دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده شیمی

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عسل، روغن سویا و روغن آفتابگردان با استفاده از واکنش نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها

پایان نامه کارشناسی ارشد

بهناز آزمون

اساتیدراهنما
دکتر یوسف غایب
دکتر کیومرث زرگوش

شهریور ۱۳۹۲

فهرست مطالب

فصل ۱ مقدمه و تئوری ۲
۱-۱ طیف سنجی لومینسانس مولکولی ۲
۱-۱-۱- فوتولومینسانس ۳
۱-۱-۲- نورتابی شیمیایی ۳
۱-۱-۳- گزیده‌ای از تاریخچه نورتابی شیمیایی ۶
۱-۲- آنتی‌اکسیدان‌ها ۷
۱-۲-۱- فرآیند آنتی‌اکسیدانی ۸
۱-۲-۲- انواع آنتی‌اکسیدان‌ها: ۹
۱-۳- واکنش‌های نورتابی شیمیایی ۱۰
۱-۳-۱- نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها (PO-CL) ۱۰
۱-۴- مکانیسم و سینتیک واکنش‌های (PO-CL) ۱۳
۱-۴-۱- مکانیسم رائوت ۱۳
۱-۴-۲- مکانیسم رائوت - مک کاپرا ۱۳
۱-۴-۳- کاربرد واکنش‌های PO-CL به عنوان آشکارساز HPLC ۱۴
۱-۴-۴- کاربرد واکنش‌های PO-CL در الکتروفورز مویینه (CE) ۱۵
۱-۵- شرایط لازم برای نشر نورتابی شیمیایی ۱۶
۱-۶- فاکتورهای مؤثر برنشر نورتابی‌شیمیایی ۱۷
۱-۶-۱- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها ۱۷
۱-۷- مروری بر کارهای انجام شده در اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدان‌ها ۱۸
۱-۷-۱- روش اندازه‌گیری ORAC ۱۸
۱-۷-۲- روش اندازه‌گیری TRAP ۱۸
۱-۷-۳- روش اندازه‌گیری TOSC ۱۹
۱-۷-۴- روش اندازه‌گیری Crocin bleaching ۱۹
۱-۷-۵- روش‌های اندازه‌گیری مبتنی بر CL ۲۰
۱-۷-۶- روش اندازه‌گیری DPPH ۲۲

فصل ۲ مواد و روش‌ها ۲۴
۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده ۲۴
۲-۲- دستگاهوری ۲۵
۲-۲-۱- اختلاط واکنشگرها و نمونه‌ها با یکدیگر ۲۶
۲-۳- مواد مصرفی و محلول‌های شیمیایی ۲۷
۲-۴- تهیه محلول‌های شیمیایی ۲۹
فصل ۳ ارائه‌ی نتایج و نتیجه‌گیری ۳۲
۳-۱- ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست و آب‌دوست با استفاده از روش نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها ۳۲
۳-۲- مطالعه فلوئورسانس فلوئورفور به کاربرده شده ۳۳
۳-۳- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها ۳۴
۳-۴- اندازه‌گیری نورتابی شیمیایی فلوئورفور در غیاب آنتی‌اکسیدان‌ها (I_0) ۳۵
۳-۵- اندازه گیری نورتابی شیمیایی فلوئورفوردرحضور آنتی‌اکسیدان‌ها (I) ۳۵
۳-۶- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گالیک اسید ۳۶
۳-۷- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوتیل- هیدروکسیل-تولوئن (BHT) ۳۷
۳-۸- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اولئیک‌اسید ۳۹
۳-۹- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترشیوبوتیل‌هیدروکوئینون (TBHQ) ۴۰
۳-۱۰- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک‌اسید ۴۲
۳-۱۱- بررسی مسیر واقعی اثر آنتی‌اکسیدانی ۴۵
۳-۱۲- ارزش‌گذاری ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی محاسبه‌شده با روش پیشنهادی با ظرفیت‌های آنتی اکسیدانی بدست‌آمده از روش استاندارد Co(II)/EDTA/•OH/H_2O_2-luminol ۴۹
۳-۱۳- بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های حقیقی ۵۰
۳-۱۴- نتیجه‌گیری نهایی ۵۱
۳-۱۵- پیشنهادات جهت ادامه کار ۵۲

چکیده

در این پایان‌نامه یک روش سریع و ساده جهت ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عسل، روغن آفتابگردان و روغن سویا با استفاده از واکنش نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها در حضور ترکیب دی‌ترشیوبوتیل-۲- (ترشیوبوتیل‌آمینو)-۵- [E-۲- فنیل-۱- اتنیل]-۳ و۴- فوران‌دی‌کربوکسیلات به‌عنوان یک فلوئورفور جدید، پیشنهاد شده است. مقدار IC_{50} (غلظتی از آنتی‌اکسیدان است که بتواند ۵۰٪ از شدت نورتابی شیمیایی شاهد را کاهش دهد) در تمامی آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری و مورد بحث قرار گرفته است.ناحیه خطی اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های گالیک اسید، آسکوربیک اسید، اولئیک اسید، TBHQ و BHT به ترتیب $۶/۶\times۱۰^{-۵}$ - $۳/۳\times۱۰^{-۷}$ و $۸/۶\times۱۰^{-۵}$- $۵/۵\times۱۰^{-۷}$ و $۳/۳\times۱۰^{-۷}$ - $۱/۰\times۱۰^{-۴}$ و $۱/۰\times۱۰^{-۴}$ - $۴/۷\times۱۰^{-۷}$ و $۶/۱\times۱۰^{-۴}$ - $۳/۳\times۱۰^{-۷}$ بود. قدرت آنتی‌اکسیدانی گالیک‌اسید> آسکوربیک‌اسید> TBHQ> اولئیک اسید>BHT بود. ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی به‌دست‌آمده با روش پیشنهادی با ظرفیت‌های اندازه‌گیری‌شده با روش استاندارد $Co(II)/EDTA/^{\bullet}OH/H_2O_2$-luminol مقایسه شد. روش پیشنهادی آزاد از فرونشانی فیزیکی و دخالت اکسیدانت می‌باشد، به‌همین دلیل از این روش می‌توان جهت اندازه‌گیری دقیق ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در به‌دام انداختن رادیکال‌های آزاد استفاده نمود. علاوه بر این، روش پیشنهادی نسبت به روش‌های متداول ارزان‌تر وسریع‌تر بوده وهم چنین قابلیت آنالیز نمونه‌های آب دوست و چربی دوست را دارد.

کلمات کلیدی: نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها، آنتی‌اکسیدان، گونه‌های اکسیژن فعال، روغن سویا، روغن آفتابگردان، عسل، گالیک‌اسید، اولئیک اسید، آسکوربیک‌اسید، BHT, TBHQ

فصل ۱
مقدمه و تئوری

با توجه به این‌که در این تحقیق از روش‌های نورتابی شیمیایی(کمی‌لومینسانس)[۱] جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف استفاده شده است، مختصری در مورد این روش‌ها توضیح داده خواهد شد.

۱-۱- طیف سنجی لومینسانس[۲] مولکولی

نور یکی از صورت‌های انرژی است. از آنجا که برای تولید نور، شکل دیگری از انرژی باید صرف شود، دو راه عمده‌ی فرآیند التهاب[۳] و فرآیند لومینسانس برای آن وجود دارد: در فرآیند التهاب، نور از انرژی گرمایی تولید می‌شود. زمانی که جسمی تا دماهای بالا حرارت داده می‌شود شروع به درخشیدن می‌کند. .در فرآیند لومینسانس، الکترون‌های ماده هدف که در شرایط معمول در حالت یا تراز انرژی پایه[۴] به سر می‌برند، با گرفتن انرژی از یک منبع مشخص به حالت‌های پر انرژی‌تر، برانگیخته[۵] می‌شوند. در بازگشت الکترون‌ها از حالت برانگیخته به حالت پایه، انرژی برانگیختگی به صورت نور (انرژی فوتون‌ها) نشر می‌شود[۱].

