

مروری بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی (اساس واکنش، روش کار، نقاط قوت و ضعف)

سپیده حسینی^a، مریم قراچورلو^{b*}، بابک غیاثی طرزی^b، مهرداد قوامی^c

^a دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران
^b استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران
^c استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

مقدمه: نقش و اثرات سودمند آنتی اکسیدان‌ها در مقابل بسیاری از بیماری‌های انسانی و فساد مواد غذایی که ناشی از فساد اکسایشی می‌باشد در سال‌های اخیر توجهات زیادی را به خود جلب کرده است در این بین آنتی اکسیدان‌هایی که مهار کننده رادیکال آزاد می‌باشند نسبت به سایر آنتی اکسیدان‌ها اهمیت بیشتری داشته که بررسی ظرفیت مهارکنندگی آنها موضوع بسیاری از تحقیقات و بحث‌های علمی می‌باشد. روش‌های زیادی در شرایط متفاوت ابداع شده است که برای بررسی ظرفیت مهارکنندگی نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مقاله تعدادی از روش‌های موجود آزمایشگاهی از نقطه نظر اساس کار، روش آزمون و نقاط ضعف و قوت آن به دقت مرور خواهد شد.

مواد و روش‌ها: در این مقاله روش‌های مختلفی مانند روش‌های احیاء رادیکال آزاد (DPPH)، آنتی اکسیدان احیاکننده آهن (FRAP)، ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترلکس (TRAC)، ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (ORAC)، پارامتر مجموع به دام انداختن رادیکال آزاد توسط آنتی اکسیدان (TRAP) به منظور مقایسه ظرفیت مهار رادیکال آزاد نمونه‌ها بررسی می‌شود تا بتوان به اصول فنی و کاربرد هر یک پی برد.

یافته‌ها: روش‌های شیمیایی که در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها استفاده می‌شوند با وجود تمام معایبی که دارند می‌توانند مفید واقع شوند زیرا ساده و ارزان قیمت بوده و نتایج را به صورت ضرابی مانند ترلکس معرفی می‌کنند که امکان مقایسه نتایج را فراهم می‌نماید اما به هر حال نتایج بدست آمده از این روش‌های شیمیایی را نمی‌توان با نحوه عملکرد آنها در بدن قیاس نمود. زیرا بعضی از این روش‌ها در شرایطی غیر مشابه شرایط فیزیولوژیکی مثلا از لحاظ pH فعالیت می‌کنند. به منظور رسیدن به نتایج دقیق‌تر این روش‌ها باید با روش سلولی همراه شود که البته این دسته از مطالعات وقت‌گیر و زمان بر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در حال حاضر به رغم تنوع در روش‌های بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی، خلا بزرگی در استاندارد سازی اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی احساس می‌شود. به این ترتیب در میان محققین اجماع نظری وجود دارد که استفاده از مخلوط چند روش می‌تواند برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، انتقال اتم هیدوژن، انتقال الکترون، ظرفیت احیاکنندگی، مهار رادیکال آزاد

مقدمه

شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف، تسریع پیری و فساد مواد غذایی دخالت دارد (Halliwell & Gutteridge, 2007). به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی یکی از متداول‌ترین موضوعات مورد بررسی در سال‌های اخیر بوده است (Aldini et al., 2010). پیچیدگی آزمون‌ها و محدودیت‌های بررسی مستقیم سینتیک واکنش ممانعت‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون چربی‌ها که اغلب روش‌های دقیق‌تر و مطمئن‌تری می‌باشند موجب شد تا روش‌های ساده‌تر در ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ابداع گردد (Muller et al., 2011). بر این اساس روش‌های زیادی به شیوه‌های گوناگون در شرایط مختلف، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و موثر بودن آنها را بررسی می‌کند اما اغلب همبستگی قوی بین ظرفیت‌های اندازه‌گیری شده بر روی مواد یکسان به وسیله روش‌های مختلف و بین ظرفیت‌های اندازه‌گیری شده با یک روش در آزمایشگاه‌های مختلف وجود ندارد (Magalhaes et al., 2008; Romay et al., 1996). به دلیل تنوع مواد فعال، ساز و کار و ویژگی‌های واکنش متفاوت مانند انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها، حضور سایر مواد مداخله‌کننده در نمونه، عدم شرکت همه آنتی‌اکسیدان‌های نمونه در واکنش روش مورد استفاده و ... که در واکنش اکسایشی دخالت دارند روش ساده و جهانی برای ارزیابی‌های صحیح و تعیین مقداری آنتی‌اکسیدان‌ها تا کنون به ثبت نرسیده است (Zulueta et al., 2009). بعلاوه تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مواد غذایی با پیچیدگی‌های بیشتری همراه است مانند خصوصیات کلونیدی نمونه، شرایط و مرحله اکسیداسیون، ویژگی‌های طبیعی ماده مانند رنگ و pH و محل حضور آنتی‌اکسیدان (فاز آبی یا روغنی) (Frankel & Meyer, 2000) که این خود باعث عدم نتیجه‌گیری از یک روش می‌گردد

بنابراین اغلب به منظور اعتبار بخشی به نتایج یک مطالعه از چندین روش برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های خوراکی استفاده می‌شود. به این ترتیب بزرگ‌ترین مشکل بر سر راه تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حقیقی نمونه‌های زیستی و خوراکی فقدان یک روش معتبر می‌باشد. تا به حال مقالات مروری بسیاری در این زمینه به چاپ رسیده است ولی با این حال جمع‌بندی یکسانی بدست نیامده است (Huang et al., 2005). حقیقت این است که نمی‌توان با روش‌های یک بعدی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی و زیستی چند عاملی را بررسی نمود (Frankel & Meyer, 2000). اما با این حال به منظور اعتبار بخشی به مطالعه انجام شده می‌توان شرایط زیر را برقرار نمود (۱) استفاده از سوبسترای معرف زیستی (۲) استفاده از شرایط متفاوت اکسیداسیون (۳) اندازه‌گیری محصولات اولیه و محصولات ثانویه اکسیداسیون (۴) مقایسه چندین نوع آنتی‌اکسیدان (مانند آسکوربیک اسید، گالیک اسید و آلفا توکوفرول) در غلظت مشابه برای یک نمونه (۵) اعلام نتایج به چند روش مختلف مانند زمان مقاومت به اکسید شدن، درصد ممانعت‌کنندگی، سرعت تشکیل هیدروپراکسید و یا تجزیه آن و محاسبه IC50 (غلظتی از آنتی‌اکسیدان که باعث اثر ممانعت‌کنندگی ۵۰ درصدی می‌شود) (Frankel & Meyer, 2000). در کنار این موضوع نتیجه‌گیری‌هایی که از مقالات مروری قبلی بدست آمده است نشان می‌دهد که روش DPPH^۱ روش ساده و آسانی برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌ها و سبزیجات و یا عصاره استخراجی آنها است (Sa'nchez-Moreno, 2002). روش ORAC^۲ اکثراً برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی (Prior & Cao, 2000) و زیستی (Prior & Cao, 1999) مفید می‌باشد. روش TRAP^۳ و روش TEAC^۴ مختص نمونه خاصی نبوده و به طور وسیعی استفاده می‌شود (Re et al., 1999; Ghiselli et al., 2000). در این تحقیق مزایا و معایب روش‌های مختلف از لحاظ سادگی، تجهیزات مورد نیاز، ساز و کار، نقطه پایانی، روش اندازه‌گیری و ارتباط زیستی بررسی می‌شود. لازم به ذکر است روش‌های انجام آزمون که در این مقاله توضیح داده

^۱ DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl

^۳ TRAP: Total Radical-trapping Antioxidant Parameter

^۲ ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

^۴ TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

کاهش رادیکال آزاد که با تغییر رنگ همراه است اندازه می‌گیرد که رنگ بر اساس غلظت آنتی‌اکسیدانی موجود در محیط تغییر می‌کند. روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس ساز و کار انتقال اتم هیدروژن شامل TRAP, ORAC و CBA^۶ و بر اساس ساز و کار روش انتقال الکترون شامل FRAP^۷, TEAC و DPPH می‌باشد (Moreira et al., 2012; Wootton-Beard et al., 2011). در کنار این روش‌های تقریباً سنتی در سال‌های اخیر روش‌های دستگاهی مانند DSC^۸ نیز در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پیشرفت اکسیداسیون مطرح شده است (Suja et al., 2004; Renuka Devi et al., 2007; Reddy et al., 2012).

عبارات مختلفی توسط محققین برای توضیح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است که شامل ظرفیت^۹، کفایت^{۱۰}، قدرت^{۱۱}، پارامتر^{۱۲}، پتانسیل^{۱۳}، توان^{۱۴} و فعالیت^{۱۵} می‌باشد. فعالیت یک ماده شیمیایی بدون شرایط ویژه واکنش مثل فشار، دما، محیط واکنش و تعیین واکنشگرهای دیگر بدون معنی می‌باشد. از آنجایی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش‌های مورد بررسی فقط تحت شرایط خاص همان روش بررسی می‌شود بنابر این درست نیست که از واژه فعالیت استفاده شود و نتایج بدست آمده را به تمامی شرایط نسبت داد. سایر واژه‌های مطرح شده نیز غیر وابسته به شرایط واکنش بوده و مفهومشان از نظر شیمیایی مشابه می‌باشد. شایان ذکر است که واژه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تر و متداول‌تر بوده و پیشنهاد می‌شود در گزارشات علمی جایگزین سایر واژه‌ها گردد (Huang et al., 2010).

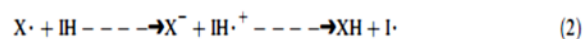
روش ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس احياء آهن یا روش FRAP

آنتی‌اکسیدان‌ها، دو نوع آنزیمی (مانند گلوکوتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ...) و غیر آنزیمی هستند. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مثل آسکوربیک اسید اهدا

شده از جمله پرتکرارترین روش‌ها در تحقیقات مربوط به مواد غذایی بوده است.

دسته‌بندی روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها

موجودات هوایی دارای یک شبکه دفاعی گسترده در مقابل اکسیداسیون هستند که آنها را قادر به مقاومت می‌کند. در این رابطه آنتی‌اکسیدان‌های متفاوتی با عملکردهای مختلف در بدن انسان فعالیت می‌کنند (Halliwell, 1997). بعضی از آنتی‌اکسیدان‌ها پروتئین و آنزیم می‌باشند در حالی که مابقی را مولکول‌های کوچک تشکیل می‌دهند. از لحاظ عملکرد می‌توان آنتی‌اکسیدان‌ها را به انواع آنتی‌اکسیدان‌های ممانعت کننده^۱، آنتی‌اکسیدان‌های مهار کننده^۲، بازسازی کننده و تعمیر کننده^۳ تقسیم بندی نمود (Niki et al., 1995). آنتی‌اکسیدان‌هایی که مهار کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند یکی از مهم‌ترین انواع آنتی‌اکسیدان هستند که بررسی ظرفیت آنها موضوع بسیاری از تحقیقات و بحث‌های علمی می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌های مهار (IH) از طریق مهار رادیکال آزاد (X^۰) قبل از حمله به مولکول‌های ضروری بدن عمل می‌نمایند به این طریق که یا اتم هیدروژن اهدا می‌کند (واکنش اول) و یا الکترون را انتقال می‌دهد (واکنش دوم). محصولات این واکنش ترکیبات پایدار و رادیکال استخراج شده از آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Niki, 2010).



روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز بر این اساس در دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند: روش انتقال اتم هیدروژن^۴ و روش انتقال الکترون^۵ (Huang et al., 2005). در روش‌های انتقال اتم هیدروژن آنتی‌اکسیدان و سوبسترا بر سر واکنش با رادیکال هیدروکسیل تولید شده از تجزیه حرارتی ترکیبات آزو با یکدیگر رقابت می‌کنند. روش‌های انتقال الکترون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در

¹ Preventing Antioxidants

² Scavenging Antioxidants

³ Repair and de novo Antioxidants

⁴ Hydrogen Atom Transfer

⁵ Electron Transfer

⁶ Crocin Bleaching Assay

⁷ Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

⁸ Differential Scanning Calorimetry

⁹ Capacity

¹⁰ Efficiency

¹¹ Power

¹² Parameter

¹³ Potential

¹⁴ Potency

¹⁵ Activity

کمپلکس احیاء شده و تشکیل کمپلکس حاوی آهن دو ظرفیتی آبی رنگ را می‌دهد که حداکثر جذب را در طول موج ۵۹۳ نانومتر دارد.

