

بررسی اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها بر اسید گالیک در محیط تالو اولئین

دکتر امیرحسین الهامی راد^{۱*}، دکتر مهرداد قوامی^۲

^۱ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
^۲ دانشیار دانشکده‌ی علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۲۰

چکیده

جهت بررسی اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها، سه فسفولیپید مورد آزمایش شامل فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین و اسید فسفاتیدیک در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد (وزنی - حجمی) همراه با اسیدگالیک در غلظت ۰/۰۲ درصد در محیط تالو اولئین مورد استفاده قرار گرفتند و طول دوره‌ی القاء به روش رنسیمت در دمای $150^{\circ}C$ اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده، نشان داد در میان سه فسفولیپید مورد آزمایش، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل کولین، دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ضعیفی هستند اما اسید فسفاتیدیک فاقد خصوصیات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. فسفاتیدیل کولین و اسید فسفاتیدیک، فاقد اثرات سینرژیستی بوده و حتی به عنوان پروکسیدان یا آنتاگونیست عمل کرده، موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدگالیک می‌شوند اما فسفاتیدیل اتانول آمین دارای اثرات سینرژیستی مناسبی به خصوص در غلظت‌های بیش از ۰/۰۸ درصد در محیط تالو اولئین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تالو اولئین، سینرژیسیم، اسید گالیک، فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین، اسید فسفاتیدیک.

۱- مقدمه

نظیر فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل سرین از این طریق عمل می کنند. فسفولیپیدهای حاوی ازت، در مقایسه با سایرین، فعال تر می باشند. فسفاتیدیل کولین با هیدروپراکسیدها واکنش داده و از طریق یک مکانیسم برشی تولید یکی از مشتقات نیتروکسیل^۲ بنام تری متیل آمین اکسید^۳ می نماید. فرآورده های ناشی از واکنش غیررادی کالی فسفاتیدیل اتانول آمین با هیدروپراکسیدها، ایمین^۴ نامیده می شوند. حتی فرآورده های اکسیداسیون فسفولیپیدها، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند. به عنوان مثال تری متیل آمین اکسید که از شکستن فسفاتیدیل کولین در اثر حمله ی اکسیداتیو پراکسیدها حاصل می شود، اثر سینرژیستی بسیار زیادی در رابطه با توکوفرول ها دارد. گاهی اوقات تحت تأثیر آنزیم های فسفولیپاز، فسفولیپیدها هیدرولیز می شوند. جدا شدن اسیدهای چرب در طی هیدرولیز، منجر به تولید ترکیباتی موسوم به لیزوفسفولیپید می شود. فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات، مشابه فسفولیپیدهای اولیه است اما فعالیت سطحی بالاتری دارند (۱۱).

یک مکانیسم دیگر در رابطه با اثر سینرژیستی فسفولیپیدها، به ویژه فسفولیپیدهای اسیدی، چلات کردن یون های فلزی می باشد. فسفاتیدیک اسیدها از این طریق با یون های فلزی ایجاد کمپلکس کرده، تولید نمک های غیردیسیوسی می نمایند (۶ و ۱۱).

مکانیسم اثر سینرژیستی میان ویتامین E و فسفولیپیدها هنوز مورد بحث است زیرا به شرایط اکسیداسیون و نوع فسفولیپید بستگی دارد. ثابت شده است که فسفاتیدیل اتانول آمین موجب احیاء α -توکوفرول کینون به α -توکوفرول می شود (۱۱) و

اثر سینرژیستی فسفولیپیدها بر فلاونوئیدها توسط Hudson and Lewis (1983) گزارش شده است. آن ها چنین نتیجه گیری کردند که فسفاتیدیل اتانول آمین مخصوصاً در غلظت های بالاتر از ۰/۱ درصد همراه با فلاونوئیدها بسیار مؤثر هستند. هم چنین سینرژیسم فلاونوئیدها با توکوفرول ها، آسکوربیل پالمیتات و اسید سیتریک نیز گزارش شده است (۹، ۱۲، ۱۰).

در این تحقیق، فعالیت آنتی اکسیدانی اسید گالیک متعلق به گروه فنلیک اسیدها همراه با اثر سینرژیستی فسفولیپیدها در

اثرات مشارکتی مهارگرها در طی اکسیداسیون که منجر به تقویت و بازتوانی آن ها می گردد، تحت عنوان سینرژیسم شناخته می شود. فسفولیپیدها، گروهی از ترکیبات سینرژیستی هستند که البته جزو آنتی اکسیدان های ممانعتی نیز طبقه بندی می شوند. ترکیبات سینرژیست به روش های متفاوتی عمل می کنند. تخریب هیدرواکسیدها، احیاء رادیکال های آنتی اکسیدان، احیاء رادیکال های ویتامین E و چلات کردن یون های فلزی از این جمله اند (۱۱).

