بهینه‌سازی و بررسی مکانیسم عمل چهار روش مختلف تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی مغز پسته سرخسی (*Pistacia vera* L.)

سیده فائزه تقی زاده*[۱]، غلامحسین داوری نژاد[۱]، جواد اصیلی[۲]، سید حسین نعمتی[۱]، غلامرضا کریمی[۳]
[۱*] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد
[۲] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد
[۳] گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد
*نویسنده مسئول: seyedehfaezeh.taghizadeh@mail.um.ac.ir

چکیده

این تحقیق به‌منظور مقایسه عملکرد و بهینه‌سازی چهار روش معمول اندازه‌گیری اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی مغز پسته سرخسی (*Pistacia vera* L.) انجام شد. در بررسی نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی به چهار روش DPPH، FRAP، BCB و TBARS اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. در میان روش‌های مورد استفاده، روش DPPH دارای بالاترین بازده (۹۵/۴۰۹) و پس از آن به ترتیب FRAP، BCB و TBARS با میزان بازداری‌های ۸۹/۹، ۷۸/۰۰ و ۶۰/۴ قرار گرفتند. از شاخص IC50 به‌منظور بیان اثرات مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد در روش DPPH استفاده گردید. نتایج IC50 عصاره در مقایسه با استاندارد BHT به ترتیب ۳۲/۹۹۴ و ۷/۲۷ بود. نتایج نشان داد که تفاوت مقادیر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات در روش‌های موجود بستگی به نوع حلال، خصوصیات انحلالی ترکیبات، نوع ترکیب آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره، توانایی استخراج متابولیت‌های ثانویه و مسیری که این ترکیبات وارد واکنش‌های شیمیایی می‌شوند دارد.

***کلمات کلیدی:* ۲و ۲ دی فنیل- ۱ -پیکریل هیدرازیل، بتا کاروتن، تیوباربیتوریک اسید، فروس سولفات**

مقدمه

پسته سرخسی (*Pistacia vera* L.) یکی از ارقام وحشی پسته متعلق به خانواده آناکاردیاسه است که اغلب به‌عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد. جنگل‌های پسته سرخسی به مساحت ۳۷۵۵۳ هکتار در حاشیه رودخانه تجن و مرز ترکمنستان در استان خراسان رضوی واقع‌شده‌اند. مغز پسته سرشار از ترکیبات فنلی (آنتوسیانین‌ها، فلاوان- ۳- ال ها، پروآنتوسیانیدین، فلاونول، فلاون، فلاونون، اسیتیلبن و اسیدهای فنلی) می‌باشد (Naderinejad *et al*, 2013). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در شمار ترکیبات طبیعی یا پلی‌فنول‌ها بوده و شامل توکوفرول ها، فلاونوئیدها، مشتقات سینامیک اسید، فسفاتیدیک اسید می‌باشند (Conforti *et al*, 2009). تعیین دقیق مقادیر ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ارقام پسته به ما کمک می‌کند تا برنامه‌های اصلاح ژنتیکی را با هدف ارتقای سطح سلامت، در مسیر صحیح‌تری هدایت نماییم (Davarynejad *et al*., 2012). از روش‌هایی که برای ارزیابی میزان اثر آنتی‌اکسیدان ترکیبات مختلف وجود دارد می‌توان به روش Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Saha *et al*., 2004) ، روش Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (Ruberto *et al*, 2000) ، Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) و بتا کاروتن (BCB) اشاره کرد. هیچ روش مورد آزمایشی به‌تنهایی جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدان کافی نیست و ترکیب چند روش متفاوت انتخاب خوبی جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های مختلف می‌باشد (Kuilisic *et al*, 2004). فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های گیاهی را نمی‌توان تنها با یک روش ارزیابی کرد؛ این امر به علت طبیعت پیچیده‌ی ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان است بنابراین لازم است که چندین روش رایج تائید شده مانند روش DPPH، قدرت احیاکنندگی، بررسی میزان فعالیت شلات کنندگی یون فروس، پراکسیداسیون لیپیدی و...

برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره‌های گیاه به کار گرفته شوند (Singh et al., 2007). یک ترکیب خاص ممکن است با یک روش اثر آنتی‌اکسیدان بالایی را نشان دهد ولی در روش دیگر فاقد این اثر باشد (Lee *et al*, 2001). بنابر مطالب گفته شده، درصدد برآمدیم تا طی این تحقیق به مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی مغز پسته سرخسی (*Pistacia vera* L.) با چهار روش DPPH، FRAP، TBARS و BCB برای عصاره‌های متانولی گیاه مذکور بپردازیم.

مواد و روش‌ها

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش DPPH

۲ میلی‌گرم از نمونه با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۲ mM) مخلوط، و این مخلوط به‌شدت تکان داده شد (Liu *et al*, 2008) ، سپس همه نمونه‌ها در دمای اتاق و تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis اندازه‌گیری شد (Rojas *et al*, 2001). درصد رنگ بری محلول DPPH طبق معادله شماره ۱ محاسبه گردید:

$$\left(B0 - \frac{B1}{B0}\right) \times 100 \qquad (1)$$

B_0 = جذب محلول کنترل منفی، B_1 = جذب مخلوط واکنش

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش FRAP

به‌منظور تهیه محلول استوک ۳/۱ گرم استات سدیم و ۱۶ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال در یک لیتر آب مقطر حل شد و pH محلول در حدود ۳/۶ تنظیم شد (بافر استات) سپس ۳۱ میلی‌گرم TPTZ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار حل شد و به‌منظور تهیه محلول ۲۰ میلی مولار کلرید آهن، ۵/۴۱ گرم کلرید آهن در یک لیتر آب مقطر حل گردید. برای تهیه محلول استاندارد از سولفات آهن استفاده شد که ۰/۲۷۸ گرم سولفات آهن در یک لیتر آب مقطر حل شد و در نهایت محلول‌های استاندارد ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار بر لیتر تهیه گردید. محلول نهایی FRAP با مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر بافر ۲/۵ میلی‌لیتر TPTZ و ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن آماده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار داخل ظروف پلیت ریخته شد و به آن ۱۰ میکرولیتر از عصاره (که حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره و ۶ میلی‌لیتر بافر فسفات بود) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس میزان جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد میزان آنتی‌اکسیدان کل بر اساس معادل میلی مول آهن در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان گردید (Benzie and Strain, 2009).

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش بری رنگ بتاکاروتن (BCB)

۲۰۰میکرو لیتر از رقت‌های نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان با ۵ میلی‌لیتر امولسیون A در لوله آزمایش کاملاً مخلوط شد. محلول کنترل منفی (بدون ماده آنتی‌اکسیدان) حاوی ۲۰۰µl اتانول و ۵ میلی‌لیتر امولسیون A است. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر محلول حاوی ۲۰۰میکرو لیتر اتانول و ۵ میلی‌لیتر امولسیون B تهیه شد. جذب نمونه شاهد (کنترل منفی) بلافاصله در زمان صفر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لوله‌های حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۲۰دقیقه در دمای ۵۰ °C انکوبه شدند و بعد از گذشت این زمان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هرچه قدرت ماده آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد رنگ‌بری بتاکاروتن کمتر است به عبارت دیگر هرچه رنگ بتاکاروتن بیشتر حفظ شود، جذب نمونه بالاتر و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است (Kuilisic *et al*, 2004). درصد مهار طبق معادله شماره (۲) محاسبه گردید:

$$\frac{Aa120 - Ac120}{Ac0 - Ac120} \times 100 \qquad (2)$$

$A_{C(120)}$ = جذب کنترل در زمان t= ۱۲۰، $A_{C(o)}$ = جذب کنترل در زمان t=۰، A_{a120} = جذب آنتی‌اکسیدان در زمان t= ۱۲۰

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش گونه‌های واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید (TBARS)

۰/۵ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ هموژن شده (۱۰ ٪ w/v) و ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف محلول به لوله آزمایش افزوده و مخلوط حاصل توسط آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به ترتیب ۰/۰۵ محلول آبی ABAP (۰/۰۷M) (برای ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی)، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۲۰٪ (pH=۳/۵) و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول اسید تیوباربیتوریک (۰/۸ ٪ w/v) در sodium dodecyl sulfate (۱/۱ ٪ w/v) به مخلوط افزوده شد و مخلوط حاصل بعد از ورتکس شدن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C انکوبه شد. بعد از خنک کردن، به هر لوله ۵ میلی‌لیتر بوتانول افزوده، محتویات لوله ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ g سانتریفوژ شد. جذب لایه آلی بالا در طول موج ۵۳۲ نانومتر و پهنای باند ۰/۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. شاخص آنتی‌اکسیدان از معادله شماره ۳ محاسبه می‌شود. هرچه قدرت ماده در جلوگیری از اکسیداسیون لیپید به‌وسیله ABAP بیشتر باشد شدت رنگ ایجاد شده و میزان جذب نور کمتر است. در تمامی روش‌ها BHT به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند (Ruberto *et al*, 2000).