فرآیندهای لومینسانس بسته به روش تهییج و مکانیسم انتشار نور حاصله، تقسیم‌بندی می‌شوند. وایدمن[۶] اولین کسی بود که پدیده‌های مربوط به نورتابی را براساس منبع تحریک به شش دسته مختلف که به‌ترتیب زیر هستند، تقسیم‌بندی نمود[۲].

۱) فتولومینسانس[۷]:در اثر جذب فوتون به‌وجود می‌آید و خود شامل فلوئورسانس[۸] و فسفرسانس[۹] می‌شود.

---

[1] Chemiluminescence
[2] Luminescence
[3] Incandescence
[4] Ground State
[5] Excited State
[6] Eilhard Wiedemann
[7] Photoluminescence
[8] Fluorescence
[9] Phosphorescence

۲) الکترولومینسانس[1] : لومینسانس ایجاد شده به‌وسیله‌ی جریان الکتریکی است. در الکترولومینسانس، گونه‌های لومینسانس دهنده در اثر واکنش الکترولیز در الکترودها به‌وجود می‌آیند.
۳) ترمولومینسانس[2] : توسط گرما دادن ملایم سامانه ایجاد می‌شود که پس از ذخیره‌سازی اولیه‌ی انرژی به‌وجود می‌آید.
۴) تریبولومینسانس[3] : عامل تحریک، نیروهای اصطکاکی و الکترواستاتیکی و یا به‌طور کلی عوامل مکانیکی مانند ضربه و سایش است.
۵) کریستالولومینسانس[4] : در اثر کریستاله شدن در شرایط ویژه ایجاد می‌شود.
۶) نورتابی شیمیایی: (کمی‌لومینسانس) :در آن واکنش‌های شیمیایی از جمله اکسایش باعث تحریک گونه‌ی مورد نظر می‌شوند.
از میان روش‌های مختلف لومینسانس، روش‌های فتولومینسانس و نورتابی شیمیایی کاربرد وسیع‌تری دارند که در ادامه این دو روش مورد بحث قرار می‌گیرند.

۱-۱-۱- فوتولومینسانس

الکترون‌های ماده در اثر جذب انرژی به سطوح برانگیخته می‌روند. منبع تحریک می‌تواند شعله، قوس الکتریکی و یا تابش الکترومغناطیسی باشد. گونه برانگیخته طول عمر کوتاهی دارد ($۱/۰\times۱۰^{-۸}$ s) و در بر گشت به حالت پایه انرژی اضافی خود را از دست می‌دهد که به این فرآیند نشر گفته می‌شود.
اگر منبع تحریک شعله باشد به نشر حاصل، نشر شعله‌ای گفته می‌شود. اما اگر نشر پس از تحریک نوری صورت گیرد به آن فوتولومینسانس گویند. به عبارت دیگر فوتولومینسانس یک تکنیک نشری است که در آن منبع تحریک، تابش الکترومغناطیسی است که به طور عمده شامل فلوئورسانس و فسفرسانس است.
فلوئورسانس با فسفرسانس این تفاوت را دارد که در آن گذارهای انرژی الکترونی مسئول برای فلوئورسانس متحمل تغییر در اسپین نمی‌شوند. در نتیجه طول عمر فلوئورسانس کوتاه است و نورتابی تقریباً بلافاصله پس از قطع منبع تحریک متوقف می‌شود. در مقابل، تغییر اسپین الکترون که با نشر فسفرسانس همراه است باعث می‌شود که تابش بعد از ختم تابش‌دهی اغلب برای چند ثانیه یا بیشتر ادامه یابد[۳].

۱-۱-۲- نورتابی شیمیایی

نورتابی شیمیایی هنگامی تولید می‌شود که یک واکنش شیمیایی یک گونه برانگیخته الکترونی تولید کند که هنگام بازگشت به حالت پایه خود نور نشر کند. می‌توان واکنش‌های نورتابی شیمیایی را براساس دو مکانیسم زیر تشریح کرد:

---
[1] Electroluminescence
[2] Thermoluminescence
[3] Triboluminescence
[4] Crystalloluminescence

۱)مکانیسم مستقیم:

(a) $A + B \longrightarrow C^* + D$

(b) $C^* \longrightarrow C + Light$

۲) مکانیسم غیرمستقیم:

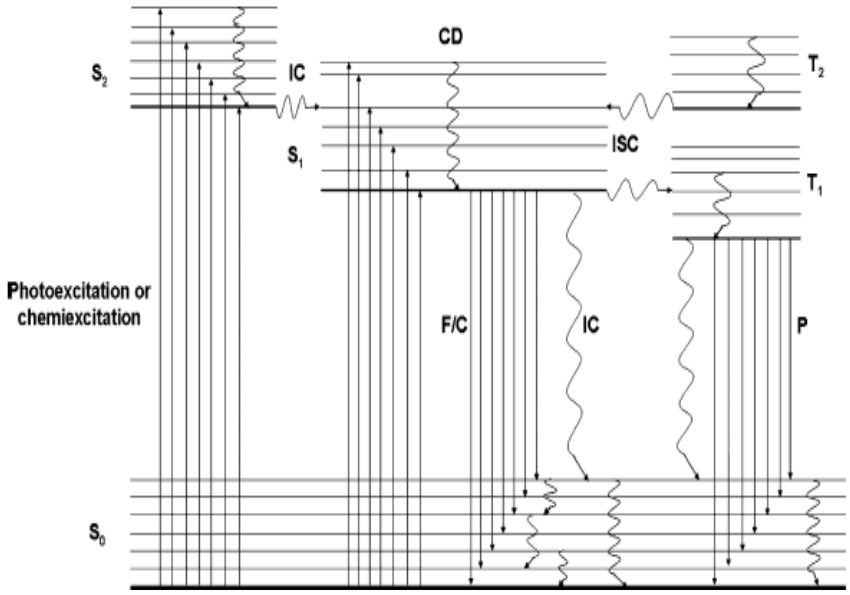
(a) $A + B \longrightarrow C^* + D$

(b) $C^* + F \longrightarrow F^* + C$

(c) $F^* \longrightarrow Light$

که A و B واکنش‌دهنده، C و D فرآورده و F مولکول پذیرنده یا فلوئورسر[1] می‌باشد. مکانیسم اول را نورتابی مستقیم[2] و مکانیسم دوم را نورتابی غیرمستقیم یا حساس‌شده[3] نیز می‌نامند. به‌طور کلی واکنش‌های نورتابی شیمیایی می‌توانند از طریق دو مکانیسم مستقیم و غیرمستقیم دنبال شوند. در مکانیسم مستقیم گونه فلوئورسانس دهنده و واکنش‌گر دیگر که معمولاً اکسید کننده است غالباً در حضور کاتالیزور با یکدیگر واکنش می‌دهند. محصول ایجادشده یا جزئی که در حالت برانگیخته به وجود می‌آید، همزمان با فرآیند آسایش و برگشت به حالت پایه، فوتون نشر خواهدکرد. در اینجا نشر کننده به‌عنوان ماده‌ای در نظرگرفته شده که محصول یا حدواسط ناشی از آن در حالت برانگیخته بوده و با نشر فوتون به حالت پایه باز می‌گردد. در مکانیسم غیرمستقیم یا حساس شده محصولات ایجاد شده در حالت برانگیخته قادر به نوردهی نیستند پس انرژی خود را به یک گونه فلوئوسانس دهنده انتقال می‌دهند. چنین فرآیندی این امکان را فراهم می‌کند تا مولکولی که نمی‌تواند مستقیماً در فرآیند نورتابی شیمیایی شرکت کند بتواند انرژی اضافی خود را به یک حساس کننده انتقال دهد و پس از برانگیخته نمودن آن باعث نشر فوتون شود[۴].
برای مشاهده نورتابی شیمیایی باید گونه، قابلیت تولید فلوئورسانس داشته باشد، چون نورتابی شیمیایی از همان ترازی که فلوئورسانس اتفاق می‌افتد، انجام می‌شود[۵]. همان‌طور که در شکل (۱-۱) مشاهده می‌شود، فرآیند نشر نور از واکنش نورتابی شیمیایی شبیه فتولومینسانس می‌باشد. در فلوئورسانس و فسفرسانس حالت برانگیخته از طریق جذب نور ناحیهٔ مرئی یا ماورای بنفش تولید می‌گردد و نشر نور هنگام بازگشت به حالت پایه می‌تواند از پائین‌ترین وضعیت یکتایی حالت برانگیخته باشد، یا اینکه از فرم سه‌تایی حالت برانگیخته، صورت گیرد.

