

DERLEME

Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler

Ebru Büyüktuncel¹

ÖZET: Bu makale, antioksidan aktivite ölçmek için kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler hakkında bilgi vermektedir. İdeal olarak, antioksidan aktivite hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle tayin edilmelidir. Fakat *in vivo* çalışmaların yüksek maliyeti nedeniyle çoğu ürün *in vitro* yöntemlerle değerlendirilir. Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) ve tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) olmak üzere iki gruba ayrılır. HAT mekanizmasına dayanan başlıca tayin yöntemleri oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC), toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP) ve karotenoid (krosin) ağartma yöntemi-dir. SET mekanizmasına dayanan başlıca tayin yöntemleri Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) yöntemi, Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit) eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ve Cu(II)'nin oksidan olarak kullanıldığı toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC)'dir.

ANAHTAR KELİMELER: Antioksidan kapasite, toplam fenolik içerik, hidrojen atomu transfer reaksiyonu, elektron transfer reaksiyonu

GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle reaktif oksijen ve nitrojen kaynaklı oksidatif stresin, kanser, diyabet, katarakt, romatoid artrit ve yaşlanma gibi çeşitli inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklarda rol oynadığı kanıtlanmıştır. Canlı sistemler, çeşitli nedenlerle (UV, kimyasal oksidantlar, hava kirliliği ya da endojen etkenler) aşırı miktarlarda üretilen serbest radikaller ile bu radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu endojen ve eksojen antioksidanlar arasında kurulu hassas bir dengeye sahiptirler. Bu dengenin oksidantlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu stres birçok hastalığın etyopatogenezinde önemli rol oynar. Bu bağlamda zaman zaman endojen antioksidanların (SOD, CAT, 6Px gibi enzimatik ve melatonin, bilirubin, ürik asit gibi non-enzimatik) yetersiz kaldığı durumlarda, organizmanın eksojen antioksidanlarla

desteklenmesi oksidatif stres oluşumunu önleyebilmektedir. Eksojen antioksidanlar ise çoğunlukla gıdalarla ve son yıllarda bazı preparatlarla alınabilen ve genellikle antioksidan sistemi doğrudan ya da dolaylı olarak destekleyen moleküllerdir. Bu noktada hem biyolojik materyallerdeki hem de gıdalardaki antioksidan etkili bileşenlerin miktar ve aktivite yönünden değerlendirilmesi son derece önemlidir (1). Antioksidanlar, gıdalarda veya vücutta, yükseltgenen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve oksidatif hasara sebep olan substratın oksidasyonunu büyük ölçüde geciktirir veya engellerler (2). Bu nedenle yiyecek ve biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan moleküllerin antioksidan aktivite etkisine artan bir ilgi vardır. Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbiri yerine kullanılırlar. Fakat farklı anlamlara sahiptirler. Aktivite, spesifik bir antioksidan ve

KURUM

¹İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

İLETİŞİM

Ebru Büyüktuncel

E-posta:

salih.a.buyuktuncel@inonu.edu.tr

Gönderilme:

02.01.2013

Revizyon:

01.02.2013

Kabul:

05.02.2013

oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalin miktarının ölçüsüdür. Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez (3).

Farklı antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki reaksiyonlar farklı hız sabitlerine sahiptir ve bu yüzden örneğin antioksidan kapasitesi farklı oksidanlarla değişir (4). Ölçümde kullanılan analitik metotlar ve analizin olduğu koşullar da aynı gıda türü için, farklı sonuçlara neden olabilir.

Bugüne kadar pek çok farklı teknikte *in vitro* ve *in vivo* antioksidan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir ve uygulanmaktadır. Bu derlemede yaygın olarak kullanılan "*in vitro*" antioksidan ölçüm teknikleri genel bir bakış açısıyla değerlendirilecektir.

ANTIOKSIDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri başlıca iki gruba ayrılabilir:

1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)
2. Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) (5, 6)

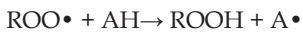
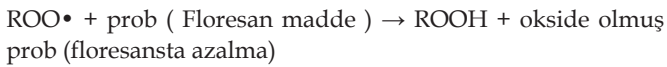
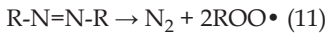
Üçüncü bir grup hem HAT hem de SET reaksiyon mekanizmalarını içerir (6).

Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar

HAT mekanizmasına dayanan tayinlerin çoğu yarışmalı reaksiyon kinetiğini izler ve kantitasyon kinetik eğrilerinden yapılır. HAT'a dayanan metotlar genellikle sentetik bir radikal üreticiden, yükseltgenabilir moleküler probdan ve bir antioksidan bileşikten oluşur. ORAC, TRAP gibi HAT-temelli metotlarda peroksil radikali ($ROO\cdot$) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. $ROO\cdot$ tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta $ROO\cdot$ ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir (5, 7)

Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC)

ORAC yöntemi başlangıçta Ghiselli ve arkadaşları (8) ve Glazer (9) tarafından çalışılmıştır. Daha sonra Cao ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (10). ORAC peroksil radikalinin antioksidan inhibisyonunu ölçer. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girer.

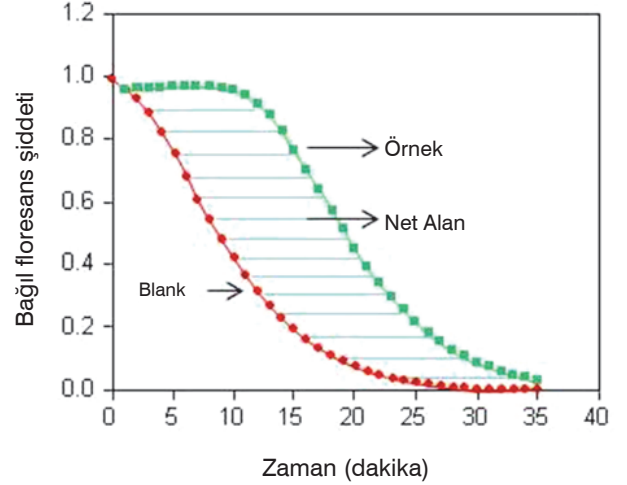


AH: H donör (serbest radikalleri hidrojen vererek gideren antioksidan)

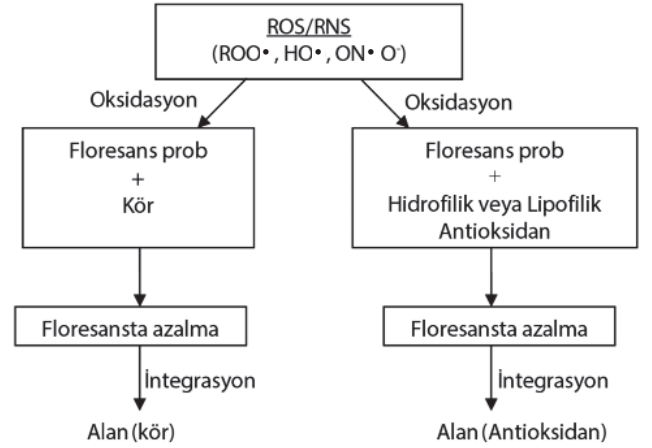
Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integrale edilmiş net alandan yapılır (AUC) (Şekil 1).

$$[\text{Alan}_{\text{antioksidan}} - \text{Alan}_{\text{kör(antioksidan olmayan)}}]$$

Böylece peroksil radikalleri ile oksitlenen bir hedef molekülün bir antioksidan tarafından ne kadar korunduğu, hedef molekülün bozunması floresans takibi ile izlenerek bulunur (6).