$$Al\% = \left(1 - \frac{At}{Ac}\right) \times 100 \quad (3)$$

At = جذب نمونه مورد آزمایش Ac = جذب محلول شاهد

آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($p < 0.05$) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی مغز پسته سرخسی به چهار روش DPPH، FRAP، BCB و TBARS نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی مستقیماً تحت تأثیر نوع روش قرار گرفته است و میان اثرات آنتی‌اکسیدانی روش‌های انجام شده تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- درصد بازداری عصاره متانولی مغز پسته سرخسی (*Pistacia vera* L.) به چهار روش مختلف

(میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
DPPH	۱۲/۸۳۸±۰/۰۰۵b	۲۱/۰۷۱±۰/۰۰b	۳۶/۷۸۸±۰/۰۰b	۶۳/۵۱۸±۰/۰۰۵b	۸۵/۴۷۳±۰/۰۰b	۹۵/۴۰۹±۰/۰۰b
FRAP	۱۱/۸±۰/۰۰۱c	۲۰/۱±۰/۰۰c	۳۰/۱۸±۰/۰۰۵c	۵۰/۱±۰/۰۰c	۷۷/۰۰±۰/۰۰c	۸۹/۹±۰/۰۰c
BCB	۶/۵±۰/۰۰d	۱۴/۱±۰/۰۰d	۲۰/۰۸±۰/۱d	۴۴/۲±۰/۰۰d	۶۴/۰۰±۰/۰۰d	۷۸/۰۰±۰/۰۰d
TBARS	۲/۳±۰/۰۰e	۸/۴±۰/۰۰e	۱۴/۰۰±۰/۰۰e	۳۰/۹±۰/۰۰e	۴۲/۶۵±۰/۰۰e	۶۰/۰۴±۰/۰۰e
BHT	۴۰/۴۴۳±۰/۰۰۵a	۴۹/۷۹±۰/۰۰a	۶۷/۹۹±۰/۰۰a	۸۰/۰۸±۰/۰۰۵a	۹۳/۱۲±۰/۰۰a	۹۹/۸۹±۰/۰۰a

مقادیری که در ستون‌ها دارای حروف مشابه هستند با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

با توجه به درصد بازداری رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های مختلف، به نظر می‌رسد که روش DPPH از راندمان عملکرد بهینه‌تری نسبت به سایر روش‌ها در این مطالعه برخوردار بوده است. از شاخص IC50 به‌منظور بیان اثرات مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد در روش DPPH استفاده گردید. بر این اساس هر چه مقدار IC50 کمتر باشد قدرت بازداری عصاره بیشتر بوده است. مقدار IC50 برای عصاره و استاندارد BHT ۳۲/۹۹۴ و ۷/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های متانولی پوست پسته (*Pistacia vera* L.) به روش‌های DPPH و FRAP شاخص IC50 ۰/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و FRAP ۶/۵۷ میلی مول بر گرم بود (Rezaie et al., 2015). در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی مغز پسته سرخسی، روش DPPH و FRAP مؤثرتر واقع شد، بعد از آن به ترتیب آزمایشات BCB و TBARS قرار داشتند. در تحقیقی که به ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی برخی میوه‌های خشکباری پرداخته شده بود نتایج حاصل با نتایج ما مطابقت داشت بدین‌صورت که مغز پسته، گردو، پکان، فندق، بادام و بادام‌زمینی به ترتیب دارای بیشترین مقادیر ترکیبات فنلی بودند و با توجه به همبستگی مثبتی که میان این گونه ترکیبات با اثرات آنتی‌اکسیدانی وجود دارد، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به روش‌های DPPH و FRAP مؤثرتر

