</sup> و علی شریف<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۳۱

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۲</sup> به‌ترتیب استاد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

\*مسئول مکاتبه: Email: rfarhoosh@um.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** بررسی مکانیسم فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌های فنلی با استفاده از روابط سینتیکی. **هدف:** تعیین مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در روغن‌های زیتون و سویا. **روش کار:** در این پژوهش فرایند خوداکسایشی روغن‌های تخلیص شده زیتون و سویا در حضور غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶ و ۰/۳۲ درصد اسید جنتیسیک و در دماهای ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد با پایش عدد پراکسید و محاسبه پارامترهای سینتیکی مختلف از قبیل فاکتور حمایتی (F)، نسبت سرعت اکسایش (ORR) و فعالیت آنتی‌اکسیدان (A) ارزیابی گردید و مکانیسم فعالیت اسید جنتیسیک با استفاده از این روابط سینتیکی مشخص گردید. **نتایج:** بررسی مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک توسط پارامترهای سینتیکی گویای شرکت این ترکیب در واکنش اصلی پایانی اکسایش  $(ROO\bullet + InH \rightarrow ROOH + In\bullet)$  در رقابت با واکنش مرحله انتشار فرایند اکسایش روغن‌ها  $(ROO\bullet + RH \rightarrow ROOH + R\bullet)$  بود. در روغن سویا به دلیل درصد بالاتر اسیدهای چند غیراشباعی افزایش غلظت اسید جنتیسیک تا سطوح بالا، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب گردید، در حالی که در روغن زیتون به سبب بالاتر بودن مقادیر اسید چرب تک‌غیراشباع آن (اسید اولئیک)، افزایش غلظت حالت پرواکسیدانی به اسید جنتیسیک بخشید و شرکت این آنتی‌اکسیدان در واکنش جانبی  $(InH + ROOH \rightarrow In\bullet + R\bullet + H_2O)$  را به دنبال داشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** اسید جنتیسیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان فنلی بدون تولید رادیکال‌های آزاد فعال و مضر توانایی کاهش سرعت فرایند اکسایش در روغن‌های زیتون و سویا را دارا بود.

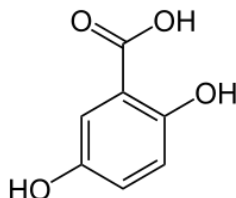
**واژگان کلیدی:** اسید جنتیسیک، روغن‌های گیاهی، مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی

### مقدمه

گسترده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی به منظور پیشگیری و یا کاهش نرخ این فرایند در روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علی‌رغم اثرگذاری بالاتر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مقایسه با انواع طبیعی، به دلیل آثار مضر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامتی و

فرایند اکسایش مخرب‌ترین فرایند محتمل در سیستم‌های لیپیدی است که علاوه بر کاهش مواد مغذی، موجب بروز بدطعمی، تندی و عدم مقبولیت مصرف‌کنندگان می‌گردد. طی سالیان گذشته، طیف

بیماری‌های قلبی و پارکینسون را نیز دارا می‌باشد (آشیدات و همکاران ۲۰۰۵). LD<sub>50</sub> این ترکیب فنلی ۴۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم که بیانگر سالم بودن آن به عنوان یک افزودنی غذایی در سطح مورد استفاده است. از منظر ساختمانی، وجود یک حلقه بنزن و قرارگیری یکی از دو گروه هیدروکسیل اسید جنتیسیک در موقعیت اورتو حلقه فنلی (شکل ۱) خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مناسبی به آن بخشیده است. هیدروژن گروه‌های هیدروکسیل قرار گرفته در موقعیت اورتو (موقعیت مجاورت گروه اسیدی کربوکسیلی حلقه فنلی) به دلیل قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی درون مولکولی با این گروه اسیدی، آنتالپی تفکیک پیوندی پایین‌تری نسبت به هیدروژن‌های قرار گرفته در موقعیت‌های دورتر از گروه اسیدی کربوکسیلی (متا) پیدا می‌کند، به این ترتیب با سهولت بیشتری از آنتی‌اکسیدان جدا و به رادیکال آزاد منتقل می‌گردد (فرهوش و همکاران ۲۰۱۶).



شکل ۱- ساختار شیمیایی اسید جنتیسیک (بندینی و همکاران ۲۰۰۷)

Figure 1-Chemical structure of Gentisic acid

با وجود مطالعات زیاد بر روی ساختمان و فعالیت آنتی‌رادیکالی اسید جنتیسیک، اطلاعات اندکی در مورد مکانیسم فعالیت اسید جنتیسیک در روغن‌های با درجه غیر اشباعیت متفاوت تحت شرایط متنوع دمایی و بر اساس پایش شاخص‌های مختلف اکسایشی منتشر شده است. سینتیک شیمیایی ابزار مناسبی برای شناسایی مکانیسم واکنش شیمیایی می‌باشد. در این روش، سرعت انجام واکنش در شرایط مختلف از جمله غلظت‌های مختلف مواد واکنش‌دهنده مورد بررسی قرار می‌گیرد. بنابراین این امکان فراهم می‌شود که با دنبال

پیشروی سلولهای سرطانی، بتدریج این آنتی‌اکسیدان‌ها از فهرست افزودنی‌های ایمن غذایی حذف گردیده‌اند و توجه مصرف‌کنندگان به‌سوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جلب شده است (پوکورنی ۱۹۹۱). از جمله مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی شناخته شده می‌توان به ترکیبات فنلی اشاره کرد. فنل‌ها، متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که به شکل وسیعی در طبیعت توزیع شده‌اند، به طوری که تاکنون حدود ۸۰۰۰ ترکیب فنلی در بخش‌های مختلف گیاهان شناسایی شده است (هرمان ۱۹۸۹). این ترکیبات به طور گسترده در صنایع مختلف از قبیل تولید رنگ، دارو، آنتی‌اکسیدان‌ها، حشره‌کش‌ها، طعم‌دهنده‌ها و مواد معطر مورد استفاده قرار گرفته (ورپورت و همکاران ۲۰۰۲) و از نظر فعالیت‌های بیولوژیکی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی همواره مورد توجه بوده‌اند (میدلتون و همکاران ۲۰۰۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در فرایند اکسایش روغن‌ها، تابع ساختمان مولکولی و توانایی انتقال هیدروژن از این ترکیبات به رادیکال‌های آزاد تولید شده می‌باشد به طوری که با افزایش تعداد مولکول‌های هیدروژن و کاهش انرژی پیوند این هیدروژن‌ها در ساختمان فنل‌ها، انتقال هر چه بیشتر و ساده‌تر هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه خنثی‌سازی این رادیکال‌ها صورت می‌گیرد.

اسید جنتیسیک (۳ و ۵-دی هیدروبنزوئیک اسید) ترکیب فنلی از زیر شاخه‌ی اسید دی‌هیدروبنزوئیک‌ها است که به طور گسترده در منابع گیاهی متعددی از جمله درخت کاکائو، چغندر قند، تمشک، آواکادو، غلات، گردو، مرکبات، انگور، کنجد، زیتون و حتی صمغ عربی شناسایی گردیده است (گریفتس ۱۹۵۹؛ بیلاود و همکاران ۱۹۹۶؛ شهیدی ۲۰۰۳؛ ساکاس و همکاران ۲۰۰۴؛ بندینی و همکاران ۲۰۰۷؛ سولتان و همکاران ۲۰۱۰). این ترکیب علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، آثار سلامتی‌بخشی چون خصوصیات ضد سرطانی، ضد تومور، ضد التهابی و قابلیت پیشگیری از ابتلا به

خالص‌سازی روغن‌ها، به منظور حذف توکوفرول و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی احتمالی موجود در آنها، به شیوه کروماتوگرافی و با عبور یکصد و سی گرم روغن از ستون کروماتوگرافی با طول ۲۵ و قطر ۲/۵ سانتیمتر، پر شده با ۷۰ گرم اکسید آلومینیوم ۶۰ (فعال، خنثی) و ۱۵ گرم سیلیکاژل با مکش و بدون استفاده از حلال انجام گرفت. برای اطمینان از حذف کامل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، هر روغن دو بار از ستونهای کروماتوگرافی پر شده تازه عبور داده شد (یانیشلیوا و مارینووا ۱۹۹۵).

#### فرایند اکسایش روغن‌ها

به منظور انجام فرایند اکسایش تحت رژیم سینتیکی که در آن اکسیژن عامل محدود کننده نباشد، ۴ گرم از نمونه روغنهای تخلیص شده حاوی غلظت‌های مختلف اسید جنتیسیک (۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶ و ۰/۳۲ درصد وزنی/ وزنی) به پلیت‌های شیشه‌ای با قطر ۹ سانتیمتر منتقل گردید و فرایند اکسایش روغن‌ها در ۴ سطح دمایی ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد در آون انجام گرفت (شانتا و دکر ۱۹۹۴).

