

Mateusz BORKOWSKI, Paweł PISZCZ, Bronisław K. GŁÓD*

Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii,
Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

*Autor do korespondencji, e-mail: bkgl@onet.eu

Właściwości antyoksydacyjne herbaty Matcha

Streszczenie: W ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie antyoksydantami i ich wpływem na organizm człowieka. Antyoksydanty są to związki występujące w małych stężeniach, które posiadają właściwości chroniące przed szkodliwym wpływem rodników. Rodniki są to atomy, cząsteczki lub jony posiadające przynajmniej jeden niesparowany elektron. Za miarę mocy antyoksydacyjnej związków uznaje się potencjał redoks lub stałą szybkości reakcji z rodnikami. Można je stosować tylko do czystych związków, do badania próbek rzeczywistych określa się sumaryczne właściwości antyoksydacyjne, definiowane jako Całkowity Potencjał Antyoksydacyjny (CPA). Celem pracy było wyznaczenie CPA dla herbaty Matcha i porównanie wyników z wybranymi produktami spożywczymi o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. CPA zostało zbadane spektrofotometrycznie, wykorzystując reakcję z rodnikiem DPPH, rodnikami peroksyłowymi generowanymi z rozpadu AAPH, ABTS^{•+}, odczynnikami Folina - Ciocalteu'a, oraz HPLC/RP z detekcją elektrochemiczną. Herbata Matcha posiada bardzo dużą ilość związków o charakterze antyoksydacyjnym. Wyniki otrzymane różnymi metodami różnią się od siebie. Jest to spowodowane różnicą w mocy użytych rodników.

Słowa kluczowe: całkowity potencjał antyoksydacyjny, antyoksydanty, wolne rodniki, herbata Matcha

Antioxidant properties of Matcha tea

Abstract: Free radicals play an important role in the functioning of living organisms. Most of them are very reactive. They are the reason, transition step, product or side-effect of many disease and aging. Free radicals are atoms, compounds or ions with the odd numbers of electrons, characterized by paramagnetic properties. Excess of the free radicals and/or oxidants are removed by the free radical scavengers and/or antioxidants. It turns out that the antioxidant properties of real samples are often better described by the, so called, total antioxidant potential (TAP). The aim of this work was the improvement of new methods for the determination of TAP and demonstrates their practical use in food research. Elaborated assays were used to test the antioxidative properties of food products such as tea Matcha. The results were compared with the standard photometric measurement based on ABTS^{•+}, DPPH, peroxy radicals and the total concentration of polyphenols in the sample.

Keywords: total antioxidant potential, free radicals, Matcha tea

1. Wstęp (Introduction)

W ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie antyoksydantami i ich wpływem na organizm człowieka. Antyoksydanty są to związki występujące w małym stężeniu, zdolne do usuwania wolnych rodników. Chronią one komórki organizmu przed szkodliwym wpływem wolnych rodników. Utlenianie związków, zaburzenie struktury związków wysokocząsteczkowych, takich jak białka, tłuszcze czy kwasy nukleinowe, powoduje zaburzenie struktury i funkcji organelli komórkowych. W szczególności dotyczy to błon komórkowych. Może spowodować to stan chorobowy, a nawet doprowadzić do śmierci organizmu. Aby mogło dojść do utleniania, do organizmu musi dostać się tlen. Jest on pobierany do płuc, gdzie wiąże się z hemoglobina występującą w czerwonych krwinkach, następnie zostaje przeniesiony do komórek, gdzie bierze udział w oddychaniu komórkowym. W każdej żywej komórce i jej otoczeniu, po dostarczeniu do niej tlenu, powstają reaktywne formy tlenu (RFT).

Antyoksydanty można podzielić ze względu na: polarność - antyoksydanty hydro- i lipofilowe; wielkość cząsteczek - niskocząsteczkowe (nieenzymatyczne) i enzymatyczne; miejsce wytwarzania – endogenne (dostarczane ze środowiska np. w postaci pożywienia) i egzogenne; krotność reakcji - "zużywalne" i odnawialne [1, 2].

Za miarę właściwości antyoksydacyjnych uznaje się potencjał redoks lub stałą szybkości reakcji antyoksydantów z rodnikami. Nie można ich zastosować do próbek rzeczywistych, często o nieznanym składzie, zawierających wiele związków różnej mocy i o różnym stężeniu. Dlatego wygodniej jest określić całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA). Oznaczając całkowity potencjał antyoksydacyjny, otrzymujemy informacje bardziej wiarygodne niż określając każdy ze składników oddzielnie [3]. Dzieje się tak, ponieważ w przypadku rzeczywistych próbek natrafiamy na zjawisko zwane synergizmem. Polega ono na interakcji między związkami o właściwościach antyoksydacyjnych zawartymi w próbkach, dzięki czemu dochodzi do wzrostu lub spadku mocy antyoksydacyjnej. Metody pomiaru CPA można podzielić na dwie grupy: metody bezpośrednie i pośrednie. Do metod bezpośrednich zaliczamy metody elektrochemiczne, np. potencjometrię i metody woltametryczne. Natomiast do metod pośrednich te polegające na reakcji trwałych lub wytworzonych rodników z próbką i detektorem (inaczej nazywanych pułapką spinową lub sensorem) [4, 5, 10].

