

抗氧化剂的评价方法研究进展

马丽*, 孙汇

(呼伦贝尔市食品药品检验所, 呼伦贝尔 021000)

摘要: 评价抗氧化剂的常用分析方法有以下3个共有问题: 第一, 常以清除自由基的能力评价抗氧化剂, 但其仅是组成人体抗氧化网络的小部分, 并且酶在此起了主要作用; 第二, 通过不同方法确定的抗氧化剂的能力和潜能没有必然的联系; 第三, 大多数抗氧化剂的评价方法建立在溶液的反应中, 与其在水油界面如细胞膜、脂蛋白中的反应没有必然联系。在溶液和生物系统以及脂质模型氧化反应中, 抗氧化剂的作用效果不同。在某些特定条件下, 水溶性抗氧化剂和脂溶性抗氧化剂会促进甚至诱导过氧化反应。因此, 本文着重介绍生物标记物的动力学研究, 使生物体内氧化应激的相关特性通过间接体内脂质过氧化反应的动力学表现出来。同时利用分析抗氧化剂的方法来评价氧化应激特性, 使生物系统模型中抗氧化剂的效用量化, 并确定使氧化反应延滞期延长一倍时间时抗氧化剂的使用量(C_{2lag}), 此量值可以表达在相关系统中抗氧化剂的强度。同时对在生物医学背景下, 抗氧化剂的抗氧化能力评价进行展望。

关键词: 抗氧化剂; 自由基; 氧化应激; 动力学; 间接体内

Research progress on evaluation methods of antioxidants

MA Li*, SUN Hui

(Food and Drug Control Institution of Hulun Buir, Hulun Buir 021000, China)

ABSTRACT: The commonly used assays utilized for ranking antioxidants exist three common problems: firstly, it usually evaluates the effects of antioxidants that quench free radicals, which constitutes only a part of the body's anti-oxidative network, in which enzymes play the central role. Secondly, both the capacity and potency of antioxidants, obtained by various methods, do not necessarily correlate with each other. Thirdly, most evaluation methods are established based on methods conducted in solution and not necessarily relevant to processes that occur at the lipid-water interfaces in both membranes and lipoproteins. The capacity and potency of antioxidants are context-dependent, have much more different effects on peroxidation between solutions, biology systems and lipid models. Under certain conditions, both water soluble antioxidants and lipid soluble antioxidants can promote or even induce peroxidation. Therefore kinetic studies of the bio-marker were introduced and the most relevant characteristic of oxidative stress in the biological context was the kinetics of *ex vivo* peroxidation of lipids. These protocols meant that antioxidants were assayed by methods commonly used to evaluate oxidative stress. It enabled quantization of the antioxidants' efficacy in biological system models. The paper proposed studying how much antioxidant was required to double the lag observed prior to rapid peroxidation. The quantity (C_{2lag}) could be used to express the strength of antioxidants in the relevant system. Evaluation capacity and potency of antioxidants about biomedicine were also prospected.

KEY WORDS: antioxidants; free radicals; oxidative stress; kinetic; *ex vivo*

*通讯作者: 马丽, 硕士, 主要研究方向为食品检验。E-mail: mali0927@126.com

*Corresponding author: MA Li, Master, Food and Drug Control Institution of Hulun Buir, Hulun Buir 021000, China. E-mail: mali0927@126.com

1 引言

抗氧化剂是一种分子、原子或相对稳定的原子团,具有减慢和阻止其他分子氧化的能力。抗氧化剂市场的持续扩大反映人们想要治愈由“氧化应激”引发的疾病的强烈愿望^[1,2]。氧化应激(oxidative stress, OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡,倾向于氧化,是自由基在体内产生的一种负面作用,并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素^[3]。Harman 等^[4,5]早在 1956 年提出了“自由基衰老假说”,Steinberg 等^[6]在 1989 年提出了“动脉硬化的氧化应激假说”。Hallowell 等^[1]相继提出了多种疾病的相关假说,包括糖尿病、神经变性疾病、恶性疾病和病毒感染等。这些假说提出了合理期望,抗氧化剂可以延长食品和药品的货架期,并通过供给中和去除病人的有害自由基减少死亡率和发病率^[7]。这也解释了为什么抗氧化剂产品和相关出版物如雨后春笋般快速发展^[8-11]。理论上讲,需要在简单的生物膜模型、血清或者低密度脂蛋白的样本条件下建立一种合理的分析人类氧化应激反应的分析方法,以通过间接体内实验确定抗氧化剂对多元不饱和脂肪酸过氧化反应的影响。