[1] Fluorescer or Acceptor
[2] Direct CL
[3] Indirect CL or Sensitized CL



شکل (۱-۱): سطوح انرژی و انتقالات برای فلورسانس، فسفرسانس و نورتابی شیمیایی . F: فلورسانس. P: فسفرسانس C: نورتابی‌شیمیایی . CD: فعالیت زدائی برخوردی IC: تبدیل درونی. ISC: عبور بین سیستمی S0: حالت پایهٔ یکتائی. S1وS2حالت برانگیختهٔ یکتائی.T1: حالت برانگیختهٔ سه تائی[۶]

یکی از مزایای مهم نورتابی شیمیایی در مقایسه با فوتولومینسانس این است که به دلیل نداشتن منبع تابش، مزاحمت پراکندگی و سیگنال زمینه را ندارد. گزینش‌پذیری بالا، سادگی و حساسیت فوق‌العاده نورتابی شیمیایی از دیگر مزایای آن است. عـدم حـضور منـبع نور این روش را به یک روش سادهٔ دستگاهی تبدیل کرده است.

شدت نورتابی شیمیایی[1] ناشی از یک واکنش، که به صورت تعداد فوتون نشر شده در واحد زمان تعریف می‌شود، به سرعت انجام واکنش شیمیایی، بازده فرایند تولید حدواسط برانگیخته، و بازده فرایند نورتابی در مقابل سایر فرایندهای غیرفعال‌سازی بستگی دارد. شدت نورتابی شیمیایی را می‌توان با معادله زیر نشان داد:

معادله (۱-۱) I_{CL}(ثانیه/تعدادفوتون) = Φ_{CL}(تعداد فوتون/ تعداد مولکول واکنش‌داده) ×dC/dt (ثانیه/ تعداد مولکول واکنش داده)

در رابطه‌ی بالا Φ_{CL} ، کارایی نورتابی شیمیایی[2] است که بیان کننده بازده تولید حدواسط برانگیخته است و به صورت تعداد مولکول تولید شده در حالت برانگیخته به ازای تعداد مولکول واکنش داده ضرب در تعداد فوتون نشر شده به ازای تعداد مولکول برانگیخته تعریف می‌شود.

dC/dt تعداد مولکول واکنش داده در واحد زمان است. همان‌طورکه گفته شد، شدت نورتابی شیمیایی به سرعت انجام واکنش بستگی دارد بنابراین می‌توان از اندازه‌گیری شدت نورتابی به عنوان مبنایی برای کمی سازی غلظت

[1] CL Intensity
[2] CL efficiency

گونه‌هایی که تعیین کننده سرعت واکنش هستند استفاده کرد[۷] . جهت بررسی دقیق اثر تمام مسیرهای غیر فعال سازی باید کمیت بازده کوانتومی نورتابی شیمیایی[1] را به صورت زیر تعریف کنیم:

معادله (۱-۲) بازده کوانتومی CL = (تعداد کل مولکول واکنش داده / تعداد فوتون نشر شده)

بازده کوانتومی CL را می توان به صورت حاصل ضرب سه فاکتور زیر نوشت :

معادله (۱-۳) بازده کوانتومی $CL = \Phi_{EX} \times \Phi_R \times \Phi_F$

Φ_{EX} کسر مولکول‌های تولید شده در حالت برانگیخته از کل مولکول‌های واکنش داده است، Φ_R کسری از کل مولکول‌های موجود است که وارد واکنش شیمیایی مورد نظر شده‌اند و Φ_F بازده کوانتومی فلوئورسانس است . بازده کوانتومی فلوئورسانس بیانگر کسری از مولکول‌های برانگیخته است که از میان تمام مسیرهای غیرفعال سازی از طریق نشر تابش به حالت پایه بر می‌گردند. بازده کوانتومی نورتابی شیمیای برای اکثر واکنش‌هایی که درشیمی تجزیه کاربرد دارند بین ۰/۰۱ تا ۰/۲ قرار دارد[۸]. بازده کوانتومی CL ترکیبات پروکسی‌اگزالات بین ۰/۰۵- ۰/۵ گزارش شده است[۹]. زمانی که گونه نشر کننده یک فلوئوسر ضعیف است (Φ_F آن عدد کوچکی است) می‌توان با افزودن یک مولکول فلوئوسر قوی بازده CL را افزایش داد. فلوئورسر ترکیباتی هستند که توانایی جذب انرژی و نشر آن به صورت نور را دارند .در این حالت بازده کوانتومی CL به صورت زیر تعریف می‌شود:

معادله (۱-۴) بازده کوانتومی $CL = \Phi_{EX} \times \Phi_R \times \Phi_{ET} \times \Phi_F$

Φ_{ET} بازده کوانتومی انتقال انرژی[2] است و بیانگر کسری از مولکول‌های بر انگیخته است که انرژی خود را به مولکول‌های فلوئورسر منتقل کرده و باعث برانگیخته شدن آنها می‌شوند. Φ_F بازده کوانتومی فلوئورسانس مولکول فلوئورسر است. زمان لازم برای کامل شدن یک واکنش نورتابی شیمیایی می‌تواند کمتر از یک ثانیه تا بیشتر از یک روز به طول انجامد[۵].

۱-۱-۳- گزیده‌ای از تاریخچه نورتابی شیمیایی

پدیده نورتابی شیمیایی در موجودات زنده از ابتدای شروع حیات انسان در روی زمین توجه بشر را به خود جلب کرده‌است. کرم شب‌تاب و سایر فرآیندهای نورتابی شیمیایی در موجودات زنده از دیرباز مورد توجه بشر بوده‌اند. اصطلاح کمی‌لومینسانس را اولین بار در سال ۱۸۸۸ ایلهاردوایدمن، هنگام مطالعه‌ی گستره‌ای از فرآیندهایی که نور تولید می‌کنند، جهت توصیف واکنش‌های شیمیایی مولد نور به کار برد[۱۰].

اولین مقاله‌ای که در این زمینه منتشر شد از آریستوتل[3] بود که در آن انتشار نور ضعیف از ماهی مرده را تشریح می‌کرد. اولین بار نورتابی شیمیایی ناشی از یک ترکیب سنتزی در سال ۱۸۷۷ توسط رادسیزکی[4] مشاهده شد. وی در مطالعات خود دریافت که لوفاین[5] (۲،۵،۴ تری‌فنیل‌امیدازول) هنگام واکنش با اکسیژن در محیط بازی نور سبز ایجاد می‌نماید. وی توانست تا سال ۱۸۸۰ لیست وسیعی از ترکیبات سنتزی و طبیعی که قابلیت نورتابی شیمیایی داشتند،

---

[1] Quantum Yield of CL
[2] Energy Transfer
[3] Aristotle
[4] Radziszewski
[5] lufain

ارائه دهد. آزمایش رابرت بویل[1] مبتنی بر کاهش شدت نورتابی یک توده باکتری نورتاب به دلیل تخلیه‌ی هوای اطراف آن‌ها از اولین کارهای تجربی است که اثبات کرد، اکسیژن یا مشتقات آن در انجام واکنش‌های نورتابی بیولوژیک[2] دخالت دارد[۱۱].