W pracy wyznaczony został CPA herbaty Matchy oraz innych produktów spożywczych uważanych za „dobre” źródło antyoksydantów. Do pomiaru CPA wykorzystano metody spektrofotometryczne, oparte o reakcję próbki z rodnikami DPPH, peroksyłowymi (powstałymi z rozpadu AAPH) oraz odczynnikami Folina-Ciocalteu'a i wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych z detekcją elektrochemiczną (RP-HPLC/ED) [6].

2. Część eksperymentalna (Experimental)

W badaniach korzystano z następujących odczynników chemicznych: woda trójrotnie destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy), metanol (99,9% czysty do HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), DPPH (2,2-difenylo-1-picrylohydrazyl), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), AAPH (2,2-diazobis-(2-amidinopropano)-dihydrochlorek), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), odczynnik Folina-Ciocalteu'a, kwas galusowy, diwodorooortofosforan sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), wodorooortofosforan disodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), bufor fosforanowy w tabletkach o pH 7,4, PBS (phosphate buffered saline), DCFH – dihydrodichloro fluoresceina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy).

Do przygotowania próbek i wykonania pomiarów stosowano: wysokosprawną chromatograf cieczowy (HPLC) firmy Knauer (Berlin, Niemcy) (składający się z: interfejsu Smartline Manager 5000 z wbudowanym degazerem, dwutłokowej pompy Smartline 1000 o przepływie fazy ruchomej w granicach 0,001 – 50 ml/min, kolumny analitycznej Eurospher 5 C18, 4 x 150 mm, autosamplera Smartline 3800, detektora amperometrycznego EC3000 (układ trójelektrodowy: elektroda pracująca - węgiel szklisty, elektroda pomocnicza - Pt, elektroda odniesienia - Ag/AgCl), komputera z oprogramowaniem do rejestracji i obróbki danych ClarityChrom).

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze mikroplótkowym Epoch™ (BioTek Instruments, Inc. USA) sterowanym za pomocą programu Gen5 (wszystkie pomiary zostały wykonane z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych). Ponadto korzystano z wirówki laboratoryjnej Centrifuge MPW - 251 (MPW Med. Instruments, Polska), wagi analitycznej (RADWAG, WAA 100/C/1, Radom, Polska) o dokładności 10^{-4} g, wagi analitycznej (Sartorius, Werke GmbH, Göttingen, Niemcy) o dokładności 10^{-6} g oraz łaźni ultradźwiękowej (Sonorex RK 250H, Bandelin, Niemcy). Materiały badawcze oraz sposób ich przygotowania zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Materiały badawcze oraz sposób przygotowania.

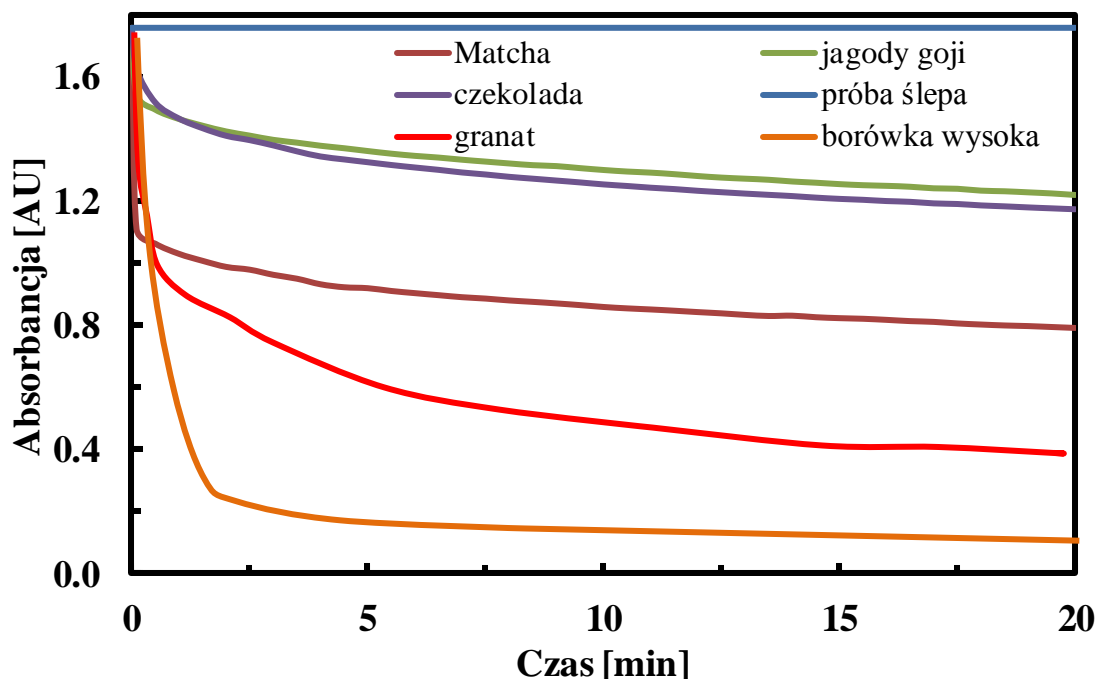
Table 1. Research materials and preparation.