目前,常用的分析抗氧化剂抗氧化能力的方法多在水溶液背景下完成,应用到生物系统中有很多局限性,方法之间联系性和一致性较差。Pinchuk 等^[12]在 2012 年建立了一种新方法,利用研究氧化应激(OS)和反应动力学评价抗氧化剂,此想法早在 10 年前已经被 Prior 等提出,但由于实验遇到困难而放弃。

一个评估抗氧化能力的标准方法应该满足以下“理想要求”^[13]: (1)有实际应用价值; (2)能够清除机体产生的自由基; (3)简便易行; (4)有明确化学反应终点; (5)满足实验条件的仪器设备; (6)实验批内、批间的重复性要好; (7)同时适用于亲水和亲脂抗氧化剂的测定; (8)适用于日常质量管理的高通量分析。

2 分析抗氧化剂的常用方法

有许多经过优化的测定抗氧化剂的方法,其中大部分是同一基础方法的改进,然而只有几个方法被“第一届抗氧化剂方法国际会议”定为标准方法^[14]。最常用的方法并不一定都是最好、最简便、最准确的,然而其应用的最为广泛,有成型的商业检测工具,重复性、重现性较其他方法要好。

2.1 氧自由基清除能力^[15](ORAC)

在研究抗氧化剂总自由基清除能力的众多方法中,氧自由基清除能力(ORAC)方法是应用最广泛的,包括工业和科研机构。与其他测定抗氧化剂的总自由基清除能力方法相似之处在于,通过自由基氧化破坏荧光物质探针形

成非荧光物质,以荧光强度变化反映自由基破坏程度,在抗氧化剂存在条件下,可以抑制自由基引起的荧光变化,抑制程度反映了它对自由基的抗氧化能力。

ORAC 测定法最早由 Wagner 等^[16]提出并改进,通过测定延滞期的时间和最大抑制百分率评价抗氧化的能力,以曲线下的面积定量。此方法可以用来测定人体血液、血浆、血清和各组织的被氧化情况。此方法是一种重要的研究工具,可灵活应用,无论是人工的还是自动化的,并且速度快(大约 1 h)。此方法的缺点是不适用于脂溶性抗氧化剂,其中很多是具有很大的潜力的抗氧化物质。

2.2 亚铁还原能力测定(FRAP)

亚铁还原能力测定(FRAP)法是以单电子转移反应机制为基础评价抗氧化能力的一个例子。此方法最初是由 Benzie 和 Strain^[17]提出的用于测定血浆的还原能力。在酸性条件下,以抗氧化剂还原 Fe^{3+} TPTZ 形成蓝色的 Fe^{2+} TPTZ 为基础,测定抗氧化剂能力。并且此方法建立在“水溶性抗氧化剂仅以还原铁离子反映还原氧自由基能力的假设”基础上。但是,FRAP 法不能测定 H 原子转移的自由基清除部分,特别是巯基化合物和蛋白质,这也导致了血清抗氧化能力的过低评价。

FRAP 法假设在 4~6 min 内完成反应过程,但是事实并非如此,结果与时间变化有很大关系,酚类物质 4 min 就可以完成反应,多酚类物质反应慢,大约 30 min。因此不同抗氧化剂活性比较,反应终点是很重要的因素。同时,在不同极性溶液条件下反应时间也不同,因此选择单一终点也是不合理的^[18]。

2.3 Trolox 当量抗氧化能力测定(TEAC)

Trolox 当量抗氧化能力测定(TEAC)法最早由 Miller 和 Rice-Evans^[19]提出,过氧化氢等氧化剂将 2,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)试剂氧化生成有颜色的 $ABTS^+$ 阳离子,添加抗氧化剂可以延长 ABTS 的寿命,降低颜色反应的速率,以此分析抗氧化能力。并且结果以 Trolox 抗氧化剂作为当量表示。