بیشتر واکنش‌های نورتابی شیمیایی در اوایل قرن بیستم کشف شدند. در سال ۱۹۰۵ تراست[3] در یک گزارش مفصل خصوصیات لومینسانس نورتابی شیمیایی بیش از چند صد ترکیب آلی شناخته شده را با انواع اکسیدکننده‌ها مورد بررسی قرار داد. در سال ۱۹۱۲ دلپین[4] برای اولین بار نورتابی شیمیایی در فاز گازی را از تعدادی ترکیبات فسفر-گوگرد در حضور اکسیژن مشاهده نمود. لومینول[5]، ترکیبی است که امروزه یکی از مهمترین ترکیبات سنتزی جهت تولید نورتابی شیمیایی می‌باشد. این ترکیب با اینکه در اواسط قرن ۱۹ سنتز شده بود، با این حال تا سال ۱۹۲۸ خصوصیات نورتابی شیمیایی آن کشف نشده بود. در این سال آلبرچت[6] نورتابی شیمیایی شدیدی را از لومینول تحت اکسیداسیون بازی مشاهده نمود. اولین کاربرد عملی لومینول در بررسی‌های پزشکی قانونی و جهت یافتن بقایای خون بوده است. این بررسی توسط اسپیچ[7] در سال ۱۹۳۷ انجام گرفت و در سال ۱۹۳۹ عملاً در پزشکی قانونی مورد استفاده قرارگرفت[۱۲]. اولین نمونه از واکنش‌های نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها[8] که شامل نورتابی شیمیایی ناشی از واکنش بین اگزالیل‌کلرید و هیدروژن‌پراکسید در حضور ترکیبات فلوئورسری مانند دی‌فنیل‌آنتراسن، آنتراسن و متیل‌آکریدون بود، در سال ۱۹۶۳ توسط کندروس[9] گزارش شد[۱۳]. پس از آن رائوت[10] و همکارانش در شرکت سیانامید واکنش‌های (PO-CL) را توسعه داده و آنها را برای اهداف تجاری ونظامی به کار گرفتند[۱۴-۱۵].

۱-۲- آنتی‌اکسیدان‌ها

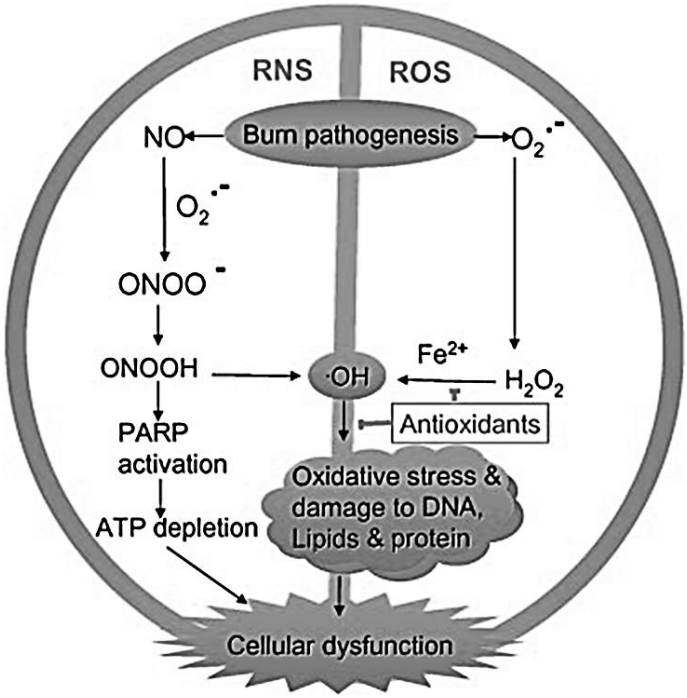
آنتی‌اکسیدان‌ها به ترکیبات شیمیایی خاصی اطلاق می‌شود که میزان و شدت اکسیداسیون سلول‌ها و مولکول‌های زنده را کاهش می‌دهد. یا به عبارت دیگر موادی هستند که قادرند با اثرات مضر اما طبیعی فرآیند فیزیولوژیک اکسیداسیون در بافت‌ها مقابله کنند. در جلوگیری از ایجاد بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری قلبی، سکته مغزی، آلزایمر، آرتریت روماتوئید و کاتاراکت نقش دارند. بهترین منبع دریافت آنتی‌اکسیدان‌ها مواد غذایی هستند[۳۵].

مطالعات نشان می‌دهند برای حفظ سلامت در وضع ایده آل باید حداقل روزانه پنج وعده میوه و سبزی به عنوان بخشی از یک رژیم غذایی متعادل مصرف کرد. ویتامین E در روغن‌های گیاهی، گردو، بادام زمینی، بادام، منابع مناسب ویتامین C شامل مرکبات مانند پرتقال وگریپ فروت، بروکلی، سبزیجات دارای برگ سبز، گوجه فرنگی، فلفل، سیب زمینی، طالبی، و توت فرنگی هستند[۳۶].

---

[1] Robert Boyle
[2] bioluminescent reactions
[3] Trust
[4] Delpine
[5] Luminol
[6] Albercht
[7] Specht
[8] Peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL)
[9] Chandross
[10] M. M. Rauhut

از مواد غذایی حاوی بتاکاروتن می‌توان به طالبی، انبه، کدو تنبل ، فلفل، اسفناج، کلم، و زردآلو اشاره کرد [۳۷]. استرس اکسیداتیو[1] زمانی روی می‌دهد که تولیدگونه‌های مضر رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت حفاظت بخشی دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. رادیکال‌های آزاد اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که شامل یک یا چند الکترون جفت نشده می‌باشند و همین امر سبب واکنش پذیری بالای آن‌ها شده است. رادیکال آزاد به طور مداوم در طی سوخت و ساز طبیعی در بافت‌ها حاصل می‌شود. سلول‌های بدن از رادیکال‌های آزاد به عنوان سلاح‌های مهم برای از بین بردن عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کند[۳۸] .گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[2] و گونه‌های نیتروژن فعال (RON)[3] مهمترین رادیکال‌های آزاد را تشکیل می‌دهند. رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن (ROS) مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد بیولوژیک هستند. ROS شامل رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل، به اضافه مشتقات اکسیژن با الکترون‌های نابرابر مانند پراکسیدهیدروژن، اکسیژن تنها، و اسید هیپوکلروس هستند. این رادیکال‌ها در بدن دنبال الکترون می‌گردند که بگیرند یا از دست بدهند. و در نتیجه به سلول‌ها، پروتئین‌ها، و DNA صدمه می‌زنند [۳۹].



شکل (۱-۲): نحوه آسیب‌رسانی رادیکال‌های آزاد به بدن[۳۹].

۱-۲-۱- فرآیند آنتی‌اکسیدانی

آنتی‌اکسیدان‌ها با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد فرآیند اکسیداسیون را متوقف می‌کنند. برای انجام این کار خودآنتی اکسیدان‌ها اکسیده می‌شوند. به همین دلیل دائماً به وجود منابع آنتی‌اکسیدانی در بدن نیاز است. نحوه عملکرد آنها به دو روش طبقه‌بندی می‌شود:[۴۰]

۱ .شکستن زنجیره:

زمانی که یک رادیکال آزاد الکترونی را جذب کرده یا از دست می‌دهد، رادیکال دوم تشکیل می‌شود. سپس این ملکول همین کار را با ملکول سوم انجام می‌دهد. این روند ادامه می‌یابد تا زمانی که طی آن یا رادیکال بوسیله

[1] Oxidative stress
[2] Reactive Oxygen Species
[3] Reactive Nitrogen Species

یک آنتی‌اکسیدان شکننده زنجیره مانند بتاکاروتن و ویتامین های C و E تثبیت می‌شود، یا به راحتی به یک محصول بی ضرر تبدیل می‌شود.

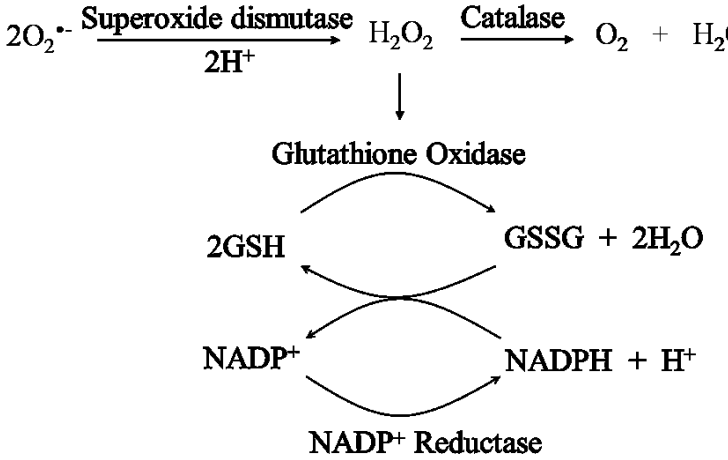
۲ .راه بازدارنده:

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و گلوتاسیون پراکسیداز با کاهش میزان تشکیل زنجیره از اکسیداسیون جلوگیری می کند. چنین آنتی‌اکسیدان‌هایی با یافتن رادیکال‌های آغازگر می‌توانند یک زنجیره اکسیداسیون را برای همیشه متوقف سازند.