از سایر روش‌ها بود (Jenny and Shahidi, 2010). اساس روش DPPH احیاء محلول الکلی DPPH در حضور آنتی‌اکسیدان دارای توانایی هیدروژن یا الکترون دهندگی است (Kuilisic *et al*, 2004). در روش FRAP کمپلکس فروزین ـ Fe^{2+} در حضور عوامل شلات کننده تخریب شده و در نتیجه رنگ بنفش این کمپلکس کاهش می‌یابد. با اندازه‌گیری میزان کاهش رنگ بنفش می‌توان فعالیت شلات‌کنندگی شلاتورهای موجود را تخمین زد (Oktay *et al*, 2003). در روش BCB، از دست رفتن رنگ زرد بتاکاروتن به علت واکنش آن با رادیکال‌هایی است که در نتیجه اکسیداسیون لینولئیک اسید در یک امولسیون تشکیل می‌شوند. لینولئیک اسید به دلیل ساختار شیمیایی خاص خود به‌سرعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد اکسید می‌شود. در اثر جدا شدن هیدروژن از کربن آلفای موجود در لینولئیک اسید و مهاجرت پیوند دوگانه، یک سیستم مزدوج ایجاد می‌شود که نتیجه واکنش آن با اکسیژن تشکیل هیدروپراکسیدهای مزدوج است (Friedland *et al*, 2000). TBARS به بررسی قدرت ماده مورد آزمایش در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها به‌وسیله ABAP می‌پردازد که بر اساس اندازه‌گیری تشکیل ترکیب ثانویه حاصل از اکسیداسیون لیپیدی (مالون دی آلدهید) طرح‌ریزی شده است. مالون دی آلدهید با اسید تیوباربیتوریک موجود در محیط واکنش داده و تولید رنگ می‌کند، هرچه قدرت ماده در جلوگیری از اکسیداسیون لیپید توسط ABAP بیشتر باشد، رنگ ایجاد شده کمتر است (Ruberto *et al*, 2000). روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان در شیمی (تولید رادیکال‌های مختلف و یا مولکول‌های هدف) و در مسیری که اندازه‌گیری می‌شوند متفاوت هستند، زیرا ترکیبات آنتی‌اکسیدان مختلف ممکن است از طریق مکانیسم‌های مختلف عمل کنند (Pellegrini et al, 2003).

نتیجه نهایی

به نظر می‌رسد در این تحقیق آنچه موجب برتری روش‌های DPPH و FRAP گردیده است را بتوان به وجود ترکیبات فنلی بالا در مغز پسته نسبت داد. این ترکیبات که از جمله متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند قادرند از فعالیت رادیکال‌های آزادی که در فرآیند اکسیداسیون لیپیدی تولید می‌شوند جلوگیری به عمل آورند. که البته حلالیت آن‌ها نیز به عواملی از قبیل نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون، واکنش میان آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در ساختار گیاه و ساختار ترکیبات نامحلول بستگی دارد (Naczk and Shahidi, 2004). در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس پوست پسته (*Pistacia vera* L.) به روش DPPH شاخص IC50 و نتایج مربوط به روش BCB چندان رضایت‌بخش نبود (Rezaie et al., 2015). نتیجه حاصل در روش DPPH را می‌توان به وجود مونوترپن‌ها در ترکیبات اسانس نسبت داد. مونوترپن ها از جمله ترکیباتی هستند که از توانایی خوبی در مهار رادیکال‌های آزاد برخوردار نیستند (Wojtunik et al. 2014) ، همچنین فقدان ترکیبات فنلی در پوست پسته سبب کاهش اثرات آنتی‌اکسیدانی در روش BCB گردید (Dorman et al. 2000). رادیکال‌های آزاد همواره در تقابل با چربی‌های غیر اشباع سطح غشا با هدف افزایش پراکسیداسیون لیپیدی عمل می‌کنند و از طرفی روش TBARS هم معمولاً به‌عنوان شاخص در فرآیند تنش‌های اکسیداتیو به شمار می‌رود (Serbetci et al., 2012). از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که مغز پسته غنی از ترکیبات فنلی بوده اما ازنظر وجود مونوترپن ها احتمالاً در حداقل میزان ممکن است، ازاین‌رو بیشترین راندمان اثرات آنتی‌اکسیدانی را در روش‌های DPPH و FRAP داشته است. مکانیسم روش TBARS بسیار متفاوت از BCB و DPPH می‌باشد. نتایج بدست آمده در روش‌های BCB و TBARS نشان دهنده این مطلب است که اثر عصاره متانولی در مهار اکسیداسیون، ناشی از اثر سینرژیستی بین اجزای تشکیل دهنده آن بوده است.