فسفولیپیدها، فعالیت توکوفرول ها را افزایش می دهند. مکانیسم اثر سینرژیستی میان ویتامین E و فسفولیپیدها به شرایط اکسیداسیون و نوع فسفولیپید بستگی دارد. تجزیه ی هیدروپراکسیدها، احیاء مجدد رادیکال ویتامین E، یا چلات کردن پروکسیدان های فلزی، مهم ترین مکانیسم های سینرژیسم ویتامین E و فسفولیپیدها می باشند. Weng and Gordon (1993) ثابت کردند که فسفاتیدیل اتانول آمین رادیکال α -توکوفریل کینون را به α -توکوفرول احیاء می کند. فسفولیپیدها همچنین بر آنتی اکسیدان های فلاونوئیدی نیز اثر سینرژیستی دارند (۷۳ و ۸۱). Koga and Terao ویژگی های آنتی اکسیدانی یکی از مشتقات فسفاتیدیل ویتامین E را بنام PCh^۱ مورد بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند در طی اتوکسیداسیون لارد در دمای $60^{\circ}C$ ، دوره ی القاء در حضور PCh (در غلظت $0.4 \frac{\mu mol}{kg}$) نسبت به مخلوط ویتامین E و فسفاتیدیل کولین، طولانی تر است. بنابراین، ثابت شد که PCh دارای ویژگی سینرژیسم ویتامین E و فسفولیپیدها می باشد زیرا از لحاظ ساختمانی مشتقی از هر دو ترکیب محسوب می شود (۱۱).

فسفولیپیدها احتمالاً با هیدروپراکسیدهای لیپیدی واکنش داده و آن ها را از طریق مکانیسم غیر رادیکالی تخریب کرده، فعالیت آنتی اکسیدانی را در چربی افزایش می دهند. از این رو، فسفولیپیدها در به تأخیر انداختن واکنش های اتواکسیداسیون تأثیر مثبت دارند. تمامی فسفولیپیدهای حاوی یک گروه آمین

واقع گرایانه تری از فعالیت میان گونه‌های آنالوگ به دست می‌دهد. بنابراین، در صورتی که 200 mg/L اسیدگالیک با 800 mg/L فسفاتید به عنوان سینرژیست مورد استفاده قرار گیرد، نسبت مولی تقریبی ۱:۱ رعایت شده است. بر اساس این، جهت مطالعات سینرژی، اسیدگالیک با غلظت 200 mg/L و سه ترکیب فسفاتیدی در سه غلظت 100 mg/L ، 400 mg/L و 800 mg/L به فراکسیون چهارم تالو (تالو اولئین) اضافه شده و دوره‌ی القاء به روش رنسیمت در دمای 150°C تعیین گردید (۱). نهایتاً درصد سینرژیسم بر اساس روش Bishov and Henick (1972) با استفاده از فرمول زیر تعیین شد (۶ و ۱۱).

$$\% \text{Synergism} = \frac{(I_{SPA} - I_S) - (I_{SA} - I_S) - (I_{SP} - I_S)}{(I_{SPA} - I_S)} \times 100$$

I_S = زمان القاء سوپسترا (فراکسیون چهارم تالو)

I_{SA} = زمان القاء تالو اولئین پایدار شده با آنتی‌اکسیدان (اسیدگالیک)

I_{SP} = زمان القاء تالو اولئین پایدار شده با فسفاتید

I_{SPA} = زمان القاء تالو اولئین پایدار شده با اسیدگالیک و فسفاتید

تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شده، به صورت میانگین گزارش گردیدند. داده‌های به دست آمده، توسط نرم افزار آماری SAS آنالیز و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، مقایسه گردیدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی تالو اولئین

در جدول ۱ نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی فراکسیون مایع استخراج شده از چربی دنبه، ارائه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود اندیس یدی تالو اولئین $51/6$ است و در دمای 5°C کاملاً مایع می‌باشد. اندیس پراکسید و اندیس اسیدی پایین تالو اولئین نیز نشان دهنده‌ی آماده‌سازی مناسب آن طی مراحل فراکسیون‌گیری می‌باشد.

