

## 정확하고 일관된 ABTS Assay에 영향을 미치는 중요한 요인 평가

— 연구노트 —

이호현 · 문용선

영남대학교 원예생명과학과

### Assessment of the Important Factors Influencing Consistent and Accurate ABTS Assay

Ho-Hyeon Lee and Yong-Sun Moon

Department of Horticulture and Life Science, Yeungnam University

**ABSTRACT** The ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free-radical scavenging activity is the most common method for evaluating plant antioxidant activities. On the other hand, the results can be affected by a range of factors, such as ABTS adjusting solutions, sample stock solvents, sample pigments, and equations. A conventional ABTS method was assessed by these factors to obtain accurate and consistent results. Daehwang (*Rheum officinale*) is a medicinal herb in Asia that was used as a plant material for the experiment. Dried roots of Daehwang were pulverized using a mixer and ground with liquid nitrogen. After extracting with 70% ethanol for 24 hours at room temperature, the extracts were condensed by vacuum evaporation. Different experimental factors of the ABTS assay were analyzed. The pH was very stable when ABTS was dissolved and adjusted with water. PBS (phosphate buffered saline) also worked well unlike 100% or 70% ethanol. When the vacuum-evaporated sample was dissolved in 70% ethanol (the same extraction solvent), it gave consistent results rather than in water or dimethyl sulfoxide. As the sample concentration was increased, the ABTS result was critically affected by the yellow sample pigments and the equation. These results suggest that an ABTS<sup>+</sup> stock solution needs to be adjusted with water or PBS buffer, and the same solvent used for extraction is required. In particular, the interference of pigments in the samples needs to be considered in the equation for accurate and consistent ABTS results of the antioxidant activity of plant samples.

**Key words:** ABTS assay, antioxidant activity, Daehwang (*Rheum officinale*), free radical scavenging activity, *in vitro* evaluation

## 서 론

세포 내 산화스트레스에 의한 당뇨, 동맥경화, 암 등과 같은 질병 치료 및 예방을 위해 천연물에 대한 관심이 증가하였으며 다양한 연구가 진행되고 있다(Charde 등, 2011; Kuppusamy 등, 2016). 모든 생물은 필연적으로 발생하는 산화 반응으로부터 자신을 보호하기 위하여 자발적 방어기전을 가지고 있지만, 여러 가지 스트레스에 의해 그 기능이 감소한다(Pigeolet 등, 1990). 최근 폴리페놀류(polyphenols) 등의 식물 이차 대사화합물이 스트레스 방어를 위한 항산화제로 대두되고 있다(Pokorny와 Korczak, 2001).

지금까지 활성산소종이 인체 내 미치는 영향에 관한 연구와 이를 제거할 수 있는 항산화 물질의 활성을 검증을 위하여 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 전자공여능 측정

법, ABTS<sup>+</sup>(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거능 측정법, FRAP(ferric reducing antioxidant power) 철환원 항산화력, ORAC(oxygen radical absorption capacity) 활성산소 흡수능력 등의 다양한 방법들이 개발되어 왔다(Thaipong 등, 2006; Schaich 등, 2015). 이 중 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> 방법은 색 반응을 이용한 편리성과 효율성으로 인해 약학, 식품, 농업 분야 등에서 널리 이용되고 있다(Alam 등, 2013). 보라색을 띠는 DPPH<sup>+</sup>는 항산화 물질과 반응 시 노란색으로 환원되며 이때 517 nm에서 전자공여능을 측정하여 항산화력으로 나타낸다(Blois, 1958). 그러나 DPPH는 친수성 화합물의 항산화력을 측정함에 어려움이 있다. 초창기 ABTS<sup>+</sup> 방법은 met-미오글로빈(met-myoglobin)이 과산화수소에 의해 ferryl-미오글로빈 라디칼을 형성하고, ABTS를 산화시켜 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 형성하여 청록색으로 변하는 원리를 이용했다. 이때 항산화 물질을 첨가하면 ferryl-미오글로빈과 반응하여 ABTS 산화를 방해한다. 이것은 항산화제가 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 환원시키는 것이 아닌 간접적 측정법이라는 단점을 가지고 있었다. 이후 Miller와 Rice-Evans(1997)는 ABTS를 과황산칼륨