ŞEKİL 1. ORAC yöntemiyle antioksidanın koruyucu etkisinin, floresans bozunma eğrisinin altındaki integrale edilmiş net alandan hesaplanması.

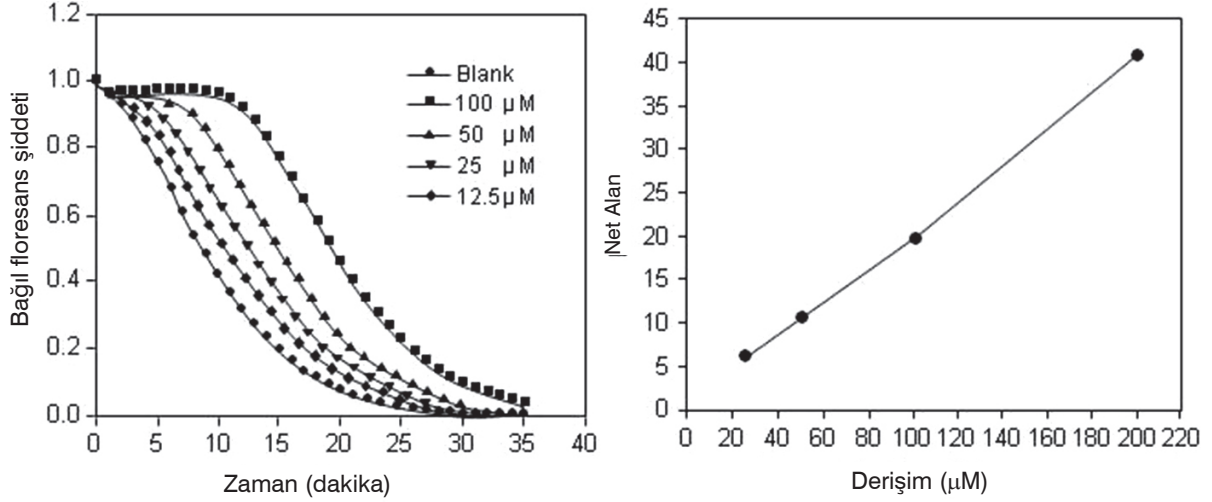


Antioksidan Kapasite = Alan (Antioksidan) - Alan (kör)

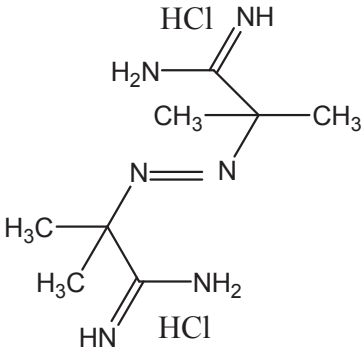
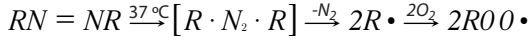
ŞEKİL 2. ORAC metodunun prensibinin şematik gösterimi (14).

ORAC değerleri genellikle Troloks eşdeğer olarak rapor edilir. Farklı derişimdeki Troloks standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilir (12). Numunenin Troloks eşdeğeri, Troloks derişimi (Y) (μM) ve floresans bozunma eğrisi altındaki net alan ($\text{Alan}_{\text{örnek}} - \text{Alan}_{\text{blank}}$) arasındaki doğrusal veya ikinci dereceden ilişki kullanılarak hesaplanır ($Y=a+bX$, doğrusal veya $Y=a+bX+cX^2$, ikinci dereceden).

Orijinal ORAC yönteminde, okside olabilir protein substratı olarak floresans özellik gösteren β -fikoeritrin (B-PE) ve peroksil radikallerini üretmek için 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) kullanılmıştır (10).



ŞEKİL 3. Farklı derişimdeki Troloks standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi



ŞEKİL 4. 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid'i (AAPH) moleküler yapısı.

Fakat ORAC metodunda B-PE kullanımının bazı dezavantajları vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir:

- 1) *Porphyridium cruentum*'dan izole edilen bir protein olan B-PE peroksil radikalleriyle reaksiyonunda çok fazla değişkenlik gösterir. Bu da sonuçlarda tutarsızlığa neden olur (13).
- 2) B-PE uyarma ışığına maruz kaldıktan sonra, fotokimyasal olarak bozunur.
- 3) Polifenoller, özellikle proantosiyanidinler, B-PE'ye nonspesifik olarak bağlanırlar.

Her iki durumda düşük ORAC değerlerine neden olur (5, 6). Bu problemleri çözmek için Ou, B-PE'yi floresein (FL) (3',6'-dihidroksispiro[isobenzofuran-1[3H], 9'[9H]-ksanten]-3-on) ile yer değiştirmiştir (7). FL sentetik protein olmayan bir probdur ve B-PE'nin limitasyonlarının üstesinden gelir. Genel olarak, numune, kontroller ve standart (bir standart eğri yapımı için dört ya da beş farklı konsantrasyonları ile Trolox) floresein çözeltisi ile karıştırılır ve AAPH çözeltisi reaksiyonu başlatmak için eklenmeden önce sabit sıcaklıkta (37 °C) inkübe edilir. Floresans şiddeti, 485 nm (uyarma)/525 nm (emisyon)

dalgaboyunda her 35 dakikada çevre koşulları altında (pH 7.4, 37 °C) ölçülür. Reaksiyon ilerledikçe FL tüketilir ve floresans şiddeti azalır. Antioksidanın varlığında FL bozunması engellenir (14).

Avantajları:

ORAC testi hidrofilik ve lipofilik ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçer. ORAC yöntemi kolayca otomatikleştirilir. 96 veya 48 kuyucuklu floresans mikropilaka okuyucu sistem ile birleştirilen robotik sekiz kanallı sıvı işleme sistemi kullanılarak, mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (14).

Dezavantajları:

ORAC reaksiyonu sıcaklığa duyarlı bir reaksiyon olduğundan, plaka boyunca sıcaklık kontrolü önemlidir. Küçük sıcaklık farklılıkları tekrar üretilebilirliği azaltır. AAPH eklenmeden önce reaksiyonun 37 °C'de inkübasyonu gün-içi değişkenliği azaltır (15). Uzun analiz zamanı (~1 saat) önemli bir eleştiri olmuştur. Fakat yüksek verimlilikte testlerin geliştirilmesiyle bu sınırlama giderilmiştir.