عدد FRAP نمونه‌ها بر اساس میکرومولار در هر یک گرم ماده خشک بشرح رابطه ۴ محاسبه می‌شود:

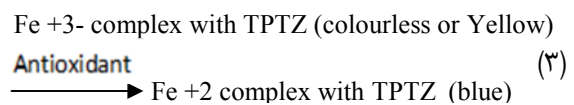
$$\text{FRAP value} = \frac{\text{The slope of the linear plot for reducing Fe}^{+3} - \text{TPTZ reagent by sample}}{\text{The slope of the linear plot for FeSO}_4 \text{ (standard)}} \quad (۴)$$

از این روش می‌توان برای مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی چند نمونه استفاده کرد و مقادیر بدست آمده نمونه‌ها را با هم مقایسه نمود که این خاصیت اصلی‌ترین کاربرد این روش می‌باشد (Griffin & Bhagooli, 2004). علاوه بر آن می‌توان با تزریق غلظت‌های مختلف استاندارد تقریب نسبی از محتوی آنتی‌اکسیدانی نمونه را بدست آورد. همچنین زمان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نیز می‌توان محاسبه نمود که این عامل بیشتر به شرایط استوکیومتری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باز می‌گردد (Wong *et al.*, 2006).

مزایا و معایب روش FRAP

این روش ساده و ارزان بوده و می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه را بدست آورد اگرچه هر ترکیبی که پتانسیل اکسیداسیون احیاء کمتر از آنچه که برای احیاء آهن سه ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی از لحاظ تئوری لازم است را داشته باشد و در عمل بتواند آهن سه ظرفیتی را به آهن دو ظرفیتی احیا کند می‌تواند در سطح آنتی‌اکسیدانی نمونه دخالت داشته باشد (Prior *et al.*, 2005). نتایج آزمون FRAP شدیداً به زمان آنالیز بستگی دارد (Roginsky & Lissi, 2005). بنابر این نظر بعضی از محققین مبنی بر این که واکنش FRAP سریعاً انجام می‌شود و حداکثر زمان ۴ تا ۶ دقیقه را می‌خواهد صحیح نمی‌باشد زیرا بعضی از پلی‌فنل‌های خوراکی با سرعت بسیار کم وارد واکنش می‌شود و مثلاً به زمان بالایی مانند ۳۰ دقیقه نیاز دارد (Alarcón & Denicola, 2013). از آنجایی که در این روش رادیکال آزادی وجود ندارد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با احیاء آهن بررسی می‌شود زمانی که در تجزیه و تحلیل مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد نتایج متفاوتی ارائه می‌کند بنابر این روش FRAP برای تحقیقات مقایسه‌ای که مثلاً اثر یک تیمار را بر روی

کننده‌های الکترون می‌باشند. در واقع در واکنش اکسیداسیون که یک عامل اکسیدشونده و یک عامل احیا کننده دارد آنتی‌اکسیدان‌ها نقش احیا کننده را بازی می‌کنند یعنی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها به توانایی احیا کنندگیشان بستگی دارد. در روش FRAP از یک واکنش اکسیداسیون احیا استفاده می‌شود که با تغییر رنگ همراه است. زمانی که احیا کننده واکنش (آنتی‌اکسیدان) الکترون خود را اهدا می‌کند ماده ای تولید می‌شود که رنگی بوده و به راحتی می‌توان شدت رنگ تولید شده که نشان دهنده پیشرفت واکنش است را اندازه گرفت (رابطه ۳) (Guo *et al.*, 2003; Martinek, 1968).

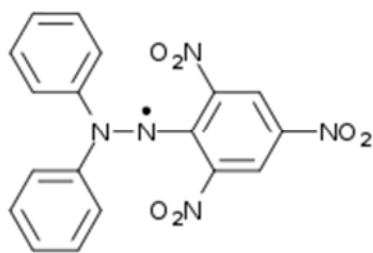


برای انجام این واکنش از یک کمپلکس آهن دار به نام Tptz با مشخصات زیر استفاده می‌شود:
2,4,6 Tripyridyl-s-triazine فرم بسته شیمیایی =
(Mp=247 - 249°C, Mw=312.33, C₁₈H₁₂N₆)

لازم به ذکر است که مقدار کمپلکس آهن سه ظرفیتی همیشه بیش از حد نیاز در محیط حضور دارد و این واکنش غیر اختصاصی بوده و هر واکنشگری که در شرایط فوق قابلیت احیا یون آهن سه ظرفیتی را داشته باشد در این واکنش شرکت می‌کند (Wootton *et al.*, 2011). زمانی که آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط حضور داشته باشند شدت رنگ آبی در محیط بیشتر می‌شود که از روی اندازه‌گیری شدت رنگ می‌توان به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پی برد (Liu *et al.*, 1982). این سیستم به غلظت آنتی‌اکسیدان غیر وابسته بوده و تفاوت‌های مشاهده شده به فاکتورهای استوکیومتری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باز می‌گردد. به این دلیل که در دز پاسخ برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف رفتار خطی دیده شده است یعنی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غیر وابسته به غلظت می‌باشد (Huang *et al.*, 2005).

برای انجام این واکنش نیاز است تا معرف FRAP تهیه گردد این معرف مخلوط کلرید آهن (FeCl₃) و TPTZ است که در یک بافر مناسب حل شده است این مخلوط بیرنگ تا زرد رنگ می‌باشد زمانی که نمونه مورد بررسی یا استاندارد به این محلول اضافه می‌شود این

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی است.



شکل ۱- رادیکال DPPH

رادیکال DPPH تشابه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی اکسیدان در دانه گندم و پوسته ترکیبات گیاهی و یا برای دانه‌های روغنی استفاده می‌شود (Chen *et al.*, 2013).

DPPH یک رادیکال پایدار است که محلول متانولی آن دارای رنگ بنفش می‌باشد که بیشترین جذب نوری را در ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر نشان می‌دهد. پایه و اساس این روش این است که رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهدا کننده مانند آنتی اکسیدان عمل می‌کند در نتیجه آن DPPH به DPPH₂ تبدیل می‌شود (رابطه ۵). در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود بنابراین شدت جذب در ۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی اکسیدانی آن پی برد.

معمولاً نتایج آزمون DPPH بر پایه IC₅₀^۱ بیان می‌شود. IC₅₀ بیان گر غلظت موثر از نمونه‌ها است که ظرفیت مهار ۵۰٪ DPPH را دارد و از طریق رگرسیون خطی منحنی درصد ممانعت کنندگی (رابطه ۶) و غلظت بدست می‌آید.

$$\text{Inhibition}\% = \frac{\text{Absorbance of Control} - \text{Absorbance of Sample}}{\text{Absorbance of Control}} \times 100$$

(۶)

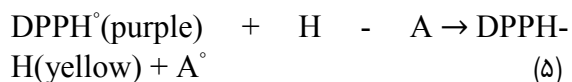
اصطلاحات دیگری که در این زمینه استفاده می‌شود EC₅₀^۲ و ARP^۳ است. EC₅₀ میزان آنتی اکسیدان که مورد نیاز است تا مقدار جذب DPPH به اندازه ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد را نشان می‌دهد و ARP ظرفیت ضد رادیکالی است که معادل عکس EC₅₀ می‌باشد (رابطه ۷).

ظرفیت آنتی اکسیدانی بررسی می‌کند مناسب خواهد بود (Gorinstein *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003; Pellegrini *et al.*, 2003; Samaniego Sanchez *et al.*, 2007). مشکل اصلی این روش زمانی نمایان می‌شود که نمونه مورد بررسی عصاره‌های گیاهی و محلول‌های زیستی باشد. TPTZ با محلول‌های پلی فنلی مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید و تانیک اسید به آهستگی و در زمان بسیار طولانی (۱۸۰ دقیقه) واکنش می‌دهد (Pulido *et al.*, 2000) و از طرف دیگر با آنتی اکسیدان‌های تیول‌دار مانند گلوکاتینون، لیپونیک اسید و کاروتنوئیدها وارد واکنش نمی‌شود (Ou *et al.*, 2001; Cao & Prior, 1998). یکی دیگر از موادی که به آرامی با FRAP وارد واکنش می‌شود بیلی روبین است علاوه بر آن بیلی روبین در طول موج ۵۹۳ نانومتر که برای تعیین شدت جذب در این روش استفاده می‌شود، دارای جذب بوده و در این روش تداخل ایجاد می‌کند.

محصول واکنش Fe⁺² می‌تواند با H₂O₂ محیط وارد واکنش شود و تولید رادیکال فعال OH[•] نماید. وجود هر نوع رادیکال اضافی در محیط باعث ایجاد خطا در نتیجه‌گیری می‌شود. واکنش FRAP به pH حساس بوده و برای بدست آوردن نتایج صحیح تر باید از pHهای اسیدی و خنثی استفاده نمود (Berker *et al.*, 2007).

روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی با رادیکال DPPH

اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH (رابطه ۵) به وسیله آنتی اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه‌گیری است (Prevec *et al.*, 2013).



DPPH (شکل ۱) یک رادیکال آزاد پایدار است که دارای یک الکترون جفت نشده بر روی یکی از اتم‌های پل نیتروژنی می‌باشد. مهار رادیکال DPPH پایه و اساس

¹ Half Maximal Inhibitory Concentration

² Half Maximal Effective Concentration

³ Anti Radical Power

- ساختار شیمیایی آنتی‌اکسیدان و قطبیت محیط که در واکنش با DPPH ایجاد تداخل می‌نماید.
- نوع محیط انجام واکنش: بر خلاف آسکوربیک اسید و PG ظرفیت مهار کنندگی BHT در محیط بافر دار متانولی نسبت به متانول تنها بالاتر می‌باشد. بنابر این ظرفیت مهار کنندگی DPPH تحت تاثیر قطبیت محیط قرار می‌گیرد.

- زمان انجام واکنش: مهار DPPH توسط آسکوربیک اسید فوری بوده اما فعالیت BHT نسبتاً آهسته‌تر بوده و جذب به طور پیوسته در طول ۹۰ دقیقه کاهش می‌یابد اما زمان انجام واکنش برای PG در حد متوسطی می‌باشد.

- نوع حلال مورد استفاده، پروتیک^۱ به معنی حلال‌هایی که آمادگی اهداء الکترون دارند (مثل استون، بوتانول و ایزو پروپانول) و اپروتیک^۲ حلال‌هایی که توانایی اهداء الکترون ندارند نیز در مقدار عددی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر دارد (Mishra et al., 2012; Chen et al., 2013; Sharma & Bhat, 2009).

- روش ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترلکس یا روش TEAC

یکی از روش‌های مشهور تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است که این روش بر اساس ربایش رادیکال نسبتاً پایدار سبز آبی ABTS^۳ می‌باشد که به یک محصول بی‌رنگ تبدیل می‌شود شدت کاهش رنگ نشان دهنده مقدار رادیکال ABTS^{۳+} است که توسط آنتی‌اکسیدان‌ها مهار شده است که میزان آن با دستگاه طیف سنج نوری اندازه گرفته می‌شود (Re et al., 1998). این روش را می‌توان برای اندازه گیری آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و چربی و یا مواد ناخالص و عصاره‌های غذایی در نظر گرفت. جواب این روش بر اساس عدد ترلکس مطرح می‌شود که بر مبنای مقایسه ظرفیت ربایش آنتی‌اکسیدانی نسبت به ترلکس است. روش TEAC به سه ترکیب شیمیایی K₂S₂O₈, ABTS, TROLOX, (Mariken et al., 2003; Gliszynska- swiglo, 2006).

$$ARP = \frac{1}{EC50} \quad (7)$$

یکی از پارامترهای واکنش استوکیومتری، مقدار واکنش‌گر (آنتی‌اکسیدان) مورد نیاز برای کاهش ۱۰۰٪ DPPH است که آن را می‌توان از حاصلضرب مقدار EC50 در ۲ بدست آورد (Mishra et al., 2012; Chen et al., 2013).