Próbka/ Sample	Sposób przygotowania/ Preparation
Herbata Matcha (<i>Cammelia sinensis</i>)	0,5 g próbki zalano 25 ml wrzącej wody destylowanej, po 10 min ekstrakcji w płuczce ultradźwiękowej otrzymano roztwór o stężeniu 0,02 g/ml.
Kolcowój pospolity /jagody goji/ (<i>Lycium barbarum L.</i>)	Jako materiał służył sok wytłoczony na zimno, stężenie wynosiło 1 g/ml.
Czekolada (<i>Theobroma cacao</i>)	5 g sproszkowanej czekolady ekstrahowano w rozdzielniku w 20 ml wody trójrotnie destylowanej z dodatkiem 20 ml heksanu przez 15 min, po rozdzielaniu do oznaczenia został użyty ekstrakt wodny o stężeniu 0,1 g/ml.

Brokuł (<i>Brassica oleracea</i>)	Kawałki brokuła suszono w suszarce laboratoryjnej przez godzinę, następnie rozdrobniiono w moździerzu, odważono 5 g otrzymanego proszku do kolby 50 ml i ekstrahowano na płuczce ultradźwiękowej przez godzinę otrzymując ekstrakt o stężeniu 0,1 g/ml.
Borówka wysoka (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	Jako materiał służył sok wytłoczony na zimno, stężenie 1 g/ml.
Euterpa warzywna /jagody acai/ (<i>Euterpe oleracea</i>)	j.w.
Granat (<i>Punica granatum</i> L.)	j.w.

Oznaczenie CPA metodą DPPH (*Determination of TAP using DPPH assay*)

W odniesieniu do rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) miarą CPA był spadek wartości absorbancji. Spowodowane było to reakcją rodnika DPPH z zawartymi w badanych próbkach antyoksydantami. Metanolowy roztwór rodnika DPPH ma barwę purpurową. W wyniku reakcji z próbką barwa ulega zmianie na żółtą. Pomiar wykonuje się przy 517 nm (rys. 1) [6]. Mierzy się spadek wartości absorbancji w odniesieniu do próbki kontrolnej. W celu wykonania pomiaru kolejno dodano do jednego dołka 96-dołkowej płytki: 150 μ l badanej próbki i 150 μ l 0,2 mM metanolowego roztworu DPPH. Czas analizy wyznaczono na 20 minut (po tym czasie różnice między właściwościami antyoksydacyjnymi były największe). Wyniki badań przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego [mg GA/g próbki].



Rys. 1. Zmiana absorbancji w metodzie DPPH.
Fig. 1. Change of absorbance in DPPH assay.

Oznaczenie całkowitego stężenia polifenoli (*Determination of total polyphenols concentration*)

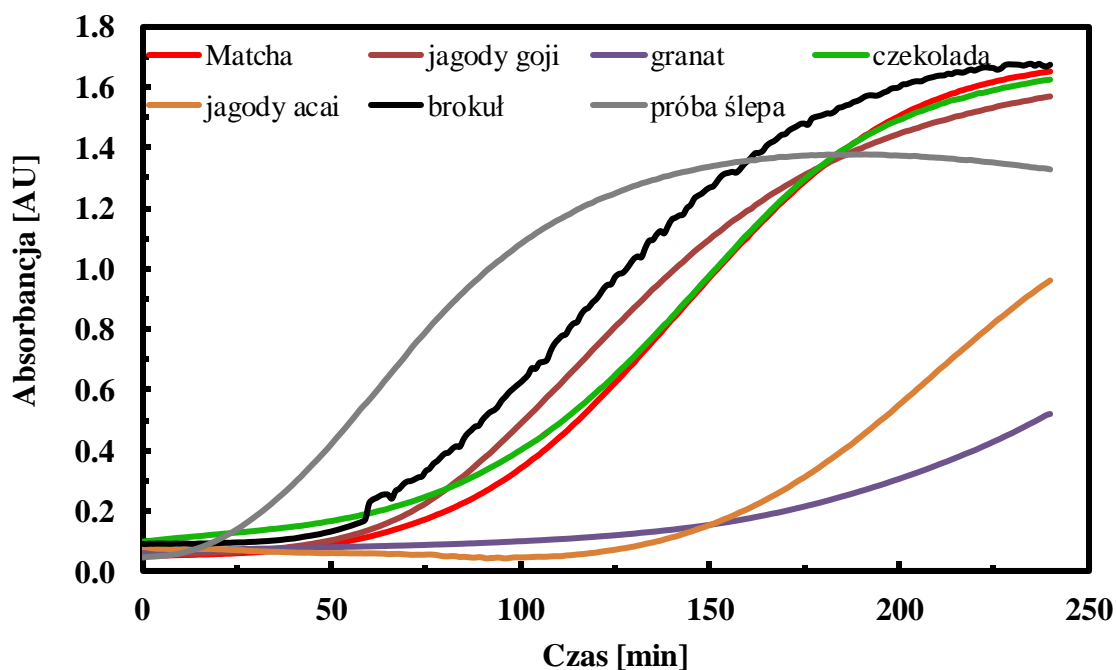
Do wyznaczenia całkowitego stężenia polifenoli w badanych próbkach wykorzystano odczynnik Folina-Ciocalteu (FC). Podczas reakcji z polifenolami odczynnik zmienia barwę z jasnożółtej na ciemnoniebieską, a natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia polifenoli w próbce [6, 7]. W celu

wykonania pomiarów odmierzone 30 μ l poszczególnych próbek, po czym dodano taką samą objętość odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Po 3 minutach dodano 100 μ l 20% węgla sodu w celu zapewnienia środowiska alkalicznego, a następnie dopełniono do 300 μ l wodą trójrotnie destylowaną. Całość odstawiono na 30 minut w ciemne miejsce w celu ustabilizowania reakcji. Po tym czasie wykonano pomiar fotometryczny przy długości fali równej 765 nm, stosując jako ślepią próbę wodę trójrotnie destylowaną. Wyniki badań przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego [GAE = mg GA/g próbki].