پایش پایداری اکسایشی روغن‌ها با نمونه‌گیری طی زمان‌های متوالی از آنها و اندازه‌گیری عدد پراکسید به روش اسپکتروفتومتری انجام شد (شانتا و دکر ۱۹۹۴). نمودار تغییرات پراکسید نمونه‌های روغن (در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان) طی زمان ترسیم گردید و کمیت سینتیکی دوره القاء فرایند اکسایش (زمان قبل از شدت گرفتن اکسایش لیپیدی)، برای نمونه‌های مختلف روغن، از طریق تلاقی معادلات خطی برازش شده بخش‌های آغازین و انتشار فرایند اکسایش مطابق شکل ۲ محاسبه گردید (فرهوش و حسینی یزدی ۲۰۱۴).

کردن واکنش‌های ۰ تا ۱۴ فرآیند اکسایش (شکل ۳) بتوان شرکت ترکیب آنتی‌اکسیدانی در واکنش‌های اصلی و جانبی فرایند اکسایش را تشخیص و حتی شناسایی نمود و سرانجام مکانیسم عمل آنتی‌اکسیدان را روشن ساخت (مارینووا و یانیشلیوا ۲۰۰۳). از این رو در این مطالعه، مکانیسم اثر آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک با رویکرد سینتیکی، در روغن‌های زیتون و سویا به ترتیب به عنوان روغنهای شاخص اولئیکی و لینولنیکی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

اسید جنتیسیک از شرکت مرک آلمان و سایر مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت‌های مرک و سیگما آمریکا خریداری شدند.

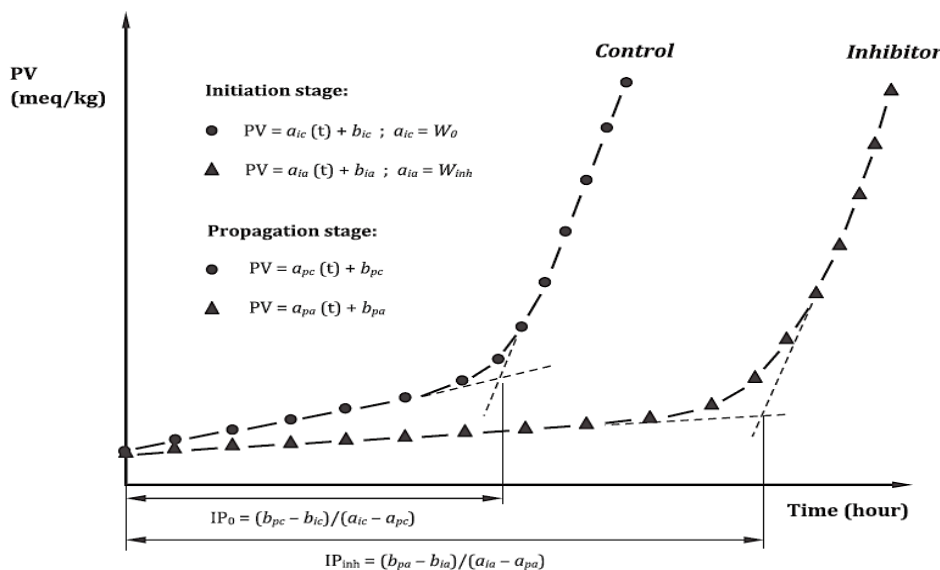
روغن‌های زیتون و سویای تصفیه، رنگبری و بوگیری شده فاقد آنتی‌اکسیدان افزوده شده، به ترتیب از واحدهای صنعتی اتکا و سه گل نیشابور خریداری و تا زمان آزمون در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  - در تاریکی نگهداری شدند. محتوای اسید چرب این روغن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

#### جدول ۱- محتوای اسید چرب روغن زیتون و سویا

Table 1- Fatty acid composition of olive and soybean oils\*

| Fatty acids (%) | soybean oil               | Olive oil                 |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>C16:0</b>    | 9.66 ± 0.28 <sup>b</sup>  | 13.12 ± 0.27 <sup>a</sup> |
| <b>C16:1</b>    | 0.71 ± 0.16 <sup>b</sup>  | 1.31 ± 0.2 <sup>a</sup>   |
| <b>C18:0</b>    | 4.62 ± 0.23 <sup>a</sup>  | 4.2 ± 0.27 <sup>a</sup>   |
| <b>C18:1</b>    | 22.08 ± 0.01 <sup>b</sup> | 68.4 ± 0.17 <sup>a</sup>  |
| <b>C18:2</b>    | 51.4 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 8.67 ± 0.17 <sup>b</sup>  |
| <b>C18:3</b>    | 7.92 ± 0.19 <sup>a</sup>  | 0.62 ± 0.05 <sup>b</sup>  |

\* Means (± standard deviation) within a row with the same lowercase letters are not significantly different at  $P < 0.05$



شکل ۲- منحنی شماتیک تولید پراکسید طی اکسایش سیستم‌های لیپیدی (فرهوش و همکاران ۲۰۱۶)  
Figure 2- A schematic kinetic curve of peroxide accumulation during oxidation of lipid systems

نسبت سرعت اکسایش (ORR) بیان کننده عکس قدرت آنتی‌اکسیدان است. به طوری که مقادیر کمتر این فاکتور دلالت بر قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتر ترکیب خواهد داشت. نسبت سرعت اکسایش با استفاده از معادله ۲ محاسبه می‌شود.

معادله ۲-

$$ORR = W_{inh} / W_0$$

در این معادله  $W_{inh}$  و  $W_0$  به ترتیب سرعت اکسایش در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان هستند.

فعالیت آنتی‌اکسیدان (A)، بیان کننده تاثیر آنتی‌اکسیدان در پایان دادن به واکنش اکسایش است. فعالیت آنتی‌اکسیدان با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید.

معادله ۳-

$$A = F / ORR$$

سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان ( $W_{InH}$ ) از نسبت غلظت اولیه آنتی‌اکسیدان ( $[InH]_0$ )، بر دوره القای اکسایش در حضور آنتی‌اکسیدان ( $IP_{inh}$ ) محاسبه شد (معادله ۴).

$$W_{InH} = [InH]_0 / IP_{inh}$$

معادله ۴-

در ادامه به کمک پارامترهای سینتیکی محاسبه شده (معادله ۴-۱) و با توجه به سری واکنش‌های اکسایشی

تعیین پارامترهای سینتیکی و مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک

تأثیر و مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک، مطابق روش یانیشلیوا و همکارانش (۱۹۹۹) محاسبه گردید. به این منظور، ابتدا کمیت‌های سینتیکی از قبیل فاکتور حمایتی (F)، نسبت سرعت اکسایش (ORR)، فعالیت آنتی‌اکسیدان (A) و سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان ( $W_{InH}$ ) به ترتیب، با استفاده از معادلات ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه گردیدند.

فاکتور حمایتی (F) یا تأثیرگذاری آنتی‌اکسیدان، توانایی آنتی‌اکسیدان در متوقف کردن زنجیره رادیکالی اکسایش به وسیله ایجاد برهم‌کنش‌های مختلف با رادیکال‌های پراکسید را نشان می‌دهد. این فاکتور متأثر از دوره‌ی القای آنتی‌اکسیدان بر حسب عدد پراکسید بوده و از معادله ۱ محاسبه گردید:

$$F = IP_{inh} /$$

معادله ۱-

$$IP_0$$

در این معادله  $IP_0$  و  $IP_{inh}$  دوره القا فرایند اکسایش به ترتیب بر حسب عدد پراکسید در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان می‌باشند.

مرتبه دوم معادله، بیانگر شرکت آنتی‌اکسیدان به صورت همزمان در هر دو واکنش جانبی ۱۱ و ۱۲ است. پس از تشخیص واکنش‌هایی که خود مولکول آنتی‌اکسیدان در آنها شرکت کرده‌اند؛ با استفاده از پارامترهای سینتیکی و با کمک معادله ۶ امکان شرکت رادیکال‌های حاصل از آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های جانبی مرحله انتشار فرایند اکسایش (شماره ۷-، ۱۰ و ۱۴) بررسی گردید.

$$W_{inh} \sim [InH]^n \quad \text{معادله-۶}$$

به این ترتیب با توجه به شرایط زیر واکنش پذیری رادیکال‌های حاصل از آنتی‌اکسیدان تفسیر شد:

۱. برقراری رابطه خطی بین غلظت آنتی‌اکسیدان  $[InH]$  و سرعت اکسایش  $(W_{inh})$  در  $n = -1$ ، بیانگر عدم شرکت رادیکال حاصله از آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های ۷- و ۱۰ می‌باشد.