TEAC 法中最应该注意的是,应严格控制试剂的加入顺序,因为抗氧化剂可以与用于氧化 ABTS 试剂的氧化剂直接反应,从而导致抗氧化能力的过高评价^[20,21]。应该将待评价抗氧化剂在 $ABTS^+$ 阳离子彻底产生后添加,尽量排除干扰因素。此方法操作简单,被许多实验室利用研究抗氧化能力,并已有大量的关于 TEAC 法的文献^[22-27]。

2.4 多种方法评价抗氧化剂

必须确定氧化应激和抗氧化能力测定的反应条件,同时根据具体的研究对象和不同的研究目的选择不同的分析方法,利用某一选定的分析方法来评价不同抗氧化剂的特性。尽管如此,不同的分析方法得到的结果相差较大,采用统一标准评价抗氧化剂并不可靠。本文上述方法仅仅是

一小部分, 为了克服方法过于繁多的问题, 一些前沿专家在 2004 年组织并举办了“第一届抗氧化方法会议”, 但是并没有达到共识, 尚未形成一种合理的统一标准。

2012 年, Leufkens 等^[28]对“血清中多种氧化应激指示剂的水平和大肠癌的关系”进行了研究。在较短的观察期内, 结果表明还原性铁离子的抗氧化能力与患大肠癌的风险没有联系, 然而氧自由基水平与患大肠癌的风险有一定关系。因此, 仅通过一种测定方法来判断抗氧化能力与疾病的关系是不合理的。

3 测定和比较抗氧化剂的新方法

3.1 动力学数据

为了进一步探索抗氧化剂的特性, 对大量的抗氧化剂的抗氧化活性进行了比较, 首先需要明确各实验因素的意义。如图 1 所示, 等浓度的抗氧化剂添加至相同条件的溶液中, 氧化产物浓度随时间变化的曲线是明显不同的。反应前 30 min, 抗氧化剂 A 比 B 抑制氧化反应的作用更强; 但在 60 min 后, 抗氧化剂 B 仍然展现出较强的抗氧化作用, 抗氧化剂 A 这一组的氧化产物明显增加, 抗氧化作用明显减弱。延滞期过后进入快速期, 氧化过程速度快, 观察 3 组曲线, 在 120 min 后氧化产物浓度基本一致, 无法判断添加物质是否具有抗氧化特性。所以仅通过选择某一时间点作为反应终点是具有误导性的, 以此说明抗氧化剂的活性是不合理的, 为了更准确合理地评价抗氧化剂的活性需要氧化过程的相关动力学数据。

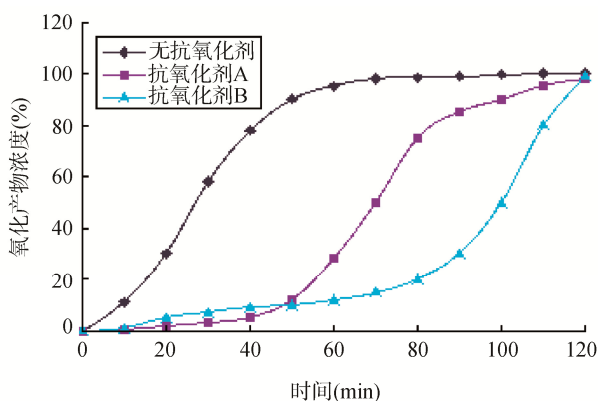


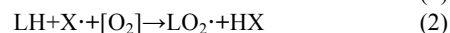
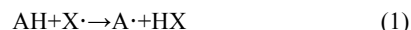
图 1 氧化产物浓度与时间的关系^[29]

Fig. 1 The concentration of oxidation products depend on the time during peroxidation^[29]

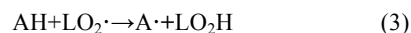
3.2 脂质过氧化特性的动力学描述

Denison 等^[30]早在 2000 年对抗氧化剂在特定条下的作用效果进行了动力学描述。经实验研究, 抗氧化剂对氧化过程的动力学影响体现在: (1)脂质过氧化反映的最初反应速率降低; (2)延长延滞期的时间。