Oznaczenie CPA metodą AAPH (*Determination of TAP using AAPH assay*)

Metoda z wykorzystaniem AAPH (2,2-diazobis-(2-amidinopropano)-dihydrochlorek) polega na reakcji rodników peroksydowych (powstałych w wyniku rozpadu AAPH pod wpływem temperatury otoczenia z tzw. sensorem). Sensorem w tym przypadku był DCFH*DA (dioctan dichlorodihydro fluoresceiny), ale może być nim każdy związek, który zmienia barwę w wyniku reakcji z rodnikami peroksydowymi. Produkt reakcji DCFH*DA z rodnikami peroksydowymi, DCF (dichlorodihydro fluoresceina) posiada maksimum absorpcji w 504 nm. AAPH oraz DCFH*DA są to substancje bezbarwne, nie wykazują więc absorpcji przy 504 nm [8].

W celu wyznaczenia właściwości antyoksydacyjnych badanych produktów spożywczych z wykorzystaniem rodników peroksydowych zmieszano ze sobą 30 μ l badanej próbki, 70 μ l buforu PBS, 100 μ l DCFH o stężeniu 150 μ M oraz 100 μ l AAPH o stężeniu 0,6 M. Po dodaniu ostatniego odczynnika rozpoczęto pomiar spektrofotometryczny. Absorbancję rejestrowano przez cztery godziny co minutę (rys. 2). Wykonano próbę ślepią, gdzie próbkę zastąpiono wodą trójrotnie destylowaną.

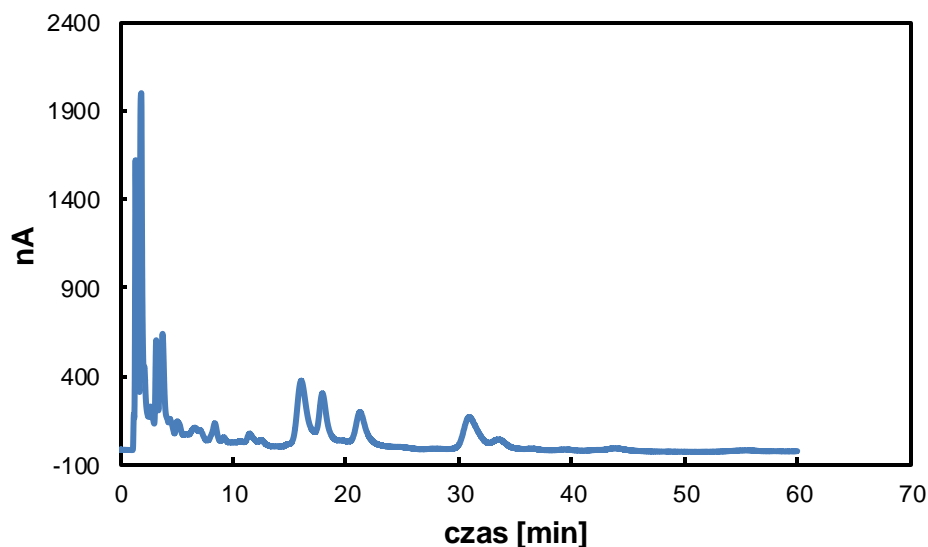


Rys. 2. Zmiana absorbancji w metodzie AAPH.
Fig. 2. Change of absorbance in AAPH assay.

CPA mierzone za pomocą HPLC z detekcją elektrochemiczną (ED) (*TAP measured by HPLC with electrochemical detection*)

Pomiary chromatograficzne z detekcją elektrochemiczną (zakres potencjałów $E = 0,8 \div 1,2$ V) przeprowadzono w układzie faz odwróconych (RP-C18) na kolumnie Eurospher C18 (Knauer), jako fazę ruchomą zastosowano bufor fosforanowy (pH=5,8 z 5% dodatkiem metanolu). Pomiary prowadzono w temperaturze 20°C. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min, a objętość nastrzykiwanej na kolumnę próbki 20 μ l. Miara CPA [6, 9] było sumaryczne pole powierzchni wszystkich pików eluowanych do 30 minut trwania analizy. Przykładowy chromatogram HPLC/ED ekstraktu herbaty Matcha uzyskany przy

potencjale 0,8 V przedstawiono na rysunku 3. Przy niższym potencjale obserwowane piki na chromatogramie były niskie, a ich pola powierzchni obarczone były dużą niepewnością pomiarową.