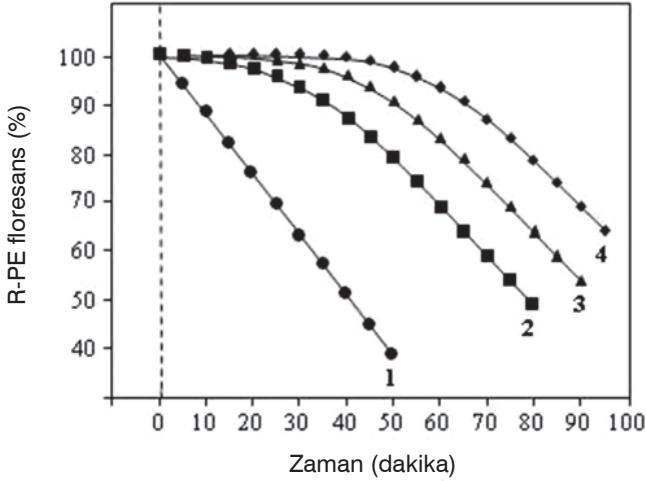
Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)

Orijinal TRAP yöntemi Wayner ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve çoğunlukla plazmanın antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır (16). Bu yöntem, bir azo bileşiğinin termal bozunmasıyla indüklenen kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi temeline dayanır. Wayner metodunda, çözünmüş oksijen tüketimi, lipid peroksidasyon hızının bir göstergesidir ve bundan dolayı plazmanın bu reaksiyonu engelleme kabiliyetinin dolaylı olarak ölçülmesidir. Plazmanın oksijen tüketimi üzerine geciktirme etkisi, bilinen miktarda troloksun geciktirme etkisiyle karşılaştırılır. Bu metod zaman alıcı bir metottür (örnek başına 2 saat) ve dolayısıyla günlük çalışılacak örnek sayısı sınırlıdır.

TRAP metodunda daha önemli bir problem, plazmanın yüksek oranda seyreltilmesinden kaynaklanır. Bu seyreltme yağ asitleri arasındaki reaksiyonun ilerlemesini zorlaştırır (17). Bu durumda TRAP değeri seyreltmeyle orantılı olarak artar.

Reaksiyon karışımına küçük bir miktar linoleik asit eklenmesiyle problemin üstesinden gelinmiştir.

Yöntemin geliştirilmesinden birkaç yıl sonra, DeLange ve arkadaşları, antioksidan kapasiteyi ölçmek için bir dış prob kullanmayı önermişlerdir (18). Bu metod R-fikoeritrini (R-PE) floresan prob olarak kullanmıştır. AAPH eklenmesiyle R-PE floresansı doğrusal olarak azalır. Plazma veya tek antioksidan eklenmesi, eklenen antioksidan miktarına bağlı olarak, floresandaki azalmayı geciktirir.



ŞEKİL 5. 5mM AAPH ile başlatılan oksidasyon reaksiyonunun kinetiği. Antioksidan olmadığında R-PE floresansında doğrusal azalma gözlenir. 4, 6 ve 8 mM troloks eklenmesi (sırasıyla 2,3 ve 4. numune), floresansın azalmasını, eklenen antioksidan miktarıyla orantılı olarak geciktirir.

R-PE ile AAPH reaksiyonunun ilerleyişi florimetrik olarak izlenir ($\lambda_{uyarma} = 495 \text{ nm}$ ve $\lambda_{emisyon} = 575 \text{ nm}$). Bilinmeyen bir numunenin Troloks eşdeğeri olarak antioksidan kapasitesi, (X), aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmiştir (8).

$$C_{\text{Troloks}}/T_{\text{Troloks}} = X/T_{\text{plazma}}$$

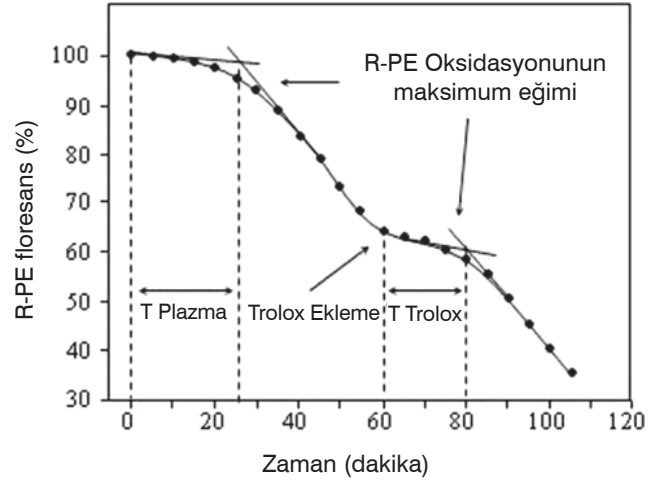
C_{Troloks} : Troloks derişimi

T_{Troloks} : Troloks varlığında R-PE kinetik eğrisinin gecikme zamanı

X: Plazmanın antioksidan kapasitesi

T_{plazma} : Plazma varlığında kinetik eğrisinin gecikme zamanı.

X daha sonra 2 ile (Troloksun stokiyometrik faktörü) ve örneğin seyreltme faktörüyle çarpılır ve TRAP değeri $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunur. T_{Troloks} 'u numunenin aynı kinetik eğrisinden elde etmek için, R-PE floresansı başlangıç değerinin yaklaşık %50'si olunca, Troloks reaksiyon karışımına eklenir. Reaksiyon, floresans azalma hızı, Troloks eklenmeden önceki seviyeye gelinceye kadar izlenir. T_{Troloks} ve T_{plazma} Troloks eklenmesi öncesi ve sonrasında, R-PE'nin maksimum oksidasyon eğrilerinin ekstrapole edilmesiyle hesaplanır (Şekil 5).



ŞEKİL 6. 5 mM AAPH ile başlatılan plazma ortamındaki R-PE oksidasyonunun kinetiği (Troloks eklenmeden önce ve eklendikten sonra).

Valkonen ve Kuusi, TRAP metodunu moleküler prob olarak diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) uygulayarak modifiye etmişlerdir (19). AAPH varlığında oluşan peroksil radikalleri ile DCFH-DA okside olur ve diklorofloresine (DCF) dönüşür. DCF yüksek floresans özellik gösteren bir bileşiktir ($\lambda_{uyarma} = 480 \text{ nm}$ ve $\lambda_{emisyon} = 526 \text{ nm}$) ve 504 nm'de absorbsansa da sahiptir. Bu yüzden meydana gelen DCF ya florimetrik olarak ya da spektrofotometrik olarak izlenebilir (20).

Avantajları:

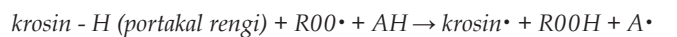
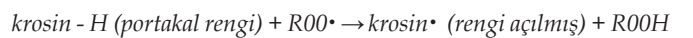
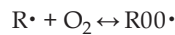
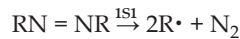
Serum veya plazma gibi biyolojik materyallerde antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılır, çünkü glutasyon, bilirubin, ürik asit ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların süpürücü aktivitesini ölçer (5).

