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] *دانشجو 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 دریافت مقاله: 1392/12/19 تاریخ پذیرش مقاله: 1393/2/27

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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 مهار کنندگی 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 ضرایبی 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: درحال 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*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: gharachorlo_m@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

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 آنتی اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی اکسیدان‌ها مورد توجه محققین، پزشکان و عموم مردم قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی یکی از متداول‌ترین موضوعات مورد بررسی در سال‌های اخیر بوده است (Aldini *et al*., 2010). پیچیدگی آزمون‌ها و محدودیت‌های بررسی مستقیم سینتیک واکنش ممانعت کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون چربی‌ها که اغلب روش‌های دقیقتر و مطمئن‌تری می‌باشند موجب شد تا روش‌های ساده تر در ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ابداع گردد (Muller *et al*., 2011). بر این اساس روش‌های زیادی به شیوه‌های گوناگون در شرایط مختلف، ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان‌ها، حضور سایر مواد مداخله کننده در نمونه، عدم شرکت همه آنتی اکسیدان‌های نمونه در واکنش روش مورد استفاده و ... که در واکنش اکسایشی دخالت دارند روش ساده و جهانی برای ارزیابی‌های صحیح و تعیین مقداری آنتی اکسیدان‌ها تا کنون به ثبت نرسیده است (Zulueta *et al*., 2009). بعلاوه تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی در مواد غذایی با پیچیدگی‌های بیشتری همراه است مانند خصوصیات کلوئیدی 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 بزرگ ترین مشکل بر سر راه تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی 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 1) استفاده از سوبسترای معرف زیستی 2) استفاده از شرایط متفاوت اکسیداسیون 3) اندازه گیری محصولات اولیه و محصولات ثانویه اکسیداسیون 4) مقایسه چندین نوع آنتی اکسیدان (مانند آسکوربیک اسید، گالیک اسید و آلفا توکوفرول) در غلظت مشابه برای یک نمونه 5) اعلام نتایج به چند روش مختلف مانند زمان مقاومت به اکسید شدن، درصد ممانعت کنندگی، سرعت تشکیل هیدروپراکسید و یا تجزیه آن و محاسبه IC50 (غلظتی از آنتی اکسیدان که باعث اثر ممانعت کنندگی 50 درصدی می‌شود) (Frankel & Meyer, 2000). در کنار این موضوع نتیجه گیری‌هایی که از مقالات مروری قبلی بدست آمده است نشان می‌دهد که روش DPPH[1] روش ساده و آسانی برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی در میوه‌ها و سبزیجات و یا عصاره استخراجی آنها است (Sa´nchez-Moreno, 2002). روش ORAC[2] اکثرا برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های گیاهی (Prior & Cao, 2000) و زیستی (Prior & Cao, 1999) مفید می‌باشد. روش TRAP[3] و روش TEAC[4] 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

[1] DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
[2] ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity
[3] TRAP: Total Radical-trapping Antioxidant Parameter
[4] TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

jftn.srbiau.ac.ir

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

دسته‌بندی روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها

موجودات هوازی 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 آنتی اکسیدان‌ها پروتئین و آنزیم می‌باشند در حالی که مابقی را مولکول‌های کوچک تشکیل می‌دهند. از لحاظ عملکرد می‌توان آنتی اکسیدان‌ها را به انواع آنتی‌اکسیدان‌های ممانعت کننده[1]، آنتی‌اکسیدان‌های مهار کننده[2]، بازسازی‌کننده و تعمیر کننده[3] تقسیم بندی نمود (Niki *et al.*, 1995). آنتی اکسیدان‌هایی که مهار کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند یکی از مهم ترین انواع آنتی اکسیدان هستند که بررسی ظرفیت آنها موضوع بسیاری از تحقیقات و بحث‌های علمی می‌باشد. آنتی اکسیدان‌های مهاری (IH) از طریق مهار رادیکال آزاد (X^o) 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 آنتی اکسیدان می‌باشد (Niki, 2010).

$$X\cdot + IH \text{ - - - - - } > XH + I\cdot \quad (1)$$

$$X\cdot + IH \text{ - - - } \rightarrow X^- + IH\cdot^+ \text{ - - - } \rightarrow XH + I\cdot \quad (2)$$

روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز بر این اساس در دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند: روش انتقال اتم هیدروژن[4] و روش انتقال الکترون[5] (Huang *et al.*, 2005). در روش‌های انتقال اتم هیدروژن آنتی اکسیدان و سوبسترا بر سر واکنش با رادیکال هیدروکسیل تولید شده از تجزیه حرارتی ترکیبات آزو با یکدیگر رقابت می‌کنند. روش‌های انتقال الکترون ظرفیت آنتی اکسیدانی را در کاهش رادیکال آزاد که با تغییر رنگ همراه است اندازه می‌گیرد که رنگ بر اساس غلظت آنتی اکسیدانی موجود در محیط تغییر می‌کند. روش‌های تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس ساز و کار انتقال اتم هیدروژن شامل ORAC , TRAP و CBA[6] و بر اساس ساز و کار روش انتقال الکترون شامل TEAC, FRAP[7] و DPPH می‌باشد (Moreira *et al.*, 2012; Wootton-Beard *et al.*, 2011). در کنار این روش‌های تقریبا سنتی در سال‌های اخیر روش‌های دستگاهی مانند DSC[8] 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 آنتی اکسیدانی استفاده شده است که شامل ظرفیت[9]، کفایت[10]، قدرت[11]، پارامتر[12]، پتانسیل[13]، توان[14] و فعالیت[15] می باشد. فعالیت یک ماده شیمیایی بدون شرایط ویژه واکنش مثل فشار، دما، محیط واکنش و تعیین واکنشگرهای دیگر بدون معنی می‌باشد. از آنجایی که فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی مناسب‌تر و متداول‌تر بوده و پیشنهاد می‌شود در گزارشات علمی جایگزین سایر واژه‌ها گردد (Huang *et al.*, 2010).

- روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس احیاء آهن یا روش FRAP

آنتی اکسیدان‌ها، دو نوع آنزیمی (مانند گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ...) و غیر آنزیمی‌هستند. آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مثل آسکوربیک اسید اهدا

[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

jftn.srbiau.ac.ir

کننـده‌هـای الکتـرون مـی‌باشـند. در واقـع در واکـنش اکسیداسیون که یک عامل اکسیدشونده و یک عامـل احیـا کننده دارد آنتـی اکسـیدان‌هـا نقـش احیـا کننـده را بـازی می‌کنند یعنی ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها بـه توانـایی احیـا کنندگیشان بستگی دارد. در روش FRAP از یک واکـنش اکسیداسیون احیا استفاده می‌شود که با تغییر رنـگ همـراه است. زمانی که احیا کننده واکنش (آنتی اکسیدان) الکترون خود را اهدا می‌کند ماده ای تولید می‌شود که رنگی بـوده و به راحتی می‌توان شدت رنگ تولید شده که نشـان دهنـده پیشرفت واکنش است را اندازه گرفـت (رابطـه 3) (Guo *et al*., 2003; Martinek, 1968).

Fe +3- complex with TPTZ (colourless or Yellow) $\xrightarrow{\text{Antioxidant}}$ Fe +2 complex with TPTZ (blue) (3)

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, $C_{18}H_{12}N_6$

لازم به ذکراست 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 آنتی اکسیدانی پی برد (Liu *et al*., 1982). این سیستم به غلظت آنتی اکسیدان غیر وابسته بوده و تفاوت‌های مشاهده شده به فاکتورهای استکیومتری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باز می‌گردد. به این دلیل که در دز پاسخ برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف رفتار خطی دیده شده است یعنی ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 ($FeCl_3$) 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 کمپلکس احیاء شده و تشکیل کمپلس حاوی آهن دو ظرفیتی آبی رنگ را می‌دهد که حداکثر جذب را در طول موج 593 نانومتر دارد.

عدد FRAP نمونه‌ها بر اساس میکرومولار در هر یک گرم ماده خشک بشرح رابطه 4 محاسبه می‌شود:

$$\text{FRAP value} = \frac{\text{The slope of the linear plot for reducing } Fe^{+3} - TPTZ \text{ regent by sample}}{\text{The slope of the linear plot for FeSO4 (standard)}} \quad (4)$$

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 آنتی اکسیدانی نمونه را بدست آورد. همچنین زمان فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی نمونه دخالت داشته باشد(Prior *et al*., 2005). نتایج آزمون FRAP شدیدا به زمان آنالیز بستگی دارد (Roginsky & Lissi, 2005). بنابر این نظر بعضی از محققین مبنی بر این که واکنش FRAP سریعا انجام می‌شود و حداکثر زمان 4 تا 6 دقیقه را می‌خواهد صحیح نمی‌باشد زیرا بعضی از پلی فنل‌های خوراکی با سرعت بسیار کم وارد واکنش می‌شود و مثلا به زمان بالایی مانند 30 دقیقه نیاز دارد (Alarcón & Denicola, 2013). از آنجایی 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 بنابر این روش FRAP برای تحقیقات مقایسه‌ای که مثلا اثر یک تیمار را بر روی

jftn.srbiau.ac.ir

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 (180 دقیقه) واکنش می‌دهد (Pulido *et al*., 2000) و از طرف دیگر با آنتی اکسیدان‌های تیول‌دار مانند گلوتاتیون، 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 593 نانومتر که برای تعیین شدت جذب در این روش استفاده می‌شود، دارای جذب بوده و در این روش تداخل ایجاد می‌کند.

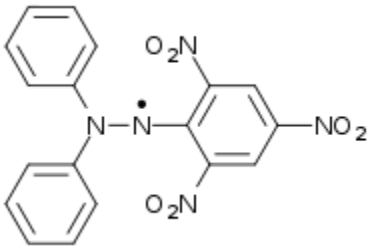
محصول واکنش Fe^{+2} می‌تواند با H_2O_2 محیط وارد واکنش شود و تولید رادیکال فعال OH° نماید. وجود هر نوع رادیکال اضافی در محیط باعث ایجاد خطا در نتیجه‌گیری می‌شود. واکنش FRAP به pH حساس بوده و برای بدست آوردن نتایج صحیح تر باید از pHهای اسیدی و خنثی استفاده نمود (Berker *et al*., 2007).

روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی با رادیکال DPPH

اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH (رابطه 5) به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها 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).

$$DPPH^{\circ}(purple) + H - A \rightarrow DPPH\text{-}H(yellow) + A^{\circ} \quad (5)$$

DPPH (شکل 1) 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 ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی است.



شکل 1- رادیکال DPPH

رادیکال DPPH تشابه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولا 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 515-520 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 $DPPH_2$ تبدیل می‌شود (رابطه 5). در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود بنابراین شدت جذب در 515 نانومتر کاهش می‌یابد از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی اکسیدانی آن پی‌برد.

معمولا نتایج آزمون DPPH بر پایه $IC50$[1] بیان می‌شود. IC50 بیان گر غلظت موثر از نمونه‌ها است که ظرفیت مهار 50 ٪ DPPH را دارد و از طریق رگرسیون خطی منحنی درصد ممانعت کنندگی (رابطه 6) و غلظت بدست می‌آید.

$$Inhibition\% = \frac{Absorbance\ of\ Control - Absorbance\ of\ Sample}{Absorbance\ of\ Control} \times 100 \quad (6)$$

اصطلاحات دیگری که در این زمینه استفاده می‌شود EC50 [2] و ARP[3] است. EC50 میزان آنتی اکسیدان که مورد نیاز است تا مقدار جذب DPPH به اندازه 50 درصد مقدار اولیه برسد را نشان می‌دهد و ARP ظرفیت

[1] Half Maximal Inhibitory Concentration [2] Half Maximal Effective Concentration [3] Anti Radical Power

jfn.srbiau.ac.ir

ضد رادیکالی است که معادل عکس EC50 می‌باشد (رابطه 7).

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

یکی از پارامترهای واکنش استوکیومتری، مقدار واکنش‌گر (آنتی اکسیدان) مورد نیاز برای کاهش 100 ٪ DPPH است که آن را می‌توان از حاصلضرب مقدار EC50 در 2 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 آنتی اکسیدان با DPPH و یا حتی در مواردی عدم انجام واکنش بعضی از آنتی اکسیدان‌ها 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. مثلا معمولا زمان انجام واکنش را 20 تا 30 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 آنتی اکسیدانی بسیاری از آنتی اکسیدان‌ها معمولا 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 آنتی اکسیدان‌ها به گروه‌های OH. به این ترتیب که پروپیلن گالات (PG) با سه گروه OH ظرفیت مهار کنندگی کمتری ازآنتی اکسیدان سنتزی BHT با یک گروه OH در این روش دارد.
- ساختار شیمیایی آنتی اکسیدان 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 نسبتا آهسته‌تر بوده و جذب به طور پیوسته در طول 90 دقیقه کاهش می‌یابد اما زمان انجام واکنش برای PG در حد متوسطی می‌باشد.
- نوع حلال مورد استفاده، پروتیک[1] به معنی حلال‌هایی که آمادگی اهداء الکترون دارند (مثل استون، بوتانول و ایزو پروپانول) و اپروتیک[2] حلال‌هایی که توانایی اهداء الکترون ندارند نیز در مقدار عددی ظرفیت آنتی اکسیدانی تاثیر دارد (Mishra *et al*., 2012; Chen *et al*., 2013; Sharma & Bhat, 2009).

- **روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترلکس یا روش TEAC**

یکی از روش‌های مشهور تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی است که این روش بر اساس رابیش رادیکال نسبتا پایدار سبز آبی ABTS[3] می‌باشد که به یک محصول بی‌رنگ تبدیل می‌شود شدت کاهش رنگ نشان دهنده مقدار رادیکال $ABTS^{\circ+}$ است که توسط آنتی اکسیدان‌ها 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 آنتی اکسیدان‌های 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 رابیش آنتی اکسیدانی نسبت به ترلکس است. روش TEAC به سه ترکیب شیمیایی $K_2S_2O_8$, ABTS, TROLOX, وابسته است

[1] Protic [2] Aprotic [3] 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)

jftn.srbiau.ac.ir

Mariken *et al*., 2003; Gliszynska- swiglo,) .(2006

ABTS ترکیب شیمیایی می‌باشد که برای مشاهده سینتیک یک آنزیم خاص کاربرد دارد. استفاده معمول این ماده در روش ELISA[1] است که برای تشخیص تبدیل مولکول‌ها به یکدیگر به کار می‌رود. این ماده معمولا به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز و اکسیدازهای چند مولکول مس دار[2] 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 ($K_2S_2O_8$، metmyoglobin و H2O2) گرمخانه گذاری می‌شود مولکول نسبتا پایدار سبز – آبی (ABTS+) تولید می‌شود (رابطه 8) رنگ ایجاد شده دارای حداکثر جذب در طول موج 600-700 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.

$$ABTS+ K_2S_2O_8 \rightarrow ABTS^{\circ+} \text{ (Blue Green)} + \text{Antioxidant} \rightarrow \text{Colorless} \quad (8)$$

عدد TEAC میلی مول غلظت ترلکس است که ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل یک میلی مولار از محلول ماده مورد بررسی را دارد (رابطه 9).