- مزایا و معایب روش DPPH

روش DPPH روش ساده ای می‌باشد اما به دلیل این که رادیکال نیتروژن پایدار است و ازدیاد سینتیک انجام واکنش آنتی‌اکسیدان با DPPH و یا حتی در مواردی عدم انجام واکنش بعضی از آنتی‌اکسیدان‌ها با رادیکال آزاد، این روش به چالش کشیده می‌شود. از آنجایی که روش‌های مختلفی برای انجام این آزمایش استفاده شده است نتایج حاصل از این روش قابل مقایسه نمی‌باشد. مثلاً معمولاً زمان انجام واکنش را ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در نظر می‌گیرند که با زمان واقعی انجام واکنش متفاوت است (Deng et al., 2011). علاوه بر این، واکنش رادیکال آزاد و DPPH برگشت پذیر بوده که این قابلیت بازگشت باعث می‌شود که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها معمولاً کمتر از حد مشخص آن خوانده شود (Abderrahim et al., 2013; Prevec et al., 2013). سایر مشکلات روش را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود:

- غلظت DPPH و حجم نمونه متفاوت که در تحقیقات مختلف استفاده می‌شود.

- شرایط محیطی مانند نور، اکسیژن و pH محیط که بر روی جذب تاثیر می‌گذارد.

- استفاده از غلظت بالای رادیکال DPPH که در محیط جذبی شدت رنگی بیش از حد توان دستگاه ایجاد می‌کند.

- وابستگی ظرفیت مهار کنندگی اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها به گروه‌های OH. به این ترتیب که پروپیلن گالات (PG) با سه گروه OH ظرفیت مهار کنندگی کمتری از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با یک گروه OH در این روش دارد.

¹ Protic

² Aprotic

³ 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)

ابتدا منحنی جذب براساس غلظت در زمان‌های ۱، ۴ و ۶ دقیقه برای استاندارد و نمونه رسم می‌شود سپس درصد ممانعت کنندگی محاسبه شده و نمودارهای بعدی بر اساس درصد ممانعت کنندگی (IP) به غلظت رسم می‌شود. از روی این نمودار است که عدد TEAC یا میلی مول غلظت ترلکس که ظرفیت آنتی اکسیدانی معال یک میلی مولار از نمونه را دارد محاسبه می‌شود. می‌توان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بر اساس مشارکت کلی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (یعنی درصد ممانعت کنندگی و غلظت روی محور عمودی نمودار) در طول زمان (محور افقی) مورد بررسی قرار داده و سطح زیر منحنی را محاسبه نمود (Mariken *et al.*, 2003; Atanassora *et al.*, 2000; Van der Berg *et al.*, 2011).

مزایا و معایب روش TEAC

این روش نسبتاً ارزان بوده و روش انجام آن نیز ساده می‌باشد. رادیکال ABTS تولید شده در این روش به pH مقاوم بوده بنابراین می‌تواند جهت بررسی اثر pH بر روی ظرفیت آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. لازم به ذکر است که واکنش بین رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان بسیار سریع بوده که باعث می‌شود در زمان بسیار کوتاه به نتایج مورد نظر دست یافت. این روش نیز مانند روش‌های ذکر شده دارای معایبی می‌باشد که استفاده از آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد از جمله این که این روش نیاز به یک مرحله اضافی جهت تولید رادیکال آزاد از نمک ABTS دارد از طرفی رادیکال آزاد تولید شده آن برای زمان طولانی مقاوم نمی‌باشد. از آنجایی که روش استاندارد سازی نشده است بنابراین مقایسه نتایج بین آزمایشگرها و کارهای تحقیقاتی بسیار دشوار خواهد بود (Frankel & Meyer, 2000; Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005; Sánchez-Moreno, 2002).

روش اندازه گیری ظرفیت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل

مولکول اکسیژن یک مولکول پایدار در زمین است که به وسیله آلوده کننده‌های محیطی، اشعه‌ها و مسیره‌های

ABTS ترکیب شیمیایی می‌باشد که برای مشاهده سینتیک یک آنزیم خاص کاربرد دارد. استفاده معمول این ماده در روش ^۱ELISA است که برای تشخیص تبدیل مولکول‌ها به یکدیگر به کار می‌رود. این ماده معمولاً به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز و اکسیدازهای چند مولکول مس دار^۲ می‌باشد. در واقع یک روش غیر مستقیم برای بررسی سینتیک واکنش هر آنزیم تولید کننده پراکسید هیدروژن و یا اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن تولید شده در هر نمونه است (Arts, 2007; Zulueta *et al.*, 2009).

روش TEAC بر این اساس است که زمانی که مولکول ABTS با یک ماده اکسید کننده مانند (K₂S₂O₈, metmyoglobin و H₂O₂) گرم‌خانه گذاری می‌شود مولکول نسبتاً پایدار سبز - آبی (ABTS⁺) تولید می‌شود (رابطه ۸) رنگ ایجاد شده دارای حداکثر جذب در طول موج ۶۰۰-۷۰۰ نانومتر می‌باشد. آنتی اکسیدان‌های موجود در محیط مایع با رادیکال‌های رنگی محیط واکنش داده و محصول بی‌رنگ را ایجاد می‌کند (Mariken *et al.*, 2003). برای بیان نتایج ابتدا باید منحنی کالیبراسیون استاندارد را رسم کرده و از روی میزان جذب نمونه مقدار غلظت معادل ترلکس را محاسبه نمود.



عدد TEAC میلی مول غلظت ترلکس است که ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل یک میلی مولار از محلول ماده مورد بررسی را دارد (رابطه ۹).

$$TEAC \text{ Value} = \frac{\text{The slope of the curve for } ABTS^{\circ} \text{ scavenging by sample}}{\text{The slope of the curve for } ABTS^{\circ} \text{ scavenging by trolox}} \quad (9)$$

$$\text{Induction Period} \% = \frac{\text{Abs blank} - \text{Abs sample}}{\text{Abs Blank}} \times 100 \quad (10)$$

IC50 غلظت مورد نیاز آنتی اکسیدان برای مهار ۵۰٪ رادیکال ABTS است که با رگرسیون خطی بدست می‌آید.

¹ Enzyme-linked Immunosorbent Assay

² Multi copper oxidase

مروری بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

در این روش بنزوئیک اسید یا محلول ۲- داکسی-۲- ریبوز^۱ به عنوان منبع تولید کننده فلوروسنس استفاده می‌شود. رادیکال آزاد تولیدی با مواد تولید کننده فلوروسنس وارد واکنش شده و شدت تابش آن را کاهش می‌دهد. چنانچه در محیط آنتی‌اکسیدان وجود داشته باشد این تغییرات را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از این خاصیت جهت تعیین ظرفیت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود (Nishikimi *et al.*, 1972; Mandel *et al.*, 2009).

ظرفیت مهار کنندگی رایکال هیدروکسیل بر اساس رابطه ۱۵ محاسبه می‌شود (Banerjee *et al.*, 2005):

$$\% \text{ Inhabitation} = [1 - (FI_S - FI_0) / (FI_C - FI_0)] \times 100 \quad (15)$$

در این رابطه FI_0 شدت فلوروسنس در $Em=470nm$, $Ex=350nm$ بدون هیچ تیمار، FI_C شدت فلوروسنسی در $Em=470nm$, $Ex=350nm$ کنترل، و FI_S شدت فلوروسنس $Em=470nm$, $Ex=350nm$ در نمونه است.

- مزایا و معایب

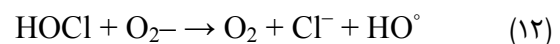
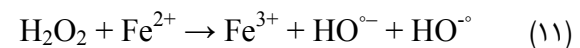
این روش بسیار ساده بوده و با مواد شیمیایی بسیار معمول و در دسترس صورت می‌گیرد اما مشکل اصلی آن دستگاه اندازه‌گیری شدت فلوروسنسی می‌باشد که بر خلاف دستگاه طیف‌سنجی چندان در دسترس نیست.

- روش ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن یا روش ORAC

ORAC روش اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های زیستی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. انواع مختلف ماده غذایی با این روش آزمایش شده و این روش به عنوان مبنای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در وب سایت وزارت کشاورزی آمریکا (USDA) استفاده شده است، اما در سال ۲۰۱۲ این روش از لحاظ زیستی نا معتبر شناخته شد که دلیل آن یافتن مدارکی است که نشان می‌دهد یک ترکیب زیست فعال خاص که ارزش آنتی‌اکسیدانی نشان داده است تاثیری بر روی سلامتی

اکسیداسیون احیا به آب، O_2 ، H_2O_2 و OH° تبدیل می‌شود. در میان رادیکال‌های اکسیژن OH° فعالیت بالایی داشته و باعث آسیب به مولکولهای زیستی می‌شود. رادیکال هیدروکسیل از طریق واکنش Fenton از مولکول O_2 و H_2O_2 نیز تولید می‌شود. اگر چه کاملاً آشکار نشده است که آیا واکنش Fenton مسئول تولید رادیکال هیدروکسیل در بافت‌های زنده تحت شرایط بیماری است یا واکنش‌های دیگر این رادیکال را ایجاد می‌کنند. در هر صورت مهم این است که ظرفیت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل توسط مواد غذایی و دارویی اندازه گرفته شود زیرا این رادیکال مسئول بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد (Chung *et al.*, 1997).

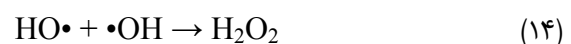
واکنش Fenton در رابطه ۱۱ و ۱۲ نشان داده شده است در این واکنش Fe^{2+} متصل شده به EDTA با پراکسید هیدروژن وارد واکنش می‌شود یا مولکول اکسیژن با اسید هیپوکلرور واکنش داده و در نهایت رادیکال هیدروکسیل تولید می‌شود.



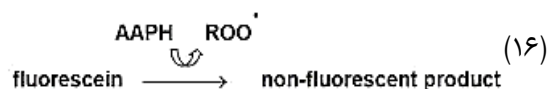
سرعت واکنش دوم از واکنش اول بالاتر می‌باشد. البته تجزیه HONOO نیز تولید رادیکال هیدروکسیل می‌نماید (رابطه ۱۳).



رادیکال‌های هیدروکسیل تولیدی شدیداً واکنش پذیر بوده و با سرعت بالا ($k \sim 10^9 - 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$) با تمامی مولکول‌های اطراف مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها، نوکلئیک اسید و قندها وارد واکنش می‌شوند. از آنجایی که سرعت ترکیب مجدد رادیکال‌های هیدروکسیل نیز شدیداً بالاست ($k = 5 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$) در نتیجه غلظت حالت پایدار آن عملاً صفر است (رابطه ۱۴) (Tirzitis & Bartosz, 2010).

¹ Deoxy- 2- Ribose² Extinction³ Emission

AAPH یا ۲۰۲- آزوبیس (۲- آمیدینو- پروپان) دی هیدروکلراید^۲ است اندازه گیری می گردد (Tijerina Saenz et al., 2009; Huang et al., 2010).



منحنی تجزیه فلوروسنس بدون حضور آنتی اکسیدان و با حضور آن نسبت به زمان رسم شده و فاصله بین این دو منحنی اندازه گرفته می شود که معمولاً جهت تعیین مقدار ماده آنتی اکسیدانی مورد نظر از ترلکس بعنوان استاندارد استفاده می شود به این ترتیب که با تهیه غلظت های مختلف از آن منحنی استاندارد بدست آمده و منحنی نمونه با آن مقایسه می شود و نتایج بصورت TE یا معادل ترلکس (Trolox Equivalents) گزارش می شود (Lee, 2000; Yilmaz & Toledo, 2006; Stockham et al., 2011).