当存在一种抗氧化剂 AH, 一种能够以恒定速度产生的自由基 X·, 并且 X·可以与 AH 和脂质物质 LH 反应, 分散或者溶解在脂质介质中。



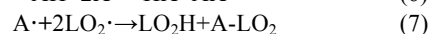
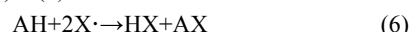
反应(2)的 LO₂·自由基, 反之又可以与抗氧化剂 AH 反应。



通过(1)和(3)反应得到的 A·可以很迅速的被 X·和 LO₂·清除掉, 如反应(4)和(5)。



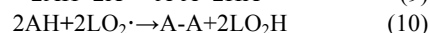
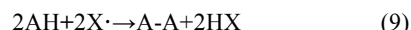
所以, 每一分子的抗氧化剂可以清除 2 个自由基 X·和 / 或 LO₂·, 如反应(6)和(7)。



这又表明, 一分子抗氧化剂可以清除 2 个自由基, 否则当 X·相对比较少, AH 抗氧化剂含量较高时, A·可以通过反应(4)和(5)或者与另一分子 A·反应, 如反应(8)。



这表示每分子 AH 尽可以清除 1 个自由基, X·和 / 或 LO₂·, 如反应(9)和(10)。

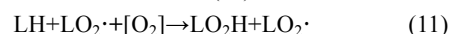


当存在一种有潜质的抗氧化剂, 研究系统中仅存在(6)和(7)的反应而不是清除 2 个自由基的反应。当抗氧化剂已接近被完全消耗掉, 并且对氧化反应的抑制作用几乎消失时, 这个时间点通常表示为延滞时间(t_{lag}), 表达式为: $t_{lag} = f \times n \times [\text{AH}] / R_i$

这个等式中, [AH]是抗氧化剂的浓度, R_i 是产生自由基的表观零级速度(初始阶段), n 表示一分子抗氧化剂能消除的最多自由基个数, f 表示实际消除自由基的化学计量。值得注意的是, n 是由抗氧化剂的化学结构决定的(如大多数多酚类物质 $n=2$), f 是 0~1 之间的数值, 表明反应(4), (5)和(8)之间的竞争关系, 同时表明了与理想化学计量的偏差程度。

此方法中, 反应的延滞期时间与抗氧化剂的浓度成正比, 与自由基产物成反比。将影响因素分成两组, 一组为固有因素, 包括 n ($n=2,4$ 甚至更多); 另一组是非固有因素 ($f=0\sim 1$), 是反映抗氧化剂消除自由基的平均值, 反映了抗氧化剂的效果。延滞期的反应速度独立于其他阶段的反应速率常数。

观察得到, 在同浓度同种自由基的条件下, 不同抗氧化剂反应的延滞期比后期反应速率常数变化要小得多, 氢过氧化物的积累量只与 f 和 n 2 个因素有关。然而, 不同抗氧化剂的能力差别不仅仅取决于氧化产物的积累。根据实验所得, 延滞期的氧化速度受抗氧化剂的浓度和化学特性影响较大。稳定期的氧化反应按照(11)进行:



抑制氧化反应的速度为： $-d[LH]/dt=k_{10} \times [LH] \times R_i / (k_1 \times f \times n \times [AH])$

其中， $[LH]$ 和 $[AH]$ 是可被氧化物和抗氧化剂的浓度； k_1 是反应(1)的抑制速率常数； k_{10} 是反应(11)的反应速率常数，抗氧化剂的潜力如何取决于 k_1 ，不同抗氧化剂的 k_1 值甚至相差几个数量级。

综上，当抗氧化剂通过竞争机制抑制氧化反应，2种不同抗氧化剂最初的抑制速率之比反映了哪种更具有“潜能”。在自由基以一定速率产生时，任意浓度的抗氧化剂对氧化反应的延滞期影响反映了其“能力”。如图1中，可以看出，抗氧化剂A的潜力比B强，抗氧化剂B的能力比A强。

4 氧化应激反应和抗氧化剂能力

“氧化应激”(OS)，在1986年被Sies^[31]定义为“体内氧化和还原反应之间的不平衡”。近几年，有科学家从动力学角度对其全新定义为：“形成氧化破坏的速度”。由此说明OS是一个连续变量，氧化破坏产生的速度依赖于氧化、还原平衡之间的复杂作用，即自身的抗氧化能力已不足以阻止OS发生。