۲. برقراری رابطه خطی بین غلظت آنتی‌اکسیدان  $[InH]$  و سرعت اکسایش  $(W_{inh})$  در  $n = -0.5$ ، بیانگر شرکت رادیکال در یکی از واکنش‌های ۷- یا ۱۰ یا ۱۴ می‌باشد. به نظر می‌رسد واکنش ۱۰ محتمل‌ترین واکنش باشد (یانیشلیوا و همکاران ۱۹۹۲).

۳. برقراری رابطه غیرخطی بین غلظت آنتی‌اکسیدان  $[InH]$  و سرعت اکسایش  $(W_{inh})$  در  $n = 2$ ، بیانگر شرکت رادیکال در بیشتر از یک واکنش (بسته به غلظت آنتی‌اکسیدان) است.

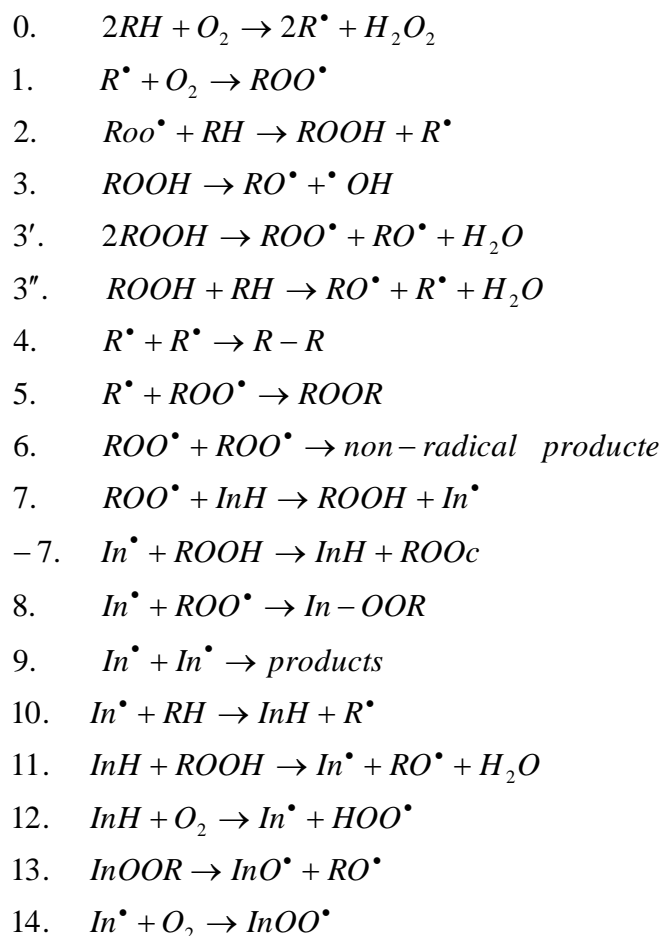
۴. عدم وجود هر یک از سه رابطه بالا بین غلظت آنتی‌اکسیدان  $[InH]$  و سرعت اکسایش  $(W_{inh})$  بیانگر فعالیت شدید آنتی‌اکسیدان است. به طوری که رادیکال پراکسید  $(ROO^{\bullet})$  سریعتر از واکنش با روغن با خود مولکول آنتی‌اکسیدان وارد واکنش می‌شود (دنيسو و خودیاکو ۱۹۸۷).

(شکل ۳) مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس شرکت مولکول آنتی‌اکسیدان و رادیکال‌های حاصل از آن در سری واکنش‌های اکسایشی تعیین گردید. در این سری از واکنش‌ها شماره ۰ تا ۶ بیانگر واکنش‌های فرایند اکسایش در عدم حضور آنتی‌اکسیدان و ۷ تا ۱۴، بیانگر واکنش‌های فرایند اکسایش در حضور آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

قدرت آنتی‌اکسیدان توسط شرکت در واکنش‌های ۷، ۷-، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و یا ۱۴ تحت تاثیر قرار می‌گیرد (یانیشلیوا و همکاران ۱۹۹۵). پارامتر  $F$  امکان مهار رادیکال‌های پراکسید از طریق واکنش اصلی پایانی شماره ۷ را نشان می‌دهد. وابستگی خطی این پارامتر با غلظت آنتی‌اکسیدان نشان‌دهنده شرکت مولکول آنتی‌اکسیدان در این واکنش پایانی می‌باشد. وابستگی غیرخطی ناشی از شرکت مولکول آنتی‌اکسیدان در واکنش‌هایی جز واکنش ۷ به شماره واکنش‌های ۱۱ و ۱۲ می‌باشد. معادله رگرسیون ۵ امکان شناسایی شرکت مولکول آنتی‌اکسیدان را در این واکنش‌های جانبی فراهم می‌آورد.

$$W_{InH} = K_{eff} [InH]^n + W_i/f \quad \text{معادله-۵}$$

که در این معادله،  $K_{eff}$  ثابت سرعت مصرف آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های جانبی مرحله آغازین،  $W_i$  سرعت مرحله آغازین در طول دوره اکسایش کند در حضور آنتی‌اکسیدان،  $f$  ضریب استوکیومتری بازدارنده است که تعداد رادیکال‌هایی که توسط آنتی‌اکسیدان مهار می‌شوند را نشان می‌دهد. مرتبه صفر ( $n=0$ ) معادله ۵ بیانگر عدم شرکت مولکول آنتی‌اکسیدان در واکنش جانبی است. مرتبه اول ( $n=1$ ) معادله ۵، بیانگر شرکت آنتی‌اکسیدان در یکی از واکنش‌های جانبی مرحله آغازین فرایند اکسایش (شماره ۱۱ یا ۱۲) است.



شکل ۳- معادلات فرایند اکسایش روغن در حضور (۷-۱۴) و عدم حضور آنتی‌اکسیدان (۰-۶)

Figure 3- Non-inhibited (0-6) and inhibited (7-14) oxidation reactions. RH: oxidizing lipid substrate; ROO: peroxide radical; InH: inhibitor.

### تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، پنج سطح غلظتی از آنتی‌اکسیدان‌ها و چهار سطح دمایی (۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد) انجام شد. میانگینها با نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) مقایسه گردید.

### نتایج و بحث

#### پایداری اکسایشی روغن‌ها بر حسب دوره القا

دوره القای فرایند اکسایش روغن‌های زیتون و سویا بر حسب عدد پراکسید، در حضور و عدم حضور غلظت‌های متفاوت اسید جنتیسیک، در دماهای ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد، در جدول ۲ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد. با افزودن اسید جنتیسیک و افزایش درصد غلظت آن، طول دوره القای اکسایش کند روغن‌ها افزایش پیدا کرد. این افزایش در تمامی دماها و غلظت‌ها در روغن زیتون بسیار چشمگیرتر از روغن سویا مشاهده گردید. از سوی دیگر افزایش دما در محیط‌های تری‌آسیل گلیسرولی

خودنشان داده است. این اختلاف را می‌توان به تفاوت محتوای اسید چربی این روغن‌ها نسبت داد. در روغن زیتون، تنها ۹/۲۹ درصد اسیدهای چرب چند غیراشباع لینولئیک و لینولنیک اندازه‌گیری گردید در حالی که این میزان در روغن سویا ۵۹/۳۲ درصد بود (جدول ۱).

زیتون و سویا، به دلیل تاثیر تسریع‌کنندگی بر فرایند اکسایش، موجب کاهش طول دوره القا اکسایش نمونه‌ها گردید. روغن زیتون (در حضور و عدم حضور اسید جنتیسیک) دوره القای بالاتری نسبت به روغن سویا از

جدول ۲- دوره القا اکسایش کند (IP) روغن‌های زیتون و سویا و در دماهای ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد و غلظت‌های مختلف اسیدهای جنتیسیک بر حسب پایش عدد پراکسید