فراکسیون مایع روغن دنبه‌ی گوسفند، مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به این که چربی‌های حیوانی از لحاظ آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ضعیف هستند، استفاده از آن‌ها به عنوان یک محیط پایه، جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات سینرژیستی بسیار مناسب می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

دنبه‌ی مورد استفاده در این تحقیق مربوط به گوسفندان نژاد بلوچی می‌باشد که بیش از ۵۰ درصد جمعیت بومی ایران را تشکیل می‌دهد. جهت استخراج چربی دنبه، از روش ذوب کردن خشک، تحت شرایط خلاء با دستگاه تبخیر کننده دوار (دمای 80°C به مدت ۲ ساعت) استفاده شد. برای فراکسیون کردن تالو و جداسازی فراکسیون مایع، از روش فراکسیون‌گیری ۳ مرحله‌ای با حلال استن در دماهای 150°C ، 25 و 5 استفاده گردید (۲).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی فراکسیون چهارم تالو، شامل نقطه‌ی ذوب (AOAC, 920.157) (۴)، اندیس فرراکتومتری (AOAC, 921.08) (۴)، اندیس یدی (AOCS, Cd 1c-85) (۵)، اندیس صابونی (AOCS, Cd 3-25) (۵)، اندیس پراکسید (AOCS, Cd 8-53) (۵)، اندیس اسیدی (AOCS, Cd 3d-) (۵)، زمان مقاومت در برابر اکسیداسیون (استاندارد ملی شماره‌ی ۳۷۳۴) (۱) و ترکیب اسیدهای چرب به روش GC (AOAC, 28.060) (۴) تعیین گردید.

در این پژوهش اسید گالیک با فرمول بسته $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ و جرم مولی $170/12 \text{ g}$ ، پودر کریستالی او ۱-۲ دی‌پالمیتوئیل -sn- گلیسر-۳- فسفاتانول آمین با فرمول بسته $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{NO}_8\text{P}$ ، جرم مولی $691/96 \text{ g}$ ، پودر کریستالی او ۱-۲ دی‌پالمیتوئیل -sn- گلیسر-۳- فسفوکولین با فرمول بسته $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$ ، جرم مولی $734/04 \text{ g}$ که به روش TLC جداسازی و تخلیص شده است، پودر کریستالی او ۱-۲ دی‌پالمیتوئیل -sn- گلیسر-۳- فسفات سدیم با فرمول بسته $\text{C}_{35}\text{H}_{69}\text{O}_8\text{P Na}^+$ ، جرم مولی $648/89$ ، از محصولات شرکت Sigma تهیه گردید.

جهت بررسی سینرژیسم میان آنتی‌اکسیدان‌های فنلی و فسفولیپیدها، نسبت‌های وزنی به گونه‌ای انتخاب شدند که یک نسبت مولی تقریبی نیز میان آن‌ها برقرار باشد. استفاده از نسبت‌های مولی در مطالعات سینرژی میان دو ترکیب، مقایسه‌ی

۲-۳- ارزیابی اثر پایدارکنندگی فسفاتیدها بر تالو اولئین

در جدول ۲ اثر پایدارکنندگی سه فسفولپید مورد آزمایش در سه غلظت متفاوت نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود در غلظت ۰/۰۱ درصد (وزنی - حجمی) فسفاتیدیل کولین زمان القاء تالو اولئین مشابه نمونه‌ی شاهد است. اما با افزایش غلظت به ۰/۰۴ درصد، زمان القاء حدوداً ۲/۵ برابر افزایش یافته و به ۰/۴۶ ساعت رسیده است. این تغییر، در سطح اطمینان ۰/۰۱ درصد کاملاً معنی‌دار است. افزایش غلظت فسفاتیدیل کولین به ۰/۰۸ درصد، منجر به کاهش مجدد در طول دوره‌ی القاء شده است به طوری که زمان القاء به ۰/۳۷ کاهش یافته است.

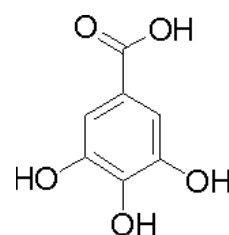
در ارتباط با فسفاتیدیل اتانول آمین نیز نتایج تقریباً مشابهی حاصل شده است. در غلظت ۰/۰۱ درصد (وزنی - حجمی) طول دوره‌ی القاء تالو اولئین تقریباً ۱/۷۷ برابر افزایش یافته و به ۰/۳۲ ساعت رسیده است. با افزایش غلظت فسفاتیدیل اتانول آمین به ۰/۰۴ درصد، طول دوره‌ی القاء به ۰/۴۲ افزایش یافته است اما در غلظت ۰/۰۸ درصد، طول دوره‌ی القاء مجدداً کاهش یافته، به ۰/۳۱ ساعت رسیده است.