Dezavantajları:

Karışık ve zaman alıcı bir yöntemdir. Ayrıca yüksek derecede uzmanlık ve deneyim gerektirir.

Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi

Karotenoidlerin otooksidasyon yoluyla renkleri açılır. Oksidasyon ışık veya ısı yoluyla (21) veya peroksil radikalleri ile (örneğin AAPH veya yükseltgeyici lipitler) başlatılır (22). Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren klasik antioksidanlar tarafından önlenemez veya azaltılabilir. Hedef olarak β -karoten sıklıkla kullanılmasına rağmen (21), β -karotenin 470 nm'de rengini kaybetmesi, birkaç yolla olabilir. Bu yüzden sonuçların yorumlanması zordur. Buna karşılık, ilk olarak Bors ve arkadaşları tarafından önerilen krosinin (23), yalnızca radikal oksidasyonu yoluyla rengi açılır. Bu nedenle β -karoten yerine tercih edilir.



Ursini ve arkadaşları bu metodu plazma antioksidan kapasitesinin tayininde uygulamışlardır (24). Deneysel olarak, reaksiyon 10 μM krosin ve bilinen miktarda antioksidan içeren 2 mL fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.0) hazırlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için radikal

başlatıcı AAPH (50 µL, 0.5 M) eklenmiştir. Renk açılması krosinin maksimum absorpsiyon yaptığı 443 nm dalgaboyunda ($\epsilon=1.33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 10 dakika boyunca spektrofotometrik olarak izlenmiştir. APFH eklendikten sonra krosinin ağarma hızı yaklaşık 1 dakika doğrusaldır. Antioksidanlar ağarmaya engel olur. Başlangıç krosin ağarma hızları antioksidan varlığında (V) ve yokluğundaki (V_0) kinetik eğrilerden elde edilir (25). V ve V_0 arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikle gösterilir.

$$\frac{V_0}{V} = 1 + \frac{k_{AH}}{k_C} \times \frac{[AH]}{[C]}$$

[AH] = antioksidan derişimi

[C] = krosin derişimi

k_{AH} = ROO• ile antioksidan reaksiyonu için hız sabiti

k_C = ROO• ile krosin reaksiyonu için hız sabiti

V_0/V 'ye karşı [AH]/[C] grafiği, eğimi k_{AH}/k_C olan ve bağlı peroksil radikal süpürme kapasitesini gösteren doğrusal bir eğri vermelidir. Plazma için, doğrusal eğri 0.79 eğimle elde edilmiştir. C vitamininin antioksidan kapasitesi 7.7 bulunmuştur. Vitamin C'nin Troloks eşdeğeri olarak hesaplanan ORAC değeri 0.95'dir (26).

Avantajları:

Krosin ağartma tekniği, mikropalakalar gibi yüksek işlem hacimli metodolojilere kolaylıkla adapte edilebilir. Bununla birlikte sıcaklık kontrolü kritiktir (27).

Dezavantajları:

Krosin ağartma tekniğinin, gıda örneklerinde uygulamaları sınırlıdır. ROO• ve fitokimyasallar arasındaki reaksiyon hız sabitleri büyük ölçüde değişebilir. Bazı fitokimyasalların reaksiyon hızları krosine benzerdir. Bu durumda, inhibe edilmiş ağartma hızları çok küçüktür ve metot antioksidanlardaki konsantrasyon değişimine duyarlı değildir. Krosin 450 nm'de absorpsiyon yapar ve karotenoid gibi pek çok meyve pigmenti ışığı aynı dalgaboyunda absorplar. Her bir örneğe girişimi önlemek için, yalnızca gıda örneği ve AAPH içeren bir karışım aynı zamanda denenmelidir (5). Krosin safrondan ekstrakte edilen bir doğal pigment karışımıdır ve çok çeşitlilik gösterir. Bu yüzden partiler arası (inter-batch) farklılık fazladır. Bu problemler metodun güvenilirliğini ve kantitatif endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlar (3).

Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

Spektrofotometrik ET-dayanan metotlar; bir reaksiyon karışımında iki bileşen içerir. Antioksidan ve oksidan. Oksidan antioksidandan bir elektron alır ve bu oksidanda renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır (5).

Oksidan + e-(antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan

Folin-Ciocalteu yöntemi (FC)

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosforungstik heteropoliasittir (3 H₂O.P₂O₅.13WO₃.5MoO₃.10 H₂O). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI) dir.

Mo(VI)(sarı) + e-(antioksidan) → Mo(V)(mavi)

FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (Örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, fenolik bileşiklere spesifik değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer (6). Fenolik bileşikler FCR ile yalnızca bazı koşullar altında reaksiyona girerler (Sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur. Fenolat ve FCR arasında oluşan mavi bileşikler, fenolik bileşiklerin yapısından bağımsızdır. Bu yüzden metal merkez ve fenolik bileşikler arasında koordinasyon bileşiği oluşma olasılığı göz ardı edilir (5).

Mavi renkli kompleks oluşumu 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir.

Avantajları:

FC yöntemi ile diğer elektron transferine dayanan metotlar arasında (örnek olarak, TEAC ve DPPH•) mükemmel doğrusal korelasyon olduğu belirlenmiştir (27). Magalhaes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, çok sayıda içeceğin (n=72) FC toplam indirgeyici kapasitesi TEAC metoduyla karşılaştırılmış; kırmızı şarap, bitki ve çay infüzyonları ve bira için iyi bir korelasyon (R>0.9) bulunmuştur (28). FC metodu ve ORAC metoduyla elde edilen antioksidan kapasite ölçümleri arasındaki ilişki genellikle iyidir (6). Bu korelasyonlar, gıda örneklerinde antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için, FC toplam indirgeyici kapasitesinin yararlılığını doğrulamaktadır.

FCR'nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FC yöntemi ile toplam fenol tayini güvenilir, basit ve tekrarlanabilir (5).