Table 2- The induction periods (IP, h) of hydroperoxide formation during the oxidation of olive and soybean oil samples containing different concentrations of Gentisic acid at 60–120 °C\*

|         | Concentration (%) | IP 60 C° (h)               | IP 80 C° (h)              | IP 100 C° (h)             | IP 120 C° (h)            |
|---------|-------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Olive   | 0.00              | 82.00±1.34 <sup>fA</sup>   | 9.33±0.61 <sup>kB</sup>   | 4.87±0.20 <sup>iC</sup>   | 1.85±0.06 <sup>gD</sup>  |
|         | 0.02              | 3206.00±4.05 <sup>bA</sup> | 319.54±4.14 <sup>eB</sup> | 68.76±0.47 <sup>eC</sup>  | 12.72±0.31 <sup>eD</sup> |
|         | 0.04              | 5586.00±7.95 <sup>aA</sup> | 346.02±7.45 <sup>dB</sup> | 95.21±0.54 <sup>dC</sup>  | 24.71±0.29 <sup>dD</sup> |
|         | 0.08              | NT                         | 407.45±3.32 <sup>cA</sup> | 137.11±0.86 <sup>cB</sup> | 42.33±0.16 <sup>cC</sup> |
|         | 0.16              | NT                         | 485.81±3.63 <sup>bA</sup> | 187.78±0.79 <sup>bB</sup> | 64.26±0.31 <sup>bC</sup> |
|         | 0.32              | NT                         | 555.90±5.09 <sup>aA</sup> | 230.54±1.02 <sup>aB</sup> | 79.12±0.58 <sup>aC</sup> |
| Soybean | 0.00              | 3.21±0.19 <sup>hA</sup>    | 1.13±0.06 <sup>lB</sup>   | 0.54±0.06 <sup>kC</sup>   | 0.30±0.02 <sup>kD</sup>  |
|         | 0.02              | 34.52±0.29 <sup>gA</sup>   | 12.47±0.21 <sup>jB</sup>  | 2.85±0.14 <sup>jC</sup>   | 0.64±0.08 <sup>jD</sup>  |
|         | 0.04              | 82.60±0.38 <sup>fK</sup>   | 19.28±0.16 <sup>iB</sup>  | 4.00±0.11 <sup>iC</sup>   | 0.98±0.11 <sup>iD</sup>  |
|         | 0.08              | 174.42±2.12 <sup>eA</sup>  | 40.53±0.25 <sup>hB</sup>  | 8.01±0.18 <sup>hC</sup>   | 1.11±0.18 <sup>iD</sup>  |
|         | 0.16              | 495.60±1.98 <sup>dA</sup>  | 68.44±1.36 <sup>gB</sup>  | 12.20±0.23 <sup>gC</sup>  | 1.59±0.11 <sup>hD</sup>  |
|         | 0.32              | 825.50±2.68 <sup>cA</sup>  | 126.90±2.03 <sup>fB</sup> | 24.30±0.39 <sup>fC</sup>  | 3.12±0.09 <sup>fD</sup>  |

\*Means (± standard deviation) within a column with the same lowercase letters are not significantly different at  $p < 0.05$ , and, means within a row with the same uppercase letters are not significantly different at  $p < 0.05$ .

NT) Not terminated

شده در روغن زیتون از قبیل نسبت سرعت اکسایش، سرعت تشکیل هیدروپراکسید و سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های برابر اسید جنتیسیک مقادیر پایبتری نسبت به روغن سویا نشان دادند. همگی این موارد حاکی از پایداری اکسایشی بالاتر روغن زیتون و تاثیر آنتی‌اکسیدانی بهتر اسید جنتیسیک بر این روغن نسبت به سویا است. بالا بودن سرعت اکسایش در روغن سویا موجب محدودیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در آن گردیده است.

### پارامترهای سینتیکی اسید جنتیسیک در روغن‌های زیتون و سویا

پارامترهای سینتیکی مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در روغن‌های زیتون و سویا در جدول ۳ نمایش داده شده‌اند. همانگونه که مشاهده می‌شود در غلظت‌های برابر از اسید جنتیسیک، فاکتور حمایتی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن زیتون نسبت به روغن سویا بالاتر بود به طوری که در غلظت ۰/۰۲ درصد از اسید جنتیسیک، در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، فاکتور F و A در روغن زیتون به ترتیب ۴۰ و ۵۰۰۱/۴۱ و در روغن سویا این مقادیر به ترتیب ۱۰/۲۳ و ۷۲/۵۵ محاسبه گردید. سایر پارامترهای سینتیکی محاسبه

جدول ۳- پارامترهای سینتیکی اکسایش (فاکتور حمایتی (F)، نسبت سرعت اکسایش (ORR)، فعالیت آنتی‌اکسیدان (A) و سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان ( $W_{InH}$ )) روغن‌های زیتون و سویا در حضور غلظت‌های مختلف اسید جنتیسیک در دماهای مختلف ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Table 3-The kinetic parameters of sunflower and olive oils containing five concentrations of Gentisic acid at 60, 80, 100 and 120 °C\*