به این ترتیب که ابتدا منحنی کالیبراسون ترلکس را محاسبه کرده و از رابطه TE ۱۷ محاسبه می شود.

$$\text{TE over considered consideration range} = \frac{\text{slop regrassion curve sample}}{\text{slop regrassion curve Trolox}} \quad (17)$$

و یا می توان از رسم نمودار مقدار فلوروسنس نسبی استاندارد در زمان های مختلف سطح زیر منحنی را برای هر یک از غلظت های استاندارد تعیین نمود (رابطه ۱۸).

$$\text{AUC} = 1 + \text{RFU1}/\text{RFU0} + \text{RFU2}/\text{RFU0} + \text{RFU3}/\text{RFU0} + \dots + \text{RFU59}/\text{RFU0} + \text{RFU60}/\text{RFU0} \quad (18)$$

مقدار فلوروسنس نسبی در زمان صفر = RFU0

مقدار فلوروسنس نسبی در زمان صفر = RFUx

می توان سطح زیر منحنی را برای هر کدام از غلظت ها تعیین نمود و با کمک آن نمودار Net AUC یا سطح زیر منحنی خالص برحسب میلی مولار غلظت ترلکس رسم نمود که با کمک نمودار بدست آمده می توان غلظت معادل ترلکس هر Net AUC نمونه را بدست آورد (از تفاضل سطح زیر منحنی هر نمونه یا استاندارد از سطح زیر منحنی شاهد Net AUC محاسبه می شود (رابطه ۱۹).

انسان نمی گذارد. تعداد زیادی ترکیبات زیست فعال وجود دارد که از لحاظ تئوری مانع از بیماری هایی مانند سرطان ها، بیماری های روده، آلزایمر و دیابت می شود اما الگوی سوخت و سازی آنها هنوز ناشناخته بوده و ساز و کار غیر آنتی اکسیدانی بازی می کند اما همچنان عدد ORAC بوسیله کارخانجات مواد غذایی و مکمل های خوراکی برای بهبود بخشیدن محصولات غذایی خود و کمک به انتخاب مردم استفاده می شود (Kevers et al., 2013; www.usda.org).

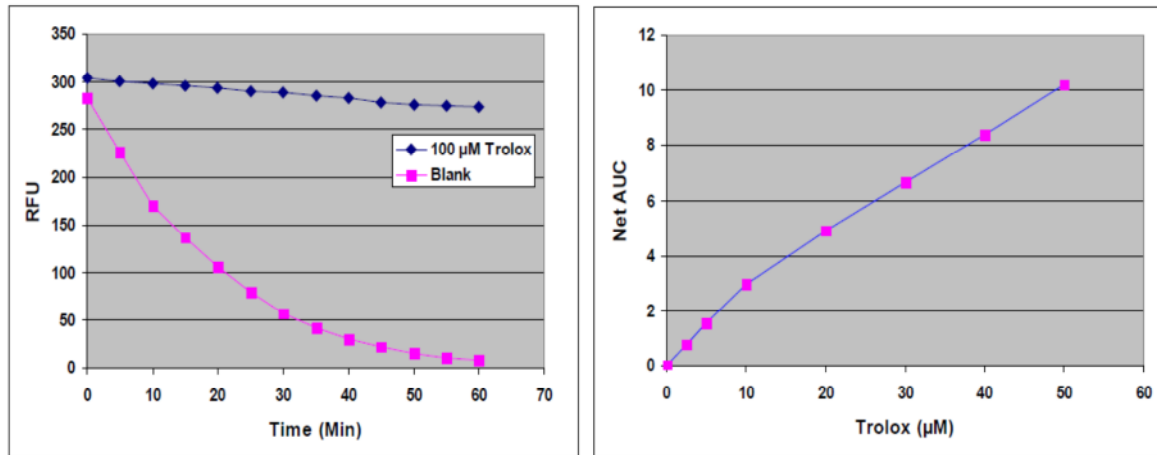
روش ORAC درجه ممانعت کنندگی از رادیکال آزاد پروکسی تولید شده بوسیله اکسیداسیون ترکیبات شیمیایی می باشد، عدد ORAC اندازه گرفته شده که معادل ترلکس می باشد هم زمان ممانعت کنندگی و وسعت ممانعت کنندگی از اکسیداسیون را نشان می دهد، در کنار ORAC روش هایی مانند FRAP و TEAC نیز می تواند مفید باشد. باتوجه به اینکه شواهد کافی وجود ندارد تا بتوان مزایای غذاهای سرشار از پلی فنل را به ظرفیت آنتی اکسیدانی آن نسبت داد پس نمی توان توانایی آنتی اکسیدانی مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی را به شرایط داخل بدن تعمیم داد.

ملکول های آنتی اکسیدان ها در مواد غذایی طیف وسیعی از عملکرد را دارند که یکی از آنها می تواند توانایشان در جذب رایکال آزاد باشد، به این ترتیب اولویت USDA استفاده از روش های FRAP و TEAC و محتوای کل ترکیبات فنلی می باشد.

اساس این روش یک ماده فلوروسنس مانند فلورسین و بتا فیکواریترین^۱ است که با مخلوط کردن ماده تولید کننده رایکال آزاد و آغازگری مثل آزو (R - N° = N - R)، ترکیبی ایجاد می شود که با حرارت دادن تولید رایکال پروکسی می نماید که به مولکول فلوروسنس آسیب می رساند و در نتیجه باعث کاهش شدت فلوروسنس می گردد (رابطه ۱۶). حضور مولکول های آنتی اکسیدان باعث حفاظت از مولکول فلوروسنس در مقابل اکسیداسیون می گردد. درجه محافظت را با دستگاه اندازه گیری شدت فلوروسنس بدست می آورند. کاهش شدت فلوروسنس ۳۵ دقیقه بعد از اضافه کردن مولکول آزو که در بیشتر مواقع

¹ Beta-phycoerythrin

² 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride



شکل ۲- منحنی استاندارد روش ORAC

ORAC برای مواد غذایی سبب شد که از سال ۲۰۱۲ این مقادیر نا معتبر اعلام گردند. لازم به ذکر است که FDA^۱ و EFSA^۲ بجز ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی مثل ویتامین آ، ویتامین سی و ویتامین ای سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را بعنوان آنتی‌اکسیدان موثر داخل بدن قبول نداشته و طبق تصمیم این سازمان‌ها سایر مواد که در مقیاس آزمایشگاهی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده اند و هیچ مدرک فیزیولوژیکی مبنی بر این ادعای آنها در بدن وجود ندارد نباید روی برچسب‌های غذایی ادعای خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها مطرح شود. مطابق با نظر EFSA، FDA و Linus Pauling Institute پلی‌فنل‌های خوراکی دارای ارزش آنتی‌اکسیدانی کم و یا بدون ارزش آنتی‌اکسیدانی مستقیم در بدن می‌باشد. افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون بعد از مصرف غذاهای حاوی پلی‌فنل‌ها با ORAC بالا مستقیماً بدلیل پلی‌فنل‌ها نبوده بلکه در نتیجه افزایش اسید اوریک حاصل از سوخت و ساز فلاونوئیدها می‌باشد. بدن فلاونوئیدها را به عنوان عامل خارجی شناخته و سعی در دفع آنها می‌نماید (Yilmaz & Toledo, 2006).

زمانی که نیاز است از اطلاعات حاصل از روش ORAC استفاده و مقایسه‌ای بین آنها انجام شود باید توجه نمود که واحدها و مواد غذایی مشابه باشد. مثلاً گروهی عدد ORAC را برای هر گرم از ماده غذایی با وزن خشک و گروهی با وزن مرطوب گزارش کرده‌اند. البته ممکن است بر اساس مقدار مصرف در هر وعده غذایی نیز عدد ORAC بیان شود، مثلاً با اینکه کشمش دارای

$$\text{Net AUC} = \text{AUC (Antioxidant)} - \text{AUC (blank)} \quad (۱۹)$$

(Winston *et al.*, 1998; Ghisell *et al.*, 1995; Prior *et al.*, 2005; Folch-Cano *et al.*, 2010)

مزایا و معایب روش ORAC

یکی از مزایای این روش آن است که توانایی آنتی‌اکسیدانی مواد با و بدون وجود فاز تاخیری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته می‌شود. مخصوصاً این خصوصیت زمانی مفید است که ارزیابی مواد غذایی و مکمل‌ها که دارای ترکیبات پیچیده با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سریع و آهسته می‌باشند را براحتی می‌توان انجام داد (Wu *et al.*, 2008; Bisby *et al.*, 2008)

مشکلات این روش بشرح زیر است:

۱- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فقط در مقابل رادیکال خاص پراکسی اندازه گرفته می‌شود.
 ۲- تشکیل رادیکال پراکسی هیچگاه تایید نشده است.
 ۳- هیچ مدرکی از شرکت رادیکال آزاد در واکنش وجود ندارد.

۴- مدرکی وجود ندارد که نشان دهد یک مکمل با عدد ORAC مشخص، همان تاثیر زیستی را در بدن بعد از مصرف بگذارد و تاکنون رابطه بین این عدد و مزایای سلامتی بخش ترکیبات ارائه نشده است.

با توجه به این مشکلات، حاصل چندین دهه تلاش محققین وزارت کشاورزی آمریکا در جمع‌آوری مقادیر

¹ Food & Drug Administration

² European Food Safety Authority

واکنش اکسیداسیون و یا مصرف اکسیژن به تاخیر می‌افتد، مدت زمان فاز تاخیری پلاسما با زمانی که مقادیر خاصی از استاندارد یا ترلکس به پلاسمای خون اضافه شده است (استاندارد داخلی) مقایسه شده و به این ترتیب مقدار ظرفیت آنتی اکسیدانی خون محاسبه می‌شود. اصلاحیه‌های بسیاری برای این روش مطرح گردید مثلاً گروهی پیشنهاد کردند لینولئیک اسید به نمونه‌های پلاسما قبل از آغاز اکسیداسیون به وسیله رادیکال پراکسید اضافه شود تا رادیکال‌های تولید شده شروع به اکسیداسیون لینولئیک اسید کرده و اکسیژن را سریعاً مصرف کنند (Prior & Cao, 1999). با این حال مشکل اصلی روش TRAP زمان پایانی برای الکترودهای اکسیژن است زیرا الکترودهای اکسیژن نمی‌توانند پایداری خود را در طول زمان مورد نیاز حفظ نمایند. در سال ۱۹۹۲ اصلاحیه‌ای بر روی روش TRAP انجام شد به این ترتیب که رادیکال‌های پراکسید تولید شده از AAPH باعث اکسید شدن لامینول^۲ (luminol) می‌شوند که در نتیجه این واکنش رادیکال‌های لامینول تولید شده که نور ساطع می‌کند، در نهایت نور ساطع شده توسط دستگاه سنجش لامینول (luminimeter)^۳ اندازه گیری می‌شود و از روی مقایسه مقدار نور ساطع شده ترلکس استاندارد ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما خون اندازه گیری می‌شود (Pryor, 2001; Wayner et al., 1985).

روش دیگری که بر پایه اصول روش TRAP ابداع شده است به این صورت عمل می‌نماید که از AAPH به منظور تولید رادیکال پراکسید و از DCFH-DA^۴ به عنوان سوبسترای قابل اکسید شدن استفاده می‌شود زمانی که DCFH-DA با رادیکال هیدروکسیل اکسید می‌شود به ماده (DCF)^۵ تبدیل شده که این ماده به شدت در

ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری از انگور نمی‌باشد اما چون بر اساس وزن خشک بیان شده است دارای عدد ORAC بالاتری است و یا گروهی از ادویه‌ها و گیاهان دارویی دارای عدد ORAC بالایی هستند ولی باید در نظر گرفت که در مقادیر کمی استفاده می‌شوند. مثال دیگر هندوانه است که عدد ORAC پائینی دارد که دلیل آن محتوای بالای آب است (Price et al., 2006; Zheng et al., 2007).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی به روش TRAP

TRAP یکی از روش‌های متداول تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسمای خون می‌باشد که اساس واکنش یکسانی با روش ORAC دارد. در این روش نیز سرعت پراکسیداسیون القا شده توسط AAPH (2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride) از طریق کاهش شدت فلوروسنس پروتئین آر فیکواریترین^۱ (R-Pe) R- phycoerythrin اندازه گرفته می‌شود. تفاوت آن با روش ORAC در این است که در روش TRAP در نهایت فاز تاخیری القایی توسط پلاسما با زمان القا شده توسط ترلکس در همان نمونه پلاسما مقایسه می‌شود (Badarinath et al., 2010).