Dezavantajları:

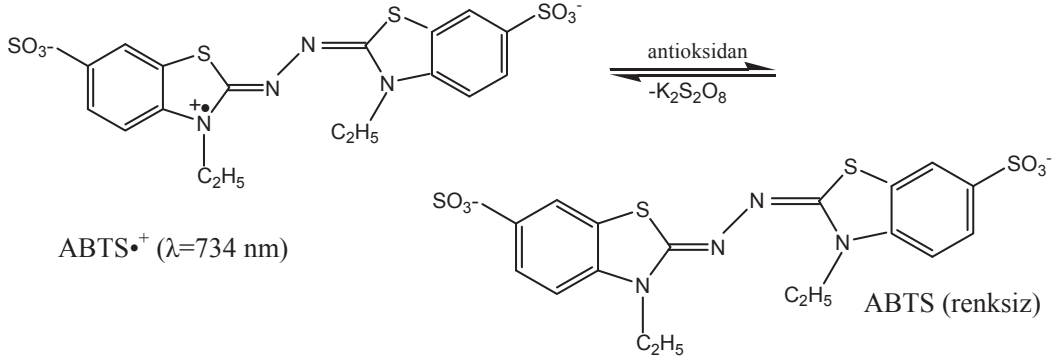
Çok sayıda makale önerilen gallik asit referans standardı yerine kateşin eşdeğeri (28), klorojenik asit eşdeğeri (29), kafeik asit eşdeğeri (30), protokateşinik asit eşdeğeri (31), vanilik asit eşdeğeri (32) kullanılarak hesaplama yapmışlardır. Metotların standardizasyon eksikliği tayin edilen fenollerde farklı değerler elde edilmesine neden olmaktadır. Son absorpsiyon değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısıyla orantılıdır ve molekülün yapısına bağlıdır. Eğer kalibrasyon için kullanılan standart madde yüksek reaktiflikte ise ve yüksek bir absorpsiyon veriyorsa, ölçülen numune değerleri düşük olacaktır. Örneğin, kafeik asitin (iki reaktif OH) absorpsiyon değeri, tek reaktif OH grubu olan bir fenolün absorpsiyonundan iki kat daha yüksek olacaktır (33). Şarap endüstrisinde, şarap fenoliklerinin ölçümü için metodun standart hale getirilmesi çabaları devam etmektedir (6).

Yöntemin zaman alması, rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için, lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır (34).

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)

TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve Rice-Evans tarafından 1993 yılında rapor edilmiştir (11). Re ve arkadaşları bu metodu geliştirmişlerdir (12). Geliştirilmiş yöntemde, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, ABTS•+ radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır.

Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Moleküllerin kararlı serbest

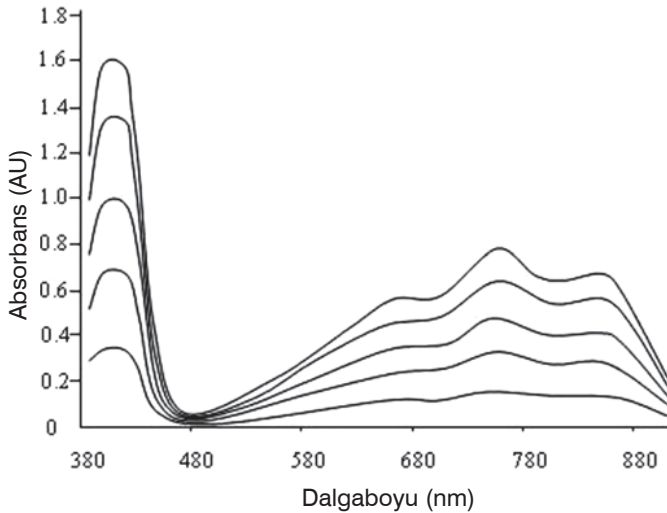


ŞEKİL 7. 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin persülfatla oksidasyonu

radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilir bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılması yapılır.

7 mM amonyum ABTS tuzu suda çözünür ve 2.45 mM potasyum persülfatla muamele edilir. Bu karışımın kullanılmadan önce oda sıcaklığında 12-16 saat beklemesi, koyu mavi renkli bir çözelti verir. Bu çözelti daha sonra, etanol veya tampon (pH 7.4) ile absorbanı 734 nm'de 0.7 olacak şekilde seyreltilir.

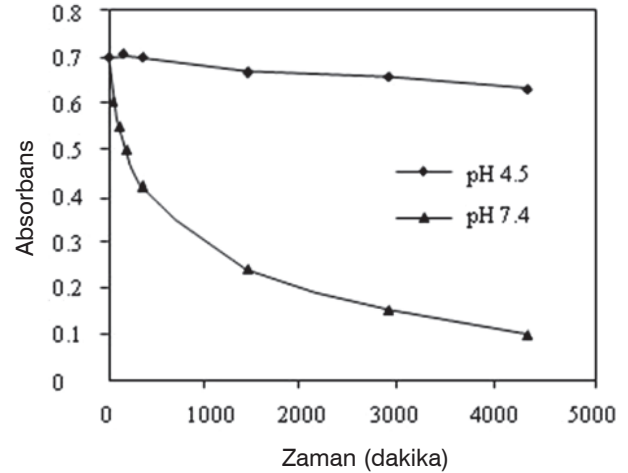
100 µL örnek 2.4 mL ABTS•⁺ çözeltisi ile karıştırılır ve 6 dakika oda sıcaklığında bekletme sonunda absorban ölçülür (35). Örneğin toplam radikal süpürme kapasitesi, Troloksun absorbanı azaltmasıyla ilişkili olarak hesaplanır. Sonuçlar gram örnek başına Troloks eşdeğer antioksidan kapasite cinsinden ifade edilir (TEAC/mg). Antioksidan ve oksidanlar arasındaki reaksiyon hız farklılıkları TEAC değerlerine yansımaz. Çünkü TEAC yöntemi bir bitiş noktası testidir (5).



ŞEKİL 8. ABTS radikal kationunun absorpsiyon spektrumu (36)

ABTS radikalinin absorpsiyon maksimumları λ_{maks} 415, 645, 734 ve 815 nm olarak gösterilmiştir (Şekil 7). ABTS•⁺ ve antioksidan arasındaki reaksiyonu izlemek için çoğu araştırmacı bunlar arasında 415 ve 734 nm'yi kullanmışlardır (37). Özgen ve arkadaşları meyvelerde antioksidan kapasite ölçümünü

ABTS metodunu modifiye ederek daha düşük pH'da yapmışlardır (38). Sodyum asetat ile hazırlanan pH 4.5 tamponu ölçümler için kararlı bir reaksiyon ortamı sağlamıştır.



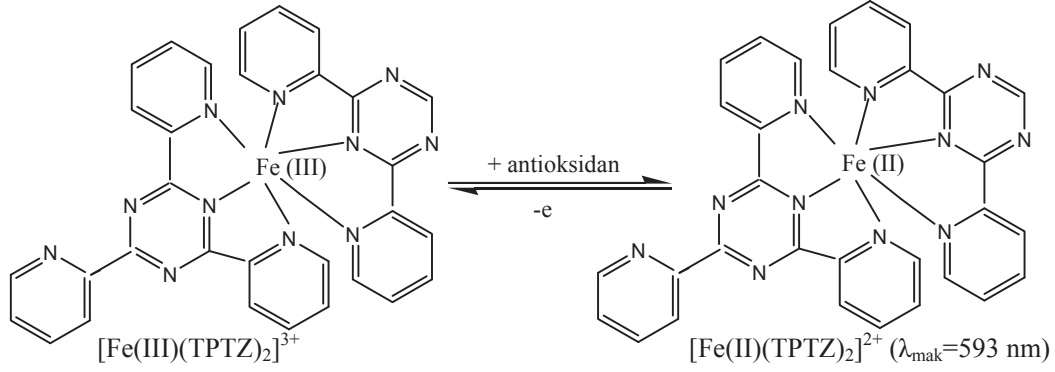
ŞEKİL 9. pH 4.5 ve pH 7.4'deki ABTS•⁺ çözeltisinin absorbanının zamana bağlı değişimi

Avantajları:

Uygulamasının kolay olması nedeniyle, TEAC yöntemi, pek çok araştırma laboratuvarında antioksidan kapasite çalışması için kullanılmıştır. ABTS radikali geniş bir pH aralığında kararlıdır. Bu yüzden antioksidan mekanizma üzerine pH etkisini çalışmak için kullanılabilir (39). ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir (40). Radikal düşük redoks potansiyeline sahiptir (0.68 V) ve nispeten daha düşük redoks potansiyelleri nedeniyle fenoliklerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için uygundur. Çoğu fenolik bileşik bu termodinamik özelliği nedeniyle, ABTS radikaliyle reaksiyona girebilir (40). TEAC reaksiyonları otomatikleştirilebilir ve mikropalakalara (41), sürekli akış sistemine adapte edilebilir (42).