| oil   | °C  | Concentration             |  | F                        | ORR                        | A                           | $W_{inh}$<br>( $\times 10^9$ )<br>(M/s) | $W_{InH}$<br>( $\times 10^{10}$ )<br>(M/s) |
|-------|-----|---------------------------|--|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|--|
|       |     | [InH] <sub>0</sub><br>(%) | [InH] <sub>0</sub><br>( $\times 10^3$ )<br>(M) |                          |                            |                             |   |  |
| olive | 60  | 0.02                      | 1.18   | 40.01±0.47 <sup>ij</sup> | 0.008±0.00 <sup>mn</sup>   | 5001.41±9.27 <sup>e</sup>   | 0.60±0.02 <sup>u</sup>                  | 1.00±0.04 <sup>v</sup>                     |
|       |     | 0.04                      | 2.37   | 69.75±1.21 <sup>d</sup>  | 0.005±0.00 <sup>n</sup>    | 13950.12±11.25 <sup>c</sup> | 0.36±0.04 <sup>u</sup>                  | 1.10±0.02 <sup>v</sup>                     |
| soy   | 60  | 0.02                      | 1.19   | 10.23±0.12 <sup>st</sup> | 0.141±0.03 <sup>fg</sup>   | 72.55±1.12 <sup>qr</sup>    | 334.02±23.14 <sup>mn</sup>              | 88.70±1.04 <sup>qr</sup>                   |
|       |     | 0.04                      | 2.38   | 23.10±0.10 <sup>o</sup>  | 0.055±0.01 <sup>ijkl</sup> | 419.43±4.71 <sup>p</sup>    | 130.04±15.30 <sup>p</sup>               | 78.61±4.22 <sup>qr</sup>                   |
|       |     | 0.08                      | 4.77   | 48.42±1.11 <sup>fg</sup> | 0.033±0.01 <sup>klmn</sup> | 1467.63±9.95 <sup>l</sup>   | 78.40±11.01 <sup>qr</sup>               | 75.11±2.05 <sup>qrst</sup>                 |
|       |     | 0.16                      | 9.55   | 129.12±4.20 <sup>b</sup> | 0.016±0.01 <sup>mn</sup>   | 8062.13±34.02 <sup>d</sup>  | 40.10±9.09 <sup>rstuv</sup>             | 56.42±5.08 <sup>qrst</sup>                 |
|       |     | 0.32                      | 19.1   | 228.02±7.71 <sup>a</sup> | 0.013±0.01 <sup>mn</sup>   | 17529.50±52.20 <sup>b</sup> | 31.61±2.11 <sup>stuv</sup>              | 63.90±3.13 <sup>qrst</sup>                 |
| olive | 80  | 0.02                      | 1.18   | 33.40±0.19 <sup>m</sup>  | 0.046±0.01 <sup>klm</sup>  | 726.35±4.12 <sup>o</sup>    | 9.29±0.11 <sup>tvu</sup>                | 10.33±0.16 <sup>uv</sup>                   |
|       |     | 0.04                      | 2.37   | 36.36±0.25 <sup>mn</sup> | 0.031±0.01 <sup>klmn</sup> | 1172.02±12.05 <sup>m</sup>  | 6.76±0.21 <sup>tvu</sup>                | 19.02±1.10 <sup>uv</sup>                   |
|       |     | 0.08                      | 4.74   | 42.90±0.76 <sup>hi</sup> | 0.023±0.02 <sup>lmn</sup>  | 1830.14±15.16 <sup>k</sup>  | 5.12±0.07 <sup>vu</sup>                 | 32.22±1.92 <sup>stuv</sup>                 |
|       |     | 0.16                      | 9.49   | 50.85±2.12 <sup>f</sup>  | 0.019±0.01 <sup>lmn</sup>  | 2662.46±25.52 <sup>h</sup>  | 4.12±0.17 <sup>vu</sup>                 | 54.40±5.33 <sup>qrst</sup>                 |
|       |     | 0.32                      | 18.99  | 58.23±1.13 <sup>e</sup>  | 0.014±0.01 <sup>mn</sup>   | 4159.85±36.12 <sup>f</sup>  | 3.08±0.15 <sup>vu</sup>                 | 95.09±6.85 <sup>q</sup>                    |
| soy   | 80  | 0.02                      | 1.19   | 7.95±0.18 <sup>uv</sup>  | 0.142±0.02 <sup>fg</sup>   | 53.89±1.28 <sup>qr</sup>    | 818.81±42.22 <sup>k</sup>               | 261.30±13.05 <sup>n</sup>                  |
|       |     | 0.04                      | 2.38   | 12.44±0.14 <sup>rs</sup> | 0.065±0.01 <sup>ijk</sup>  | 191.79±1.54 <sup>q</sup>    | 377.22±27.07 <sup>l</sup>               | 334.01±9.01 <sup>m</sup>                   |
|       |     | 0.08                      | 4.77   | 25.66±0.59 <sup>o</sup>  | 0.037±0.01 <sup>klmn</sup> | 693.05±3.49 <sup>o</sup>    | 218.02±11.24 <sup>o</sup>               | 324.72±5.17 <sup>m</sup>                   |
|       |     | 0.16                      | 9.55   | 46.94±1.31 <sup>g</sup>  | 0.020±0.01 <sup>lmn</sup>  | 2347.91±45.70 <sup>i</sup>  | 115.12±10.08 <sup>p</sup>               | 355.44±10.04 <sup>m</sup>                  |
|       |     | 0.32                      | 19.1   | 80.23±2.75 <sup>c</sup>  | 0.018±0.01 <sup>lmn</sup>  | 44573.95±66.11 <sup>a</sup> | 104.82±13.11 <sup>pq</sup>              | 415.80±6.18 <sup>l</sup>                   |
| olive | 100 | 0.02                      | 1.18   | 14.38±0.17 <sup>qr</sup> | 0.081±0.01 <sup>hij</sup>  | 177.11±3.42 <sup>qr</sup>   | 44.01±1.85 <sup>rstu</sup>              | 48.64±2.81 <sup>rstu</sup>                 |
|       |     | 0.04                      | 2.37   | 20.11±0.12 <sup>p</sup>  | 0.042±0.02 <sup>klmn</sup> | 478.19±5.81 <sup>p</sup>    | 23.21±1.42 <sup>uv</sup>                | 69.66±4.16 <sup>qrst</sup>                 |
|       |     | 0.08                      | 4.74   | 29.22±0.68 <sup>n</sup>  | 0.022±0.01 <sup>lmn</sup>  | 1328.91±12.12 <sup>i</sup>  | 12.42±0.76 <sup>uv</sup>                | 95.81±6.78 <sup>q</sup>                    |
|       |     | 0.16                      | 9.49   | 39.37±0.56 <sup>jk</sup> | 0.018±0.01 <sup>lmn</sup>  | 2178.45±20.45 <sup>j</sup>  | 10.01±0.58 <sup>uv</sup>                | 142.44±11.44 <sup>p</sup>                  |
|       |     | 0.32                      | 18.99  | 48.84±1.12 <sup>fg</sup> | 0.014±0.01 <sup>lmn</sup>  | 3488.16±17.32 <sup>g</sup>  | 8.00±0.91 <sup>uv</sup>                 | 229.71±21.04 <sup>o</sup>                  |
| soy   | 100 | 0.02                      | 1.19   | 4.35±0.12 <sup>wx</sup>  | 0.32±0.02 <sup>klmn</sup>  | 13.59±0.63 <sup>qr</sup>    | 3240.12±36.21 <sup>f</sup>              | 1083.79±9.17 <sup>j</sup>                  |
|       |     | 0.04                      | 2.38   | 7.21±0.10 <sup>uv</sup>  | 0.189±0.01 <sup>e</sup>    | 38.12±1.91 <sup>qr</sup>    | 1920.09±44.21 <sup>g</sup>              | 1309.11±25.11 <sup>i</sup>                 |
|       |     | 0.08                      | 4.77   | 11.44±0.81 <sup>rs</sup> | 0.154±0.02 <sup>f</sup>    | 74.28±2.18 <sup>qr</sup>    | 1560.21±19.08 <sup>h</sup>              | 1654.12±25.01 <sup>h</sup>                 |
|       |     | 0.16                      | 9.55   | 17.50±0.64 <sup>q</sup>  | 0.114±0.01 <sup>gh</sup>   | 153.67±2.24 <sup>qr</sup>   | 1160.36±28.34 <sup>i</sup>              | 2165.55±29.12 <sup>f</sup>                 |
|       |     | 0.32                      | 19.1   | 35.71±1.51 <sup>mn</sup> | 0.094±0.01 <sup>hi</sup>   | 397.48±12.45 <sup>p</sup>   | 960.25±23.10 <sup>j</sup>               | 2122.22±18.12 <sup>g</sup>                 |
| olive | 120 | 0.02                      | 1.18   | 6.85±0.07 <sup>uvw</sup> | 0.239±0.03 <sup>d</sup>    | 28.65±0.87 <sup>qr</sup>    | 288.11±4.18 <sup>n</sup>                | 276.35±22.13 <sup>n</sup>                  |
|       |     | 0.04                      | 2.37   | 13.94±0.14 <sup>f</sup>  | 0.109±0.02 <sup>gh</sup>   | 127.22±10.34 <sup>qr</sup>  | 132.03±2.22 <sup>p</sup>                | 272.82±12.18 <sup>n</sup>                  |
|       |     | 0.08                      | 4.74   | 23.23±0.79 <sup>o</sup>  | 0.056±0.01 <sup>ijkl</sup> | 414.32±12.46 <sup>p</sup>   | 68.15±1.98 <sup>qrst</sup>              | 327.61±34.03 <sup>m</sup>                  |
|       |     | 0.16                      | 9.49   | 36.49±0.68 <sup>lm</sup> | 0.039±0.01 <sup>klmn</sup> | 935.46±14.78 <sup>n</sup>   | 48.22±1.78 <sup>rst</sup>               | 717.51±10.75 <sup>k</sup>                  |
|       |     | 0.32                      | 18.99  | 43.97±1.11 <sup>h</sup>  | 0.025±0.02 <sup>lmn</sup>  | 1758.05±12.11 <sup>k</sup>  | 31.22±0.97 <sup>stuv</sup>              | 693.33±21.13 <sup>k</sup>                  |
| soy   | 120 | 0.02                      | 1.19   | 2.29±0.01 <sup>x</sup>   | 0.610±0.05 <sup>a</sup>    | 3.75±0.14 <sup>r</sup>      | 10480±72.15 <sup>a</sup>                | 3516.51±44.15 <sup>e</sup>                 |
|       |     | 0.04                      | 2.38   | 2.84±0.04 <sup>x</sup>   | 0.421±0.02 <sup>b</sup>    | 6.69±0.47 <sup>r</sup>      | 7296.31±29.10 <sup>b</sup>              | 5699.26±32.12 <sup>d</sup>                 |
|       |     | 0.08                      | 4.77   | 4.31±0.07 <sup>wx</sup>  | 0.390±0.05 <sup>b</sup>    | 11.35±0.93 <sup>qr</sup>    | 6040.09±21.11 <sup>c</sup>              | 7485.82±28.18 <sup>c</sup>                 |
|       |     | 0.16                      | 9.55   | 6.31±0.13 <sup>vw</sup>  | 0.290±0.04 <sup>c</sup>    | 21.75±1.14 <sup>qr</sup>    | 5080.22±42.32 <sup>d</sup>              | 10242.33±37.23 <sup>b</sup>                |
|       |     | 0.32                      | 19.1   | 9.73±0.11 <sup>stu</sup> | 0.240±0.01 <sup>d</sup>    | 40.54±1.03 <sup>qr</sup>    | 4160.15±14.03 <sup>e</sup>              | 13297.14±51.31 <sup>a</sup>                |

\* Means (± standard deviation) within a column with the same lowercase letters are not significantly different at p< 0.05



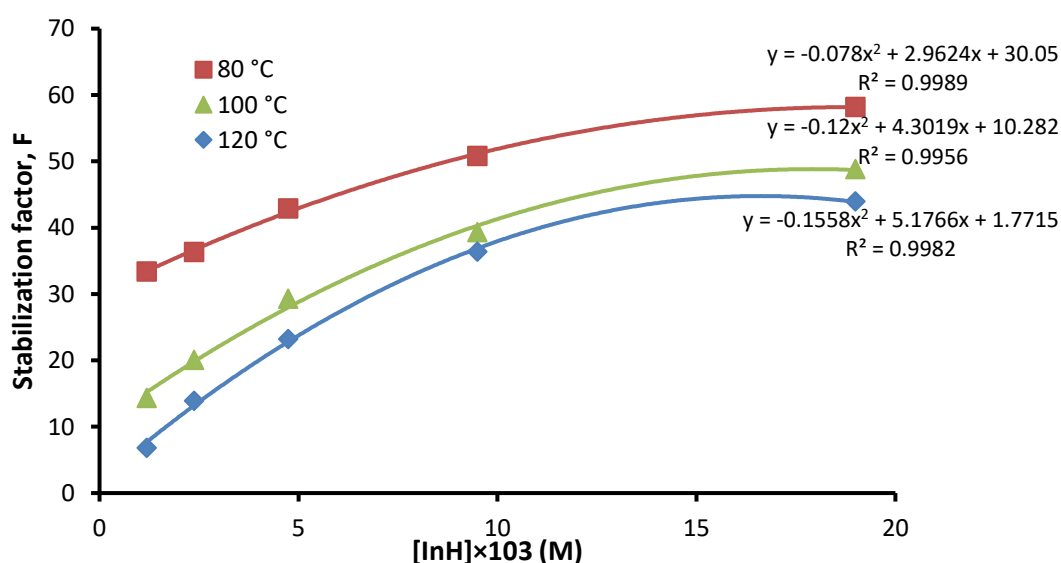
سوی دیگر عملکرد مناسب آنتی‌اکسیدان منوط به عدم تمایل رادیکال حاصله از آنتی‌اکسیدان برای شرکت در واکنش‌های جانبی تسریع کننده (واکنش‌های ۷-، ۱۰ و ۱۴) نیز می‌باشد.