تاثیر هر آنتی‌اکسیدانی در بدن بستگی به این دارد که درگیر چه رادیکال آزادی می‌شود، چگونه و کجا تولید می‌شود، و هدف آسیب کجاست. بنابراین در حالیکه یک آنتی‌اکسیدان در یک سیستم ویژه می‌تواند در برابر رادیکال‌های آزاد اثر حفاظت بخش داشته‌باشند، ممکن است در سیستم‌های دیگر هیچ تاثیری نداشته باشند. یا در شرایط خاص یک آنتی‌اکسیدان حتی ممکن است بعنوان یک پرو- اکسیدان که انواع اکسیژن سمی را ایجاد می کند، عمل نماید[۴۱].

۱-۲-۲- انواع آنتی‌اکسیدان‌ها:

۱) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (آندوژن): در شکل (۱-۳) نقش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی را مشاهده کنید.



شکل (۱-۳): نحوه عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی[۴۱].

۲) گلوتاتیون: مهمترین آنتی‌اکسیدانی است که در بدن به طور طبیعی ساخته می‌شود و باعث محافظت اجزای مهم سلولی در برابر واکنش با گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار مانند رادیکال‌های آزاد پراکسیدها می‌شود.

۳) عناصر معدنی: سلنیوم، روی، مس، منگنز، آهن

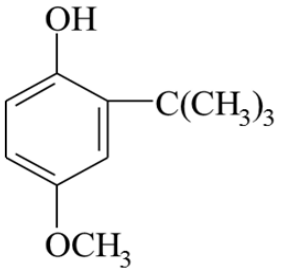
۴) کاروتنو ییدها: یکی از انواع آنتی‌اکسیدان‌های مهم می‌باشند که عملکرد سیستم ایمنی را بالا می‌برند. کاروتنوییدها در سبزیجات زرد، نارنجی وسبز یافت می‌شوند. لازم است از انواع سبزیجات استفاده شود زیرا کاروتنوییدها در تقویت سیستم ایمنی بدن کمک می کنند.

$$^1O_2 + {}^1\beta\text{-CAROTENE} \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta\text{-CAROTENE}$$

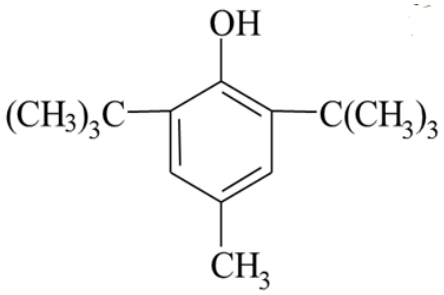
$$^3\beta\text{-CAROTENE} \xrightarrow[\text{RADIATIONLESS}]{} {}^1\beta\text{-CAROTENE}$$

۵)ویتامین‌ها: ویتامین E و C

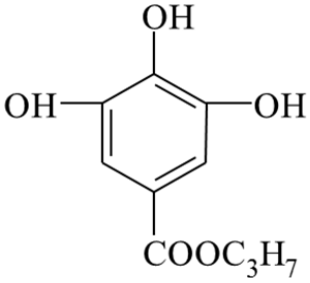
۶)آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی: آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ساخته دست بشرند و اغلب از مشتقات فنلی هستند.ترکیبات سنتزی متفاوتی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارند ولی به دلیل قوانین ایمنی کاربرد تعداد اندکی از آن‌ها در مواد غذایی مجاز اعلام شده است.



Butylated Hydroxy Anisole



Butylated Hydroxy Toluene



Propyl Gallate

شکل (۱-۴): ساختار برخی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی[۴۱].

۱-۳- واکنش‌های نورتابی شیمیایی

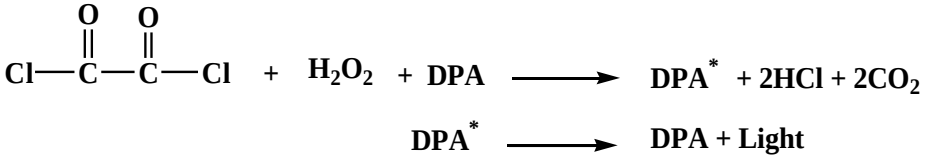
کاربردهای روزمره نورتابی شیمیایی به‌عنوان یک ابزار تجزیه‌ای احتمالاً به حدود سال ۱۹۸۰ برمی‌گردد. در این زمان از واکنش‌های نورتابی شیمیایی به عنوان شناساگر پایان تیتراسیون‌های اسید و باز، رسوبی، اکسایش و کاهش یا تشکیل کمپلکس استفاده می شد (چه از طریق ایجاد نور و چه از طریق خاموش شدن نور). در این تیتراسیون‌ها معمولاً از واکنش اکسیداسیون بازی لومینول یا لوسیژنین[۱] به عنوان عامل نورتابی شیمیایی استفاده می‌شد. همچنین کاربرد نورتابی شیمیایی به‌عنوان آشکارساز کروماتوگرافی مایع توسط کاواساکی[۲] و همکاران در سال ۱۹۸۵ معرفی شد. به دلیل اینکه در این پروژه از واکنش نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها استفاده می‌شود، به صورت ویژه آن‌ها را معرفی کرده و کاربردهای آن‌ها را در شیمی تجزیه به طور خلاصه بررسی می‌شود.

۱-۳-۱- نورتابی شیمیایی پروکسی‌اگزالات‌ها[۳] (PO-CL)

اولین نمونه از واکنش‌های (PO-CL) در سال ۱۹۶۳ توسط شیمیدان جوانی به نام کندروس گزارش شد[۱۶] . این واکنش بین هیدروژن‌پراکسید و اگزالیل‌کلرید انجام شد که دارای نور ضعیف آبی متمایل به سفید بود، ولی در حضور فلوئورسرهایی مانند آنتراسن[۴] دی فنیل آنتراسن[۵] ، و متیل‌آکریدون[۱] دارای نورتابی شدیدی بود که رنگ نور

[1] Lucigenun
[2] Kawasaki
[3] Peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL)
[4] anthracene
[5] 9,10-dighenylanthracene

نشر شده در هر مورد کاملاً با رنگ فلوئورسانس ترکیب فلوئورسر مطابقت داشت. کندروس فرض کرد که یک گونه ی حدواسط نیمه پایدار پرانرژی از واکنش هیدروژن‌پراکسید و اگزالیل‌کلرید حاصل می‌شود که می‌تواند انرژی خود را به فلوئورسری مانند آنتراسن منتقل کند و باعث برانگیخته شدن آن شود.

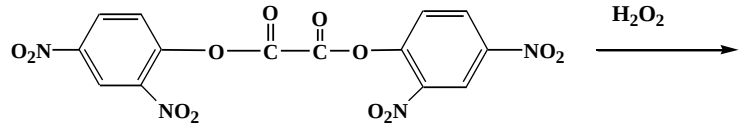


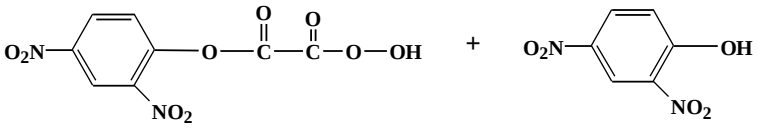
شکل (۱-۵): مکانیسم پیشنهادی کندروس برای واکنش‌های(PO-CL)