در اسید فسفاتیدیک، هیچ‌گونه اثر پایدارکنندگی مشاهده نشد. به طوری که استفاده از این ترکیب در سه غلظت ۰/۰۸ و ۰/۰۴، ۰/۰۱ درصد تغییری در طول دوره القاء تالو اولئین نسبت به نمونه‌ی شاهد ایجاد نکرد. بنا براین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در میان ۳ فسفاتید مورد آزمایش، اسید فسفاتیدیک، فاقد خاصیت پایدارکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) است اما فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین اثرات آنتی‌اکسیدانی ضعیفی نشان می‌دهند به طوری که در غلظت مشابه (۰/۰۴ درصد)، طول دوره‌ی القاء در فسفاتیدیل کولین ۳/۲۸ برابر و در فسفاتیدیل اتانول آمین ۳/۵ برابر کم‌تر از استاندارد α -توکوفرول می‌باشد.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در غلظت ۰/۰۱ درصد، قدرت آنتی‌اکسیدانی فسفاتیدیل اتانول آمین کمی بیش‌تر از فسفاتیدیل کولین است اما در غلظت‌های بالاتر، فسفاتیدیل کولین اثر پایدارکنندگی بیش‌تری نشان می‌دهد ($P \leq 0.01$).

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی تالو اولئین

ویژگی	مقدار
اندیس فراکومتري (۲۵ °C)	۱/۴۵۹
نقطه‌ی ذوب (°C)	در ۵ °C مایع است
عدد پدی	۵۱/۶
اندیس اسیدی	۰/۵۶
درصد اسید چرب آزاد	۰/۲۸
عدد پراکسید (meq/1000g)	۳/۶
عدد صابونی	۱۸۷/۷۷
زمان القاء (۱۲۰ °C)	۲/۵۱



شکل ۱- ساختمان شیمیایی اسید گالیک (۱۴).

جدول ۲- ترکیب اسیده‌های چرب تالو اولئین (درصد)

Fatty acid	Content(%)
C10:0	0.31
C11:0	0.08
C12:0	0.24
C13:0	0.13
C14:0	3.75
C14:1	0.76
C15:0	1.36
C15:1	0.35
C16:0	21.32
C16:1	3.60
C17:0	2.07
C17:1	2.56
C18:0	7.53
C18:1tr	2.36
C18:1cis	46.68
C18:2tr	1.69
C18:2cis	2.87
C20:0	0.08
C18:3 alpha	0.82
C20:1	0.87
C22:0	0.05
Others	0.52

جدول ۲ - اثر غلظت بر طول دوره‌ی القا در تالو اولئین پایدار شده با انواع دی پالمیتویل فسفولیپیدها

* زمان القاء (ساعت)				دی پالمیتویل
(w/v)/۰/۰۸	(w/v)/۰/۰۴	(w/v)/۰/۰۱	(w/v)/۰/۰۰	فسفاتیدها (%)
۰/۳۷a	۰/۴۶a	۰/۱۸b	۰/۱۸a	فسفاتیدیل کولین
۰/۳۱b	۰/۴۲b	۰/۳۲a	۰/۱۸a	فسفاتیدیل اتانول آمین
۰/۱۸c	۰/۱۸c	۰/۱۸b	۰/۱۸a	اسید فسفاتیدیک

* میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند ($P < 0.01$)

گروه کربوکسیل اسیدی می‌باشد. اسید گالیک به صورت ترکیبی در ساختار کاتشین‌های چای و نیز در ساختمان گالوتانین‌ها وجود دارد. اسید گالیک در توت‌فرنگی، تمشک و زغال‌اخته یافت می‌شود (۱۱ و ۱۴). خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اسید گالیک به جزء پیروگالول نسبت داده می‌شود که دارای سه گروه هیدروکسیل فنلی است (شکل ۱).

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود طول دوره‌ی القاء تالو اولئین در حضور ۰/۰۲ درصد اسید گالیک (در دمای $150^{\circ}C$) ۴/۸۲ ساعت می‌باشد. اما در تیمارهای ترکیبی شامل اسید گالیک و فسفاتیدیل کولین، طول دوره‌ی القاء در هر سه تیمار در مقایسه با نمونه‌ی حاوی اسید گالیک به تنهایی، کاهش قابل توجهی یافته است.

نتایج، نشان می‌دهد که استفاده از فسفاتیدیل کولین همراه با اسید گالیک دارای سینرژیسم منفی یا اثرات آنتاگونیستی است که موجب کاهش کارایی آنتی‌اکسیدان می‌شود. نکته‌ی قابل توجه، آن است که با افزایش غلظت فسفاتیدیل کولین، اثرات آنتاگونیستی بیش‌تر می‌شود به طوری که در غلظت ۰/۰۱ درصد فسفاتیدیل کولین ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/3$) و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره‌ی القاء تالو اولئین ۳/۹۸ ساعت تعیین گردید. با افزایش غلظت فسفاتیدیل کولین به ۰/۰۴ درصد ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/3$) طول دوره‌ی القا حدود ۱/۴ برابر کاهش یافته، به ۲/۷۷ ساعت می‌رسد. افزایش غلظت فسفاتیدیل کولین به ۰/۰۸ درصد ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/3$) موجب می‌شود که طول دوره‌ی القا به ۱/۷۹ ساعت کاهش یابد.