Received 4 January 2019; Accepted 19 January 2019

Corresponding author: Yong-Sun Moon, Department of Horticultural Science, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea  
E-mail: hangulmys@ynu.ac.kr, Phone: +82-53-810-2946

Author information: Ho-Hyeon Lee (Graduate student), Yong-Sun Moon (Professor)

(potassium persulfate)과 반응시켜 청록색의  $ABTS^+$ 를 미리 생성한 후 항산화제에 의한 환원력을 측정하는 탈색반응으로 기존의 문제점을 보완하였다. 또한 Re 등(1999)은  $ABTS^+$ 가 734 nm에서 최고의 흡광도를 나타내며, 반응시간은 1분 이상이면 충분하고 대부분의 항산화제의 농도 증가에 따라  $ABTS^+$  라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다.  $ABTS^+$  라디칼 소거능은 친수성 및 소수성 화합물의 항산화력 측정이 가능하고, 비교적 높은 734 nm의 파장에서 최대의 흡광도를 가져 추출물 고유의 색소에 의한 영향이 최소한으로 작용하므로 DPPH보다 정확한 항산화력을 측정할 수 있다고 보고되고 있다(Arnao 등, 2001a; Boligon 등, 2014) 하지만 여전히  $ABTS^+$  방법은 빠른 반응을 일으키는 카로티노이드 등의 반응속도를 고려하지 않은 점(Arnao 등, 2001b; Floegel 등, 2011)과 대부분의 항산화 활성 실험들이 *in vitro* 상에서 이루어지기 때문에 실제 *in vivo*에서의 역할과 일치하지 않는다는 단점이 있다(Apak 등, 2013). 특히 반응속도(reaction rate), 운동역학(kinetics)과 지방(lipids)에서 일어나는 전자반응이 고려되지 않아 채소, 과수, 허브, 약용작물 등의 양적, 질적 항산화 능력을 정확히 측정할 수 없다(Jimenez-Alvarez 등, 2008).

$ABTS^+$  라디칼 소거능 측정법의 신뢰도, 재현 가능성 및 정확도를 높이기 위한 실험 조건들의 검증 및 확립이 매우 절실한 실정이다. 따라서 이번 실험에서는 대부분 고유의 색소를 가지고 있는 식물 재료 중 대황 뿌리를 시료로 이용하여  $ABTS^+$  stock을 희석하기 위한 희석용매와 시료의 stock 용매 및  $ABTS^+$  라디칼 소거능을 나타내는 공식에 초점을 맞추어, 정확하고 안정된 항산화 실험 결과를 얻기 위한 조건들을 확립하여 원예작물을 포함한 식물의 항산화능 측정을 위한 표준화된 ABTS 실험방법을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료 및 에탄올 추출

실험에 사용된 식물 재료인 말린 대황 뿌리(*Rheum officinale*)는 동일약업사(대구, 한국)에서 구매하여 사용하였다. 건조 대황 뿌리는 믹서기로 분쇄 후 액체질소를 이용해 질은 노란색 파우더 상태로 준비하여 200 mg을 50 mL 70% 에탄올을 이용하여 회전교반기(VS-203D, Vison, Daejeon, Korea)에서 24시간 상온 추출 후 여과지(No.2, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하고 회전 감압농축(EYEL4, Rikokai, Tokyo, Japan) 한 후 실험용 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 모든 물은 3차 증류된 멸균수를 사용하였으며, 에탄올(Merk, Darmstadt, Germany)과  $ABTS$ (Wako, Tokyo, Japan)를 제외한 모든 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### $ABTS^+$ 라디칼 소거능 측정