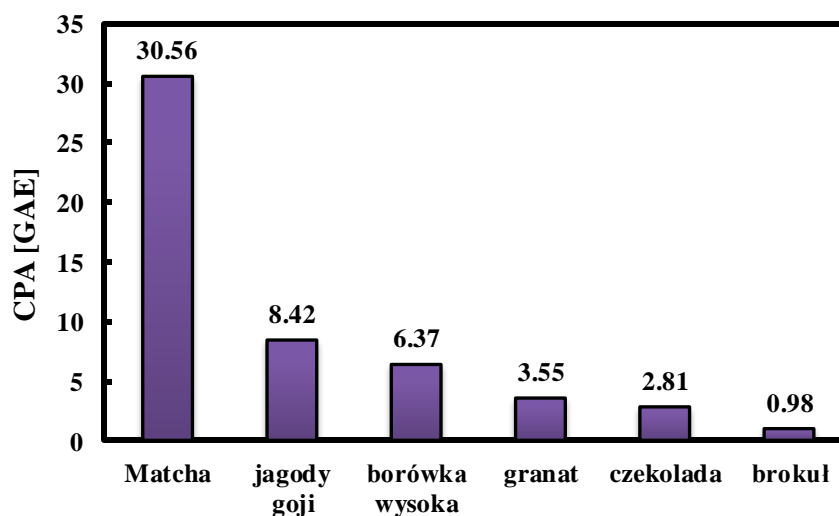


Rys. 3. HPLC/ED chromatogram herbaty Matchy. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18, 5 μ m, 150 x 4 mm (Knauer); temperatura 20°C; faza ruchoma - bufor fosforanowy pH 5,8 / 5% MeOH; - szybkość przepływu: 1 ml/min, detekcja elektrochemiczna ($E = 0,8$ V vs Ag/AgCl).

Fig. 3. HPLC/ED chromatogram of Matcha tea. Experimental conditions: column – Eurospher C18, 5 μ m, 150 x 4 mm (Knauer); temperature – 20°C; mobile phase – phosphate buffer pH 5,8 / 5% MeOH; flow rate – 1 ml/min, electrochemical detection ($E = 0.8$ V vs Ag/AgCl).

3. Wyniki i ich dyskusja (Results and discussion)

Właściwości antyoksydacyjne badanych produktów spożywczych wyznaczono m.in. na podstawie ich zdolności do zmiatania rodników DPPH. Produktem o najwyższej wartości CPA^{DPPH} okazała się herbata Matcha, a o najniższej brokuł. Po przeliczeniu na GAE okazało się, że 1 g herbaty Matchy odpowiada 30,56 mg kwasu galusowego (rys. 4). Zdecydowanie niższą zawartością antyoksydantów charakteryzują się soki z jagód goji, granatu i borówki wysokiej. Wyłączając próbkę zawierającą herbatę Matcha, można stwierdzić, że im ciemniejsza barwa produktu, tym większa zawartość antyoksydantów (sok z borówki ma barwę ciemnofioletową, a ekstrakt z brokołu - jasnozieloną).



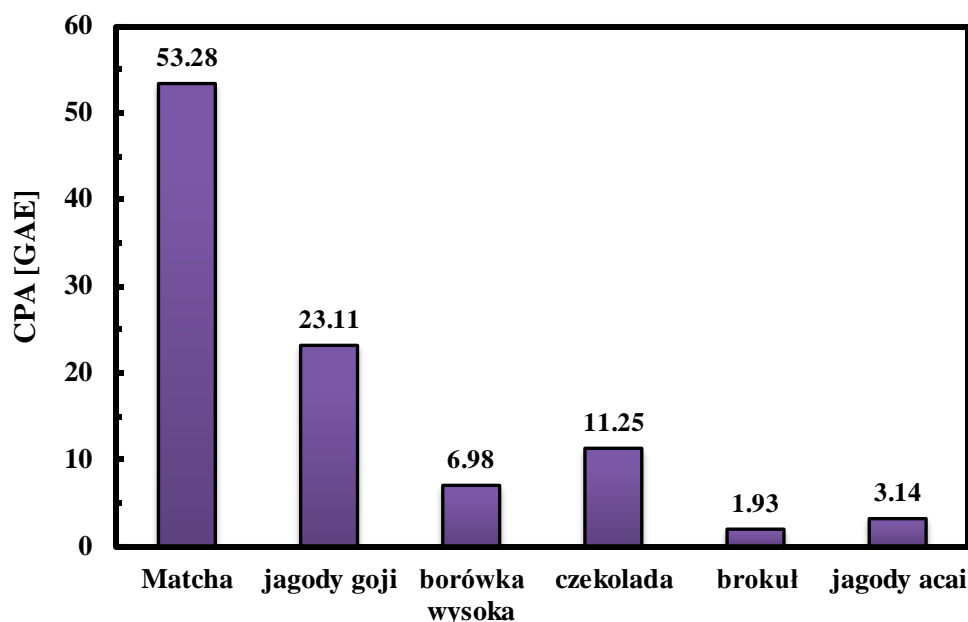
Rys. 4. CPA badanych próbek wyznaczony metodą DPPH.

Fig. 4. TAP of the samples determined using DPPH assay.