او از مطابقت رنگ نور نشر شده در هر مورد با رنگ فلوئورسانس ترکیب فلوئورسر و سرعت بالای واکنش نتیجه گرفت که حالت برانگیخته فلوئورسر یک حالت یکتایی[۲] است (واکنش‌های مستلزم انتقالات سه تایی معمولاً کند هستند). از طرفی سطح انرژی اکسیژن برانگیخته در حالت یکتایی کمتر از آن است که این گونه بتواند مسئول چنین نورتابی باشد. از این رو گونه‌ی حدواسط دیگری باید تشکیل شود. کندروس نتوانست حدواسط مشخصی که مشاهدات او را توجیه کند برای این سیستم پیشنهاد نماید. وی از اهمیت کشف خود خبر نداشت و آن را منتشر کرد تقریباً همزمان با او رائوت و همکارانش در شرکت سیانامید کار بر روی سیستمی که کندروس کشف کرده بود را آغاز کردند و یک سری مکانیسم و حدواسط‌های محتمل برای این سیستم‌ها پیشنهاد کردند[۱۷]. سپس سنتز ترکیباتی را طراحی کردند که بازده کوانتومی آن‌ها در حدی باشد که بتواند کاربردهای تجاری داشته باشد. رائوت و دانشجویانش یک سری از اگزالات‌استرها را سنتز کردند که بازده کوانتومی نورتابی واکنش آن‌ها با هیدروژن‌پراکسید در حضور یک فلوئورسر ٪ ۵ بود، هنوز بازده این سیستم نسبت به بازده کوانتومی سوسک شبتاب (٪۸۸) بسیار کمتر بود. آن‌ها توانستند یک دسته استر از اگزالیک‌اسید سنتز کنند که بازده کوانتومی نورتابی واکنش آن‌ها با هیدروژن‌پراکسید در حضور یک فلوئورسر به۲۲ تا ۲۷ درصد می‌رسید که درخشان‌ترین سیستم نورتابی غیر آنزیمی ساخته شده توسط انسان تا آن زمان بود. می‌توان معادله‌ی یک واکنش نوعی از این دسته برای بیس(۲و۴-دی نیتروفنیل اگزالات)[۳] (DNPO) به صورت زیر خلاصه کرد:

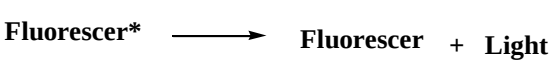
---

[1] N-methylacridone
[2] singlet excited state
[3] bis (2,4-dinitrophenyl)oxalate



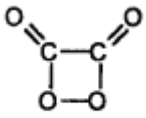


1



شکل (۱-۶):مکانیسم نورتابی شیمیایی (DNPO)[۱۸].

رائوت و دانشجویانش عصای روشن اصلاح شده از این مواد را سیالومه[1] نامیدند و این اسم، نام تجاری محصولات شیمیایی درخشان شرکت سیانامید شد. این محصولات شامل توپ گلف درخشان در شب ، شبنماهای کنار جاده، تورهای ماهی‌گیری شبنما و ...بود رائوت برای اولین بار حدواسط دی‌اکستان دی‌اون[2] (ترکیب DO)، و ساختارهای مشابه را به عنوان حدواسط واکنش‌های نورتابی پروکسی‌اگزالات‌ها پیشنهاد کرد و اثر پارامترهایی نظیر غلظت هیدروژن‌پراکسید، فلوئورسر، اگزالات‌استر و بازهای ضعیف مثل سدیم سالیسیلات را بررسی وگزارش کرد[۱۸].



DO

او مشاهده کرد که با افزایش تعداد گروه‌های الکترونگاتیو بر روی آریل‌پروکسی‌اگزالات‌استر بازده کوانتومی نورتابی افزایش و طول عمر نورتابی کاهش می‌یابد، با افزایش غلظت هیدروژن‌پراکسید شدت نورتابی افزایش ولی بازده کوانتومی ثابت می‌ماند، تغییر غلظت فلوئورسر تغییری در بازده کوانتومی و طول عمر نورتابی ایجاد نمی‌کند. برخی ترکیبات بازی مثل تری‌اتیل‌آمین سرعت واکنش را افزایش ولی بازده کوانتومی را به مقدار اندکی کاهش می‌دهد[۱۸].

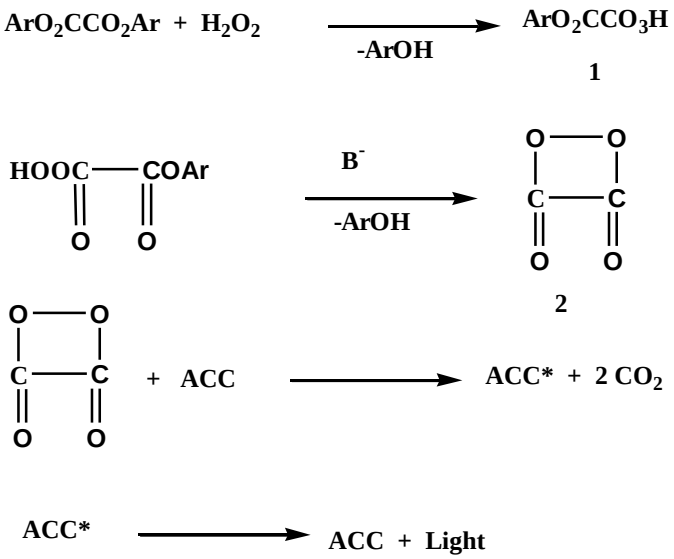
رائوت سپس تلاش خود را بر طراحی و سنتز فلوئورسرهای جدید با بازده کوانتومی نورتابی بیشتر و بررسی دقیق تر مکانیسم واکنش‌های نورتابی پروکسی‌اگزالات‌ها متمرکز کرد.

[1] cyalume
[2] dioxetanedione

۱-۴- مکانیسم و سینتیک واکنش‌های (PO-CL)

۱-۴-۱- مکانیسم رائوت

مکانیسم واکنش‌های نورتابی شیمیای پروکسی‌اگزالات‌ها به طور وسیع مورد بررسی قرارگرفته‌اند. رائوت مکانیسم زیر را پیشنهاد کرد[۱۸]:



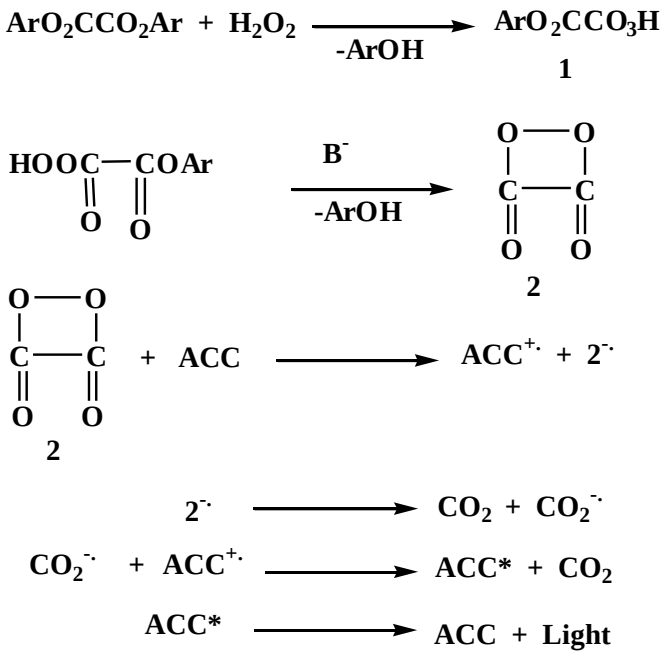
شکل(۱-۷): مکانیسم پیشنهادی رائوت برای واکنش‌های (PO-CL)، B^- کاتالیزگر بازی و ACC فلوئورسر است[۱۸]:.

مهمترین مشخصه‌ی مکانیسم رائوت حدواسط دی‌اکستان‌دی‌اون (ترکیب ۲) است که تاکنون به طور مستقل آشکارسازی نشده است[۱۹]. در مکانیسم پیشنهادی رائوت ابتدا پروکسی‌اگزالات‌استر وارد واکنش نوکلئوفیلی با هیدروژن‌پراکسید می‌شود تا پراگزالیک‌اسید ۱ حاصل شود که با جانشینی درون مولکولی دومین گروه فنولی را حذف کرده و حدواسط کلیدی ۲ را به وجود می‌آورد که به تعبیر رائوت دیمرکربن‌دی‌اکسید است. سپس این حدواسط یک شبه کمپلکس انتقال بار با فلوئورسر، معمولاً یک دهنده‌ی خوب الکترون، تشکیل می‌دهد. با تجزیه‌ی این کمپلکس فلوئورسر درحالت برانگیخته یکتایی ایجاد می‌شود که هنگام برگشت به حالت پایه طیف فلوئورسانس خود را نشر می‌کند[۲۱-۲۰].