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

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

IC50 غلظت مورد نیاز آنتی اکسیدان برای مهار 50٪ رادیکال ABTS است که با رگرسیون خطی بدست می‌آید.

ابتدا منحنی جذب براساس غلظت در زمان‌های 1، 4 و 6 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*.,) .(2011; Van der Berg *et al*., 2000

– *مزایا و معایب روش TEAC*

این روش نسبتا 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

[1] Enzyme-linked Immunosorbent Assay

[2] Multi copper oxidase

jftn.srbiau.ac.ir

مولکول اکسیژن یک مولکول پایدار در زمین است که به وسیله آلوده کننده‌های محیطی، اشعه‌ها و مسیرهای اکسیداسیون احیا به آب، H_2O_2، O_2 و $^{\circ}OH$ تبدیل 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 کاملا 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 11 و 12 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.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\circ-} + HO^{-} \quad (11)$$

$$HOCl + O_2^{-} \rightarrow O_2 + Cl^{-} + HO^{\circ} \quad (12)$$

سرعت واکنش دوم از واکنش اول بالاتر می‌باشد. البته تجزیه HONOO نیز تولید رادیکال هیدروکسیل می‌نماید (رابطه 13).

$$HONOO \rightarrow NO2 + HO^{\circ} \quad (13)$$

رادیکال‌های هیدروکسیل تولیدی شدیدا واکنش پذیر بوده و با سرعت بالا ($k \sim 10^9$–10^{10} $M^{-1} \cdot s^{-1}$) با تمامی‌مولکول‌های اطراف مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها، نوکلئیک اسید و قندها وارد واکنش می‌شوند. از آنجایی که سرعت ترکیب مجدد رادیکال‌های هیدروکسیل نیز شدیدا بالاست ($k = 5 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$) در نتیجه غلظت حالت پایدار آن عملا صفر است (رابطه 14) (Tirzitis & Bartosz, 2010).

$$HO\bullet + \bullet OH \rightarrow H_2O_2 \quad (14)$$

در این روش بنزوئیک اسید یا محلول 2- داکسی- 2- ریبوز[1] به عنوان منبع تولید کننده فلوئورسنس استفاده می‌شود. رادیکال آزاد تولیدی با مواد تولید کننده فلوئورسنس وارد واکنش شده و شدت تابش آن را کاهش می‌دهد. چنانچه در محیط آنتی اکسیدان وجود داشته باشد این تغییرات را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از این خاصیت جهت تعیین ظرفیت مهارکنندگی آنتی اکسیدان استفاده می‌شود (Nishikimi *et al*., 1972; Mandel *et al*., 2009).

ظرفیت مهار کنندکی رایکال هیدروکسیل بر اساس رابطه 15 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_O شدت فلوئورسنس در Em=470nm,[2] Ex=350nm[3] بدون هیچ تیمار، FI_C شدت فلوئورسنسی در Em=470nm, Ex=350nm کنترل، و FI_S شدت فلوئورسنس 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 آنتی اکسیدانی نمونه‌ها در وب سایت وزارت کشاورزی آمریکا (USDA) استفاده شده است، اما در سال 2012 این روش از لحاظ زیستی نا

[1] Deoxy- 2- Ribose
[2] Extinction
[3] Emission

jfn.srbiau.ac.ir

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 انسان نمی‌گذارد. تعداد زیادی ترکیبات زیست فعال وجود دارد که از لحاظ تئوری مانع از بیماری‌هایی مانند سرطان‌ها، بیماری‌های روده، آلزایمر و دیابت می‌شود اما الگوی سوخت و سازی آنها هنوز ناشناخته بوده و ساز و کار غیر آنتی اکسیدانی بازی می‌کند اما همچنان عددORAC بوسیله کارخانجات مواد غذایی و مکمل‌های خوراکی برای بهبود بخشیدن محصولات غذایی خود و کمک به انتخاب مردم استفاده می‌شود (Kevers *et al*., 2013; www.usda.org).

روش ORAC درجه ممانعت کنندگی از رادیکال آزاد پروکسی تولید شده بوسیله اکسیداسیون ترکیبات شیمیایی می‌باشد، عدد ORAC اندازه گرفته شده که معادل ترلکس می‌باشد هم زمان ممانعت کنندگی و وسعت ممانعت کنندگی از اکسیداسیون را نشان می‌دهد، در کنار ORAC روش‌هایی مانند FRAP وTEAC نیز می‌تواند مفید باشد. باتوجه به اینکه شواهد کافی وجود ندارد تا بتوان مزایای غذاهای سرشار از پلی‌فنل را به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داد پس نمی‌توان توانایی آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی را به شرایط داخل بدن تعمیم داد.