Dezavantajları:

TEAC reaksiyonunun bitiş noktasına ulaşması uzun bir zaman alabilir. Böylece, kısa süreli bir bitiş noktasının kullanılması (4-6 dakika), reaksiyon tamamlanmadan önce okuma



ŞEKİL 10. Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II) formuna indirgenmesi

yapılmasına ve daha düşük TEAC değerleri bulunmasıyla sonuçlanabilir (6).

Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)

FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır. Burada Fe(III) tuzu, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır (43). Fe(III) tuzu redoks potansiyeli (~70 V) ABTS•⁺'nin redoks potansiyeli (0.68 V) ile benzerdir. Bu yüzden, TEAC ve FRAP yöntemleri arasında pek fark yoktur. TEAC yöntemi, nötral pH'da, FRAP yöntemi ise demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3.6) gerçekleştirilir. Düşük pH değerinde, Fe(III)-TPTZ kompleksi, Fe(II) formuna indirgenir (Şekil 7). Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir (44).

FRAP testi aşağıdaki işlemleri içerir:

FRAP testindeki oksidan; 10 mM 40 mM HCl içinde çözünmüş 2.5 mL TPTZ, 25 mL asetat tamponu ve 20 mM 2.5 mL FeCl₃. H₂O'nun karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım FRAP reaktifi olarak adlandırılır. Son çözelti 1.67 mM Fe(III) ve 0.83 mM TPTZ içerir.

FRAP sonuçları, analiz zamanına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Hızlı reaksiyon veren polifenoller, 4 dakika gibi kısa analiz zamanlarında tayin edilirler. Bununla birlikte, bazı polifenoller daha yavaş reaksiyon verirler ve tayin için daha uzun analiz süreleri gerektirirler (30 dakikadan birkaç saate kadar). Pulido ve arkadaşları, kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kersetin gibi polifenoller için absorpsiyon 593 nm'de yavaş yavaş arttığını saptamışlardır (45).

Avantajları:

Bu yöntem hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur. FRAP yönteminin en önemli avantajı, basitliği, hızı, ucuzluğu ve sağlamlığıdır. Özel bir ekipman gerektirmez. Otomatik, yarı-otomatik ve manuel metotlarla gerçekleştirilebilir (6).

Dezavantajları:

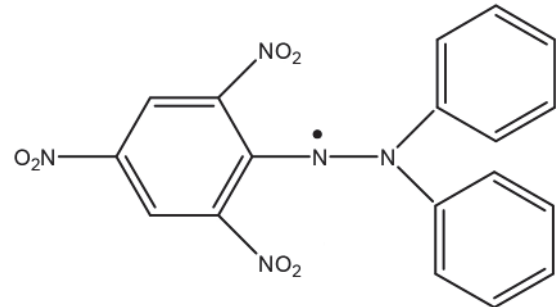
Bu reaksiyon spesifik değildir ve 0.70 V'dan daha düşük redoks potansiyeline sahip, *in vivo* olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir (46). Glutatyon gibi tiyol antioksidanlar FRAP yöntemiyle ölçülemezler (47). Bunun nedeni Fe(III)'ün, kimyasal olarak

inert olmasına neden olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir (48). Ayrıca diğer bir neden FRAP yöntemi ile fizyolojik olmayan pH'da çalışılmasıdır (49). Bu yöntem orijinal olarak plazmanın antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir, fakat daha sonra çay ve şarabın antioksidan kapasite tayininde kullanılmıştır (45). FRAP sonuçları analiz zaman ölçüğüne bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir.

Karışım gıda ekstraktındaki şelatlarla bağlanabilen diğer Fe(III) türlerini içeriyorsa, potansiyel problemler meydana gelir. Bu kompleksler antioksidanlarla reaksiyona girebilir. Sonuçlar FRAP değeri ve antioksidanın verdiği elektron sayıları arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir (3).

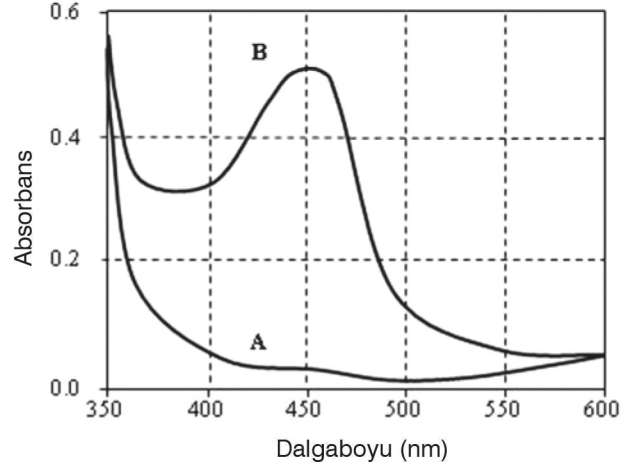
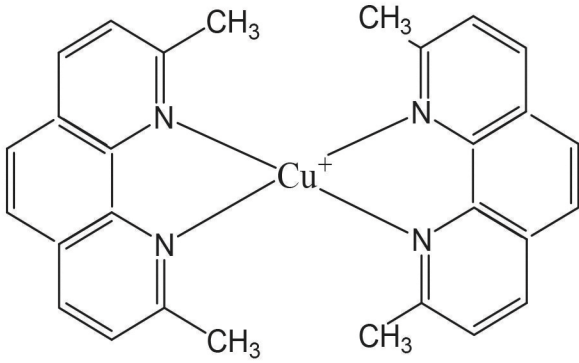
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi

DPPH• radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. UV-GB absorpsiyon maksimumu 515 nm'dir. Ticari olarak bulunur ve ABTS•⁺ radikali gibi deneyden önce hazırlanması zorunlu değildir (6). Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır.



