j3009

การประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง

Total Antioxidant Capacity Assessments *in vitro*

ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย[1]

Patiwit Loypimai[1]

Received: 15 April 2011; Accepted: 2 June 2011

บทคัดย่อ

สารสกัดจากพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และสารแอนโทไซยานิน เป็นต้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ปัจจุบันการประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมของผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากพืชกำลังเป็นที่สนใจเพิ่มขึ้น วิธีที่ใช้ประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง แบ่งเป็น 2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาคือ (1) การประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลต่างๆ เป็นการวัดความสามารถต้านออกซิเดชันจากปริมาณของสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย เช่น วิธี FRAP, DPPH และ TEAC และ (2) การประเมินจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระวิธีนี้นิยมวัดความสามารถต้านออกซิเดชันในเลือด หรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระด้วยอะตอมไฮโดรเจน เช่น วิธี ORAC โดยทั่วไปความสามารถรวมต้านออกซิเดชันรวมของสารประกอบพืช ส่วนใหญ่จะเกิดทั้งสองกลไกควบคู่กันไปเสมอ บทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีต่างๆ ในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง

คำสำคัญ: ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อนุมูลอิสระ หลอดทดลอง

Abstract

Plant extracts mainly consist of phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids, and anthocyanins, which consist of the activity of antioxidation. Currently, the measurement of the antioxidant capacity of food plant products is a matter of growing interest. Total antioxidant capacity (TAC) assessments of plant extracts *in vitro* are basically classified into two mechanisms including (1) assessment based on electron transfer (ET) to the various free radicals, measuring the capacity of an antioxidant in the reduction of an antioxidant, which changes color solution when reduced. ET assays include the FRAP, DPPH, and TEAC methods, and (2) assessment based on hydrogen atom transfer (HAT) to the free radical, as a popular method used to evaluate the ability of antioxidants in the blood or plasma in the removal of free radicals by hydrogen atoms, such as ORAC. Normally, TAC of plant compounds mostly occurred to both ET and HAT mechanisms simultaneously. Therefore, this article aimed to compare various TAC assessments *in vitro.*

Keywords: antioxidant capacity, radicals, in vitro

---

[1] *อาจารย์, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, 1061 ซอยอิสรภาพ 15 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600, เบอร์โทร 080-1981693, อีเมลล์ Patiwit_loy@hotmail.com,*

[1] *Lecturer, Division of Food Science and Technology, Department of Applied Science, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajaphat University, 1061 Soi Isaraphab 15, Isaraphab Rd., Thonburi, Bangkok 10600 Thailand*

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัล (orbital) วงนอกสุด ที่มีระดับพลังงานสูงรวมถึงอะตอมไฮโดรเจน และอิออนโลหะทรานซิชัน[1] ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ และมีความสำคัญทางด้านชีวภาพ เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\cdot}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($OH_2^{\cdot}$)[2,3,4] อนุมูลเหล่านี้จะถูกยับยั้งด้วยสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลอื่นๆ โดยจะไปยับยั้งปฏิกิริยาขั้นต้น (initiation) หรือขั้นต่อเนื่อง (propagation) ของการออกซิไดซ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reactions)[1] นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันร่างกายมนุษย์จากโรคมะเร็งต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation)[5,6,7]

วิธีการประเมินหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชที่นำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารกำลังได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เพราะทำให้ข้อมูลที่ได้มีความหลากหลาย เช่น สภาวะทนต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน การกระจายตัวของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน หรือฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ที่มีอยู่แล้วภายในร่างกาย หรือได้รับจากการบริโภคอาหารที่ได้จากพืช[8] แนวคิดของวิธีการประเมินนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในสาขาวิชาเคมี ต่อมาได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านชีววิทยา การแพทย์ ระบาดวิทยา และทางโภชนาการ[9,10,11] มีงานวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาเพื่อประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมของผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ยังไม่มีวิธีประเมินที่เป็นทางการ โดยแนะนำไว้ว่าการประเมินฤทธิ์การต้านออกซิเดชันควรประเมินหลายๆ สภาวะทั้งมีขั้วหรือไม่มีขั้ว และเลือกใช้วิธีการประเมินที่มีกลไกแตกต่างกัน[10] ซึ่งวิธีการประเมินส่วนใหญ่เป็นการวัดจากค่าการดูดกลืนแสงหลังจากสารสกัดทำปฏิกิริยา (Spectrophotometric assay) วิธีการที่นิยมใช้ เช่น 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid(ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP)[12,13,14,15,16,17,18] เป็นต้น ในปี ค.ศ. 2007 Apak และคณะ[19] รายงานไว้ว่าวิธีที่ใช้ประเมินความสามารถต้านออกซิเดชัน ขึ้นอยู่กับกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (1) การประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระเป็นการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย เช่น วิธี FRAP DPPH และ TEAC และ (2) การประเมินจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมวัดหาความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในเลือด หรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระโดยให้อะตอมไฮโดรเจนเช่น วิธี ORAC และความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวม จะเกิดกลไกทั้งสองควบคู่กันไปเสมอ[1] เพื่อช่วยทำให้ผู้วิจัย เลือกวิธีการประเมินได้เหมาะสม และมีความเข้าใจกับผลการทดลองที่ได้ ดังนั้นการทำความเข้าใจกลไก และหลักการพื้นฐานจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น เพื่อใช้ประกอบในการตัดสินใจเลือกวิธีการประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลองได้ดียิ่งขึ้น

วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน ในหลอดทดลอง

1. วิธี Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC)

เป็นวิธีการวัดหาดัชนีความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวม ที่พัฒนาขึ้นโดย Cao และคณะ[9] โดยวัดความสามารถของสารที่ทดสอบในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radicals) ไม่ให้เข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยกลไกการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน โดยจะไปยับยั้งอนุมูลอิสระที่จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนจากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์เป็นสารไม่ให้สารฟลูออเลสเซนส์ ซึ่งปริมาณและความสามารถของสารทดสอบ จะแปรผันตรงกับสารฟลูออเลสเซนส์ วิธีนี้จะใช้สาร β-phycoerythrin (fluorescein) ซึ่งมีคุณสมบัติให้แสงฟลูออเลสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง หรือรังสีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สาร β-phycoerythrin จะถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ ทำให้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงเสียไป[1] (Figure 1)

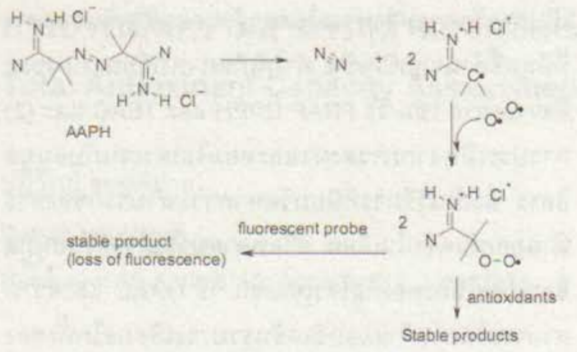


Figure 1 Reaction of the AAPH radical in the presence of the antioxidant compound during the ORAC assay (Zulueta และคณะ[20])

2. วิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

กลไกดัง Fig 2. เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS$^{\cdot+}$ ซึ่งเป็นสารที่มีสี เกิดจากการออกซิไดซ์โดยอนุมูลเปอร์ออกซี เมื่อเติมสารทดสอบลงไปยับยั้งอนุมูลจะทำให้สีสารละลายจางลง ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้จะคำนวณเป็นค่าคงที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลมาตรฐาน Trolox (วิตามินอีที่ละลายน้ำได้)[1, 20]

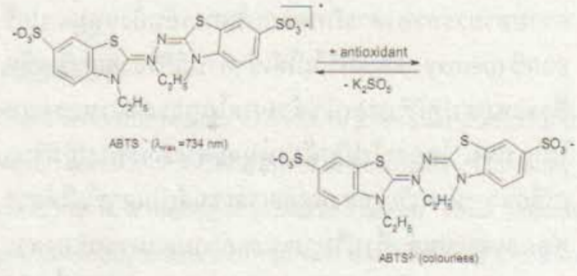


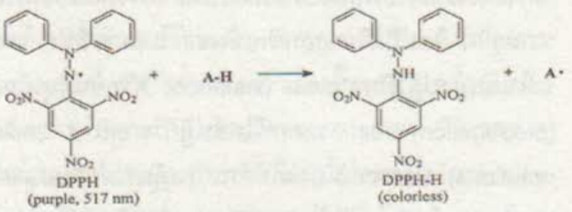
Figure 2 Reaction of the ABTS radical in the presence of the antioxidant compound during the TEAC assay (Zulueta และคณะ20)

3. วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธีนี้เป็นการใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบอะตอมของเหล็ก ซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyl triazine) ซึ่งสารสีน้ำเงินสารนี้จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร[1]

4. วิธี 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

อาศัยอนุมูลของสาร DPPH ที่มีสีม่วงที่อยู่ในรูปอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัวมาก ซึ่งไม่ต้องผ่านทำปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณี ABTS$^{\cdot+}$ โดยสารต้านออกซิเดชัน จะให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ช่วยให้สารนี้เสถียร (Fig 3.) จึงส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 หรือ 517 นาโนเมตร[1,21,22]



Scheme 1 - Structure of DPPH before and after reaction with antioxidant (AH)

Figure 3 Reaction of the DPPH radical in the presence of the antioxidant compound during the DPPH radical scavenging assay. (Halliwell และ Gutteridge22)

บทสรุป

วิธีการที่ใช้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง มีข้อดีและข้อเสียต่างกัน ดัง Table.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (1) การประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระต่างๆเช่น วิธี FRAP, DPPH, และ TEAC และ (2) การประเมินจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ เช่น วิธี ORAC ส่วนใหญ่จะเกิดทั้งสองกลไกควบคู่กันไปเสมอ และมีงานวิจัยของ Floegel และคณะ[10] รายงานไว้ว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันรวมของสารสกัดพืช 30 ชนิด โดยวิธี ABTS มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับวิธีDPPH (r=0.906) แต่อย่างไรก็ตาม สารในพืชที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว (Table. 2) ผลการทดลองที่ได้ในแต่ละวิธีจึงไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกัน[21] (Table. 3)

3 1 ก.ค. 2556

Table 1 Advantages and disadvantages of the ORAC, ABTS, FRAP and DPPH methods [1,19]

Methods	Mechanism	Advantages	Disadvantages
Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC)	HAT	-Uses biologically relevant free radicals - Standardized: allows for data comparison across laboratories - Integrates both degree and time of antioxidant reaction	- Normally requires use of expensive equipment - Data variability can be large across equipment - pH sensitive -Requires long time to quantify results
Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) /2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sul-fonicacid) (ABTS)	SET	-Inexpensive and easy to use -Stable to pH - Fast reaction	- Extra step to generate free radical from ABTS salt necessary -Generated free radical not stable for long periods of time - Not standardized, hence hard to compare values across laboratories
Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	SET	- Inexpensive and easy to use - Fast reaction	-Can not be measured hydrogen atom transfer (HAT) of antioxidant -Analysis of the mechanism is not related to the biological body (blood or plasma FRAP values to less than reality)
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging	SET	- Inexpensive and easy to use - Fast reaction	-Reducing agents can scavenged DPPH radicals to decrease absorbance value

HAT: Hydrogen atom transfer

Table 2 Major phenolic compounds and total antioxidant capacity of some selected fruits and vegetables

Fruits /Vegetables	Major phenolic compounds	Total antioxidant capacity assay			
		ORAC [19,23,24] (umolTE/100g Fw)	TEAC [11,19,23,25] (umolTE/100g Fw)	FRAP [11,19,23] (umolFe^{2+}/100g Fw)	DPPH [19,26] (umolTE/100g Fw)
Strawberry	Pelargonidin-3-glucoside Cinnamonyl glucose	2437±95 3577	2591±68 1134	3352±38 2800	3100
Orange	Hesperidin Narirutin Neohesperidin	1904±259 1814	849±25 874	1181±6 2050	600
Banana	Quercetin-3-glucoside/ conjugates	331±59 879	181±39 64	164±32 228	1100
Apple	5-Caffeoylquinic acid Rutin Quercetin-3-glucoside/ conjugates	560±18 2936	343±13 159	394±8 384	1400
Spinach	Flavonol conjugates Hydroxycinnamate conjugates	1655±115 2640	757±54 849	1009±35 2694	500
Broccoli	Hydroxycinnamate conjugates Flavonol conjugates	1335±62 1590	648±25 304	833±16 1167	600
Onion	Quercetin conjugates	988±30 1029	532±29 182	369±13 528	200
Tomato	-Chalconarigenin -5-Caffeoylquinic acid	420±39 460	255±14 165 160±60	344±7 512	200
Lettuce	-Quercetin conjugates -5-Caffeoylquinic acid	319±37 1550	171±12 133	124±7 494	150