ملکول‌های آنتی اکسیدان‌ها در مواد غذایی طیف وسیعی از عملکرد را دارند که یکی از آنها می‌تواند توانایشان در جذب رایکال آزاد باشد، به این ترتیب اولویت USDA استفاده از روش‌های FRAP وTEAC و محتوای کل ترکیبات فنلی می‌باشد.

اساس این روش یک ماده فلوئورسنس مانند فلورسین و بتا فیکواریترین[1] است که با مخلوط کردن ماده تولید کننده رایکال آزاد و آغازگری مثل آزو $(R - N° = N - R)$، ترکیبی ایجاد می‌شود که با حرارت دادن تولید رایکال پراوکسی می‌نماید که به مولکول فلوئورسنس آسیب می‌رساند و در نتیجه باعث کاهش شدت فلوئورسنس می‌گردد (رابطه 16). حضور مولکول‌های آنتی‌اکسیدان باعث حفاظت از مولکول فلوئورسنس در مقابل اکسیداسیون می‌گردد. درجه محافظت را با دستگاه اندازه‌گیری شدت فلوئورسنس بدست می‌آورند. کاهش شدت فلوئورسنس 35 دقیقه بعد از اضافه کردن مولکول آزو که در بیشتر مواقع AAPH یا 2و2- آزوبیس (2- آمیدینو- پروپان) دی هیدروکلراید[2] است اندازه‌گیری می‌گردد (Tijerina, Saenz *et al*., 2009; Huang *et al*., 2010).

$$\text{fluorescein} \xrightarrow{\text{AAPH} \quad \text{ROO}^{\bullet}} \text{non-fluorescent product} \qquad (16)$$

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

به این ترتیب که ابتدا منحنی کالیبراسون ترلکس را محاسبه کرده و از رابطه 17 TE محاسبه می‌شود.

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

و یا می‌توان از رسم نمودار مقدار فلوئورسنس نسبی استاندارد در زمان‌های مختلف سطح زیر منحنی را برای هر یک از غلظت‌های استاندارد تعیین نمود (رابطه 18).

$$AUC = 1 + RFU1/RFU0 + RFU2/RFU0 + RFU3/RFU0 + \ldots\ldots + RFU59/RFU0 + RFU60/RFU0 \qquad (18)$$

RFU0 = مقدار فلوئوروسنسی نسبی در زمان صفر

RFUx = مقدار فلوئوروسنسی نسبی در زمان صفر

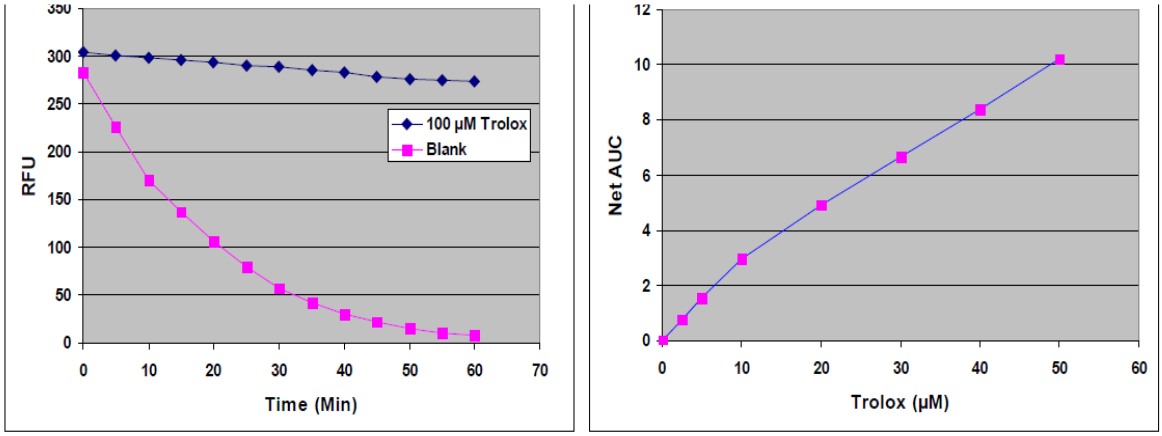
می‌توان سطح زیر منحنی را برای هر کدام از غلظت‌ها تعیین نمود و با کمک آن نمودار Net AUC یا سطح زیر منحنی خالص برحسب میلی مولار غلظت ترلکس رسم نمود که با کمک نمودار بدست آمده می‌توان غلظت معادل

[1] Beta-phycoerythrin

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

jftn.srbiau.ac.ir

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 می‌شود (رابطه 19).



شکل2- منحنی استاندارد روش ORAC

$$\text{Net AUC} = \text{AUC (Antioxidant)} - \text{AUC (blank)} \quad (19)$$

(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 آنتی اکسیدانی در نظر گرفته می‌شود. مخصوصا 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:

1- ظرفیت آنتی اکسیدانی فقط در مقابل رادیکال خاص پراکسی اندازه گرفته می‌شود.

2- تشکیل رادیکال پراکسی هیچگاه تایید نشده است.

3- هیچ مدرکی از شرکت رادیکال آزاد در واکنش وجود ندارد.