با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص می‌شود که غلظت ۰/۰۴ درصد، حد بهینه‌ی استفاده از فسفاتیدها می‌باشد زیرا با افزایش غلظت آن‌ها، طول دوره‌ی القا به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P \leq 0/01$).

Hudson and Lewis در سال ۱۹۸۳ تاثیر پایداری کنندگی فسفولیپیدها را در لارد مورد بررسی قرار دادند. بنابراین گزارش، طول دوره‌ی القاء لارد در دمای $140^{\circ}C$ و در حضور ۰/۰۴ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین ۰/۱۴ ساعت، در غلظت ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین ۰/۱۷ ساعت و در غلظت ۰/۱۶ درصد ۰/۲۳ ساعت تعیین گردید. طول دوره‌ی القاء نمونه‌ی شاهد در دمای $140^{\circ}C$ ، ۰/۱۳ ساعت گزارش گردید. در شرایط مشابه، طول دوره‌ی القاء لارد در حضور ۰/۰۴ درصد فسفاتیدیل کولین، ۰/۱۶ ساعت، در غلظت ۰/۰۸ درصد ۰/۱۵ ساعت و در غلظت ۰/۱۶ درصد نیز ۰/۱۵ ساعت گزارش گردید. بر اساس تحقیقات Hudson and Lewis، اثر پایدار کنندگی فسفاتیدیل اتانول آمین در غلظت‌های بالاتر بیش از فسفاتیدیل کولین است. ضمن این که در مورد فسفاتیدیل کولین با افزایش غلظت از حد ۰/۰۴ درصد، طول دوره‌ی القا کاهش می‌یابد (۶).

۳-۳- بررسی سینرژی میان فسفولیپیدها و اسید گالیک

جهت بررسی اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها، سه فسفولیپید مورد آزمایش، شامل فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین و اسید فسفاتیدیک در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد (وزنی - حجمی) همراه با اسید گالیک در غلظت ۰/۰۲ درصد در محیط تالو اولئین مورد استفاده قرار گرفتند.

اسید گالیک، جزو فنلیک اسیدها و نوعی هیدروکسی بنزوئیک اسید است که دارای سه گروه هیدوکسیل فنلی و یک

جدول ۳- بررسی سینرژی میان اسید گالیک و فسفاتیدیل کولین در دمای ۱۵۰ °C

سینرژیسم (درصد)	زمان القاء (ساعت)*	نسبت مولی (GA/PC)	غلظت (درصد وزنی/حجمی)	
			فسفاتیدیل کولین	اسید گالیک
-	۴/۸۲a	۱:۰	-	۰/۰۲
-	۰/۱۸g	۰:۰/۲۵	۰/۰۱	-
-	۰/۴۶e	۰:۰/۵	۰/۰۴	-
-	۰/۳۷f	۰:۱	۰/۰۸	-
آنتاگونیسم	۳/۹۸b	۱:۰/۲۵	۰/۰۱	۰/۰۲
آنتاگونیسم	۲/۷۷c	۱:۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۲
آنتاگونیسم	۱/۷۹d	۱:۱	۰/۰۸	۰/۰۲
-	۰/۱۸g	-	-	-

*میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (P<0.01)

طول دوره‌ی القا به طور معنی‌داری افزایش یافته، به ۴/۹۰ رسیده است که البته میزان سینرژیسم حاصل، ناچیز و حدود ۰/۸۴ درصد تعیین گردید.

در غلظت ۰/۰۴ درصد فسفا تیدیل اتانول آمین ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/5$) و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره‌ی القاء به ۵/۶۰ افزایش یافته است که میزان سینرژیسم حاصل حدود ۱۰/۳۳ درصد محاسبه گردید.