为了能够掌握氧化破坏的进程，至少需要一个标识物。假设一种给定的“氧化应激”类型^[3]，以选用一种灵敏的氧化破坏的探针为基础。根据经验，灵敏的生物标记物多为脂类物质，因此脂质过氧化反应更适于反映氧化和抗氧化之间的平衡。

利用OS评价抗氧化剂的活性应需了解评估OS的常用方法以及其普遍存在的问题。有研究结果^[13]揭示了氧自由基的生理重要性和抗氧化剂过度使用的危险性，因此对OS和抗氧化活性的定量是十分必要的。

5 氧化应激和抗氧化剂能力的相关问题

5.1 缺乏氧化应激反应的统一标准

利用OS的动力学方法来评价抗氧化剂，因缺少统一的标准而受限制，因此应该考虑到测定氧化应激的主要问题。将3种常用的测定人类血清总抗氧化能力的方法(ORAC, TEAC, FRAP)进行比较，结果表明ORAC与FRAP之间存在着微弱的但有意义的线性关系，ORAC与TEAC并无线性关系^[32]。并且，不同方法的范围和限制因素均有不同，同一ORAC法的不同提取工艺导致不同极性抗氧化剂间有较大差异。Dotan等^[4]提出，不同方法测定的OS之间也无关联，有理由相信有不同类型的OS存在。在没有具体测定方法时，利用OS是具有误导性的。一些研究表明，利用同一方法评价OS，但监测的生物标记物不同，结果差异也是相当大的。对这种不一致性的解释在于不同测定方法的复杂性，特别是方法中用到不同的外部探针等。

5.2 实验细节

不一致性的又一重要来源是利用测定生物标记物的方法可靠性。近几年，商业化的方法利用率明显增加，大多方法对实验细节敏感度高，不同实验室测定的结果差异大，而当利用试剂盒测定比人工测定时更为严重。有超过200种的试剂盒商业化，ELISA提供OS指示剂作为产物，包括脂质过氧化产物，DNA片段，抗氧化物酶等。实际上，这些试剂盒测定不同的标记物进行OS分析，结果之间缺少关联性，而且必须要强调“测定数值要求在线性范围内”。

5.3 测定的时间相关性

作为生物标记物的氧化产物浓度具有时间相关性。分两组进行OS的研究：(1)研究不同人群的稳定氧化状态，如“健康和不同患病人群的比较”，“不同种族、性别、生长环境的人群之间的比较”。(2)由于急性事件，如“接触环境因素，物理活性，饮食突然改变”等导致的OS改变。

需要间接体内实验以监测氧化产物浓度的提高和/或可氧化物质浓度的降低，并且这些生物标记物的浓度依赖于生物体内液体的代谢时间。例如，红细胞中不同酶浓度对生理活性的影响测定需要几分钟，而在DNA中，需要几天甚至几周^[33]。

5.4 在溶液和界面中的反应不同

大多数重要的生物医学氧化过程发生在脂质蛋白和细胞膜的水/油界面，这与仅在溶液中反应相比受更多因素的影响。其中包括：两相中诱导氧化物和抗氧化剂的分配，外层PUFA的浓度和物理特性，脂质径向扩散，金属离子转移导致的氧化反应等。

总之，分析OS和AOC遇到很多问题，标准多样，生物标记物多样，实验细节多样。OS分析方法中最大的误差在于仅测定某一波长、某一时间点来研究生物标记物，而不是一个完整的动力学描述。问题在于：(1)生物标记物的浓度是否处于稳定状态；(2)测定的浓度值是否与吸光度呈线性关系；(3)脂质聚集体在水系中是否分布均匀；(4)生物标记物的光谱测定是否可信^[34]。

Pinchuk等^[35]在2011年建议“以抗氧化剂能够抑制基质过氧化的浓度为基础，定义抗氧化剂标准。”同时，“有益的抗氧化剂帮助人类打败有害的ROS”这一说法遭到质疑。特别是，ROS在人体中起了重要的生理学作用，过低浓度的ROS对人体也是有害的^[36,37]。