4- 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 ORAC برای مواد غذایی سبب شد که از سال 2012 این مقادیر نا معتبر اعلام گردند. لازم به ذکر است که FDA[1] و EFSA[2] بجز ویتامین‌های آنتی اکسیدانی مثل ویتامین آ، ویتامین سی و ویتامین ای سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را بعنوان آنتی اکسیدان موثر داخل بدن قبول نداشته و طبق تصمیم این سازمان‌ها سایر مواد که در مقیاس آزمایشگاهی ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی خون بعد از مصرف غذاهای حاوی پلی فنل‌ها با ORAC بالا مستقیما بدلیل پلی فنل‌ها نبوده بلکه در نتیجه افزایش اسید اوریک حاصل از سوخت و ساز فلاوونوئیدها 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

[1] Food & Drug Administration

[2] European Food Safety Authority

jftn.srbiau.ac

توجه نمود که واحدها و مواد غذایی مشابه باشد. مثلا گروهی عدد ORAC را برای هرگرم 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، مثلا با اینکه کشمش دارای 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 آنتی‌اکسیدانی 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 فلوئورسنس پروتئین آر فیکواریترین[1] R- phycoerythrin (R-Pe) 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 آنتی‌اکسیدان‌ها در پلاسما زمان آغاز [illegible]

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 مثلا 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 سریعا 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 1992 اصلاحیه ای بر روی روش TRAP انجام شد به این ترتیب که رادیکال‌های پراکسید تولید شده از AAPH باعث اکسید شدن لامینول[2] (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)[3] اندازه گیری می‌شود و از روی مقایسه مقدار نور ساطع شده ترلکس استاندارد ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسمای خون اندازه گیری می‌شود (Pryor, 2001; Wayner *et al*., 1985).

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

[2] luminol ماده شیمیایی است که وقتی با مواد اکسید کننده مناسب در حضور کاتالیزور واکنش می‌دهد نور آبی ساطع می کند به این ترتیب که رادیکال آزاد الکترون را از ترازهای انرژی پایین‌تر luminol جدا می کند، 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. اصطلاحا به نور ساطع شده chemiluminescent می‌گویند.

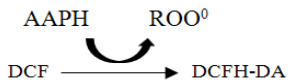
[3] دستگاهی جهت اندازه‌گیری شدت نور و خصوصیات اپتیکی سطوح مختلف می‌باشد که می تواند chemiluminescent، فلورسنس، بازتاب نور و پراکندگی نور را اندازه گیرد.

[4] 2',7'-dichlorfl uorescein-diacetate

[5] 2',7'-dichlorfl uorescein

jfn.srbiau.ac.ir

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[4] به عنوان سوبسترای قابل اکسید شدن استفاده می‌شود زمانی که DCFH-DA با رادیکال هیدروکسیل اکسید می‌شود به ماده (DCF)[5] تبدیل شده که این ماده به شدت در طول موج (Ex=480nm, Em=526nm) فلوئورسنس 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 20). در این روش تشکیل فلوروسنس یا جذب DCF شامل چهار مرحله است. ابتدا مرحله کمون، که به دلیل وجود آنتی اکسیدان در نمونه می‌باشد بعد از مصرف آنتی اکسیدان‌ها 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).



(20)

- مزایا و معایب

این روش را می‌توان جهت ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم و یا پلاسما (به طور کلی شرایط داخل بدن) بکار برد و میزان ظرفیت آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی‌مانند گلوتاتیون 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 نسبتا پیچیده و زمان بر بوده و علاوه بر این اجرای آن نیاز به تخصص و تجربه دارد (Badarinath *et al*., 2010).

- روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس رنگبری بتا کاروتن و کروسین[1]

این روش به منظور بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی یا پراکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی کاربرد دارد. روش رنگبری بتاکاروتن (Marco, 1968) و کروسین[2] (Bors & Saran, 1984) به ترتیب برای محیط‌های چربی 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 کروسین 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 460 نانو متر) حضور آنتی اکسیدان‌ها مانع از بی رنگ شدن می‌گردد یا حداقل بی‌رنگ شدن را به تاخیر می‌اندازد (رابطه 21) (Prior *et al*., 2005). به این ترتیب با استفاده از یک استاندارد مناسب می‌توان ظرفیت آنتی اکسیدانی محیط را اندازه‌گیری نمود (Laguerre *et al*., 2007). نتایج این روش به صورت نیم عمر سوبسترا بیان می‌شود نیم عمر سوبسترا به معنی زمان مورد نیاز برای اکسید شدن 50 درصدی سوبسترا یا همان کاروتن و کروسین می‌باشد که این زمان را از روی نمودار شدت جذب، جایی که جذب سوبسترا به 50 درصد مقدار اولیه می‌رسد محاسبه می‌نمایند. زمانی که هر دو ماده رنگی با هم و همزمان به نمونه مورد بررسی اضافه شود (روش CCB[3]) می‌توان ظرفیت آنتی اکسیدان‌های 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 مثلا این روش را می‌توان برای بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی انواع چای (Prieto Lage *et al*., 2013)، قهوه (Daglia *et al*., 2012) و ... استفاده نمود.