Note: For the ORAC antioxidant capacities, the first values correspond to $ORAC_{\beta\text{-PE}}$ and second to $ORAC_{FL}$. The ORAC test using fluorescein (FL) probe has been reported in the literature to yield much higher values than the classical assay using β-phycoerythrin probe. The fruits and vegetable assayed were collected from different food markets, as indicated in the text.

Table 3 Spearmans-Rho coefficients for the correlation between antioxidant capacities measured by TEAC, DPPH, ORAC and FRAP assays of 50 US foods[**]

	TEAC	DPPH	ORAC	FRAP[a]
TEAC	1	0.949	0.593	0.917
DPPH	0.949	1	0.539	-
ORAC	0.539	0.539	1	-
FRAP[a]	0.917	-	-	1

Values were obtained from USDA ORAC database[10]

[a] Pellegrini and others[27]

** Correlation is significant at (p<0.001)

References

1. โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. "สารต้านอนุมูลอิสระ". พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ; โอเดียนสโตร์. 2549. p.11-74.
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. "Free radicals in biology and medicine". Fourth Edition; Oxford University Press; 1989. p 268-340.
3. Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara A.A., Algur O.F., Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta Desf Ex DC*), sage (*Salvia triloba L.*) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. Agric Food Chem 2000, 48: 5030–34.
4. Gulcin I., Oktay M.O., Kufrevioglu O.I., Aslan A. Determination of antioxidant activity of *lichen Cetraria islandica (L.)* Ach. Ethnopharmacology 2002, 79: 325–9.
5. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Agric Food Chem 1998, 46: 4113–17.
6. Pryor W.A. The antioxidant nutrient and disease prevention-what do we know and what do we need to find out. TJCN 1991, 53:391–3.
7. Kinsella J.E., Frankel E., German B. Kanner J. Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. Food Technology 1993, 47: 58–89.
8. Huang D., Ou B., Prior R.L.The chemistry behind antioxidant capacity assays. Agric Food Chem 2005, 53: 1841–56.
9. Cao G., Prior R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clin Chem 1998, 44: 1309-15.
10. Floegel A., Kim O.D., Chung J.S., Koo I.S., Chun K.O. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Food Compos Anal 2011.
11. Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oil consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. Nutr 2003, 133: 2812-19.
12. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT 1995, 28: 25-30.
13. Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Agric Food Chem 2002, 50: 3713-17.
14. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagam J.A.J., Deemer E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Agric Food Chem. 2002, 50: 3122-28.
15. 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: 1231-37.

16. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Food Compos Anal 2006, 19: 669-75.
17. van den Berg R., Haenen G.R., vander den Berg H., Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem 1999, 66: 511-17.
18. van den Berg R., van Vliet T., Broekmans W.M., Cnubben N.H., Vaes W.H., Roza L., Haenen G.R., Bast A., van der Berg H. A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. Nutr 2001, 131: 1714-22.
19. Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik E.S., Bektasoglu B., Berker I.K., Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assays. Molecules 2007, 12: 1496-47.
20. Zulueta A., Esteve J.M., Frigola A. ORAC and TEAC assays comparision to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 2009, 114: 310-16.
21. Dasgupta N., De B. Antioxidant activity of *Piper betle L.* leaf extract in vitro. Food Chem 2004, 88(2): 219-24.
22. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Agric Food Chem 2005, 53: 4290-02.
23. Proteggente A.R., Pannala A.S., Paganga G., van Buren L., Wagner E., Wiseman S., van de Put F., Dacombe C., Rice-Evans C.A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radic Res 2002 36: 217-3.
24. Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E. Prior R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. Agric Food Chem 2004, 52: 4026-37.
25. Pagana G., Miller N., Rice-Evans C.A. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? Free Radic Res 1999, 30:153-2.
26. Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. Am Coll Nutr 2000, 19: 312-9.
27. Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Daniele Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M.,Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different In vitro assays. Nutr 2003, 2812-19.