$ABTS^+$  라디칼 소거능 측정법은 Park 등(2011)의 방법을

변형하여 진행하였다. 7 mM의  $ABTS$  시약을 멸균수에 완전히 녹인 뒤 최종 농도가 2.45 mM이 되도록 과황산칼륨을 녹여주었다. 암 상태에서 16시간 동안 반응을 유도하여 프리라디칼을 생성하였다.  $ABTS^+$  stock을 희석하기 위한 용매로 물, 70% 에탄올, 100% 에탄올, PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)를 사용하였으며, 734 nm에서 흡광도를 측정하여 광학밀도(optical density, OD)가 0.6이 되도록 희석하였다. 70% 에탄올 추출물은 stock 용매로 물, 70% 에탄올, DMSO(dimethyl sulfoxide)로 최종 stock의 농도가 50 mg/mL가 되도록 제조하였다. 96-well plate(Corning, New York, NY, USA)에 농도별 시료 50  $\mu$ L와 희석된  $ABTS^+$  (OD=0.6) 50  $\mu$ L를 넣어 5분간 반응 후 microplate reader(UVM34, Biochrom, Cambridge, UK) 734 nm에서 흡광도를 측정하여  $ABTS^+$  라디칼 소거능을 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

$$ABTS^+ \text{ 라디칼 소거능}(\%) = \{1 - (S - SC) / (BS - BC)\} \times 100$$

S: sample (sample/ $ABTS^+$ )

SC: control ( $H_2O/ABTS^+$ )

BS: blank of sample (sample/ $H_2O$ )

BC: blank of control ( $H_2O/H_2O$ )

### 통계분석

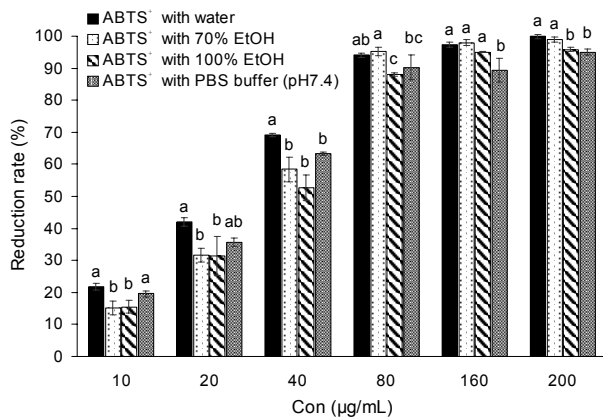
통계분석은 SPSS Statistics 21.0 version(IBM, New York, NY, USA)을 이용하였다.  $P < 0.05$  유의수준에서 각 시료군의  $ABTS^+$  라디칼 소거능의 유의적 차이는 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 검정하였다. 모든 실험 결과는 3회 반복한 값을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### $ABTS^+$ stock 희석용매에 따른 라디칼 소거능의 차이

실험을 수행하기 직전에  $ABTS^+$  stock을 특정 용매로 희석하여 734 nm 파장에서 OD 값을 0.6으로 맞춘 후  $ABTS^+$  라디칼 소거능을 측정하였다. 기존 연구에서 사용되는  $ABTS^+$  stock 희석용매로는 플라즈마 항산화 물질의 항산화력을 측정할 경우에는 PBS(pH 7.4)를, 식품 추출물이나 페놀화합물의 항산화력을 측정할 경우에는 주로 100% 에탄올을 사용했다(Re 등, 1999). 따라서 이번 연구에서는 식물 시료의 항산화력 측정을 위한  $ABTS^+$  stock 희석용매에 따른 라디칼 소거능의 차이를 확인하고자 물, 70% 에탄올, 100% 에탄올, PBS(pH 7.4)를 이용하여 실험을 진행하였으며 결과는 Fig. 1과 같다.