[2] Crocin (Crocetin di-gentiobiose ester)
یکی از ترکیبات جدا شده از زعفران است که باعث ایجاد رنگ قرمز می‌شود این رنگدانه به خانواده کاروتنوئید ها تعلق دارد که محلول در آب است.

[1] β-carotene and crocin bleaching reactions
[3] Carotene Combined Bleaching (CCB) assay
[4] Super Oxide Scavenging Activity Assay

jftn.srbiau.ac.ir

$$B-Carotene\ or\ Crocin \xrightarrow{\text{Oxidation}} \text{Colorless } Product \quad (21)$$

- 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 [4]

اکسیدان‌های ابدوست 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 دی متیل 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 سوبسترای زرد رنگNBT (نیترو بلو تترا زول)[1] وجود دارد که در اثر واکنش با رادیکال‌های آزاد به ماده آبی رنگ فورمازان[2] تبدیل می‌شود که می‌توان تغییرات رنگ را در 560 نانومتر اندازه گیری نمود (رابطه22). نتایج به صورت درصد مهار کنندگی رادیکال سوپراکسید به وسیله عصاره و استاندارد از طریق رابطه 23 بدست می‌آید (Uddin Talukder *et al*., 2013).

$$NBT\ (\text{yellow color}) \xrightarrow{O^{\circ 2}} Formazanolor\ (\text{blue color}) \quad (22)$$

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

رادیکال سوپراکسید $O^{\circ 2-}$ با انتقال یک تک الکترون از آنزیم‌های اکسیداسیون احیاء به مولکول اکسیژن ایجاد می‌شود که در سلول‌های زنده دارای عمر کوتاهی می‌باشد زیرا سریعا 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[3] 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 (Pascul *et al*., 1992) ، تولید شیمیایی رادیکال پراکسید (Flohe & Otting, 1984) و شناساگرهای جدیدی مانند NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971) و NBD-Cl (Olojo *et al*., 2005) است.

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

- 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 آنتی اکسیدانی در محیط‌های چربی دوست مفید واقع شود.

سایر روش‌ها

- روش‌های سریع اندازه گیری 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 آنتی اکسیدانی 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

[3] Ferricytochorome [4] Active Oxygen Method (AOM)

jftn.srbiau.ac.ir

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[4]

اکسیژن فعال با روغن است. روش کار به این صورت است که مقداری روغن داخل محفظه‌ای که دمای آن 97 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 mEq/kg 100 (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 AOCS (Cd 12-57) حداقل سه تیتراسیون برای هر نمونه مورد نیاز است. نتایج ممکن است انحراف معیاری در حدود ٪ 13/4 ± یا حداکثر انحراف بین آزمایشگاه‌های مختلف بین 25 ± ساعت در هر 100 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[۲]

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 می‌بینند، 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 سیلوستر

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 اندازه گیری اکسیژن مصرفی معمولا یکی از سه روش وزن سنجی، اندازه گیری 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 انالیز گرماسنجی افتراقی[۳]

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 اندازه گیری‌ها 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

[1] Nitro Blue Tetrazolium [2] Formazan
[2] DSC(Deferential Scanning Calorimeter)

[1] Oil Stability Index (OSI)

jftn.srbiau.ac.ir

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، (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)

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

2- مقاومت اکسایشی روغن و تعیین زمان مقاومت و فعالیت آنتی اکسیدان‌ها (Gardette *et al*., 2013; Tan & Che Man, 1999).

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

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

- مقاومت اکسایشی روغن و تعیین زمان مقاومت و ظرفیت آنتی اکسیدان‌ها:

زمانی که افزایش شدیدی در اکسیداسیون روغن رخ می‌دهد نشان دهنده پایداری اکسایشی روغن[1] 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 گرمازای سریع رخ می‌دهد به این ترتیب این روش می‌تواند برای تعیین ظرفیت اکسایشی در دماهای 130،120،110 و 140 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 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 3 تا 5 گرم از نمونه در جایگاه خاص آن ریخته سرعت گاز اکسیژن 15 دسی متر معکب در ساعت و سرعت گرم کردن 2 تا 20 درجه کلوین در دقیقه برای افزایش دما از 40 تا 350 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 10 درجه دما زمان مقاومت تقریبا 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 آنتی اکسیدان را بر اساس رابطه 24 تعیین نمود (Cerná *et al*., 2012; Pomerantsev & Rodionova, 2005).

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

jftn.srbiau.ac.ir

معمولا 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 تری گلیسرید (96 تا99٪) ساخته شده است. زمانیکه در معرض شرایط

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 دمای80°C بالا برده می‌شود و به مدت 5 دقیقه در این دما نگهداشته می‌شود تا تمامی‌هسته‌های بلور از بین رود سپس سریعا با سرعت ثابت تا دمای 30°C– خنک شده و 5 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 گرمازای بلورینه شدن را نشان می‌دهد. زمانی که روغن فاسدتر شده باشد پیک بلورینه شدن به سمت دماهای پائین‌تر جابجا شده و شدیدا 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 آنتی اکسیدانی 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.