در غلظت ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/5$) و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره‌ی القاء به ۶/۴۶ ساعت افزایش یافت که میزان سینرژیسم حاصل ۲۴/۳۶ درصد محاسبه شد. لذا مشخص می‌شود که با افزایش غلظت فسفاتیدیل اتانول آمین، اثرات سینرژیستی افزایش یافته، فعالیت آنتی اکسیدانی اسید گالیک به طور قابل توجهی بهبود می‌یابد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج Hudson and Lewis (1983) در لارد، تطابق دارد. این محققین، در بررسی اثرات سینرژیستی فسفاتیدیل اتانول آمین با انواع مختلفی از فلاونوئیدها شامل کوئرستین، فیستین، لوتولین، تاکسیفولین، فوستین، بوتین و اریودیکتبول، درصد سینرژیسم قابل توجهی را مخصوصاً در غلظت‌های ۰/۱ درصد

نتایج به دست آمده از این پژوهش با گزارش‌های Hudson and Lewis تطابق دارد. این محققین در بررسی اثرات سینرژیستی میان فسفاتیدیل کولین با ترکیبات پلی فنل نظیر کوئرستین و تاکسیفولین در لارد (دمای ۱۴۰ °C) بیان کردند که فسفاتیدیل کولین، فاقد اثرات سینرژیستی مناسب است به طوری که در ارتباط با کوئرستین سینرژیسم کمی مشاهده می‌شود اما در مورد تاکسیفولین، دارای اثرات پروکسیدانی یا آنتاگونیستی می‌باشد (۶).

همان گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود طول دوره‌ی القاء تالو اولئین در حضور ۰/۰۲ درصد اسید گالیک در دمای ۱۵۰ °C، ۴/۸۲ ساعت می‌باشد. در تیمارهای ترکیبی حاوی اسید گالیک و فسفاتیدیل اتانول آمین، طول دوره‌ی القاء در هر سه تیمار در مقایسه با نمونه‌ی حاوی اسید گالیک به تنهایی، افزایش یافته است. بررسی نتایج، نشان می‌دهد که استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین همراه با اسید گالیک دارای اثرات سینرژیستی بوده، موجب افزایش کارایی اسید گالیک و در نتیجه افزایش طول دوره‌ی القاء می‌شود. با افزایش غلظت فسفاتیدیل اتانول آمین، درصد سینرژیسم به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P \leq 0/01$). در غلظت ۰/۰۱ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین، ($10^{-3} M \times 2/3 \times 2/5$) و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک،

جدول ۴- بررسی سینرژی میان اسید گالیک و فسفاتیدیل اتانول آمین در دمای ۱۵۰ °C

سینرژیسم (درصد)	زمان القاء (ساعت)*	نسبت مولی (GA/PE)	غلظت (درصد وزنی/حجمی)	
			فسفاتیدیل اتانول آمین	اسید گالیک
-	۴/۸۲d	۱:۰	-	۰/۰۲
-	۰/۳۲f	۰:۰/۲۵	۰/۰۱	-
-	۰/۴۲e	۰:۰/۵	۰/۰۴	-
-	۰/۳۱f	۰:۱	۰/۰۸	-
۰/۸۴	۴/۹۰c	۱:۰/۲۵	۰/۰۱	۰/۰۲
۱۰/۳۳	۵/۶۰b	۱:۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۲
۲۴/۳۶	۶/۴۶a	۱:۱	۰/۰۸	۰/۰۲
-	۰/۱۸g	-	-	-

*میانگین های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (P<0.01).

سه تیمار حاوی اسید فسفاتیدیک و اسید گالیک، فقط در یک مورد اثرات سینرژیستی مشخص گردید.

در غلظت ۰/۰۱ درصد اسید فسفاتیدیک و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره ی القا به ۵/۰۲ ساعت افزایش یافت که در سطح اطمینان ۰/۰۱، معنی دار است. در این تیمار، میزان سینرژیسم اندکی در حدود ۴/۵ درصد محاسبه گردید. در سایر غلظت های ترکیبی، اثرات آنتاگونیستی مشاهده شد به طوری که در حضور ۰/۰۴ درصد اسید فسفاتیدیک و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره ی القا از ۴/۸۲ به ۴/۱۴ ساعت کاهش یافت. همچنین در غلظت ۰/۰۸ درصد اسید فسفاتیدیک و ۰/۰۲ درصد اسید گالیک، طول دوره ی القا و از ۴/۸۲ به ۴ ساعت کاهش یافت.

بنابراین، مشخص می شود که اسید فسفاتیدیک در غلظت های بسیار کم حدود ۰/۰۱ درصد دارای اثرات سینرژیستی ضعیفی با اسید گالیک می باشد اما با افزایش غلظت به عنوان پروکسیدان عمل کرده و موجب کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی اسید گالیک می گردد.