물과 100% 에탄올은 10~80  $\mu$ g/mL의 시료 농도 범위 내에서 프리라디칼 소거능이 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다. 시료 농도 160  $\mu$ g/mL 이상에서는  $ABTS^+$  stock 희석용매의 종류와 상관없이 프리라디칼 소거능이 100% 이상의 포화상태로 확인되었다.  $ABTS^+$  stock 희석용매로 가장 많이 사용하고 있는 100% 에탄올의 경우 시료 측정 시

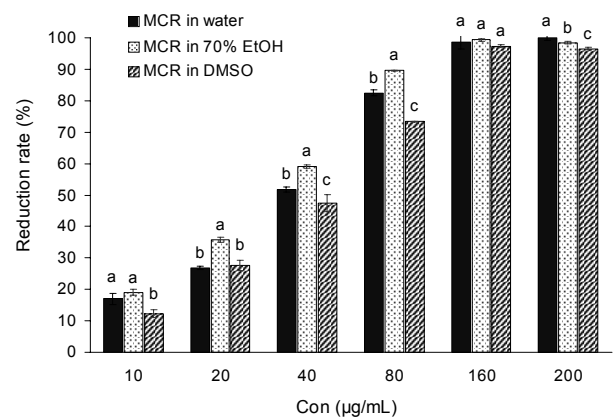


**Fig. 1.** The effect of ABTS<sup>+</sup> adjusting solution on antioxidant activity in medicinal Chinese 'Daehwang' root (MCR). ABTS<sup>+</sup> was adjusted to OD=0.6 at 734 nm with various solution (water, 70% or 100% ethanol, PBS). MCR was extracted with 70% EtOH and 50 mg/mL sample stock was prepared with 70% EtOH. The different letters indicate statistical differences at the  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value represents the mean $\pm$ SD of triplicates.

상당량의 푸른색 침전물이 발생하였으며, 이로 인한 OD 값의 변화 정도도 크고, 특히 낮은 농도 구간에서 반복구 간의 오차도 크게 나타났다. 이는 100% 에탄올이 쉽게 휘발하여 ABTS<sup>+</sup>의 침전이 일어난 것으로 사료된다. 반면 물과 PBS로 희석한 ABTS<sup>+</sup> stock은 시간이 지나도 ABTS 침전과 OD 값의 변이가 거의 없이 매우 안정적이었다. 또한 ABTS와 과황산칼륨은 모두 물에 잘 녹는 시약이기 때문에 물로 OD 값을 조정하여 시료의 항산화력을 측정하는 것이 더욱 바람직하다고 판단된다.

#### 시료 stock 용매에 따른 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능의 변화

식물 시료인 대황 뿌리를 70% 에탄올로 추출 후 회전 감압농축 한 추출물을 다양한 시료 stock 용매인 물, 70% 에탄올, DMSO에 녹여 최종 50 mg/mL 농도의 대황 70% 에탄올 추출물 stock을 준비하였다. 10~80 µg/mL 농도 구간에서(20 µg/mL 예외) DMSO stock 용매는 70% 에탄올과 물 stock 용매를 이용한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능에서 통계학적 유의차를 나타냈다(Fig. 2). DMSO는 일반적으로 식물 및 한약재 시료에 많이 사용하는 stock 용매이지만 시료가 완전히 녹지 않아 최종 농도가 부정확한 상태에서 실험이 진행된다는 단점이 있다. 이번 실험 결과에서도 대황 시료가 잘 녹지 않아 프리라디칼 소거능이 낮게 나타난 것으로 사료된다. 물은 DMSO에 비해 상대적으로 잘 녹았지만 70% 에탄올을 이용했을 때보다 잔여물이 많이 남아 있었다. 이는 시료의 stock 용매에 따라 시료의 용해도가 달라져서 최종 농도가 다른 상태에서 실험에 진행되는 것으로 실험 결과에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 따라서 정확한 항산화능을 측정하기 위해서는 시료의 추출용매를 고려하여 적절한 시료 stock 용매를 선택하는 것이 매우 중요하다.