به منظور بررسی مکانیسم اثر آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در واکنش‌های جانبی اکسایش در روغن‌های زیتون و سویا، وابستگی پایداری این آنتی‌اکسیدان به غلظت ترسیم گردید (شکل ۴). همان‌گونه که در شکل ۴ نیز مشخص است رابطه فاکتور حمایتی و غلظت اسید جنتیسیک در روغن زیتون در دماهای ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد به صورت هذلولی به دست آمد. این رابطه غیرخطی نشان دهنده شرکت اسید جنتیسیک در واکنش‌های جانبی ۱۱ و ۱۲ در روغن زیتون می‌باشد که با توجه به خطی شدن وابستگی سرعت متوسط مصرف اسید جنتیسیک در روغن زیتون در برابر غلظت این آنتی‌اکسیدان (شکل ۵)، مشخص گردید که اسید جنتیسیک در تمامی دماها در روغن زیتون در یکی از واکنش‌های جانبی شماره ۱۱ یا ۱۲ و نه هر دو آنها شرکت کرده است.

افزایش غلظت اسید جنتیسیک و کاهش دمای فرایند اکسایش، در هر دو روغن زیتون و سویا موجب افزایش مقادیر فاکتور حمایتی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش نسبت سرعت اکسایش، سرعت تشکیل هیدروپراکسید و سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان گردید (جدول ۳). نتایج مشابهی توسط ربولوا در مورد تاثیر دما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی از جمله اسید جنتیسیک گزارش شده است. به طوری که در این تحقیق نیز افزایش دما موجب کاهش فعالیت و پایداری آنتی‌اکسیدان‌ها گردیده است (ربولوا ۲۰۱۲).

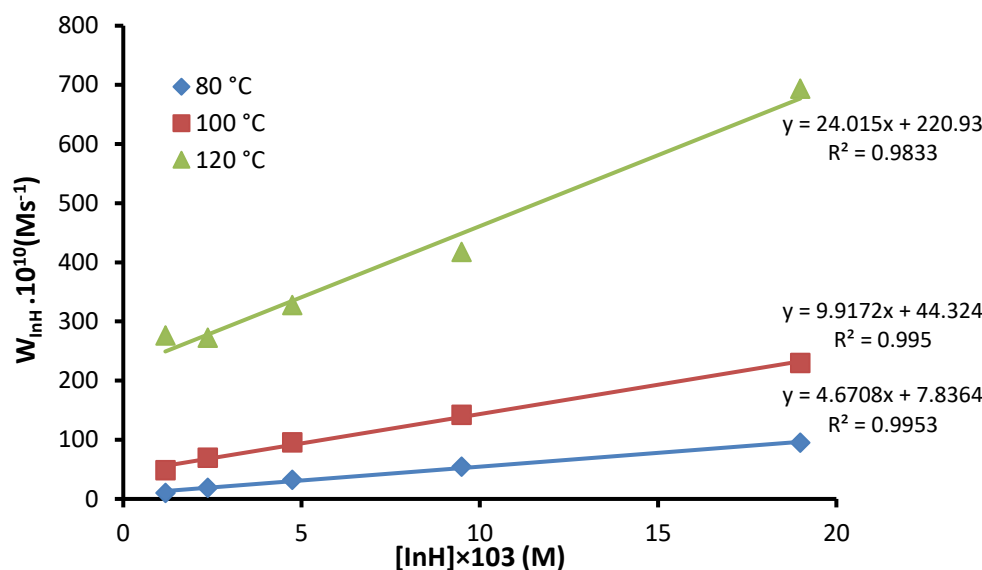
#### تعیین مکانیسم فعالیت اسید جنتیسیک در روغن‌های زیتون و سویا

اینکه هر آنتی‌اکسیدان فعالیت خاص خود را نشان می‌دهد به دلیل این است که چه مکانیسم عملی داشته و در چه واکنش‌هایی در فرایند اکسایش (شماره ۷ تا ۱۴) شرکت کرده است (شکل ۳). به طور کلی هر چه میزان شرکت آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های پایانی اکسایش (واکنش‌های ۷ و ۸) بیشتر باشد و در واکنش‌های جانبی ۱۱، ۱۲ و ۱۳ به عنوان آغازگر اکسایش شرکت نکند، آنتی‌اکسیدان مطلوب‌تر و موثرتری تلقی می‌شود. از



شکل ۴- وابستگی غلظتی پایداری اسید جنتیسیک در روغن زیتون در دماهای ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Figure 4- Concentration dependence of the stabilization factor, parameter  $F$ , of Gentisic acid during oxidation of olive oil at various temperatures (80, 100, 120 °C)



شکل ۵- وابستگی غلظتی سرعت متوسط مصرف اسید جنتیسیک در روغن زیتون در دماهای ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Figure 5- Dependence of the mean rate of consumption ( $W_{inH}$ ) of Gentisic acid on the concentration  $[InH]$  during oxidation of olive oil at various temperatures (80, 100, 120 °C)

سیستم لیپیدی می‌باشد. همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد با افزایش غیراشباعیت از روغن زیتون به روغن سویا میزان ضریب  $K_{eff}$  افزایش یافته است. این اختلاف ایجاد شده تحت تاثیر تغییر اشباعیت محیط لیپیدی، بر اساس مطالعات تایید شده پیشین توسط یانیشلیوا و مارینووا، گویای شرکت اسید جنتیسیک در واکنش جانبی شماره ۱۱ می باشد (یانیشلیوا و مارینووا ۱۹۹۵).

به منظور تعیین دقیق این مهم که اسید جنتیسیک در کدامیک از واکنش جانبی (۱۱ یا ۱۲) در روغن زیتون شرکت کرده است. از مقایسه ثابت سرعت مصرف آنتی‌اکسیدان در روغن‌های زیتون و سویا استفاده گردید. این ثابت از روی شیب خط نمودار وابستگی غلظتی سرعت متوسط مصرف آنتی‌اکسیدان در روغن‌های زیتون و سویا محاسبه شد (جدول ۴).  $K_{eff}$  ثابت سرعت مصرف آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های جانبی مرحله آغازین بوده و به شدت تابع اشباعیت

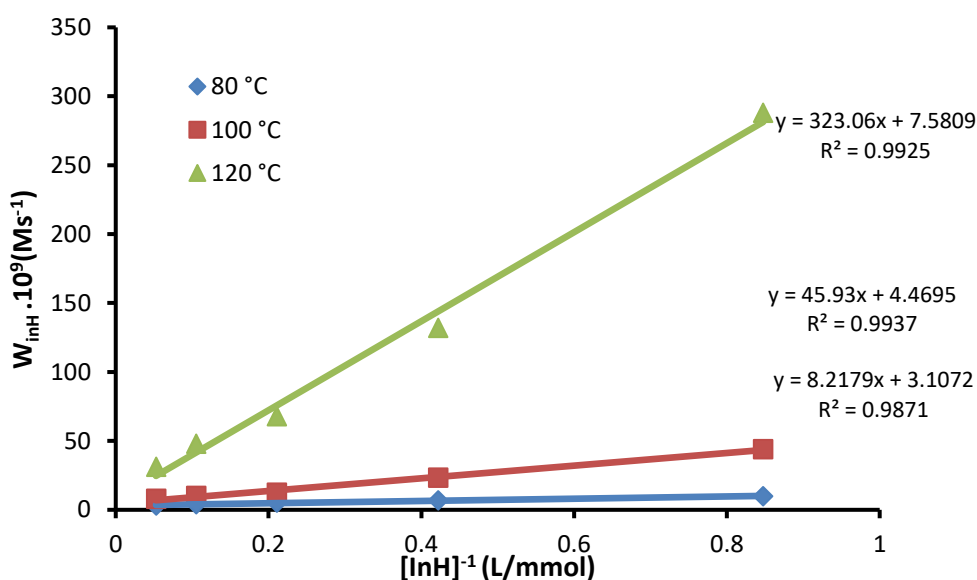
جدول ۴- پارامترهای سینتیکی اکسایش (ثابت سرعت مصرف آنتی‌اکسیدان در واکنش‌های جانبی مرحله آغازین اکسایش ( $K_{eff}$ ) و سرعت متوسط مرحله آغازین ( $W_i/f$ )) در روغن‌های سویا و زیتون در حضور اسید جنتیسیک در دماهای ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Table 4- Kinetic parameters characterizing the rate constant of antioxidant consumption in side reaction(s) of chain initiation,  $K_{eff}$ , and the mean rate of initiation ( $W_i/f$ ) during the oil samples oxidation at 80–100 °C

| oil     | $K_{eff}$<br>( $\times 10^7 S^{-1}$ ) |        |        | $W_i/f$<br>( $\times 10^{10} M/S$ ) |         |         |
|---------|---------------------------------------|--------|--------|-------------------------------------|---------|---------|
|         | 80 °C                                 | 100 °C | 120 °C | 80 °C                               | 100 °C  | 120 °C  |
| Soybean | 6.97                                  | 55.84  | 506.81 | 286.81                              | 1253.80 | 4298.80 |
| Olive   | 4.67                                  | 10.25  | 24.01  | 7.83                                | 43.04   | 220.93  |

غلظت و عکس رادیکال غلظت رسم (شکل ۶) و بررسی گردید. رابطه خطی بین تغییر سرعت اکسایش با معکوس غلظت آنتی‌اکسیدان بیان کننده عدم شرکت رادیکال اسید جنتیسیک در واکنش‌های جانبی (۷-۱۰ و ۱۴) در روغن زیتون بود.