روش TRAP به طرق متعددی انجام می‌شود روش اولیه آزمون TRAP به این ترتیب است که بعد از اضافه کردن AAPH به پلاسما مقدار اکسیداسیون مواد قابل اکسید شدن از طریق اندازه گیری مقدار اکسیژن مصرفی در طول واکنش توسط الکترودهای اکسیژن اندازه گرفته می‌شود. در حضور آنتی اکسیدان‌ها در پلاسما زمان آغاز

^۲ luminol ماده شیمیایی است که وقتی با مواد اکسید کننده مناسب در حضور کاتالیزور واکنش می‌دهد نور آبی ساطع می‌کند به این ترتیب که رادیکال آزاد الکترون را از ترازهای انرژی پایین تر luminol جدا می‌کند، اتم یونیزه شده برای پایدار شدن آرایش می‌یابد به طوری که حفره اولیه عمقی با الکترونی از تراز بالاتر با انرژی بیشتر پر می‌شود این گذار الکترون از تراز بالا به تراز پایین با گسیل فوتون همراه است که در مورد این ماده فوتون‌های تولیدی ایجاد نور آبی می‌کنند. اصطلاحاً به نور ساطع شده chemiluminescent می‌گویند.

^۴ 2',7'-dichlorflu uorescein-diacetate

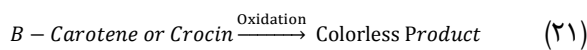
^۵ 2',7'-dichlorflu uorescein

^۱ R-PE یک پروتئین فلوروسنس قرمز است که دارای چندین زیر مجموعه است که از این طریق می‌تواند به سایر مولکول‌ها متصل شود و پروب فلوروس تولید نماید. این فلورو کروم از خانواده phycobiliprotein جدا شده از جلبک قرمز دریایی *Porphyra tenera* می‌باشد و کاربرد اصلی آن در آزمون‌های ایمنولوژیکی مانند رنگامیزی سلول‌های زنده، تکنیک‌های نشانه‌گذاری دوگانه و فرایندهای دسته بندی سلول‌ها است (Oi et al., 1982).

^۲ دستگاهی جهت اندازه‌گیری شدت نور و خصوصیات اپتیکی سطوح مختلف می‌باشد که می‌تواند chemiluminescent، فلوروسنس، بازتاب نور و پراکندگی نور را اندازه گیرد.

مروری بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

دوست و آبدوست استفاده می‌شود که می‌تواند نتایج کامل و مفیدی را در مطالعه عصاره‌های طبیعی پیچیده که دارای مواد مختلف با درجه قطبیت متفاوت هستند، بدست آورد. اساس این روش بر این است که کاروتنوئیدها و یا کروستین بر اثر اکسید شدن به وسیله نور، حرارت و یا رادیکال‌های پراکسید (تولید شده از AAPH یا لیپیدهای اکسید شده) (Kampa *et al.*, 2002; Tubaro *et al.*, 1998) بی‌رنگ می‌شود (جذب در ۴۶۰ نانومتر) حضور آنتی‌اکسیدان‌ها مانع از بی‌رنگ شدن می‌گردد یا حداقل بی‌رنگ شدن را به تاخیر می‌اندازد (رابطه ۲۱) (Prior *et al.*, 2005). به این ترتیب با استفاده از یک استاندارد مناسب می‌توان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محیط را اندازه‌گیری نمود (Laguerre *et al.*, 2007). نتایج این روش به صورت نیم عمر سوپسترا بیان می‌شود نیم عمر سوپسترا به معنی زمان مورد نیاز برای اکسید شدن ۵۰ درصدی سوپسترا یا همان کاروتن و کروستین می‌باشد که این زمان را از روی نمودار شدت جذب، جایی که جذب سوپسترا به ۵۰ درصد مقدار اولیه می‌رسد محاسبه می‌نمایند. زمانی که هر دو ماده رنگی با هم و همزمان به نمونه مورد بررسی اضافه شود (روش CCB) می‌توان ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های چربی دوست و آبدوست را با هم بررسی نمود که این امر هم از نظر هزینه و هم از نظر سرعت باعث بهبود فرایند اندازه‌گیری می‌شود مثلاً این روش را می‌توان برای بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی انواع چای (Prieto Lage *et al.*, 2013)، قهوه (Daglia *et al.*, 2012) و ... استفاده نمود.



- مزایا و معایب

این روش بسیار سریع می‌باشد اما غیر اختصاصی عمل کردن و اندازه‌گیری زمان، ممکن است نتایج را با خطای بالایی همراه کند.

- روش ارزیابی فعالیت مهار سوپر اکسید یا روش SOSA^۴

طول موج (Ex=480nm, Em=526nm) فلئوروسنس بوده و همچنین دارای جذب در طول موج 504nm است بنابراین DCF تولید شده را می‌توان با دستگاه اسپکتروفتومتر و یا دستگاه اندازه‌گیری فلوروسنس اندازه‌گیری نمود (رابطه ۲۰). در این روش تشکیل فلوروسنس یا جذب DCF شامل چهار مرحله است. ابتدا مرحله کمون، که به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان در نمونه می‌باشد بعد از مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها توسط رادیکال آزاد واکنش وارد فاز انتشار می‌گردد، بعد از آن فاز کمون دوم است که در مرحله انتشار تداخل ایجاد می‌کند این فاز کمون از اضافه کردن ترلکس (استاندارد داخلی) در طول فاز انتشار به وجود می‌آید در نهایت فاز انتشار ثانویه است که بعد از مصرف ترلکس ایجاد می‌شود. از مقایسه فاز کمون اولیه و ثانویه می‌توان به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه پی برد (Ghiselli *et al.*, 1995; Valkonen *et al.*, 1997).



- مزایا و معایب

این روش را می‌توان جهت ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و یا پلاسما (به طور کلی شرایط داخل بدن) بکار برد و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند گلوکاتینون و آسکوربیک اسید را اندازه گرفت اما از آنجایی که نقطه پایانی متفاوتی را می‌توان برای این روش در نظر گرفت بنابر این امکان مقایسه نتایج در تحقیقات مختلف وجود ندارد. این روش نسبتاً پیچیده و زمان بر بوده و علاوه بر این اجرای آن نیاز به تخصص و تجربه دارد (Badarinath *et al.*, 2010).

- روش ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس رنگبری بتا کاروتن و کروستین^۱

این روش به منظور بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی یا پراکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی کاربرد دارد. روش رنگبری بتا کاروتن (Marco, 1968) و کروستین^۲ (Bors & Saran, 1984) به ترتیب برای محیط‌های چربی

¹ β-carotene and crocin bleaching reactions

³ Carotene Combined Bleaching (CCB) assay

⁴ Super Oxide Scavenging Activity Assay

² Crocin (Crocin di-gentiobiose ester)

یکی از ترکیبات جدا شده از زعفران است که باعث ایجاد رنگ قرمز می‌شود این رنگدانه به خانواده کاروتنوئیدها تعلق دارد که محلول در آب است.

جدیدی مانند NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971) و NBD-Cl (Olojo *et al.*, 2005) است.

$$\% \text{ superoxide scavenging activity} = \frac{\text{Test absorbance} - \text{control}}{\text{Test absorbance}} \times 100 \quad (23)$$

- مزایا و معایب

این روش بدلیل استفاده از آنزیم‌ها چندان ساده نبوده و نسبت به روش‌های دیگر زمان برتر می‌باشد. روش SOSA اکثرا برای محیط‌های آبی کاربرد دارد بنابراین نمی‌تواند جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در محیط‌های چربی دوست مفید واقع شود.

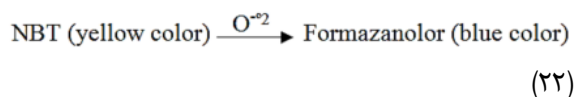
سایر روش‌ها

- روش‌های سریع اندازه‌گیری پایداری

روغن‌ها و چربی‌ها از جمله موادی است که همواره جزئی از غذای مصرفی انسان می‌باشد از آنجایی که اکسیداسیون عامل اصلی فساد آنها به حساب می‌آید محاسبه پایداری روغن‌ها اهمیت بسزایی دارد. بنابر این از دیر باز روش‌های سریعی در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد تا بتوان در زمانی کوتاه در مورد فساد محصول روغنی تصمیم‌گیری نمود. روش‌های سریع اندازه‌گیری پایداری که بسیار ساده و متداول می‌باشد گاه می‌تواند در جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات خاص نیز استفاده شود به این معنی که نمونه مورد نظر به یک محیط روغنی اضافه شده و زمان پایداری روغن اندازه گرفته می‌شود و با مقایسه آن با شاهد معیاری برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدست می‌آید (Tan & Che Man, 1999; Proestos *et al.*, 2013). در اکثر این روش‌ها، برای تشدید واکنش‌های فیزیکی و شیمیایی از نور یا دماهای بالا استفاده می‌شود و پیشرفت اکسیداسیون بر اساس مصرف اکسیژن یا تولید محصولات اکسیداسیون محاسبه می‌شود اکسیداسیون روغن در ابتدا به آرامی انجام می‌شود اما بعد از یک زمان مشخص سرعت اکسیداسیون افزایش ناگهانی دارد که این زمان به زمان پایداری روغن (Induction Period) مشهور است.

- روش اکسیژن فعال^۴

این روش به منظور اندازه‌گیری توانایی آنتی‌اکسیدان‌های آبدوست در واکنش مستقیم با رادیکال سوپر اکسید گسترش یافته است. در این روش رادیکال سوپر اکسید از طریق اضافه کردن هیدروکسید سدیم به هوای اشباع شده با دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) یا از سیستم‌های آنزیمی مانند هیپوزانتین - زانتین اکسیداز (HPX-XOD) و زانتین - زانتین اکسیداز (X-XOD) ایجاد می‌شود (Robak & gryglewski, 1988) و رادیکال‌های تولید شده در محلول پایدار می‌ماند. در محلول سوپسترای زرد رنگ NBT (نیترولو بلو تترا زول)^۱ وجود دارد که در اثر واکنش با رادیکال‌های آزاد به ماده آبی رنگ فورمازان^۲ تبدیل می‌شود که می‌توان تغییرات رنگ را در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری نمود (رابطه ۲۲). نتایج به صورت درصد مهار کنندگی رادیکال سوپراکسید به وسیله عصاره و استاندارد از طریق رابطه ۲۳ بدست می‌آید (Uddin Talukder *et al.*, 2013).



روش SOSA در بیشتر مواقع جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی استفاده می‌شود (Aruoma *et al.*, 1993; Furuno *et al.*, 2002; Taubert *et al.*, 2003).

رادیکال سوپراکسید $\text{O}^{\cdot-2}$ با انتقال یک تک الکترون از آنزیم‌های اکسیداسیون احیاء به مولکول اکسیژن ایجاد می‌شود که در سلول‌های زنده دارای عمر کوتاهی می‌باشد زیرا سریعاً به H_2O_2 و مولکول اکسیژن تبدیل می‌شود (Alscher *et al.*, 2002).