Zdolności antyoksydacyjne wybranych próbek wyznaczono także na podstawie odwracalnej reakcji redukcji molibdenu(VI) do molibdenu (V) w środowisku zasadowym zawartym w odczynniku Folina-Ciocalteu przez fenole obecne w badanej próbce. W tej metodzie oznaczania CPA najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne wykazywała herbata Matcha. Zawierała ona stężenie polifenoli równoważną 53,28 mg kwasu galusowego (rys. 5). Wynik ten jest wyższy od wyniku uzyskanego z rodnikami DPPH. Może to oznaczać, że oprócz polifenoli, dużą część antyoksydantów mogą stanowić inne grupy związków o charakterze antyoksydacyjnym. Odczynnik FC ma szereg zalet, z czego najważniejszą jest prostota wykonania pomiaru, posiada jednak wiele wad. Jedną z nich jest to, że odczynnik ten jest niespecyficzny. Utlenia nie tylko polifenole, lecz również wiele innych związków, np. kwas askorbinowy [7].

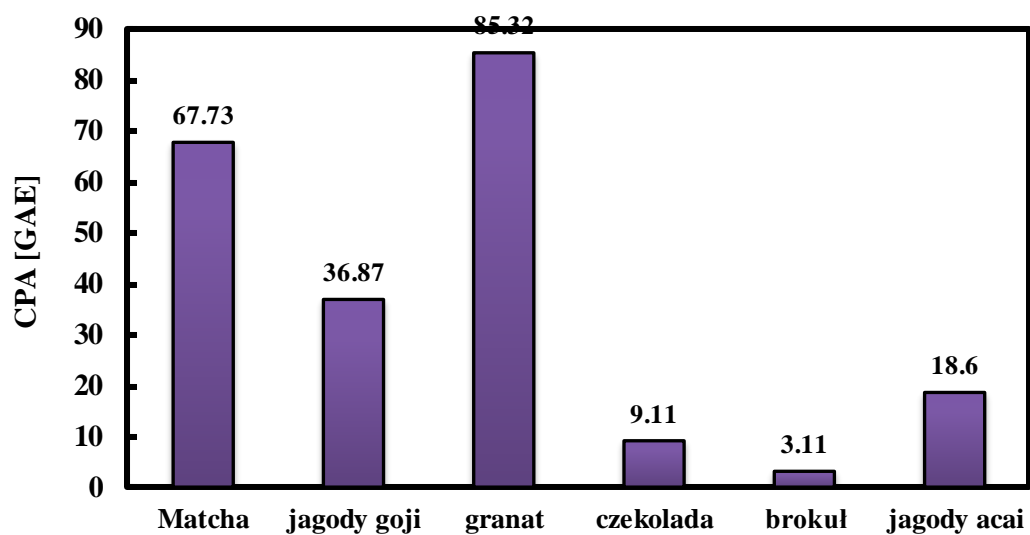
Oznaczono również wartość CPA produktów spożywczych wykorzystując rodniki peroksydowe wygenerowane z rozpadu AAPH. Otrzymane wartości CPA nie pokrywały się jednak z wartościami otrzymanymi wcześniej opisanymi metodami. Najwięcej antyoksydantów zawierał ekstrakt z granatu, odpowiednio 85,32 mg kwasu galusowego na gram próbki (rys. 6). Herbata Matcha wykazywała równowartość 67,73 mg kwasu galusowego na gram próbki, co świadczy że pomimo różnych metod pomiaru CPA zawiera ona dużo związków o charakterze antyoksydacyjnym. Jagody goji, czekolada i brokuł charakteryzowały się większą wartością CPA w stosunku do rodników peroksydowych niż w metodzie z rodnikami DPPH. Może to wynikać z różnicy w reaktywności tych rodników.

Właściwości antyoksydacyjne oznaczone metodą HPLC/ED zostały porównane na podstawie pola powierzchni wszystkich pików na chromatogramie. Okazało się, że podobnie jak w przypadku rodników hydroksylowych, najwięcej antyoksydantów zawiera granat (rys. 7, 8).

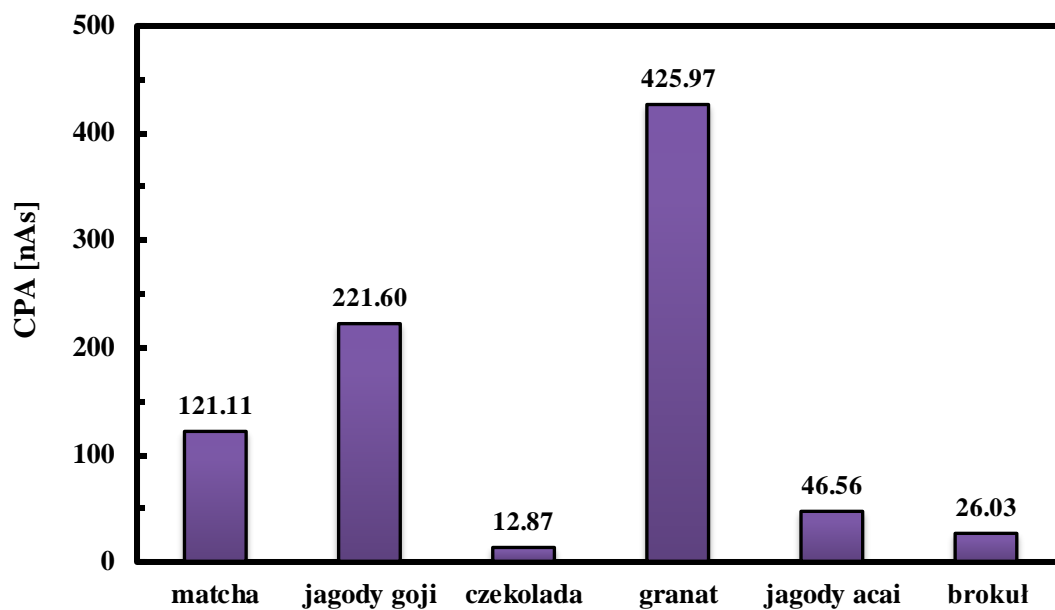


Rys. 5. CPA badanych próbek wyznaczony metodą Folina-Ciocalteu.