6 抗氧化剂的间接体内实验

2012年Pinchuk等^[13]提出“利用OS方法分析抗氧化剂的活性”。换言之，在给定系统中研究抗氧化剂对过氧化反应的抑制作用。特别是，当在脂质聚集体(低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、血清、细胞膜)中加入抗氧化剂可以减慢速度，阻止过氧化反应。

6.1 对血清脂蛋白中 PUFA 过氧化反应的抑制作用

由铜离子诱导未分离的血浆或血清进行间接体内试验, 用光谱仪记录过氧化物产物, 研究其脂质过氧化反应的动力学^[38]。有机自由基诱导血清过氧化反应的方法, 与上述方法相似^[39], 过氧化反应的抑制作用则通过延长反应的延滞期来表达。建议用已给定的抗氧化剂能够使延滞期延长至未加抗氧化剂的二倍时的浓度来表示抗氧化活性, 结果可以与在相同下的一个标准探针比较, 如 Trolox。

关于亲脂和亲水抗氧化剂总抗氧化能力的方法优化, 与体内氧化反应相似, 受多种复杂因素的影响。要注意以下几个方面: (1) 抗氧化剂的分配系数; (2) 脂质分子间和分子内的自由基移动; (3) 金属的螯合性。并且, 血清是多功能团环境, 包括白蛋白和一些天然的抗氧化剂, 可能通过不同的方式影响待研究的抗氧化剂能力。

6.2 膜模型中抗氧化剂的评价

脂质体作为一种最为简单方便的膜模型, 适合用于评估抗氧化机制和天然或合成抗氧化剂的活性^[40]。以脂质体为基质分析抗氧化剂活性受制备方法、分散度、结构、纯度等因素影响较大。特别是, 与脂蛋白、血清蛋白的过氧化反应不同, 脂质体的过氧化反应在没有抗氧化剂时并没有明显的延滞期。据此需要选择合适的抗氧化剂浓度, 使达到最大氧化速度的时间延长一倍 $t_{2\max}$ ^[41]。

7 结 论

抗氧化剂最显著的作用是延长过氧化反应的延滞期, 因此延滞期的长短反映了抗氧化剂的能力。另一个可以表示抗氧化剂特性的参数是形成氧化产物的最初速率, 反映了抗氧化剂的潜能。测定一种抗氧化剂的能力和潜能需要动力学数据。某一个时间点的氧化产物浓度并不足以说明该抗氧化剂的特性。

“氧化应激”和“抗氧化能力”都具有条件依赖性。特别是, 抗氧化剂对抑制在水溶液中和在水油界面的探针过氧化反应的效果是不一致的。所以, 在生物医学背景下, 抗氧化剂的抗氧化能力可以通过研究氧化应激过程来评价。

参考文献

- [1] Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine (4th Ed) [M]. New York: Oxford University Press, 2007.
- [2] Niki E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited [J]. Clin Biochem Nutr, 2011, 48: 3–7.
- [3] Carocho M. A review on antioxidants, pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51: 15–25.
- [4] Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 [J]. Biogerontology, 2009, 10: 773–781.
- [5] Lurier, E. Effects of radical oxygen species and antioxidants on macrophage polarization [J]. Biomed Eng Confer, 2015, 4: 17–19.
- [6] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol-modifications of low-density lipoprotein that increase its athero-genicity [J]. New Engl J Med, 1989, 320: 915–924.
- [7] Frankel EN. Antioxidants in food and biology [M]. Bridgewater: the Oily Press, 2007.
- [8] Schmidt HHHW, Stocker R, Vollbracht C, et al. Antioxidants in translational medicine [J]. Antioxid Redox Sign, 2015, 23(14): 1130–1243.
- [9] Miller ER, Pastor-Barruso R, Dalal D, et al. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality [J]. Ann Intern Med, 2005, 142: 37–46.
- [10] Dotan Y, Pinchuk I, Lichtenberg D, et al. Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin E does more harm than good [J]. Arterioscl Throm Vas, 2009, 29: 1304–1309.
- [11] Schnitzer E, Pinchuk I, Lichtenberg D. Peroxidation of liposomal lipids [J]. Eur Biophys J Biophys, 2007, 36, 499–515.
- [12] Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, et al. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays [J]. Chem Phys Lipids, 2012, 165: 638–647.
- [13] Barclay G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine [J]. Free Radical Res, 2010, 44: 711–720.
- [14] Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 4290–4302.
- [15] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 4619–4926.
- [16] Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human-blood plasma by controlled peroxidation the important contribution made by plasma-proteins [J]. FEBS Letters, 1985, 187: 33–37.
- [17] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239: 70–76.
- [18] İlhami Gülçin. Fe³⁺-Fe²⁺ transformation method: an important antioxidant assay [J]. Adv Prot Oxidant Stress, 2014, 9: 233–246.
- [19] Warren J, Resuehr H, Windham S, et al. Associations between Plasma Antioxidant Capacity and Skeletal Muscle Antioxidant Gene Expression [J]. FASEB J, 2015, 29(1): 632–636.
- [20] Christodouleas DC, Fotakis C, Nikokavour A, et al. Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils [J]. Food Anal Meth, 2015, 8: 1294–1302.
- [21] Van den Berg R, Haenen GRMM, Van den Berg H, et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures [J]. Food Chem, 1999, 66: 511–517.
- [22] Gil MI. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing [J]. Agric Food Chem, 2000, 48: 4581–4589.
- [23] Pellegrini P, Serafini M, Colombi B, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays [J]. Nutrients, 2003, 133: 2812–2819.