ŞEKİL 11. DPPH radikali

Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma UV-GB spektrofotometresiyle ölçülür. Alternatif olarak, antioksidan indirgeme yeteneği, elektron spin rezonans ile de değerlendirilebilir. Metanolik DPPH çözeltisindeki daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının



ŞEKİL 12. Bakır(II) neokuproin [Cu(II)-Nc] kelatı ve A: [Cu(II)-Nc] ve B: [Cu(I)-Nc] kelatının absorpsiyon spektrumu (57)

absorbansında daha fazla düşme, dolayısıyla yüksek radikal süpürme kapasitesi demektir (50).

Uzun zamandan beri kullanılan renk giderme yöntemi ilk olarak Brand-Williams ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (51). Kalan DPPH yüzdesi, aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\%DPPH^*_{\text{kalan}} = 100 \times [DPPH^*_{\text{kalan}}] / [DPPH^*]_{t=0}$$

$\%DPPH^*_{\text{kalan}}$ antioksidan derişimiyle doğru orantılıdır. Başlangıç DPPH[•] derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim EC₅₀ olarak tanımlanır. EC₅₀ denge derişimine ulaşması için gerekli olan zaman, kinetik eğrilerden hesaplanır ve T_{EC50} olarak tanımlanır. Sanchez-Moreno ve arkadaşları, antioksidan bileşikleri, kinetik davranışına göre sınıflandırmışlardır (52).

T_{EC50} < 5 dak (hızlı)

T_{EC50} < 5-30 dak (orta)

T_{EC50} < 30 dak (yavaş)

Ayrıca antioksidan kapasiteyi ifade etmek için, antiradikal verim (AE) denilen başka bir parametre tanımlanmıştır. Antiradikal verim aşağıdaki şekilde bulunur:

$$AE = (1/EC_{50})T_{EC50}$$

Avantajları:

DPPH yöntemi basit ve hızlıdır. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir (49). Yalnızca UV-GB spektrofotometresine ihtiyaç duyar. Çok sayıda örnek analizi mikropilaka kullanılarak yapılabilir (53).

Dezavantajları:

DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır (54). Fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için geniş ölçüde kullanılmaktadır, fakat ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Metanol ve aseton içindeki DPPH'nin 517 nm'deki absorbansı ışık altında, 120 dakikalık süre boyunca %20 ve %35 azalmaktadır. Karanlıkta ise 150 dakika süre boyunca önemli bir değişim

olmadığı bulunmuştur (55). Yukarıda belirtildiği gibi çözücünün su içeriği antioksidan kapasitesini azaltan önemli bir sınırlamadır. Çünkü DPPH'nin bir kısmı koagüle olur ve antioksidanlarla kolay reaksiyona giremez (34). Bazı örnek bileşenleri, örneğin karotenoidler, DPPH'nin 515 nm'deki absorbans spektrumuyla çakışabilirler (56). DPPH, canlı organizmalarda bulunan radikallerin tersine, kararlı, uzun ömürlü bir azot radikalidir ve yüksek reaktiflikte, kısa ömürlü, lipid peroksidasyonunda rol alan peroksil radikallerine benzemez. Peroksil radikalleriyle hızlı reaksiyon veren çoğu antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir veya sterik engel nedeniyle DPPH'a karşı inert olabilir. Ayrıca DPPH ile öjenol reaksiyonunun tersinir olduğu rapor edilmiştir (5). Bu durum öjenol ve benzer yapıya sahip polifenollerin içeren numunenin antioksidan kapasitesinde düşük okumalara neden olur.

DPPH radikaline sterik ulaşabilme reaksiyonunun başlıca belirleyicisidir. Küçük moleküller radikale daha kolay ulaşabildiklerinden daha yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahiptirler (5).

Cu(II)'nin oksidan olarak kullanıldığı toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC)

Bu yöntem, bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi temeline dayanır. Apak ve arkadaşlarının (48) geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

Fenantrolin kompleksleri suda çok düşük çözünürlüğe sahiptirler ve %95'lik etanol gibi organik çözücülerde çözünmelidirler ve seyreltilmelidirler. Polifenoller için FRAP değerleri oldukça daha düşük iken, CUPRAC değerleri TEAC değerleriyle benzerdir.

Avantajları:

Bu reaktif seçicidir, çünkü fenantrolin veya tripiridiltriazin türü ligandlarla bağlı demire göre daha düşük redoks potansiyeline sahiptir. FRAP yönteminde girişime neden olan basit

şekerler ve sitrik asit, CUPRAC reaktifiyle okside olmaz (48). CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır. FRAP metodu canlı bitki ve hayvan hücrelerinin önemli düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşeni olan glutatyon gibi tiyol tipi antioksidanları ölçmez (7). Bunun nedeni Fe(III)'ün, kimyasal olarak inert olmasına neden olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir. Oysa Cu(II)'nin elektronik yapısı, hızlı kinetiğe imkan verir. Sisteinin Fe(III) ile indirgenme reaksiyonunun 1,10-fenantrolin varlığında yavaş ilerlediği rapor edilmiştir. Fakat bu reaksiyon katalizör olarak Cu(II) kullanılmasıyla hızlandırılmıştır (58). CUPRAC reaktifi, ABTS ve DPPH gibi, kromojenik radikal reaktiflerden daha kararlıdır ve daha kolay temin edilebilir. Renkli Cu(I)-Nc şelatı veren redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (48).

Dezavantajları:

CUPRAC yöntemi askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kersetin için birkaç dakika içinde tamamlanır, fakat daha kompleks moleküller için 30-60 dakika gereklidir. CUPRAC yönteminde kompleks antioksidan karışımında uygun reaksiyon zamanını seçme açısından problemlidir (6).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Başlıca spektrofotometrik antioksidan aktivite ölçüm yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. Farklı antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki reaksiyonların farklı hız sabitlerine sahip olması nedeniyle örneğin antioksidan kapasitesi farklı oksidanlarla değişir. Ölçümde kullanılan analitik metotlar ve analizinin olduğu koşullar da aynı gıda türü için, farklı sonuçlara neden olabilir.

ORAC reaksiyonu sıcaklığa duyarlı bir reaksiyon olduğundan, sıcaklık kontrolü önemlidir. TRAP serum veya plazmada *in vivo* antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılır, çünkü glutatyon, askorbik asit gibi enzimatik olmayan

antioksidanları ölçer. Krosinin karotenoid gibi pek çok meyve pigmentinin absorpsiyon yaptığı 450 nm'de absorpsiyon yapması ve safrandan ekstrakte edilen bir doğal pigment karışımı olması nedeniyle çok çeşitlilik göstermesi kantitatif endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır.

FC yönteminin zaman alıcı olması rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için, lipofilik bileşikler için uygulanmamaktadır. TEAC metotlarında kullanılan ABTS radikali geniş bir pH aralığında kararlıdır. Bu yüzden antioksidan mekanizma üzerine pH etkisini çalışmak için kullanılabilir. FRAP yöntemi ile fizyolojik olmayan pH'da çalışıldığından glutatyon gibi tiyol antioksidanlar bu yöntemle ölçülemezler. DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır. DPPH radikaline sterik ulaşabilme reaksiyonunun başlıca belirleyicisidir. Küçük moleküller radikale daha kolay ulaşacağından daha yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahiptirler. FRAP yönteminde girişime neden olan basit şekerler ve sitrik asit, CUPRAC reaktifinin daha düşük elektrot potansiyeline sahip olması nedeniyle bu reaktifle okside olmazlar. Ayrıca CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır.