**Fig. 2.** The effect of sample solvents of medicinal Chinese 'Daehwang' root (MCR) on antioxidant activity by ABTS assay. ABTS<sup>+</sup> was adjusted to OD=0.6 at 734 nm with water. MCR was extracted with 70% EtOH and then 50 mg/mL sample stock was prepared with one of sample solvents-DMSO, 70% EtOH, or water. Each value represents the mean $\pm$ SD of triplicates. The different letters indicate statistical differences at the  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 계산공식에 따른 항산화능의 차이

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능을 정량화하기 위한 계산공식의 선택은 정확한 결과 도출에 큰 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다. 이번 실험에서는 많이 이용되고 있는 공식 중 Ak와 Gülçin(2008)의 공식을 C-1, Loo 등(2008)의 공식을 C-2, 그리고 저자가 제안하는 공식을 HH로 명명하여 비교하였다. 저자가 제안하는 공식은 Park 등(2011)이 사용한 공식과 같다.

비타민 C와 같은 무색 시료와 달리 대부분의 식물 혹은 천연물들은 고유의 색을 가지고 있는 경우가 많아 특히 항산화능을 측정할 때에는 색소에 의한 흡광도의 변화를 고려해야 한다. 색소를 고려한 공식과 그렇지 않은 공식에 따른 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능의 차이를 Table 1에 나타내었다. 대조구로 사용한 무색 시료인 아스코르브산(ascorbic acid)의 경우 계산공식에 관계없이 비슷한 결과를 나타냈지만, 진한 노란색의 대황 뿌리 70% 에탄올 추출물의 경우 색소를 고려한 공식과 그렇지 않은 경우 약 20% 정도의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능의 차이를 확인하였다. 시료의 색소 및 ABTS<sup>+</sup> 고유의 색을 고려하지 않는 C-1 및 C-2와 같은 공식을 사용할 경우 EC<sub>50</sub> 값으로 보정하는 것이 필요하다고 사료된다. 지금까지의 결과를 종합해볼 때 정확한 ABTS<sup>+</sup> 항산화력 실험을 진행하기 위하여 ABTS<sup>+</sup> stock 희석용매, 추출용매를 고려한 시료 stock 용매 및 적합한 계산공식을 사용하여 신뢰할 수 있는 결과를 도출하여야 한다.

## 요 약

본 연구에서는 중국 대황(*Rheum officinale*)을 식물 재료로 이용하여 ABTS<sup>+</sup> 프리라디칼 소거능 측정법에 영향을 미치는

**Table 1.** Comparison of ABTS antioxidant activity of pigmented and no pigmented sample based on equations

Sample	Equation	Con (μg/mL)					
		10	20	40	80	160	200
NPS	HH $\{1 - (S - BS) / (SC - BC)\} \times 100$	38.59±2.60 <sup>a</sup>	63.19±0.70 <sup>a</sup>	101.03±0.98 <sup>a</sup>	99.46±2.97 <sup>a</sup>	100.64±1.23 <sup>a</sup>	99.98±1.59 <sup>a</sup>
	C-1 $\{1 - (S/C)\} \times 100$	30.10±1.53 <sup>b</sup>	52.58±0.37 <sup>b</sup>	83.15±0.81 <sup>b</sup>	83.48±2.44 <sup>b</sup>	84.44±1.02 <sup>b</sup>	84.07±1.32 <sup>b</sup>
	C-2 $\{(C - S)/C\} \times 100$	30.10±1.53 <sup>b</sup>	52.58±0.37 <sup>b</sup>	83.15±0.81 <sup>b</sup>	83.48±2.44 <sup>b</sup>	84.44±1.02 <sup>b</sup>	84.07±1.32 <sup>b</sup>
PS	HH $\{1 - (S - BS) / (SC - BC)\} \times 100$	19.10±1.02 <sup>a</sup>	35.68±0.82 <sup>a</sup>	59.04±0.46 <sup>a</sup>	89.63±0.17 <sup>a</sup>	99.37±0.34 <sup>a</sup>	97.29±0.36 <sup>a</sup>
	C-1 $\{1 - (S/C)\} \times 100$	16.63±1.03 <sup>b</sup>	30.56±0.93 <sup>b</sup>	50.16±0.43 <sup>b</sup>	74.87±0.16 <sup>b</sup>	86.16±0.32 <sup>b</sup>	86.25±0.35 <sup>b</sup>
	C-2 $\{(C - S)/C\} \times 100$	16.63±1.03 <sup>b</sup>	30.56±0.93 <sup>b</sup>	50.16±0.43 <sup>b</sup>	74.87±0.16 <sup>b</sup>	86.16±0.32 <sup>b</sup>	86.25±0.35 <sup>b</sup>