علاوه بر مولکول اسید جنتیسیک، رادیکال این آنتی‌اکسیدان نیز ممکن است فعال بوده باشد و به جای اتصال با رادیکال دیگر آنتی‌اکسیدان و خنثی شدن، در واکنش جانبی تسریع کننده واکنش اکسایش (واکنش ۱۴ و ۱۰ و ۷-) شرکت کند. برای بررسی این مهم در روغن زیتون، روند تغییر سرعت متوسط اکسایش با عکس

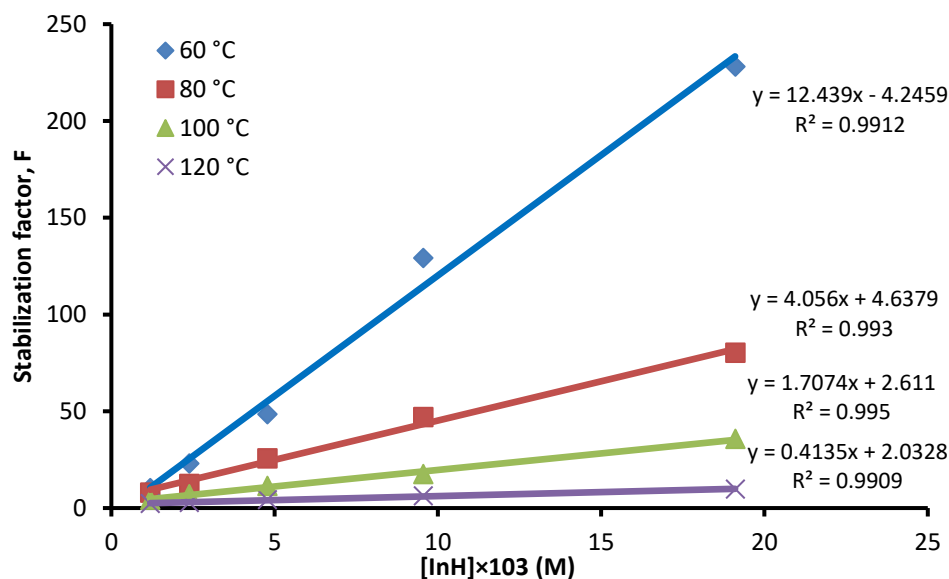


شکل ۶- رابطه سرعت اکسایش ( $W_{inh}$ ) با عکس غلظت اسید جنتیسیک در روغن زیتون در دماهای ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Figure 6- Dependence of the rate of inhibited oxidation ( $W_{inh}$ ) on the concentration of Gentisic acid,  $[InH]^{-1}$ , during oxidation of Olive oil at various temperatures (80, 100, 120 °C)

سویا به صورت خطی است. افزایش خطی فاکتور حمایتی با غلظت بدین معنی است که اسید جنتیسیک در فرایند اکسایش روغن سویا فقط در واکنش‌های پایانی ۷ و ۸ شرکت کرده و در واکنش‌های جانبی ۱۱ و ۱۲ شرکت نکرده است.

به منظور بررسی مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسید جنتیسیک در روغن سویا نیز ابتدا وابستگی غلظتی فاکتور حمایتی آنتی‌اکسیدان در روغن سویا در دماهای ۶۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد رسم گردید (شکل ۷). همان گونه که در شکل ۷ مشخص است. وابستگی پارامتر F به غلظت اسید جنتیسیک در جلوگیری از اکسایش روغن

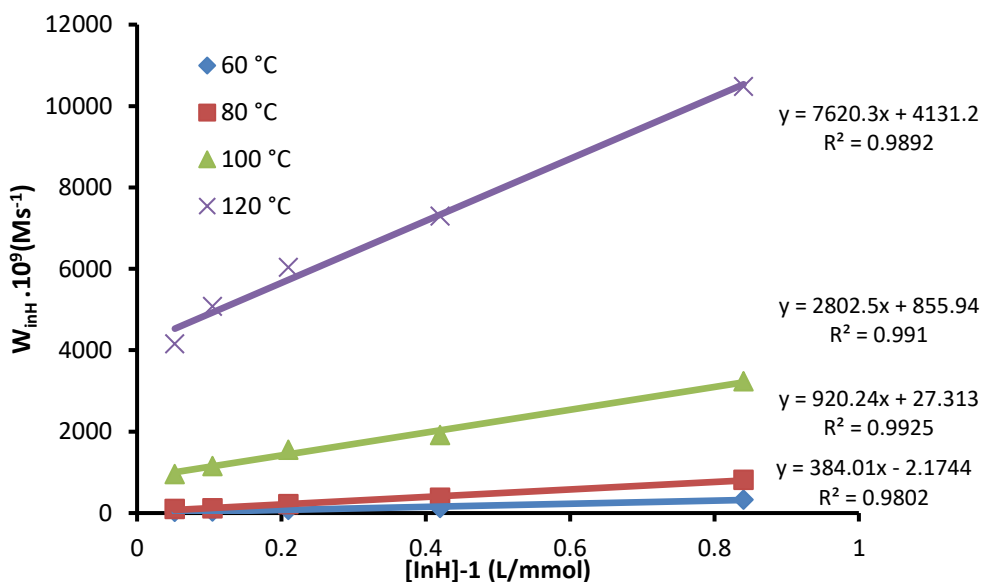


شکل ۷- وابستگی غلظتی پایداری اسید جنتیسیک در روغن سویا در دماهای ۶۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Figure 7- Concentration dependence of the stabilization factor, parameter  $F$ , of Gentisic acid during oxidation of soybean oil at various temperatures (60, 80, 100, 120 °C)

مشخص است رابطه سرعت متوسط اکسایش با معکوس غلظت اسید جنتیسیک خطی برآورد گردید که دلالت بر عدم شرکت رادیکال اسید جنتیسیک در واکنش‌های جانبی ۷- و ۱۰ و ۱۴ می‌باشد.

به منظور بررسی شرکت رادیکال حاصل از اسید جنتیسیک در واکنش‌های جانبی نیز، رابطه سرعت متوسط اکسایش روغن سویا با معکوس غلظت اسید جنتیسیک بررسی شد. همان گونه که در شکل ۸



شکل ۸- وابستگی غلظتی سرعت متوسط اکسایش (W<sub>inh</sub>) اسید جنتیسیک در روغن سویا در دماهایی ۶۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد

Figure 8- Concentration dependence of the oxidation rate ( $W_{inh}$ ) of Gentisic acid during oxidation of soybean oil, at various temperatures (60, 80, 100, 120 °C)

**نتیجه گیری کلی**

اسید جنتیسیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان فنلی توانایی کاهش سرعت فرایند اکسایش در روغن‌های گیاهی، بدون تولید رادیکال آزاد فعال و مضر را دارا بود. این فعالیت در روغن زیتون بالاتر از روغن سویا مشاهده گردید.

برای روغن سویا که حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباعی نظیر اسید لینولئیک و اسید لینولنیک است، به سبب سرعت مصرف بیشتر آنتی‌اکسیدان، غلظتهای بالاتر اسید جنتیسیک موجب افزایش فعالیت

آنتی‌اکسیدانی این ترکیب، بدون شرکت در واکنش‌های جانبی مراحل آغازین اکسایش گردید. در حالی که در مورد روغن زیتون به سبب بالاتر بودن مقادیر اسید چرب تک غیراشباع مانند اسید اولئیک پایداری اکسایشی بالاتری نسبت به روغن سویا داشت. به این ترتیب غلظت پایین اسید جنتیسیک نیز کارایی لازم برای پایداری روغن زیتون را داشت ولی افزایش غلظت، حالت پرواکسیدانی و شرکت این آنتی‌اکسیدان در واکنش جانبی شماره ۱۱ را به دنبال داشت.