- [24] Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, *et al.* The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition [J]. *Free Radical Res*, 2002, 36: 217–233.
- [25] Nielsen ILF, Haren GR, Magnussen EL, *et al.* Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency [J]. *Agric Food Chem*, 2003, 51: 5861–5866.
- [26] Pietta P, Simonetti P, Gardana C, *et al.* Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2000, 23: 223–226.
- [27] Cao G, Russell RM, Lischner N, *et al.* Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women [J]. *Nutrients*, 1998, 128: 2383–2390.
- [28] Leufkens AM, Van Duijnhoven, Boshuizen HC, *et al.* Educational level and risk of colorectal cancer in EPIC with specific reference to tumor location [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130: 622–630.
- [29] Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, *et al.* Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays [J]. *Chem Phy Lipids*, 2012, 165: 638–647.
- [30] Denisov ET. *Handbook of antioxidants: bond dissociation energies, rate constants, activation energies and enthalpies of reactions*, 2nd ed [M]. Florida, CRC Press, 2000.
- [31] Sies H. *Biochemistry of oxidative stress* [J]. *Angewandte Chemie-Int Ed English*, 1986, 25: 1058–1071.
- [32] Gracy K.F, Oliveira, Thiago F, *et al.* Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity [J]. *Food Chem*, 2016(1), 192:691–697.
- [33] Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, *et al.* The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations [J]. *Sports Med*, 2008, 38: 579–606.
- [34] Zembron-Lacny A, Ostapiuk J, Slowinska-Lisowska M, *et al.* Pro-antioxidant ratio in healthy men exposed to muscle-damaging resistance exercise [J]. *J Physiol Biochem*, 2008, 64: 27–35.
- [35] Pinchuk I, Shoval H, Bor A, *et al.* Rank-ing antioxidants based on their effect on human serum lipids peroxidation [J]. *Chem Phy Lipids*, 2011, 164: 42–48.
- [36] Birringer M, Ristow M. Efficacy and risks of supplementation with antioxidants [J]. *Ernahrungs Umschau*, 2012, 59: 10–14.
- [37] Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress [J]. *Free Radical Biol Med*, 2011, 51: 327–336.
- [38] Schnitzer E, Pinchuk I, Bor A, *et al.* Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma [J]. *Chem Phy Lipids*, 1998, 92: 151–170.
- [39] Atkin MA, Gasper AM, Ullegaddi R, *et al.* Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation [J]. *Clin Chem*, 2005, 51: 2138–2144.
- [40] Schroder H, Navarro E, Tramullas A, *et al.* Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidant supplement [J]. *Int J Sports Med*, 2000, 21: 146–150.
- [41] Gal S, Lichtenberg D, Bor A, *et al.* Copper-induced peroxidation of phosphatidylserine-containing liposomes is inhibited by nanomolar concentrations of specific antioxidants [J]. *Chem Phy Lipids*, 2007, 150: 186–203.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



马丽, 质量检验工程师, 硕士, 主要研究方向为食品检验。
E-mail: mali0927@126.com