NPS: no pigment sample (L-ascorbic acid), PS: pigment sample (yellow 'Daehwang' root).

HH: author suggested (Park et al., 2011), C-1: Ak and Gülçin (2008), C-2: Loo et al. (2008).

S: sample (Daehwang/ABTS<sup>+</sup>), BS: blank of sample (Daehwang/H<sub>2</sub>O), SC (=C): control (H<sub>2</sub>O/ABTS<sup>+</sup>), BC: blank of control (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O).

Each value represents the mean±SD of triplicates.

The different upper letters indicate statistical differences at the  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

여러 가지 요인을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. ABTS<sup>+</sup> stock을 물과 PBS(pH7.4)를 이용하여 OD 값을 0.6으로 조절하였을 때 70% 혹은 100% 에탄올을 희석용매로 사용했을 때보다 정확하고 안정적인 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 결과를 나타내었다. 또한 감압농축 한 시료의 stock을 제조하기 위해 추출용매와 동일한 70% 에탄올을 이용하였을 때 DMSO와 물보다 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능의 반복 간 변이가 매우 낮았다. 마지막으로 색소를 가지는 추출물은 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능을 나타내는 계산공식에 따른 결과가 20% 정도의 차이를 나타냈다. 이러한 결과를 토대로 정확한 ABTS 항산화력 실험을 수행하기 위하여 ABTS<sup>+</sup> 희석용매, 시료 추출용매를 고려한 stock 용매, 적절한 계산공식을 선택하여 천연재료의 항산화력을 검증하기 위하여 더욱 정확하고 신뢰성 있는 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정법을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 감사의 글

이 논문은 2017학년도 영남대학교 연구년 결과물로 제출됨.

## REFERENCES

- Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008. 174:27-37.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 2013. 21:143-152.
- Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2013. 85:957-998.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 2001a. 73:239-244.
- Arnao MB, Cano A, Alcolea JF, Acosta M. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem Anal.* 2001b. 12:138-143.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958. 181:1199-1200.
- Boligon AA, Machado MM, Athayde ML. Technical evaluation of antioxidant activity. *Med Chem.* 2014. 4:517-522.
- Charde MS, Shukla A, Bukhariya V, Mehta J, Chakole R. Herbal remedies as antioxidants: an overview. *Int J Pharmacol Res.* 2011. 1:25-34.
- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal.* 2011. 24:1043-1048.
- Jimenez-Alvarez D, Giuffrida F, Vanrobaeys F, Golay PA, Coting C, Lardeau A, et al. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2008. 56:3470-3477.
- Kuppusamy S, Thavamani P, Megharaj M, Nirola R, Lee YB, Naidu R. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. *Ind Crops Prod.* 2016. 83:630-634.
- Loo AY, Jain K, Darah I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.* 2008. 107:1151-1160.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radical Res.* 1997. 26:195-199.
- Park GH, Lee JY, Kim DH, Cho YJ, An BJ. Anti-oxidant and antiinflammatory effects of *Rosa multiflora* root. *J Life Sci.* 2011. 21:1120-1126.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990. 51:283-297.
- Pokorny J, Korczak J. Preparation of natural antioxidants. In: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. *Antioxidant in Food: Practical Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2001. p 311-330.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999. 26:1231-1237.
- Schaich KM, Tian X, Xie J. Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *J Funct Foods.* 2015. 18:782-796.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 2006. 19:669-675.