اصلاحیه‌های فراوانی برای این روش وجود دارد در روش اولیه از سیستم X-XOD برای تولید رادیکال سوپر اکسید و فریسیتوکروم^۳ به عنوان شناساگر احیا کننده استفاده می‌گردید (McCord & Fridovich, 1969). سپس تحقیقات زیادی برای بهبود این روش انجام شد که این تحقیقات بر اساس استفاده از سیستم HPX-XOD (Paya *et al.*, 1992)، پراکسیداز ترب کوهی (Pascual *et al.*, 1992)، تولید شیمیایی رادیکال پراکسید (Flohe & Otting, 1984) و شناساگرهای

^۱ Nitro Blue Tetrazolium

^۲ Formazan

^۳ Ferricytochrome

^۴ Active Oxygen Method (AOM)

اساس این روش اندازه‌گیری پراکسید تولیدی واکنش اکسیژن فعال با روغن است. روش کار به این صورت است که مقداری روغن داخل محفظه‌ای که دمای آن ۹۷ درجه سانتی‌گراد بوده و به طور پیوسته هوا در آن جریان دارد، قرار می‌گیرد سپس در زمان‌های مختلف از روغن نمونه برداری شده و عدد پراکسید آن محاسبه می‌شود. زمانی که لازم است تا نمونه روغنی به عدد پراکسید 100 mEq/kg (میلی اکی والان پراکسید در هر کیلوگرم روغن) برسد به عنوان AOM برای روغن‌ها گزارش می‌شود.

- مزایا و معایب

از آنجایی که در این روش نیاز به تیتراسیون‌های متعدد برای بدست آوردن عدد پراکسید است این روش بسیار زمانبر خواهد بود. مطابق با روش رسمی (Cd AOCs) (57-12) حداقل سه تیتراسیون برای هر نمونه مورد نیاز است. نتایج ممکن است انحراف معیاری در حدود $\pm 13/4\%$ یا حداکثر انحراف بین آزمایشگاه‌های مختلف بین ± 25 ساعت در هر ۱۰۰ ساعت نمونه داشته باشد. از آنجایی که این روش مورد تایید است اغلب جهت تعیین خصوصیات روغن‌ها استفاده می‌شود (Ranken et al., 1997).

- شاخص پایداری روغن^۱

پایداری اکسایشی روغن‌ها را می‌توان به صورت اتوماتیک با تجهیزات خاصی اندازه‌گیری نمود مانند دستگاه رنسیمت (Rancimat) از شرکت metrohm یا دستگاه اندازه‌گیری پایداری اکسایشی شرکت Omnion. بر خلاف روش AOM که عدد پراکسید را محاسبه می‌نمود در این روش ترکیبات فرار تولیدی از روغنی که تحت شرایط ثابت هوادهی حرارت می‌بیند، اندازه گرفته می‌شود. ترکیبات فرار مانند اسیدهای آلی کوتاه زنجیر (فرمیک و استیک اسید) که از روغن حرارت دیده تولید می‌شوند در آب به دام می‌افتند و سرعت تولید آنها از طریق اندازه‌گیری هدایت الکتریکی محاسبه می‌شود. زمان پایداری روغن (IP) به عنوان (OSI) برای یک روغن معین در دمان تعیین شده گزارش می‌شود. این روش همبستگی خوبی (ضریب همبستگی $0/987$ و $0/976$ در دمای 100 و 110 درجه سانتی‌گراد) با روش AOM دارد (Ranken et al., 1997).

- مزایا و معایب

این روش ساده و کیفی بوده اما نیازمند تجهیزات خاصی است.

- نظریه بمب اکسیژن یا آزمون سیلومتر

این روش بر این اصل استوار است که اکسیژن موجود در هوای اطراف نمونه در واکنش اکسیداسیون جذب نمونه شده در نتیجه فشار آن افت می‌کند که این کاهش اکسیژن به صورت نمودار برحسب زمان کشیده می‌شود. زمانی که کاهش شدیدی در نمودار مشاهده شد آن نقطه به عنوان پایان زمان پایداری روغن در نظر گرفته می‌شود. برای اندازه‌گیری اکسیژن مصرفی معمولاً یکی از سه روش وزن سنجی، اندازه‌گیری غلظت اکسیژن در هوای اطراف نمونه و اندازه‌گیری فشار در محفظه نمونه بکار می‌رود که روش سوم اساس کار دستگاه FIRA-ASTELL می‌باشد (Ranken et al., 1997).

- روش آنالیز گرماسنجی افتراقی^۲

در این روش دماها و جریانهای حرارتی مربوط به تغییر حالت مواد در تابعی از دما و زمان تحت شرایط اتمسفر کنترل شده‌ای اندازه گرفته می‌شود، این اندازه‌گیری‌ها اطلاعاتی را در مورد مقادیر و کیفیت تغییرات فیزیکی و شیمیایی ماده مورد نظر که شامل فرایندهای گرماگیر، گرماده و یا تغییرات در ظرفیت حرارتی می‌باشد در اختیار محقق قرار می‌دهد. در این روش نمونه و مرجع را حرارت می‌دهند تا از دمای مبدا به یک دمای خاصی برسد به این ترتیب دستگاه به هر دو نمونه انرژی یکسانی می‌دهد و میزان تغییرات دمایی نمونه نسبت به مرجع را می‌سنجد.

برنامه دمایی این دستگاه می‌تواند دینامیک باشد که در آن نمونه با سرعت ثابتی در محدوده‌های مورد نیاز گرم یا سرد می‌شود، می‌تواند شامل دمای ثابت از پیش تعیین شده باشد و تغییراتی را که در محدوده زمانی مشخص اتفاق می‌افتد را اندازه‌گیری نماید. این روش به تنهایی در تشخیص و شناسایی مواد موثر نیست اما زمانی که با دستگاهی مانند طیف‌سنج جرمی و طیف‌سنج FTIR همراه شود اطلاعات مفیدی به ما می‌دهد. عوامل موثر در DSC شامل خصوصیات نمونه (مقدار نمونه و اندازه ذرات آن،

¹ Oil Stability Index (OSI)

² DSC(Deferential Scanning Calorimeter)

دیگر مناسب‌تر است. با کمک این روش می‌توان اثر آنتی‌اکسیدانی یا سینرژیستی یک ترکیب را نیز تعیین نمود. برای چنین منظوری یک بار نمونه و شاهد رفتارشان با دستگاه بررسی می‌شود سپس رفتار اکسیداسیون در جوار آنتی‌اکسیدان بررسی می‌شود. بدیهی است که با افزایش آنتی‌اکسیدان دمای شروع پیک‌های اکسیداسیون افزایش می‌یابد. شرایط آزمایش به این صورت است که ۳ تا ۵ گرم از نمونه در جایگاه خاص آن ریخته سرعت گاز اکسیژن ۱۵ دسی متر معکب در ساعت و سرعت گرم کردن ۲ تا ۲۰ درجه کلون در دقیقه برای افزایش دما از ۴۰ تا ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. می‌توان برای تحریک اکسیداسیون نمونه از غلظت آغاز گر مناسب نیز استفاده نمود.

در شریط آزمون DSC زمان مقاومت کمتر محاسبه می‌شود که دلیل آن مقدار کم نمونه می‌باشد. از آنجائیکه نسبت سطح به حجم نقش مهمی در اکسیداسیون باز می‌کند زمانی که مقدار کمی از روغن استفاده می‌شود مقدار برهمکنش آنها با اکسیژن بیشتر می‌شود. در این روش با افزایش هر ۱۰ درجه دما زمان مقاومت تقریباً نصف می‌شود. البته همبستگی بسیار مناسبی بین زمان مقاومت با DSC و روش‌های دیگر تعیین مقاومت روغن وجود دارد. در این روش می‌توان درصد ممانعت کنندگی آنتی‌اکسیدان را بر اساس رابطه ۲۴ تعیین نمود (Cerná et al., 2012; Pomerantsev & Rodionova, 2005).

$$(24) \text{ درصد ممانعت کنندگی} = \frac{\text{مقدار شاهد} - \text{مقدار آنتی‌اکسیدان}}{\text{مقدار شاهد}} \times 100$$

معمولاً در کنار تعیین مقاومت به اکسیداسیون، مشاهده اکسیداسیون در روغن و تعیین فساد آن نیز بررسی می‌شود. در این روش می‌توان روغن اکسید شده و حرارت دیده را بطور کامل منجمد کرده و نمودار سرد شدن آن را رسم نموده سپس دمای آن را به آهستگی بالا آورده و پیک بلوریزاسیون، دما و آنتالپی آن را بررسی نمود. پیک منحنی سرد شدن می‌تواند عدد صابونی، درصد اسیدهای چرب آزاد و ترکیبات قطبی موجود را نشان دهد. این روش بیشتر در تعیین فساد روغن کاربرد دارد.

روغن‌های خوراکی مانند سایر روغن‌ها از تری‌گلیسرید (۹۶ تا ۹۹٪) ساخته شده است. زمانیکه در معرض شرایط

ظرفیت حرارتی و هدایت حرارتی آن) عوامل دستگامی (سرعت گرمادهی، جنس نگهدارنده نمونه و مرجع و اتمسفر آزمایش) است (Litwinienko et al., 1999; Cerná et al., 2012; Cibulkova et al., 2005).

– کاربرد DSC در صنعت غذا:

DSC می‌تواند برای بررسی‌های مختلف در روغن‌های خوراکی و همچنین سایر مواد غذایی استفاده شود که این بررسی‌ها را می‌توان در چهار گروه کلی بشرح زیر طبقه‌بندی نمود: (Berger & Akehurst, 1966)

۱- مشاهده اکسیداسیون در روغن و تعیین فساد آن (Cerná et al., 2012; Pomerantsev & Rodionova, 2005).

۲- مقاومت اکسایشی روغن و تعیین زمان مقاومت و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها (Gardette et al., 2013; Tan & Che Man, 1999).

۳- سینتیک اکسیداسیون در روغن‌ها و چربی‌ها (Litwiniek et al., 1999; Ficarra et al., 2002; Dave Oomah et al., 2006).

۴- شناسایی انواع روغن (Chiavaro et al., 2008).

– مقاومت اکسایشی روغن و تعیین زمان مقاومت و ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها:

زمانی که افزایش شدیدی در اکسیداسیون روغن رخ می‌دهد نشان دهنده پایداری اکسایشی روغن^۱ می‌باشد. از آنجائیکه انتقال ملکول اکسیژن به روغن غیر اشباع یک فرایند گرمازا بوده بنابراین می‌توان پایداری اکسایشی روغن‌های خوراکی را با استفاده از DSC تعیین نمود به این ترتیب که منحنی هم دما در مجاورت گاز اکسیژن خالص رسم شود و پایداری روغن اندازه گرفته شود. پایان زمان DSC جایی است که یک فرایند گرمزای سریع رخ می‌دهد به این ترتیب این روش می‌تواند برای تعیین ظرفیت اکسایشی در دماهای ۱۳۰، ۱۲۰، ۱۱۰ و ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گیرد. افزایش شدید دما باعث تیز شدگی پیک می‌گردد. روش DSC بدلیل قیمت، مقدار نمونه مصرفی، سرعت و کارآمدی بالا نسبت به روش‌های

¹ Induction Period

مروری بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

یکی از روش‌های اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی روش Folin- Ciocalteu می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۲۷ مطرح گردید. معرف Folin- Ciocalteu مخلوطی از فسفومولیدات و فسفوتنگستیک اسید می‌باشد که بر مبنای رنگ سنجی عمل می‌کند که می‌تواند مقدار کل ترکیبات فنولی محیط را اندازه‌گیری نماید. این روش بطور غیر مستقیم از روی قدرت کاهش ترکیبات غذا و نوشابه‌ها محتوای ترکیبات فنولی را تخمین می‌زند (Lester et al., 2012).

این معرف می‌تواند با بسیاری از ترکیبات موجود در محیط مانند ترکیبات نیتروژن دار مثل هیدروسیل امید، گوانیدین، گروه‌های تیول، اسکویک اسید، برخی نمک‌های غیر آلی، گلوکز و... واکنش دهد (Turkemen et al., 2006; Lester et al., 2012).

اساس این روش بر این اصل استوار است که Folin- Ciocalteu یک ترکیب اکسند است. فنول‌ها و پلی فنول‌ها با انتقال تک الکترون خود در محیط قلیایی به آن این ترکیب را احیا کرده و ایجاد رنگ آبی در محیط می‌نمایند که در ۷۲۵ نانومتر بیشترین میزان جذب را نشان می‌دهد. از آنجایی که بسیاری از بافرها و عوامل چلپیت کننده و همچنین دترجنت‌ها و... در این روش تداخل ایجاد می‌کنند برای کنترل دقیق این روش حتما باید از محلول شاهد یا استاندارد استفاده نمود که در بیشتر تحقیقات از گالیک اسید بعنوان استاندارد استفاده می‌شود و نتیجه نهایی بصورت معادل گالیک اسید برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده بیان می‌شود (Obied et al., 2007; Mediana, 2011).