۱-۴-۲- مکانیسم رائوت - مک کاپرا [1]

مک کاپرا یکی از دانشجویان رائوت مکانیسم پیشنهادی رائوت را گسترش داد تا مکانیسم لومینسانس تبادل الکترون با آغاز شیمیایی[2] (CIEEL) را که اولین بار توسط کوستر[3][۲۱] پیشنهاد شده بود شامل شود[۲۲]. مکانیسم پیشنهادی رائوت- مک کاپرا در شکل (۱-۸) نشان داده شده است.

[1] McCapra
[2] chemically initiated electron exchange luminescence (CIEEL)
[3] Schuster



شکل (۱-۸): مکانیسم پیشنهادی رائوت- مک کاپرا برای واکنش‌های (PO-CL)، B^- کاتالیزگر بازی و ACC فلوئورسر است[۲۲].

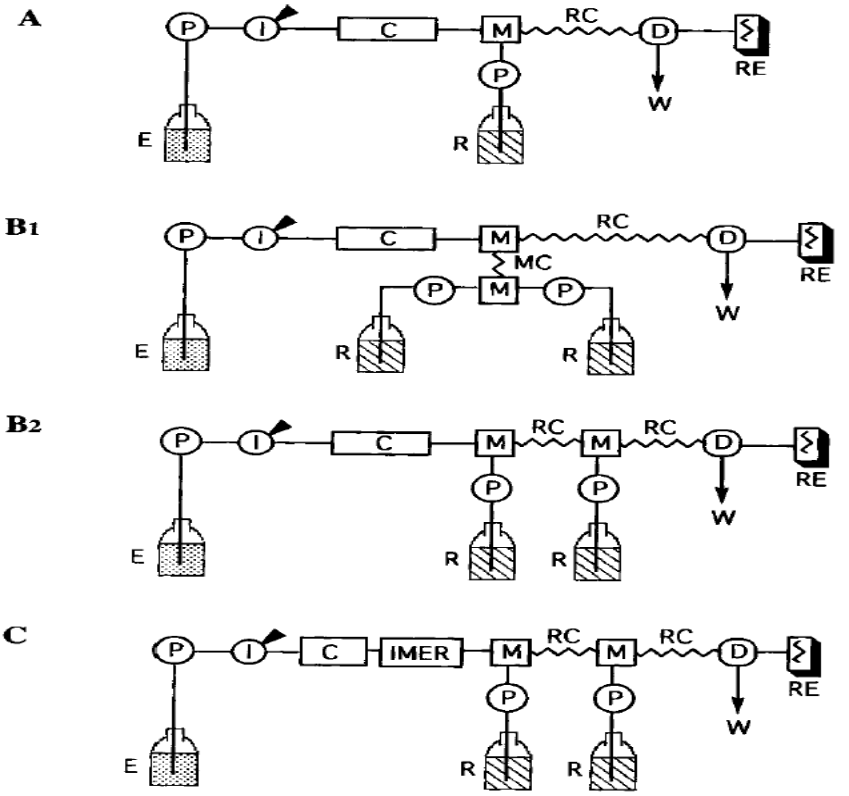
در این مکانیسم حدواسط دی‌اکستان‌دی‌اون، یک الکترون از فلوئورسر می‌پذیرد و به یک آنیون-رادیکال تبدیل می‌شود و فلوئورسر نیز به یک کاتیون-رادیکال تبدیل می‌شود که این دو به صورت یک زوج کاتیون-رادیکال آنیون-رادیکال درکنار هم باقی می‌مانند. سپس آنیون -رادیکال به دو مولکول کربن‌دی‌اکسید تبدیل می‌شود که یکی از آن‌ها یک آنیون-رادیکال در حال برانگیخته است که الکترون پر انرژی را به کاتیون رادیکال فلوئورسر منتقل کرده باعث برانگیخته شدن آن می‌شود که در نهایت فلوئورسر هنگام برگشت به حالت پایه انرژی اضافی خود را به صورت نور نشر می‌کند. دو تفاوت اساسی میان مکانیسم رائوت و مکانیسم رائوت- مک‌کاپرا وجود دارد: اول اینکه در مکانیسم رائوت انتقال الکترون از فلوئورسر به حدواسط مطرح است در صورتی که در مکانیسم رائوت- مک کاپرا تبادل الکترون مطرح می‌شود. دوم اینکه در مکانیسم رائوت، فلوئورسر نقشی در به وجود آمدن حدواسط ندارد اما درمکانیسم دوم فلوئورسر تشکیل شدن حدواسط را کاتالیز می‌کند، به همین دلیل فلوئورسر را فعال کننده[1] نیز می‌گویند[۲۱].

۱-۴-۳- کاربرد واکنش‌های PO-CL به عنوان آشکارساز HPLC

معمولاً آشکارسازهای HPLC-CL برای اندازه‌گیری گونه‌هایی به کار می‌روند که خود ذاتاً فلوئورسر هستند یا اینکه قبل از تزریق به ستون یا بعد از خروج از آن با یک مولکول فلوئورسر مشتق‌سازی می‌شوند. در شکل (۱-۹) پرکاربردترین سیستم‌های آشکارسازی HPLC-CL نشان داده شده‌اند. سیستم A یک سیستم بسیار ساده است که در آن یک محلول (شامل اگزالات و فلوئوروفور) به محلول خروجی از ستون به صورت postcolumn اضافه می‌شود تا آنالیت موجود در آن مثل هیدروژن‌پراکسید را اندازه‌گیری کند. سیستم B مرسوم‌ترین سیستم آشکارسازی مبتنی بر CL می‌باشد که دارای دو پمپ یکی جهت آوردن اجزای لازم جهت تنظیم pH ، آب و غلظت نمک است که باید قبل از افزودن واکنشگرهای CL تنظیم و اضافه شوند و دیگری جهت آوردن اجزای لازم برای واکنش CL

[1] activator

می‌باشد. سیستم C زمانی به‌کار می‌رود که یک رآکتور آنزیم تثبیت شده به مجموعه‌ی B اضافه شود. آنالیت جدا شده توسط HPLC توسط رآکتور فوق به یک گونه‌ی مناسب جهت واکنش CL تبدیل می‌شود سپس با واکنشگرهای CL مخلوط می‌گردد در این حالت یک بافر به عنوان فاز متحرک و یک ستون تبادل یونی جهت واکنش آنزیمی به کار می‌رود. جهت شویش‌های گرادیانی سازوکار پیچیده‌تری مورد نیاز است. اندازه‌گیری ترکیباتی که ذاتاً فلوئورسر هستند مانند فلوفنازین[1]، دی پیریدامول[2] و بنزیدامین[3] در پلاسمای موش توسط HPLC-PO-CL گزارش شده‌است[۲۳-۲۴] .



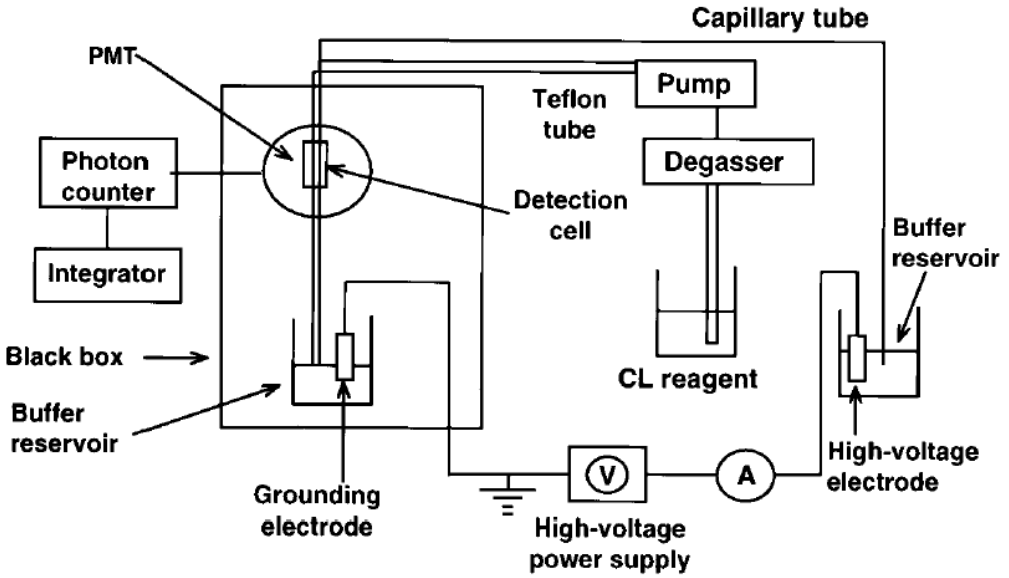
شکل (۱-۹): سیستم‌های آشکارسازی HPLC-CL ، P نشان‌دهنده پمپ ، I تزریق کننده، C ستون ، M مخلوط کننده T شکل، D آشکارساز،RC پیچه ی واکنش، MC پیچه‌ی مخلوط کن، RE ثبات، E شوینده، R واکنشگر، W فاضلاب، IMER رآکتور آنزیم تثبیت شده می‌باشند [۲۵].