**منابع مورد استفاده**

- Ashidate K, Kawamura M, Mimura D, Tohda H, Miyazaki S, Teramoto T, Yamamoto Y and Hirata Y, 2005. Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *European Journal of Pharmacology* 513: 173–179.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gomez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A and Lercker G, 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade *Molecules* 12: 1679–1719.
- Billaud C, Lecornu D and Nicolas J, 1996. Substrates and carboxylic acid inhibitors of a partially purified polyphenol oxidase from gum arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1668–1675.
- Denisov E, Khudyakov I, 1987. Mechanism of action and reactivities of the free radicals of inhibitors. *Jornal of Chemical Reviews* 87:1313–1357.
- Farhoosh R and Hoseini-Yazdi SZ, 2014. Evolution of Oxidative Values during Kinetic Studies on Olive Oil Oxidation in the Rancimat Test. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91: 293–281.
- Farhoosh R, Johnny S, Asnaashari M, Molaahmadibahraseman N and Sharif A, 2016. Structure-antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chemistry* 194: 128–134.
- Griffiths LA, 1959. On the distribution of gentisic acid in green plants. *Journal of Experimental Botany* 10: 437–442.
- Herrmann K, 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28: 347–315.
- Marinova EM and Yanishlieva NV, 2003. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry* 81: 189–197.
- Middleton EJr, Kandaswami C and Theoharides TC, 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673–751.
- Pokorný J, 1991. Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology* 2: 223–227.
- Réblová Z, 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Sciences* 30: 171–177.
- Sakas MB, Pericin DM, Mandic AI and Kormanjos SM, 2004. Antioxidant properties of ethanolic extract of sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica* 35: 255–264.
- Shahidi F, 2003. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. New York: CRC Press.
- Shantha NC and Decker EA, 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International* 77: 421–424.

- Sultana N, Akhter M and Khatoon Z, 2010. Nematicidal natural products from the aerial parts of *Rubus niveus*. *Natural Product Research* 24: 407–415.
- Verpoorte R, Contin A and Memelink J, 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1:13-25.
- Yanishlieva NV and Marinova EM, 1992. Inhibited oxidation of lipids I. Complex estimation and comparison of the antioxidative properties of some natural and synthetic antioxidants. *Fat Science Technology* 94:374–379.
- Yanishlieva N and Marinova EM, 1995. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry* 54: 377–382.
- Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH and Raneva VG, 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64: 59–66.

*Journal of Food Researches/vol.30 No.1/ 2020/pp 151-166*  
<https://foodresearch.tabrizu.ac.ir>

## Mechanism of antioxidant activity of gentisic acid in olive and soybean oils

A Mardanighahfarokhi<sup>1</sup>, R Farhoosh<sup>2\*</sup> and A Sharif<sup>2</sup>

Received: February 12, 2019

Accepted: April 20, 2019

<sup>1</sup>PhD Student, Department of food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>2</sup>Professor and Assistant Professor, respectively, Department of food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

\*Corresponding author: rfarhoosh@um.ac.ir

**Introduction:** Lipid oxidation is the oxidative deterioration of unsaturated fatty acids via an autocatalytic radical chain process that leads to the deterioration both the sensory and nutritional quality of lipids. Lipid oxidation has adversely consequences for the quality of lipid and human health by producing a wide range of harmful reactive radicals. Using antioxidants is the most important defense means to delay or slow rate of lipids oxidation by scavenge chain-propagating peroxy radicals. Recently, the interest in natural antioxidants has been increased due to the reported toxicologically negative effects of the synthetic antioxidants.

The most powerful types of natural antioxidants are the phenolic acids, which are widely found as secondary metabolites in plant kingdom acids. A relationship between the antioxidant activities and the structures of the phenolic acids were the object of a number of investigations. The number of hydroxyl groups and the position of these groups in the phenolic ring have a significant influence in antioxidant activity of phenolic acids. The activity increases in the following order: monohydroxy < dihydroxy < trihydroxy. Gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid) is one of the interesting subset of dihydroxybenzoic acids, present in many natural sources such as citrus fruits, grapes, olive, peanuts and herbs. The antioxidant activity of the Gentisic acid was the object of lot investigations. Gentisic acid has been reported to has anxiolytic, antirheumatic, anticarcinogenic, anti-inflammatory and antimutagenic properties. The capacity of Gentisic acid to prevent lipid oxidation is related to its mechanism of antioxidant activity. The relative positions of the two hydroxyl groups in Gentisic acid phenolic ring have significantly influence in antioxidant property.

**Material and methods:** Purified triacylglycerols of sunflower and olive oils were obtained by removing all pro- and anti- oxidants by adsorption chromatography: 130 g of oils were purified twice by passing in a glass column (25 × 2.5 cm i.d), packed with 70 g of aluminum oxide 60 activated at 200 °C for 3 h in bottom and, 15 g of silica gel activated at 160 C for 3 h in upper layer. Triacylglycerols were drawn in dark through the column by suction without solvent. Then soybean and olive oil samples, containing different concentrations of the Gentisic acid (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 and 0.32 wt. %) were prepared by adding aliquots of its solutions in purified acetone. The solvent was removed under nitrogen. 1-mm layer of the prepared oils samples (4 g) were oxidized in a Petri dish having a diameter of 9 cm Under these conditions, the process took place in a kinetic regime, i.e., at a sufficiently high oxygen concentration which the diffusion rate does not influence the oxidation rate. Oxidation was performed in dark at 60, 80, 100 and 120 °C.

The oxidation process was followed by withdrawing samples at certain time intervals and subjecting them to spectrophotometric determination of the peroxide value (PV) as primary oxidation products and different kinetic parameters i.e. stabilizing factor (*F*), oxidation rate ratio (ORR), and antioxidant activity (*A*). In order to PV measurement, the vegetable oil samples (≤0.01–0.30 g) were added to a glass tube containing 9.8mL chloroform–methanol (7:3 v/v) and were

vortexed for 2–4 s. 50mL of ammonium thiocyanate solution (30 % w/v) was added the sample was mixed on a vortex mixer for 2–4s. Then iron (II) chloride solution [50mL, (0.4g barium chloride dehydrate dissolved in 50mL H<sub>2</sub>O) + (0.5 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O dissolved in 50mL H<sub>2</sub>O) + 2mL 10 M HCl], with the precipitate, barium sulfate, filtered off to produce a clear solution]) were added, and the sample was vortexed for 2-4 s. After 5min incubation at room temperature, the absorbance of the sample was read against a blank sample (containing all the reagents except the sample) at 500nm (UV-VIS spectrophotometer, Model 160A Shimadzu, Kyoto, Japan). Results were reported as milliequivalents of oxygen per kilogram of oil. Kinetic curves of peroxide accumulation were plotted. The x-coordinate of intersection point of two straight lines fitted on the initiation and propagation stages of the oil oxidation was calculated as induction period (IP). Mechanism of antioxidative action was determined according to kinetic parameters and the based on the participation of Gentisic acid molecules and radicals in a series of reactions).

**Results and discussion:** Gentisic acid as a phenolic antioxidant was effectiveness during autoxidation in both lipid systems (i.e. olive and soybean oil) without reactive free radicals production. The dependence of the parameter F on antioxidant concentration is linear only in the case of Gentisic acid-inhibited sunflower oil oxidation that showed the participation of antioxidant molecules mainly in reaction 7. The absence of F linearity in other treatments ( $\alpha$ -Resorcylic acid in both olive and sunflower oils oxidation and Gentisic acid in olive oil oxidation) is due to the participation of the inhibitors molecules in the side reactions other than the main reaction of chain termination 7, namely reaction 11 or/and 12. The mean rate of antioxidant consumption increased as the unsaturation degree of the soybean oil increased. Despite having the more appropriate performance in the olive oil sample, which normally contains higher amounts of oleic acid. The overall performance of Gentisic acid was attributed to the main reaction of chain termination ( $\text{ROO}\cdot + \text{InH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{In}\cdot$ ) as competed with the main oxidation reaction of chain propagation ( $\text{ROO}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}\cdot$ ). Due to the higher percentage of non-saturated fatty acids in soybean oil, antioxidant activity of gentisic acid promoted with increased concentrations, while in olive oil because higher content of monosaturated fatty acid (e.g. oleic acid), Gentisic acid participate in side oxidation reactions ( $\text{InH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{In}\cdot + \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ ) as prooxidant in high concentration.

**Conclusion:** The present study was performed to elucidate the mechanism of antioxidative action of Gentisic acid. It was concluded that Gentisic acid as a phenolic antioxidant was effectiveness during autoxidation in both lipid systems (i.e. olive and soybean oil) without reactive free radicals production. The mean rate of antioxidant consumption increased as the unsaturation degree of the oil system increased. Despite having the more appropriate performance in the olive oil sample, which normally contains higher amounts of oleic acid.

**Keywords:** Gentisic acid, Vegetable oils, Mechanism of antioxidant activity