یا بیش تر گزارش کردند. آن ها، تاثیر منبع تولید فسفاتیدیل اتانول آمین و نیز ترکیب اسیدهای چرب آن را بر خصوصیات سینرژیستی مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به دست آمده، دی پالمیتوئیل فسفاتیدیل اتانول آمین سنتزی که از لحاظ ترکیب اسیدهای چرب کاملاً اشباع است در مقایسه با انواع طبیعی که از زرده ی تخم مرغ و یا سویا استخراج می شود، دارای اثرات سینرژیستی بسیار قوی تری می باشد. همچنین فسفاتیدیل اتانول آمین حاصل از تخم مرغ نسبت به سویا دارای اثرات سینرژیستی بسیار بالاتری می باشد. علت این مساله، احتمالاً آن است که فسفاتیدیل اتانول آمین تخم مرغ حاوی حدود ۵۴ درصد اسید چرب اشباع (۱۸:۰ و ۱۶:۰) و حدود ۴۶ درصد اسید چرب نااشباع (۱۸:۱، ۱۸:۲، ۱۸:۳، ۱۸:۴) می باشد. در حالی که فسفاتیدیل اتانول آمین سویا حاوی حدود ۷۰ درصد اسید چرب نااشباع و ۳۰ درصد اسید چرب اشباع است. اسیدهای چرب نااشباع به دلیل ناپایداری در برابر اکسیداسیون و یا شرکت در سایر واکنش های جانبی موجب کاهش اثرات سینرژیستی فسفولپیدها می شوند (۶).

علی رغم این که اسید فسفاتیدیک به تنهایی فاقد خصوصیات آنتی اکسیدانی بود اما با توجه به ویژگی های چلات کنندگی یون های فلزی، از لحاظ خصوصیات سینرژیستی مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در جدول ۵ مشاهده می شود در میان

جدول ۵- بررسی سینرژی میان اسید گالیک و اسید فسفاتیدیک در دمای ۱۵۰ °C

سینرژیسیم (درصد)	زمان القاء (ساعت)*	نسبت مولی (GA/PA)	غلظت (درصد وزنی/حجمی)	
			اسید فسفاتیدیک	اسید گالیک
-	۴/۸۲b	۱:۰	-	۰/۰۲
-	۰/۱۸e	۰:۰/۲۵	۰/۰۱	-
-	۰/۱۸e	۰:۰/۵	۰/۰۴	-
-	۰/۱۸e	۰:۱	۰/۰۸	-
۴/۵	۵/۰۲a	۱:۰/۲۵	۰/۰۱	۰/۰۲
آنتاگونیسیم	۴/۱۴c	۱:۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۲
آنتاگونیسیم	۳/۷۰d	۱:۱	۰/۰۸	۰/۰۲
-	۰/۱۸e	-	-	-

*میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (P<0.01)

با توجه به مطالب فوق، مشخص می‌شود که تولید پروتون یک عامل کلیدی و مهم در سینرژیسیم محسوب می‌شود. از آن جا که فسفاتیدیل کولین در pH خنثی منحصراً به شکل یک یون دوقطبی^۱ می‌باشد لذا نمی‌تواند به عنوان دهنده‌ی پروتون عمل کند و به همین دلیل در مقایسه با فسفاتیدیل اتانول آمین، اثرات سینرژیستی بسیار ضعیف‌تری نشان می‌دهد (۶).

Jewell and Nawar در سال ۱۹۸۰، اکسیداسیون دی‌پالمیتوئیل فسفاتیدیل اتانول آمین را در حضور هوا در دمای ۱۵۰ °C مورد مطالعه قرار داد، گزارش کردند که عدم وجود آلدئیدها در فرآورده‌های ناشی از پیرولیز فسفاتیدها نشان‌دهنده واکنش آن‌ها با گروه آمین آزاد فسفولیپیدها است که مشابه با واکنش تراکمی میان ترکیبات کربونیل دار و ترکیبات آمین دار در طی واکنش‌های قهوه‌ای شدن میلارد می‌باشد (۷). شرایط مورد استفاده در اکسیداسیون فسفاتیدیل اتانول آمین در مطالعه‌ی مذکور، مشابه شرایط آزمون رنسیمت (دمای ۱۵۰ °C و جریان هوای $20 L/h$) می‌باشد. بدون تردید در چنین دماهایی فسفولیپیدها جدا از تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب موجود در ساختارشان، دچار تغییرات شیمیایی می‌شوند. اما ظاهراً چنین تغییراتی فعالیت سینرژیستی آن‌ها را مهار نمی‌کند (۶).