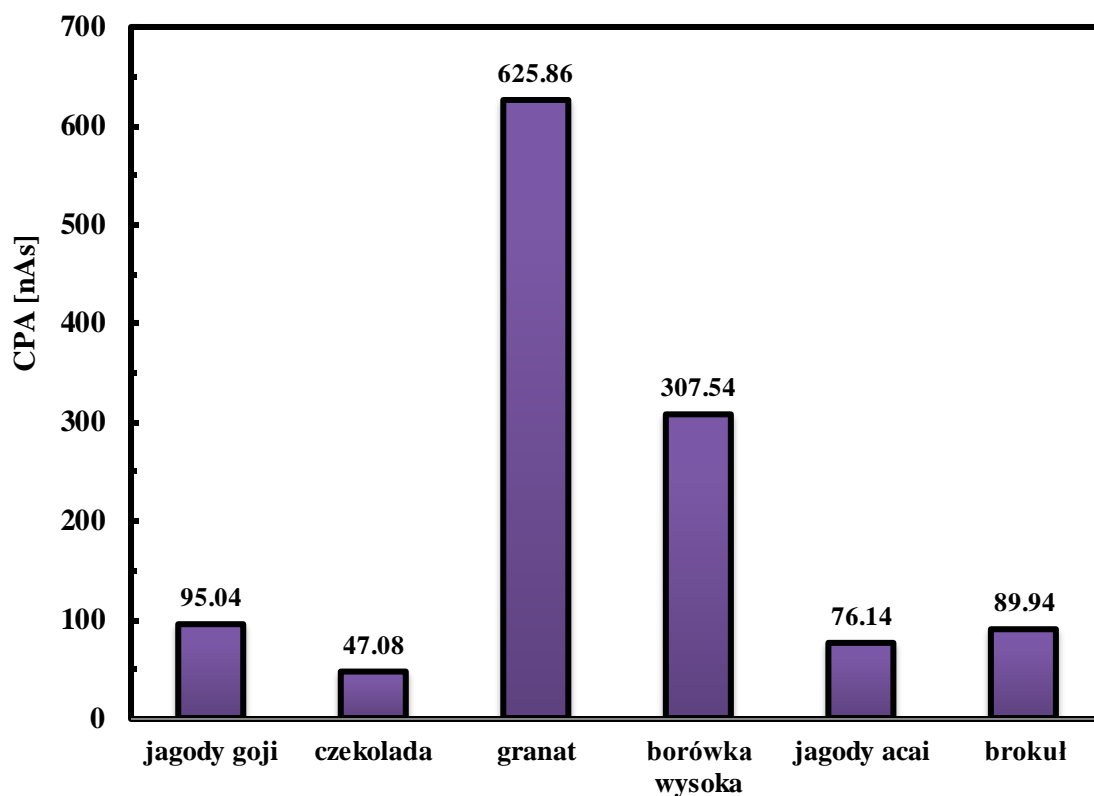
Fig. 5. TAP of the samples determined using Folina-Ciocalteu assay.



Rys. 6. CPA badanych próbek wyznaczony metodą AAPH.
Fig. 6. TAP of the samples determined using AAPH assay.



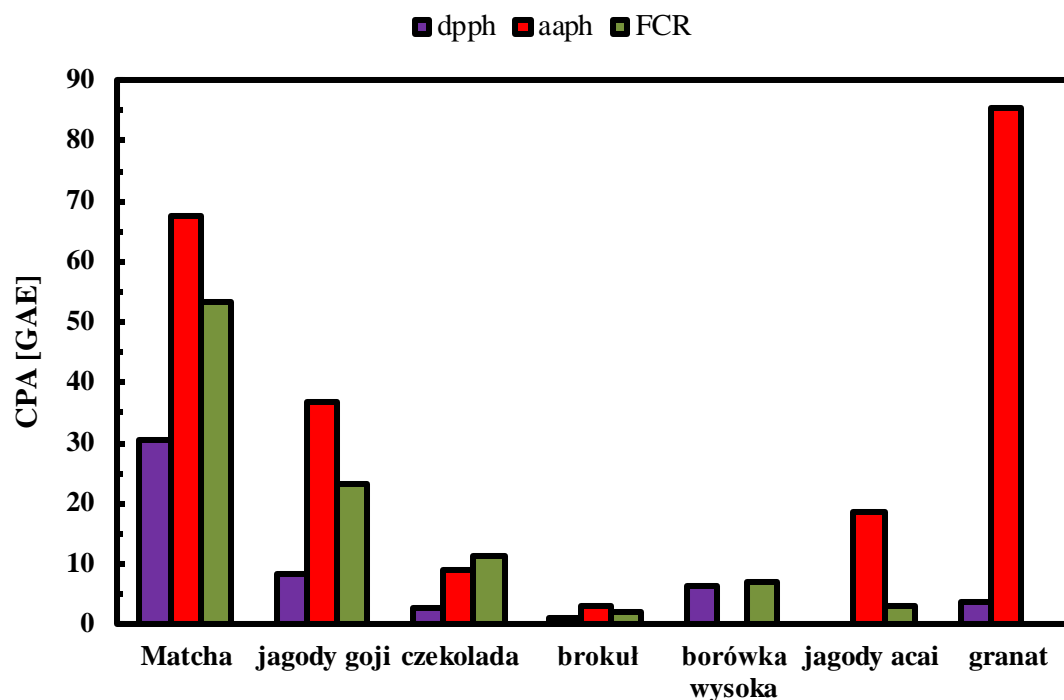
Rys. 7. CPA badanych próbek wyznaczony metodą HPLC/ED (0,8 V).
Fig. 7. TAP of the samples determined using HPLC/ED assay (0,8 V).