همانطور که قبلا نیز اشاره شده است موادی مثل آنتی‌اکسیدان‌های غیر فنولی و مواد احیا کننده مثل آسکوبیک اسید، گلوکز، فروکتوز و سولفیدها که افزودنی‌های متداول غذایی هستند و بطور طبیعی در بسیاری از آب میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند می‌توانند باعث تشکیل رنگ آبی از معرف Folin- Ciocalteu گردند. لازم به ذکر است که آمینواسیدهایی مثل تیروزین، تریپتوفان و پروتین‌هایی که دارای این آمینو اسیدها هستند نیز دارای تاثیر مشابه روی معرف هستند. بنابراین نیاز به روش‌های ساده‌تر، سریع‌تر و مستقیم جهت شناسایی ترکیبات فنولی می‌باشد (Obied et al., 2007; Mediana, 2011).

بلورین قرار می‌گیرد رفتاری مانند پلیمرها از خود نشان می‌دهد به این ترتیب که از مرحله تشکیل هسته، رشد بلورها شروع و سرانجام بحالت بلور می‌رسد. عواملی که روی بلورینه شدن روغن تاثیر دارد ناخالصی‌هایی مانند اسیدهای چرب آزاد، مونو و دی گلیسرید و محصولات اکسیداسیون می‌باشد که در طول سرخ کردن و حرارت دهی در ماده غذایی افزایش می‌یابد. رفتار بلور شدن روغن می‌تواند در تشخیص تجزیه حرارتی روغن موثر باشد.

روش انجام کار برای این منظور بشرح زیر است: چند میلی‌گرم نمونه ابتدا از دمای محیط با سرعت ثابت تا دمای 80°C بالا برده می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگهداشته می‌شود تا تمامی هسته‌های بلور از بین رود سپس سریعاً با سرعت ثابت تا دمای 30°C - خنک شده و ۵ دقیقه نگهداشته می‌شود تا تغییرات چند شکلی آن صورت گیرد سپس با سرعت بسیار آهسته تا دمای 85°C - خنک می‌شود تا پروفایل سرد کردن آن بدست آید. منحنی خنک کردن یک پیک گرم‌زایی بلورینه شدن را نشان می‌دهد. زمانی که روغن فاسدتر شده باشد پیک بلورینه شدن به سمت دماهای پائین‌تر جابجا شده و شدیداً کاهش می‌یابد. می‌توان بین دمای پیک و عدد پراکسید، اسیدهای چرب آزاد و ترکیبات قطبی یک معادله درجه اول نوشت که همبستگی منفی بین دمای پیک و درصد اسید چرب آزاد را نشان می‌دهد. همچنین یک همبستگی مثبتی بین دمای پیک و عدد یونی دیده می‌شود (Gardette et al., 2013; Tan & Che Man, 1999; Tan & Che Man, 2002).

- روش Folin- Ciocalteu:

این روش بطور مستقیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بررسی نمی‌کند بلکه همیشه مکمل روش‌های بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد در واقع تعیین کننده ترکیبات کل فنولی می‌باشد. ترکیبات پلی‌فنولی شامل فلاونوئید، فلاوانول، فلاوانول، ایزوفلاون‌ها، فلاوانون، فلاوان، آنتوسیانیدین، آنتوسیانید، ایزومرهای کلروژنیک اسید و خانواده سینامیک و بنزوئیک اسید و همچنین لیگنین، تانن، توکوفرول و توکوتری انول می‌باشد که در میوه‌ها، سبزیجات، دانه‌های روغنی، آجیل‌ها، گیاهان دارویی و اجزا گیاهان وجود دارد.

خصوصیات آن بهتر است در برخی محصولات که همزمان آنتی اکسیدان‌های چربی دوست و آبدوست را دارا هستند حداقل به عنوان یک روش مکمل در نظر گرفته شود.

با توجه به گستردگی کارهای انجام شده با روش‌های شیمیایی TEAC, DPPH, FRAP می‌توان گفت که این روش‌ها نتایج قابل مقایسه‌ای را در زمینه اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی مطرح می‌کنند. اکثر این روش‌های شیمیایی ساده و سریع بوده اما همیشه همبستگی خوبی بین نتایج آنها مشاهده نمی‌شود همراه شدن این روش‌ها با اندازه‌گیری کل ترکیبات فنلی (که در اکثر مواقع متناسب با نتایج آزمون‌های شیمیایی است) می‌تواند مفید واقع شود.

در مقایسه روش TEAC, DPPH که از جمله متداول‌ترین روش‌ها در مقالات می‌باشد می‌توان گفت: روش DPPH فقط در محدوده pH ۴ تا ۸ عمل می‌کند در حالی که TEAC در محدوده pH ۱ تا ۸ کاربرد دارد. در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی تمامی پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها نشان داده‌اند که به pH وابسته هستند. زیرا اغلب پلی فنل‌هایی که مثلاً در غلات یافت می‌شوند مثل فنولیک اسید و فلاونوئیدها به نحوی با دیگر اجزاء موجود پیوند برقرار کرده اند پس آزاد سازی برای اثرگذاری آنها نیازمند تغییرات pH خواهد بود. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که استخراج قلیایی می‌تواند باعث سهولت در استخراج ترکیبات فنولی باند شده گردد (Sosluski et al., 1982). رقت معرف که از اضافه کردن نمونه به مخلوط واکنش دست می‌آید فاکتور اصلی محدود کننده روش TEAC است (در این روش حداکثر رقت نمونه به معرف به صورت حجمی-حجمی می‌تواند یک به ۱۰ باشد). نوع حلالی که در روش TEAC برای استخراج نمونه‌های جامد استفاده می‌شود در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی اثر گذار بوده و باعث اثرات معناداری می‌گردد (Ferri et al., 2013).

می‌توان از روش بررسی مستقیم اضافه کردن ABTS و یا DPPH به نمونه بدون هیچ فرایند استخراج حلال نیز استفاده نمود که این روش دارای مزایایی بشرح زیر است:

۱- دامنه وسیعی از ترکیبات آنتی اکسیدانی آزاد یا متصل به ترکیبات دیگر را می‌توان بدون وابستگی به قابلیت انحلالشان در حلال بررسی نمود.

روش سریع^۱ BB یکی از روش‌های سریع جایگزین Folin-Ciocalteu است که اساس آن بشرح زیر می‌باشد: نمک BB یون آروماتیکی است که تمایل به زوج کردن الکترون‌های خود با مواد فعالی مانند فنول‌ها دارد. معرف Fast BB دارای گروه‌های Diazonium میباشد که با گروه‌های OH ترکیبات فنولی وارد واکنش می‌شود معمولاً این زوج شدن در موقعیت پارا ترکیبات فنولی انجام می‌شود مگر اینکه این موقعیت قبلاً اشغال شده باشد در این صورت در موقعیت ارتو زوج شدن اتفاق می‌افتد. محیط قلیایی ضعیف باعث فعال شدن گروه‌های فنولی گشته و برهم کنش آنها مناسب‌تر می‌شود. شرایط بهینه این واکنش طول موج ۴۲۰ نانومتر، زمان واکنش ۶۰ دقیقه و ترکیب قلیایی ۶٪ سود و حلال اتانول ۷۰٪ می‌باشد. مقدار معادل گالیک اسید که با روش Fast BB گزارش شده است نسبت به روش Folin-Ciocalteu در چای و قهوه ۲ تا ۶ برابر می‌باشد در حالی که این اختلاف در آب میوه‌های غنی شده با ویتامین C و شربت ذرت به حد اقل مقدار خود یعنی ۱ تا ۴ برابر می‌رسد که دلیل آن خاصیت احیا کنندگی این سیستم است (Lester et al., 2012).

نتیجه‌گیری

در میان روش‌های ذکر شده، روش ORAC با توجه به ایرادات فراوانی که به اساس آن وارد شده است و اطلاعیه USDA برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی پیشنهاد نمی‌شود، روش SOSA به دلیل پیچیدگی و زمان بر بودن چندان مورد توجه محققین قرا نگرفته است، روش FRAP از آنجایی که شدیداً به ترکیبات نمونه وابسته است و با توجه به این که در این روش رادیکال آزادی وجود ندارد و ظرفیت آنتی اکسیدانی با احیاء آهن بررسی می‌شود زمانی که در تجزیه و تحلیل مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد نتایج متفاوتی ارائه می‌کند. بنابراین هیچ‌گاه به تنهایی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد اما به دلیل ساده بودن همواره به عنوان روش دوم و یا سوم تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی در تحقیقات به کار می‌رود. در مورد روش رنگبری کاروتن و کروستین علی‌رغم این که نیازمند دقت بالایی است اما می‌توان گفت که با توجه به

¹ Fast Blue BB (4-benzoylamino-2,5-dimethoxy benzenediazonium chloride hemi-[zinc chloride])

(2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. Volume 53, Issue 372, pp. 1331-1341.

Aruoma, O., Murcia, A., Butler, J. & Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41 (11), pp 1880-1885.

Atanassova, M., Georgieva, S. & Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity & biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy*, 46, 1, 81-88.

Banerjee, A., Dasgupta, N. & Bratati, D. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90, 727-733.

Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 44(1), pp. 276-87.

Berger, R.G. & Akehurst, E. E. (1966). Some applications of differential thermal analysis to oils and fats, 3. *Fd Technol*, 1, 237-247.

Berker, K., Guclu, K., Tor, I. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72, 1157-1165.

Badarinath, A. V., Mallikarjuna Rao, K., Madhu Sudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S. & Gnanaprakash, K. (2010). Review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, Vol. 2, No. 2, pp 1276-1285.

Bisby, R. H., Brooke, R. & Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1002-1007.

Bors, W., Michel, C., & Saran, M. (1984). Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 796(3), 312-319.

Cao, G. & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin.Chem.* 44, 1309-1315.

۲- جلوگیری از تخمین زدن کمتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدلیل عدم استخراج کامل بوسیله تیمار قلیایی.

۳- حذف هر نوع اثر سینرژیستی در میان آنتی‌اکسیدان‌های متفاوت (Serpen *et al.*, 2007; Serpen *et al.*, 2008).

در میان روش‌های سریع اندازه‌گیری پایداری که در محیط روغن صورت می‌گیرد روش DSC در میان کارهای پژوهشی مرسوم‌تر بوده اما لازم به ذکر است که این روش‌ها تنها برای محیط‌های آبریز کاربرد می‌باشد و در اکثر مواقع نتایج بدست آمده از این روش همبستگی خوبی با روش‌های شیمیایی نشان می‌دهد. به عنوان جمع‌بندی کلی می‌توان گفت با توجه به نظر اکثر محققین استفاده تنها از یک روش شیمیایی نتایج دقیق و قابل استنادی ارائه نمی‌کند بنابراین پیشنهاد می‌شود در کارهای تحقیقاتی حداقل از دو یا سه روش شیمیایی استفاده شود اما به هر حال نتایج بدست آمده از این روش‌های شیمیایی را نمی‌توان با نحوه عملکرد آنها در بدن قیاس نمود. زیرا بعضی از این روش‌ها در شرایطی غیر مشابه شرایط فیزیولوژیکی مثلا از لحاظ pH فعالیت می‌کنند. به منظور رسیدن به نتایج دقیق‌تر این روش‌ها باید با روش سلولی همراه شود که البته این دسته از مطالعات وقت‌گیر و زمان بر می‌باشد.

۱۰۶

منابع

Abderrahim, F., Arribas, S. M., Gonzalez, M. C. & Condezo-Hoyos, L. (2013). Rapid high-throughput assay to assess scavenging 1 capacity index using DPPH. *Food Chemistry*. In press. (Accepted Manuscript).

Alarcón, C. L. & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 763, 1-10.