در ارتباط با مکانیسم عمل سینرژیستی فسفولیپیدها، نظریات مختلفی ارائه شده است. بنا به نظریه‌ی Lunde و همکاران (۱۹۷۶)، فسفولیپیدها از طریق چلات کردن یون‌های فلزی عمل پروکسیدانی آن‌ها را کاهش می‌دهند. این محققین، نشان دادند که یون‌های فلزی می‌توانند از یک محیط آبی به محیط غیرقطبی که حاوی فسفولیپیدهای محلول است، منتقل شوند. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری کردند که فسفولیپیدها، جاذب یون‌های فلزی هستند. بر اساس مطالعات Hudson and Lewis، غلظت فسفاتیدیل اتانول آمین لازم جهت بروز سینرژیسیم قابل توجه، بیش از مقداری است که برای واکنش با مقادیر ناچیز یون‌های فلزی موجود در چربی‌ها و روغن‌های طبیعی نیاز می‌باشد (۸ و ۶).

بر اساس نظریه‌ی Tai و همکاران (۱۹۷۴)، سینرژیست‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند از طریق آزاد کردن پروتون، موجب تخریب سریع هیدروپراکسیدها شوند بدون آن که رادیکال‌های آزاد تولید نمایند. Brandt و همکاران (۱۹۷۳)، معتقدند که سینرژیست‌ها ترکیباتی هستند که از طریق احیای مجدد آنتی‌اکسیدان‌های اولیه، موجب طولانی شدن عمر مفید آن‌ها می‌شوند (۳ و ۱۵).

۴- نتیجه گیری

به طور کلی در ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و اثرات سینرژیستی فسفولیپیدها می‌توان موارد ذیل را بیان کرد:

- در میان سه فسفولیپید مورد آزمایش، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل کولین دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ضعیفی هستند اما اسید فسفاتیدیک فاقد خصوصیات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.
- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین در غلظت‌های حدود ۰/۰۴ درصد حداکثر است و خارج از این محدوده، کاهش می‌یابد.
- فسفاتیدیل کولین و اسید فسفاتیدیک فاقد اثرات سینرژیستی بوده، بلکه به عنوان پروکسیدان یا آنتاگونیست عمل کرده و موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدگالیک می‌شوند اما فسفاتیدیل اتانول آمین دارای اثرات سینرژیستی مناسبی به خصوص در غلظت‌های بیش از ۰/۰۸ درصد در محیط تالو اولئین می‌باشد.

۵- منابع

- 1- استاندارد ملی ایران، شماره‌ی ۳۷۳۴، روش اندازه‌گیری پایداری روغن‌ها و چربی‌های خوراکی در برابر اکسید شدن، چاپ اول.
- 2- قراچورلو، م. ۱۳۸۵. ارزیابی کیفیت، فراکسیون‌گیری و بهبود خصوصیات کیفی چربی حیوانی جهت تولید روغن‌هایی با خصوصیات کاربردی مناسب در صنایع غذایی، پایان‌نامه‌ی دکترای رشته‌ی مهندسی کشاورزی علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده‌ی کشاورزی.
- 3-Brandt, P., Hollestein, E. and Franzke, C. 1973. The pro and antioxidant effects of phosphatides, A Literature Survey, *Lebensmittel Ind.*, 20(1):31-33.
- 4-Firestone, D. 1990. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC)*, 15 th edn., Arlington, USA.
- 5-Firestone, D. 1994. *Official methods and recommended practices of the American oil chemists society (AOCS)*, 4 edn., AOCS Press, Champaign, IL.
- 6-Hudson B. J. F. and Lewis, J. I. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists, *Food Chemistry*, 10(2): 111-120.
- 7-Jewell, N. E. and Nawar, W.W. 1980. Thermal oxidation of phospholipids, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 57:398-402.
- 8-Lunde, G., Landmark, L. H. and Gether, J. 1976. Sequestering and exchange of metal ions in edible oils containing phospholipids, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 53:207-210.
- 9-Nieto S., Garrido A., Sanhueza J., Loyola L. A., Morales G., Leighton F. and Valenzuela, A. 1993. Flavonoids as stabilizers in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 773-778
- 10-Pekkarinen, S. S. Heinonen, I. M. and Hopia, A. I. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate, *Journal of Science and Food Agriculture*, 79:499-506.
- 11-Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. *Antioxidants in food*, Practical Applications, CRC Press.
- 12-Rizner Hras, A., Hadolin, M., Knez, Z. and Bauman, D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71:229-233.
- 13-Segawa T., Hara S. and Totani, Y. 1994. Antioxidant behavior of phospholipids for polyunsaturated fatty acids of fish oil. II. Synergistic effect of phospholipids for tocopherol. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 43: 515-519.
- 14-Shahidi, F. and Nacz, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press.
- 15-Tai, P. T., Pokorny, J., and Janicek, G. 1974. Kinetics of the oxidative browning of phosphatidyl ethanolamine, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 156:257-262.