Rys. 8. CPA badanych próbek wyznaczony metodą HPLC/ED (1,2 V).
 Fig. 8. TAP of the samples determined using HPLC/ED assay (1,2 V).

Z powyższych rysunków możemy wywnioskować brak korelacji pomiędzy wynikami CPA otrzymanymi różnymi metodami fotometrycznymi: DPPH, AAPH i FCR (rys. 9). Wynika to m.in. z dużej różnicy w wartościach CPA dla soku z granatu. Różnice pomiędzy metodami spektrofotometrycznymi i HPLC/ED mogą wynikać z selektywności metod spektrofotometrycznych. DPPH jest najmniej reaktywnym rodnikiem, dlatego wyniki CPA otrzymane tą metodą są najniższe. Ponadto, rodnik DPPH jest rozpuszczalny w metanolu, dlatego do badań zostały użyte roztwory metanolowe. W pozostałych metodach użyto roztworów wodnych. Odczynnik FC silniej utlenia związki zawarte w próbkach, ale utlenia także inne związki oprócz flawonoidów.

Nie udało się otrzymać wyników CPA^{DPPH} dla ekstraktu jagód acai. Z badanego roztworu wytrącał się biały, kłaczkowaty osad, który uniemożliwiał prawidłowy pomiar absorbancji. Z tego samego powodu dla ekstraktu borówki wysokiej nie udało się uzyskać wyników CPA w odniesieniu do rodników peroksydowych. W metodzie FC niemożliwy był do uzyskania wynik CPA dla ekstraktu granatu. Barwa soku i odczynnika po reakcji absorbowała w tym samym zakresie długości fali. Do badań należało odwirować wszystkie zanieczyszczenia (np. osady) z ekstraktów, które zakłócałyby właściwy pomiar CPA. Należy jednak zaznaczyć, że dane produkty są spożywane w całości. Oznaczone CPA może być więc niższe niż w rzeczywistości.



Rys. 9. Korelacja różnych metod pomiaru CPA.
 Fig. 9. Correlation of different TAP measurement assays.

4. Wnioski (Conclusions)

Herbata Matcha zawiera duże ilości związków o właściwościach antyoksydacyjnych. W zależności od zastosowanej metody oznaczania CPA, wyniki pomiarów dla poszczególnych próbek różnią się od siebie. Jest to spowodowane różną reaktywnością użytych odczynników. Metody oparte na słabych rodnikach, jakim jest DPPH, są czułe na próbki zawierające tylko silne antyoksydanty. Metoda FC opiera się głównie na zawartości polifenoli w badanych próbkach. Z uzyskanych wyników, można wywnioskować, że za właściwości antyoksydacyjne badanych próbek odpowiadają w dużej mierze polifenole w nich zawarte. Wyznaczone CPA może być niższe, ponieważ przed przeprowadzaniem reakcji należało odwirować osady również spożywane przez człowieka, które mogą zawierać antyoksydanty.

5. Literatura (Literature)

1. G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, PWN Warszawa, 2006.
2. H. Puzanowska - Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz, Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 43 (2010) 9-14.
3. B.K. Głód, P. Piszcz, J. Czajka, P.K. Zarzycki, Evaluation of total antioxidant potential of selected biogenic polyamines, non-alcoholic drinks and alcoholic beverages using improved RP-HPLC assay involving fluorescence detection, Food Chemistry, 131 (2012) 1026-1029.
4. A.V. Badarinath, K.M. Rao, C.M.S. Chetty, S. Ramkanth, T.V.S. Rajan, K. Gnanaprakash, A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations, International Journal of PharmTech Research, 2 (2010) 1276-1285.
5. R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 4290-4302.
6. P. Piszcz, B.K. Głód, Właściwości antyoksydacyjne ziół zbadane różnymi metodami, Camera Separatoria, 8 (2016) 23-31.
7. J.D. Everette, Q.M. Bryant, A.M. Green, Y.A. Abbey, G.W. Wangila, R.B. Walker, Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 8139-8144.

8. M. Valkonen, T. Kuusi, Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38 (1997) 823-33.
9. P.M. Wantusiak, P. Piszcz, B.K. Głód, A fast and simple method for the measurement of total antioxidant potential and a fingerprint of antioxidants, *Journal of Chromatographic Science*, 50 (2012) 909-913.
10. R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 85 (2013) 957-998.