Aldini, G., Yeum, K. J., Niki, E. & Russell, R. M. (2010). Biomarkers for Antioxidant Defense & Oxidative Damage: Principles and Practical Applications. Wiley Blackwell, Ames.

Arts, M. J. T. J. (2007). Assessing Antioxidant Activity. *Datawyse / Universitaire Pers Maastricht*. PhD thesis. Pp-45-56.

Alscher, R. G., Erturk, N. & Heath, L. S.

Chen, Z., Bertin, R. & Froidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414–420.

Cerná, A., Cibulková, Z., Simon, P., Uhlár, J. & Lehocký, P. (2012). DSC study of selected antioxidants and their binary mixtures in styrenebutadiene rubber. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1724–1729.

Cibulkova, Z., Imon, P. S., Lehocky, P. & Balko, J. (2005). Antioxidant activity of p-phenylenediamines studied by DSC. *Polymer Degradation and Stability*, 87, 479e486.

Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Barnaba, C., Vittadini, E., Cerretani, L. & Bendini, A. (2008). Differential scanning calorimetry: A potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *analytica chimica acta*, 625, 215–226.

Chung, K., Haddad, L., Ramakrishna, J. & Riely, F. (1997). Identifying the food insecure: the application of mixed method approaches in India. International Food Research institute, Washington D. C.

Dave Oomah, B., Dumon, D., Cardador-Marti, A. & Godfrey, D. (2006). Characteristics of echinacea seed oil. *Food Chemistry*, 96, 304–312.

Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Bertè, F. & Gazzani, G. (2000). In vitro antioxidant & ex Vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem*, 48 (5), pp 1449–1454.

Deng, J., Cheng, W. & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry* 125, 1430–1435.

Frankel, E. N. & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. SCI. FOOD AGRIC.* 80: 1925–1941.

Ferri, M., Gianotti, A. & Tassoni, A. (2013). Optimisation of assay conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components. *Journal of Food Composition and Analysis*. Volume 30, Issue 2, 94–101.

Ficarra, R., Tommasini, S., Raneri, D., Calabro, M.L., Di Bella, M.R., Rustichelli, C., Gamberini, M. C. & Ficarra, P. (2002). Study of flavonoids/_cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray

investigation. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 29, 1005–1014.

Folch-Cano, C., Jullian, C., Speisky, H. & Olea-Azar, C. (2010). Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. *Food Research International*, 43, 2039–2044.

Folhe, A. & Otting, F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105:93, pp. 104.

Furuno, K., Akasako, T. & Sugihara, N. (2002). The contribution of the pyrogallol moiety to the Superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Bid. Pharm. Bull.*, 25, 19–23.

Gardette, J. L. & Baba, M. (2013). FTIR and DSC studies of the thermal & photochemical stability of Balanites aegyptiaca oil (Toogga oil). *Chemistry and Physics of Lipids*, 170–171, 1–7.

Ghisell, A., Serafini, M., Giuseppe, M., Azzin, E. & Ferro-Luzzi, A. (1995). A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 1, 29–36.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review & experimental data. *Free Radical Biol. Med.* 29, 1106–1114.

Gliszczyn'ska-S'wigło, A. (2006). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 96, 131–136.

Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Suhaj, M. & Sheng, G. P. (2010). Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis* 21, 355–362

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23, 1719–1726.

Griffin, S. P. & Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 302, 201–211.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol.* 38:3–20.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology & Medicine*, 4th edition Clarendon, Oxford.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Huang, W. Y., Majumder, K. & Wu, J. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123, 635–641.
- Kampa, M., Nistikaki, A., Tsaousis, V., Maliaraki, N., Notas, G. & Castanas, E. (2002). A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clinical Pathology*, 2:3.
- Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J. & Dommès, J. (2013). Antioxidant capacity of hydrophilic food matrices: optimization and validation of ORAC assay. *Food Analytical Methods*. 10.1007/s12161-013-9640-6.
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y. & Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6509–6515.
- Laguerre, M., Lecomte, J. & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends & challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Lester, G., Lewers, K., Medina, M. B. & Saftner, R. A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 27, 102–107.
- Liu, T., Chin, N., Kiser, M. & Bigler, W. (1982). Specific spectrophotometry of Ascorbic Acid in Serum or Plasma by Use of Ascorbate Oxidase. *CLIN. CHEM.* 28/11, 2225-2228.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine & its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295, 141–154.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* 613:1–19.
- Mandel, P., Misra, T. K. & Ghosal, M. (2009). Free radical scavenging activity and phytochemical analysis in the leaf and stem of *Drymaria diandra* Blume. *International journal of integrative biology*, 7, 2, 80.
- Marco, G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.
- Martinek, R. G. (1968) Method for the Determination of Vitamin E (Total Tocopherols) in Serum. *Clinical Chemistry*, Vol. 10, No. 12.
- Mariken, J. T. J., Sebastiaan Dallinga, J., Hans-Peter V., Guido, R. M. M. & Aalt, B. (2003). A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80, 409–414.
- McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocytin). *J. Biol. Chem*, 244, pp. 6056.
- Medina, M. B. (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS* 3, 79–87.
- Mishra, K., Ojha, H. & Kumar Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036–1043.
- Moreira, F., Guerreiro, J. Barros, R. & Sales, G. (2012). The effect of method, standard and sample components on the total antioxidant capacity of commercial waters assessed by optical conventional assays. *Food Chemistry* 134, 564–571.
- Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129, 139–148.
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1322S–1326S.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 503–515.
- Nishikimi, M., Rao, N. A. & Yagi, K. (1972). The occurrence of super oxide anion in the reaction of reduced Phenazine

methosulphate and molecular oxygen. *Biochem Biophys res. Commun*, 46:846-853.

Obied, H. K., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D. & Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food & Chemical Toxicology* 45, 1238–1248.

Oi, V. T., Glazer, A. N. & Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells & molecules. *Journal of Cell Biology*, 93(3):981-6.

Olojo, E. A. A., Olurin, K. B., Mbaka G. & Oluwemimo, A. D. (2005). Histopathology of the gill & liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (1), pp. 117-122.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. 49(10):4619-26.

Park, H. Y., Rho, H. S., Kim, D. H., Kim, H. K., He, Q.Q. & Yeon, J. (2010). Modified Rancimat Method for Evaluation of Antioxidative Effect against Skin Lipids. *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 31, No. 6.

Pascual, C., Castillo, M. D. & Romay, C. (1992), A New Luminol Sensitized Chemiluminescence Method for Determination of Superoxide Dismutase, *Anal. Lett.* 25:837-849.

Payá, M., Halliwell, B. & Houlst, J. R. S. (1992). Peroxyl Radical Scavenging by a Series of Coumarins. *Free Radical Research*. Vol. 17, No. 5, Pages 293-298.

Pulido, R. Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.*, 48(8):3396-402.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition* 133, 2812–2819.

Pomerantsev, A. L. & Rodionova, O. Y. (2005). Hard and soft methods for prediction of antioxidants' activity based on the DSC measurements. *Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems*, 79, 73 – 83.

Prevec, T., Šegatin, N., PoklarUlrih, N. & Cigić, B. (2013). DPPH assay of vegetable oils & model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109, 13–19.

Price, J. A., Sanny, C. G. & Shevlin, D. (2006). Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54, 56 – 61.

Prior, R. & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 27, Issues 11–12, Pages 1173–1181.

Prior R. L. & Cao, G. H. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J. AOAC Int.* 83 (4), 950-956.

Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. J. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods & dietary supplements. *Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.

Prieto Lage, M. A., Murado García, M. A., Vázquez Álvarez, J. A., Anders, Y. & Curran, T. P. (2013). A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic & hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and β -carotene bleaching methods in a single combined assay: Tea extracts as a case study. *Food Research International*. Volume 53, Issue 2, Pages 836–846.

Proestos, C., Lytoudi, K., Konstantina Mavromelanidou, O., Zoumpoulakis, P. & Sinanoglou, S. J. (2013). Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts & Their Essential Oils. *Antioxidants*, 2, 11-22.

Pryor, W. A. (2001). Bio-assays for Oxidative Stress Status (BOSS). *Gulf Professional Publishing*. pp-40-43.

Ranken, M. D., Christopher, G. J. & Baker, R.C. (1997). *Food Industries Manual*. Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman and Hall. UK. Pp. 437-441.

Robak, J. & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 1:37(5), pp.837-41.

Roginsky, V. & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, 235–254.

- Romay, C., Del Castillo, M. C., Pascual, C., Campos, A. M., Escobar, J. & Lissi, E. A. (1996). Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 48:86–95; 1996.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved antiradical action decolonization assay. *PII S0891-5849*, 00315-3.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26 (9/10), 1231-1237.
- Reddy, K. K., Ravinder, T. & Kanjilal, S. (2012). Synthesis and evaluation of antioxidant and antifungal activities of novel ricinoleate-based lipoconjugates of phenolic acids *Food Chemistry* 134, 2201–2207.
- Renuka Devi, R., Jayalekshmy, A. & Arumughan C. (2007). Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. *Food Chemistry* 104, 658–664.
- Samaniego Sanchez, C., Troncoso Gonzalez, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., Lopez Garcia de la Serrana, H. & Lopez Martinez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta* 593, 103–107.
- Sa' nchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods & biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8 (3), 121-137.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V. & Gökmen, V. (2007). A new procedure to measure the Antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7676-7681.
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N. & Fogliano, V. (2008). Direct measurement of the antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science*, 48, 816-820
- Sharma, O. P. & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202–1205.
- Stockham, K., Paimin, R., Orbell, J.D., Adorno, P. & Buddhadasa, S. (2011). Modes of h&ling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labeling. *Journal of Food Composition & Analysis*, 24, 686–691.
- Suja, K. P., Abraham, J. T., Thamizh Selvam, N., Jayalekshmy, A. & Arumughan, C. (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry* 84, 393–400.
- Tan, C. P. & Che Man, Y. B. (1999). Differential scanning calorimetric analysis for monitoring the oxidation of heated oils. *Food Chemistry*, 67, 177±184.
- Tan, C. P. & Che Man, Y. B. (2002). Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. *Food Chemistry*, 76, 89–102.
- Tijerina Saenz, A., Elisia, I., Innis, S. M., Friel, J. K. & Kitts, D. D. (2009). Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 694–698.
- Tirzitis, G. & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles & new insights. *Biochemical Polanical*, 57, 1.
- Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M. & Ursini, F. (1998). Analysis of Plasma Antioxidant Capacity by Competition Kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 24, Issues 7–8, Pages 1228–1234.
- Taubert, D., Breitenbach, T., Lazar, A., Censarek, P., Harlfinger, S., Berkels, R., Klaus, W. & Roesen, R. (2003). Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 35, Issue 12, Pages 1599–1607.
- Turkmen, N., Sari, F. Y. & Velioglu, S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 99, 835–841.
- Uddin Talukder, Md. E., Aklima, J., Bin Emran, T., Islam, S., Rahman, A. & Bhuiyan, R. H. (2013). In vitro antioxidant potential of *Momordica charantia* fruit extracts. *British Journal of Pharmaceutical Research* 3(4): 963-971.
- Valkonen, M. & Kuusi, T. (1997). Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res.* 38(4):823-33.
- Van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., van der Vijgh, W. & Bast, A. (2000).

The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related -avonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70, 391-395.

Wayner, D. D., Burton, G. W., Ingold, K. & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the TRAP of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. *FEBS Lett* 187: 33-37.

Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H. & Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 3, 480-493.

Withdrawn: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010)". United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 16 May 2012. Retrieved 13 June 2012.

Whitehead, T. P., ThorpeCorresponding, G. H. G. & Maxwell, S. R. J. (1992). Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*. Volume 266, Issue 2, Pages 265-277.

Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W. & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal

plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705-711.

Wootton-Beard, P., Moran, A. & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International* 44, 217-224.

Wu, C., Duckett, S. K., Neel, J. P. S., Fontenot, J. P. & Clapham, W. M. (2008). Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Science*, 80, 662-667.

Yilmaz, Y. & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-48.

Zheng, Y., Wang, S. Y., Wang, C. Y. & Zheng, W. (2007). Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT*, 40, 49-57.

Zulueta, A., Esteve, M. J. & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310-316.