منابع

Benzie, I. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1): 70-76.

Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D. and Menichini, F. 2009. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. Food Chemistry, 112(3): 587-594.

Davarynejad, G., Stefanovits, B. and Nagy, P. 2012. Investigation of antioxidant capacity and some bioactive compounds of Iranian Pistachio (*Pistachio vera* L.) cultivars. Notulae Scientia Biologicae, 4(4): 62-66.

Dorman H, Figueiredo AC, Barroso JG and Deans SG 2000. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components Flavour Fragr J 15:12–16.

Friedland, K. D., Hansen, L. P., Dunkley, D. A. and MacLean, J. C. 2000. Linkage between ocean climate, post-smolt growth, and survival of Atlantic salmon (Salmo salar L.) in the North Sea area. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil, 57(2): 419-429.

Jenny, A. and Shahidi, F. 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excela*). Journal of Functional food. 2: 196-209.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry, 85(4): 633-640.

Lee, K. K., Haraguchi, T., Lee, R. S., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K. L. 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. Journal of Cell Science, 114(24): 4567-4573.

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B. and Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (Phyllanthus emblica L.) from six regions in China. Journal of Food composition and Analysis, 21(3): 219-228.

Naczk, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95–111.

Nadernejad, N., Ahmadimoghadam, A., Hossyinifard, J. and Poorseyedi, S. 2013. Evaluation of PAL activity, phenolic and flavonoid contents in three pistachio (Pistacia vera L.) cultivars grafted onto three different rootstocks. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 9(3).

Oktay, M., Gülçin, İ. and Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts. LWT-Food Science and Technology, 36(2): 263-271.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and 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(9): 2812-2819.

Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A. and Golmohamadzadeh, S. 2015. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (Pistacia atlantica subsp. mutica) hull using various solvents of different physicochemical properties. Food Chemistry, 173, 577-583.

Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J. and Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. Journal of Ethnopharmacology, 74(1): 97-101.

Ruberto, G. and Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69(2): 167-174.

Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G. and Dorman, H. D. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils. Planta medica, 66(08): 687-693.

Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant Journal Ethnopharmacol, 92: 263-267.

Serbetci T, Ozsoy N, Demirci B, Can A, Kulur S and Baser K 2012. Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of Hypericum lydium Boiss. Industerial Crops and Product, 36:599–606.

Singh, R., Singh, S., Kumar, S. and Arora, S . 2007. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn . Food Chemical and Toxicology., 45, 1216-1223.

Wojtunik KA, Ciesla LM and Waksmundzka-Hajnos M. 2014. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62:9088–9094.

Optimization and Evaluation the Four Methods to Determine the Antioxidant Activity of *Pistacia vera* var. Sarakhs Kernel

Seyedeh Faezeh Taghizadeh[1]*, Gholamhossein Davarynejad[1], Javad Asili[2], Seyed Hossein Nemati[1], Gholamreza Karimi[3]

[1*] Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture and Landscape Engineering, Mashhad, Iran

[2 c] Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

[3] Pharmaceutical Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

[*]*Corresponding Author:* seyedehfaezeh.taghizadeh@mail.um.ac.ir

Abstract

This study was conducted to compare four common methods of measuring performance and optimize the antioxidant effects of methanol extract of *Pistacia vera* var. Sarakhs Kernel. In evaluation the results of the four methods, DPPH, FRAP, BCB and TBARS the significant differences were observed at 5%. DPPH method has the highest efficiency (95.409) and then as FRAP, BCB and TBRAS with the inhibition of 89.9, 78.00 and 60.4 has the highest functional. IC50 index to express the inhibitory effects of free radicals DPPH method was used. The results of IC50, compared with BHT were 32.994 and 7.27, respectively. The difference in levels of antioxidant compounds in various assays depends on the type of solvent, dissolution properties, types of antioxidant compound in extract, the ability of secondary metabolites extract and the way which these compounds are chemically reacts. Hence, the select of effective methods and eliminate assays that do not express the desired effects are recommended.

***Keywords*: BCB, DPPH, FRAP, TBARS**