Antioksidan kapasite tayinlerinde doğru yöntemi seçmek çok önemlidir. Antioksidanın hidrofilik veya lipofilik olması seçeceğimiz yöntemin belirlenmesinde önemli bir kriterdir. Bu makalede antioksidan kapasite yöntemleri sınıflandırılmıştır ve bunların sınırlamaları, güçlü tarafları, avantaj ve dezavantajları açıklanmıştır.

Bu yöntemlerde kullanılan radikallerin hiçbiri, biyolojik sistemlerde bulunmaz. Bu nedenle fizyolojik olmayan radikal kaynağını gösterirler.

Main spectrophotometric methods for the determination of total phenolic content and antioxidant capacity

ABSTRACT: This article gives the information regarding mainly spectrophotometric methods that used to measure antioxidant activity. Ideally, the antioxidant activity should be tested using both *in vitro* and *in vivo* techniques but due to the high cost of *in vivo* testing, many products are evaluated by *in vitro* testing. On the basis of chemical reactions mechanism, major antioxidant capacity assays can be divided into two categories: hydrogen atom transfer (HAT) reaction based assay and single electron transfer (SET) reaction based assay. HAT-based assays include Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Total Radical Trapping Antioxidant Paramater (TRAP) and Crocin Bleaching Assays. SET-based assays include the total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalence antioxidant capacity (TEAC), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay and total antioxidant potential assay using a Cu(II) complex as an oxidant (CUPRAC).

KEY WORDS: Antioxidant capacity, total phenolic content, hydrogen atom transfer reaction, electron transfer reaction

KAYNAKLAR

1. Prior RL, Cao G. Assessing antioxidant capacity in plant foods. *Free Radical Bio Med* 1999; 27: S11-S.
2. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res* 1999; 31:261-72.
3. MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agr* 2006; 86:2046-56.
4. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Bio Med* 2000; 29:1106-14.
5. Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 2005; 53:1841-56.
6. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* 2005; 53: 4290-302.
7. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem* 2001; 49:4619-26.
8. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferroluzzi A. A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic Bio Med* 1995; 18:29-36.
9. Glazer AN. Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. *Method Enzymol* 1990; 186:161-8.
10. Cao GH, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants. *Free Radic Bio Med* 1993; 14:303-11.
11. Niki E. Free-Radical Initiators as Source of Water-Soluble or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals. *Method Enzymol* 1990; 186:100-8.
12. Huang DJ, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agr Food Chem* 2002; 50:1815-21.
13. Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol* 1999;299:50-62.
14. Huang DJ, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agr Food Chem* 2002; 50:4437-44.
15. Prior RL, Hoang H, Gu LW, Wu XL, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang DJ, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agr Food Chem* 2003; 51:3273-9.
16. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human-Blood Plasma by Controlled Peroxidation - the Important Contribution Made by Plasma-Proteins. *Febs Lett* 1985; 187:33-7.
17. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The Relative Contributions of Vitamin-E, Urate, Ascorbate and Proteins to the Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Activity of Human-Blood Plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924:408-19.
18. Delange RJ, Glazer AN. Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Peroxy-Radicals - a Screen for Biologically Relevant Protective Agents. *Anal Biochem* 1989; 177:300-6.
19. Valkonen M, Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res* 1997; 38:823-33.
20. Hammes E, Hoffmann A, Plieth C, Hansen UP. Light-induced decrease in DCF fluorescence of wheat leaves in the presence of salicylhydroxamate. *Protoplasma* 2005; 227:11-5.
21. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agr Food Chem* 2001; 49:2774-9.
22. Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Bio Med* 1998; 25: 250-2.
23. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841-56.
24. Tubaro F, Ghiselli A, Rapuzzi P, Maiorino M, Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Bio Med* 1998; 24:1228-34.
25. Ordoudi SA, Tsimidou MZ. Crocin bleaching assay step by step: Observations and suggestions for an alternative validated protocol. *J Agr Food Chem* 2006; 54:1663-71.
26. Bowry VW, Ingold KU. The unexpected role of vitamin E (alpha-tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein. *Accounts Chem Res* 1999; 32:27-34.
27. Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem* 1999; 269:38-44.
28. Vinson JA, Su XH, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J Agr Food Chem* 2001; 49:5315-21.
29. Wang MF, Simon JE, Aviles IF, He K, Zheng QY, Tadmor Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agr Food Chem* 2003; 51:601-8.
30. Maranz S, Wiesman Z, Garti N. Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *J Agr Food Chem* 2003; 51:6268-73.
31. Cai R, Hettiarachchy NS, Jalaluddin A. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *J Agr Food Chem* 2003; 51:1623-7.
32. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agr Food Chem* 2003; 51:4442-9.
33. Stratil P, Klejdus B, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *J Agr Food Chem* 2006; 54:607-16.
34. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 2008; 613:1-19.

35. Erdogan S, Ates B, Durmaz G, Yilmaz I, Seckin T. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:1592-7.
36. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26:1231-7.
37. Cano A, Acosta M, Arnao MB. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep* 2000; 5:365-70.
38. Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J Agr Food Chem* 2006; 54:1151-7.
39. Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Bio Med* 2001; 31:869-81.
40. Osman AM, Wong KKY, Hill SJ, Fernyhough A. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochem Bioph Res Co* 2006; 340:597-603.
41. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37:112-9.
42. Buratti S, Pellegrini N, Brenna OV, Mannino S. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *J Agr Food Chem* 2001; 49:5136-41.
43. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-6.
44. Benzie IF. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* 1996; 29:111-6.
45. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 2000; 48:3396-402.
46. Nilsson J, Pillai D, Onning G, Persson C, Nilsson A, Akesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:239-46.
47. Ou BX, Huang DJ, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J Agr Food Chem* 2002; 50:3122-8.
48. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem* 2004; 52:7970-81.
49. Perez-Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Diaz-Rubio ME, Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 2008; 41:274-85.
50. Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules* 2010; 15:6905-30.
51. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci Technol-Leb* 1995; 28:25-30.
52. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agr* 1998; 76:270-6.
53. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agr Food Chem* 2000; 48:3597-604.
54. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech* 2000; 11:419-21.
55. Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 2003; 68:487-90.
56. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42:361-70.
57. Guclu K, Sozgen K, Tutem E, Ozyurek M, Apak R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta* 2005; 65:1226-32.
58. Teshima N, Katsumata H, Kurihara M, Sakai T, Kawashima T. Flow-injection determination of copper(II) based on its catalysis on the redox reaction of cysteine with iron(III) in the presence of 1,10-phenanthroline. *Talanta* 1999; 50:41-7.