۱-۴-۴- کاربرد واکنش‌های PO-CL در الکتروفورز مویینه[4] (CE)

اساس جداسازی در سیستم الکتروفورز مویینه برمبنای تحرک الکترومویینه‌ی گونه‌هاست زمانی که یک پتانسیل بسیار بزرگ، ۱۰-۳۰ کیلوولت، به دو سر لوله مویینه القاء می‌شود. تحرک الکترومویینه‌ی گونه‌ها تابعی از اندازه و بار آن‌ها در یک بافر با pH معین می‌باشد. امروزه از این روش کاربردهای وسیعی در اندازه‌گیری مواد بیولوژیکی و داروها گزارش شده‌است[۲۷-۲۶] . در کارایی CL به عنوان آشکارساز CE چند مشکل وجود دارد : نخست اینکه شدت نورتابی تابع غلظت اجزای محیط می‌باشد. بنابراین در هر جداسازی و اندازه‌گیری باید شرایط،

[1] Fluphenazine
[2] Dy piridamol
[3] Benzidamin
[4] Capillary electrophoresis

غلظت و جریان واکنشگرهای درگیر در نورتابی کاملاً ثابت و به صورت ویژه‌ی آن کار بهینه شود. دوم این‌که این سیستم‌ها به هر ترکیب فلوئورسر پاسخ می‌دهند بنابراین از گزینشگری مناسبی برای اندازه‌گیری یک آنالیت در CE برخوردار نیستند. این مشکل با طراحی راکتورهای مناسب واکنش در HPLC قابل حل است ولی در CE موانع بیشتری دارد.سوم اینکه کارایی سیستم‌های PO-CL محدود به حلال‌های آلی یا محیط‌هایی می‌باشدکه مقدار آب در آن کم باشد. سیستم‌های PO-CL این مزایا را دارند که در محدوده وسیعی از pH قابل استفاده‌اند. اولین بار هارا[1] در سال ۱۹۹۱ از CE-PO-CL برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها استفاده کرد[۲۸] . این روش توانست مشکل ظهور پیک‌های متعدد در اندازه‌گیری‌های مبتنی بر فلوئورسانس پروتئین‌های مشتق‌سازی شده را برطرف کرده و از گرفتگی لوله‌های مویین توسط پروتئین‌ها جلوگیری کند. با استفاده از این روش گروه‌های پژوهشی مختلف توانستند پروتئین‌ها را با حد تشخیص‌های بسیار مطلوب جداسازی و اندازه‌گیری کنند[۳۰-۲۹]. شکل(۱-۱۰) سیستم CE-PO-CL استفاده‌شده در مرجع[۲۹] را نشان می‌دهد.



شکل(۱-۱۰): سیستم CE-PO-CL استفاده شده در اندازه‌گیری پروتئین‌ها [۲۹].

۱-۵- شرایط لازم برای نشر نورتابی شیمیایی

برای اینکه یک واکنش شیمیایی بتواند تولید نور کند بایستی سه شرط اصلی در آن رعایت شود[۳۱]:

۱) انرژی تولید شده توسط واکنش باید به اندازه کافی بزرگ باشد تا بتواند یک حالت برانگیخته تولید کند. برای اینکه نورتابی شیمیایی اتفاق بیافتد بایستی واکنش گرمازا باشد. درصورتی که هدف، ایجاد نورتابی شیمیایی در ناحیه‌ی مرئی باشد بایستی انرژی آزاد آن بین ۷۰-۴۰ Kcal/mol باشد.

۲) وجود یک واکنش شیمیایی مناسب از نظر انرژی که بتواند حدواسط‌های پر انرژی تولید کند. دراین واکنش باید کسر قابل توجهی از مولکول‌هایی که وارد واکنش می‌شوند به حالت برانگیخته برسند.

[1] Hara

۳) وجود یک مسیر غیرفعال‌سازی مناسب از طریق نشر تابش نورتابی شیمیایی که سایر مسیرهای غیرتابشی رقیب در مقابل آن در حداقل باشند. در مورد نورتابی شیمیایی حساس‌شده یا غیرمستقیم، راندمان انتقال انرژی(Φ_{ET})از گونه‌ی برانگیخته به مولکول‌های فلوئورفور و هم‌چنین کارایی فلوئورسانس گونه‌ی فلوئورفور بایستی بزرگ باشد[۳۲-۳۳].

۱-۶- فاکتورهای مؤثر برنشر نورتابی‌شیمیایی

فاکتورهای زیادی بر روی سرعت و بازده کوانتومی واکنش نورتابی شیمیایی تاثیر می‌گذارند[۳۱]: از جمله:

۱) pH و قدرت یونی

۲) دما

۳) آبگریزی و ترکیب حلال؛ مهمترین اثری که حلال می‌تواند داشته باشد برهمکنش بین حلال و حل شونده به ویژه برهمکنش‌های الکترواستاتیکی است. اگر حالت برانگیخته حل‌شونده قطبی‌تر از حالت پایه‌اش باشد، فوتون‌های نشر شده به سمت طول موج‌های بلندتری خواهند رفت. در این حالت حلال‌های قطبی باعث پایداری حالت برانگیخته خواهندشد[۳۴]. به‌عنوان مثال بازدۀ نورتابی شیمیایی برای لومینول اکسید شده در دی‌متیل‌سولفوکساید مقدار ۰/۰۵ و در آب ۰/۰۱ می‌باشد.

۴) ساختار شیمیایی گونه بوجودآورنده‌ی نورتابی شیمیایی.

۵) طبیعت و غلظت واکنش‌گرهای دیگر که روی مسیر نورتابی شیمیایی اثر می‌گذارند. همچنین فرآیندهای رقابتی غیر تابشی که ممکن است اتفاق افتد (به صورت گرمایی).

۶) کاتالیزور انتخاب شده.

۷) حضور گونه‌های پذیرنده و انتقال‌دهندۀ انرژی در محیط.

۸) حضور یون‌های فلزی، بخصوص فلزات واسطه‌ای که در فرآیند اکسایش دخالت دارند.

۱-۶-۱- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها

به‌علت نقش مهم آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در محافظت بدن در برابر بیماری‌های وابسته به ROS، روش‌های زیادی مانند روش قابلیت جذب رادیکال اکسیژن[1] (ORAC) [۳۴-۳۵]، معیار توانایی آنتی‌اکسیدان در به دام انداختن همه‌ی رادیکال‌ها[2] (TRAP) [۴۲-۴۳]، اکسایش لیپوپروتئین‌ها با دانسیته‌ی کم[3] (LDL oxidation)، روش قابلیت تنظیف همه‌ی اکسی‌رادیکال‌ها[4] (TOSC) و روش‌های مبتنی بر نورتابی شیمیایی جهت ارزیابی توانایی به دام انداختن گونه‌های اکسیژن فعال در غذاها و نمونه‌های زیستی توسعه یافته‌اند.

[1] Oxygen Radical Absorbance Capacity
[2] Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
[3] Low Density Lipoproteins Oxidation
[4] Total Oxyradical Scavenging Capacity