یکی از روش‌های اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی روش Folin- Ciocalteu می‌باشد که اولین بار در سال 1927 مطرح گردید. معرف Folin- Ciocalteu مخلوطی از فسفومولیبدات و فسفوتنگستیک اسید می‌باشد که بر مبنای رنگ سنجی عمل می‌کند که می‌تواند مقدار کل ترکیبات فنولی محیط را اندازه گیری 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، اسکوبیک 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 اکسنده 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 725 نانومتر بیشترین میزان جذب را نشان می‌دهد.از آنجایی که بسیاری از بافرها و عوامل چیلیت 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

[1] Induction Period

jftn.srbiau.ac.ir

نتیجه نهایی بصورت معادل گالیک اسید برحسب میلی‌گرم در 100 گرم وزن خشک ماده بیان می‌شود Obied *et al*., 2007;) (Mediana, 2011.

همانطور که قبلا نیز اشاره شده است موادی مثل آنتی اکسیدان‌های 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).

روش سریع BB[1] 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 Diazoniun میباشد که با گروه‌های OH ترکیبات فنولی وارد واکنش می‌شود معمولا این زوج شدن در موقعیت پارا ترکیبات فنولی انجام می‌شود مگر اینکه این موقعیت قبلا 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 420 نانومتر، زمان واکنش 60 دقیقه و ترکیب قلیایی 6٪ سود و حلال اتانول 70٪ می‌باشد. مقدار معادل گالیک اسید که با روش Fast BB گزارش شده است نسبت به روش Folin-Ciacoteu در چای و قهوه 2 تا 6 برابر می‌باشد در حالی که این اختلاف در آب میوه‌های غنی شده با ویتامین C و شربت ذرت به حد اقل مقدار خود یعنی 1 تا 4 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 اندازه گیری 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 شدیدا 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 هیچ گاه 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 کروسین علی رغم این که نیازمند دقت بالایی است اما می‌توان گفت که با توجه به خصوصیات آن بهتر است در برخی محصولات که همزمان [illegible] 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 اندازه گیری 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 DPPH، TEAC که از جمله متداول‌ترین روش‌ها در مقالات می‌باشد می‌توان گفت: روش DPPH فقط در محدوده pH 4 تا 8 عمل می‌کند در حالی که TEAC در محدوده pH 1 تا 8 کاربرد دارد. در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمامی پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها نشان داده‌اند که به pH وابسته هستند. زیرا اغلب پلی فنل‌هایی که مثلا 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 (Sosulski *et*

[1]

jftn.srbiau.ac.ir

al., 1982). رقت معرف کـه از اضـافه کـردن نمونـه بـه مخلوط واکنش دست می‌آید فاکتور اصـلی محـدود کننـده روش TEAC است (در این روش حداکثر رقت نمونـه بـه معرف به صورت حجمی‌حجمی‌می‌تواند یک به 10 باشـد.) نوع حلالی که در روش TEAC برای استخراج نمونه‌های جامد استفاده می‌شود در تعیین ظرفیت آنتی اکسـیدانی اثـر 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:

1- دامنه وسیعی از ترکیبـات آنتـی اکسـیدانی آزاد یـا متصل به ترکیبات دیگر را مـی‌تـوان بـدون وابسـتگی بـه قابلیت انحلالشان در حلال بررسی نمود.

2- [illegible]

[1] Fast Blue BB (4-benzoylamino-2,5-dimethoxy benzenediazonium ch

3- حـذف هـر نـوع اثـر سینرژیسـتی در میـان آنتـی اکسیدان‌های 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 آبگریز کاربردی می‌باشد و در اکثر مواقع نتایج بدست آمده از این روش همبستگی خوبی با روش‌هاس 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.

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. (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.,

fstbiau.ac.ir

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.

Chen, Z., Bertin, R. & Froldi, 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 styreneebutadiene 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, 6 2 5, 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-Martı, 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 Rajan, T. V. S. & Gnanaprakash, K. (2010). Review on in-vitro antioxidant methods: comparisions, 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.

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 dismotase 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.

jfn.srbiau.ac.ir

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. & Dommes, 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 pectrophotometry of AscorbicAcid in Serumor Plasmaby Use of AscorbateOxidase. 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 di&ra Blume. Internatinal journal of integrative biology, 7, 2, 80.

Marco, G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of the AmericanOil 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 erythrocuprein (hemocuprein). J.Biol. Chem, 244, pp. 6056.

Medina, M. B. (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. J O U R NA L O F F U N C T I ONA L F O O D S 3, 7 9 –8 7.

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

jfn.srbiau.ac.ir

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 peroxyl 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. & Hoult, 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). St&ardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods & dietary supplements. Agric. Food Chem. 53, 4290–4302.

Prieto Lage, M. Á., 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. &

ifrn.srbiau.ac.ir

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.

jfn.srbiau.ac.ir

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 peroxyl 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.

jfn.srbiau.ac.ir

jftn.srbiau.ac.ir