

## 专家组稿专栏

**编者按:**研究表明,肌体氧化应激是加速细胞功能性退行的重要因素,许多老化相关疾病,如动脉硬化、心血管病、糖尿病、白内障、老年痴呆、癌症、关节炎等,与体内活性氧及自由基相关。人体的抗氧化系统是一个可与免疫系统相比拟,具有完善和复杂功能的系统,提高抗氧化能力,有利于机体减少自由基产生或加速其清除,预防和减缓老化性疾病的发生。“食品体外抗氧化能力评价方法探讨”一文,探讨了抗氧化评价的方法、机制、特点,提出了目前抗氧化评价存在问题及改进措施。“响应面法优化微波辅助提取紫苏中迷迭香酸”一文,采用响应面试验设计结合微波辅助提取,优化了紫苏叶中重要抗氧化成分——迷迭香酸的提取工艺。对于指导抗氧化剂和功能性食品研发有一定指导作用。

(栏目主持人:王成涛教授)

文章编号:1671-1513(2012)01-0020-06

## 食品体外抗氧化能力评价方法探讨

张迪<sup>1</sup>, 籍保平<sup>1</sup>, 周峰<sup>1</sup>, 吴薇<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

**摘要:**食品抗氧化能力评价是功能性食品研究的重要领域。目前体外抗氧化能力评价存在着定义不清,实验方法混乱等方面的问题,极大地阻碍了人们比较和筛选抗氧化功能性食品。因此,开发一种能准确评价样品抗氧化能力的方法是亟待解决的世界性难题。从诱导方式,反应机理,结果指标等角度讨论主要体外化学抗氧化评价方法和体外细胞抗氧化评价方法的特点以及他们的缺陷,并对体外抗氧化评价方法的发展与创新提出了展望。

**关键词:**氧化应激; 自由基; 电化学; 细胞模型

**中图分类号:** TS201.2

**文献标志码:** A

1956年英国Harman博士提出了著名的自由基理论,五十多年来,这一理论得到了不断地完善和丰富,这一理论的核心内涵是人体细胞内由于抗氧化物质和促氧化物质的平衡失调而导致其长期处于氧化应激状态。这种失调会导致细胞内大分子物质(蛋白质、脂质、糖类)的积累性氧化损伤,加速人体细胞衰老的趋势,即细胞功能性退化<sup>[1-2]</sup>。近年来,越来越多的实验证据表明,体内氧化应激是诱导多种慢性疾病(炎症,心血管疾病,癌症等)发生、发展

的主要机制<sup>[3-5]</sup>。流行病学研究证实:经常摄入富含抗氧化物质的食物(果蔬等)可以有效降低上述慢性疾病的发病风险<sup>[6]</sup>。食物的抗氧化能力有可能反映它们预防或缓解相关疾病的功效。因此,为了预测各种食物对于人体健康的保护作用,抗氧化能力评价就成为了科研工作者们关注的焦点。

然而,抗氧化的概念至今没有一个准确统一的定义描述,因此常常被人们误解和混淆,事实上抗氧化并不是一个单一的概念,它分为以下3个主要方

收稿日期: 2011-11-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171647); 国家十二五科技支撑计划项目(2011BAD08B03-01)。

作者简介: 张迪,男,博士研究生,研究方向为功能性食品;

籍保平,男,教授,博士生导师,主要从事功能性食品与果蔬加工方面的研究。通讯作者。

面的内容<sup>[7]</sup>:1)抑制自由基/活性氧基团的生成,包括金属离子螯合、提高细胞氧化应激防御体系活力等;2)自由基/活性氧的直接清除;3)生物体氧化损伤的修复与再生。

抗氧化的内涵决定了抗氧化评价的多面性。令人遗憾的是,时至今日仍然缺乏一种准确可靠的抗氧化能力评价方法。目前所使用的多种抗氧化评价方法存在着氧化物物化性质各异,测试环境差异大,结果不可比等问题,有的抗氧化评价方法甚至缺乏科学的严谨性。因此开发一种准确反映受试样品抗氧化能力的方法是极具挑战性的世界性难题。

本文探讨了体外抗氧化评价方法(化学和细胞抗氧化评价方法)的特点,并对体外抗氧化评价方法的创新与发展提出了展望。

## 1 体外化学抗氧化评价方法

化学评价方法是目前使用范围最广的体外抗氧化评价方法,该方法的原理是基于受试物与氧化物间的氧化还原反应。

### 1.1 自由基清除能力

化学评价方法中所使用的自由基分为生物自由基和化学自由基。生物自由基主要包括超氧阴离子、过氧亚硝基阴离子、脂质过氧化自由基、羟基自由基等。生物自由基往往需要较为特殊的反应体系才能在溶液中产生,而且存在的时间极短。在此过程中,受试物有可能会和反应体系中的其他物质作用<sup>[8]</sup>,这使得实验结果意义模糊。相比生物自由基而言,化学自由基获取不需要额外的反应体系,且较为稳定。因此,在抗氧化评价和机理研究中,化学自由基评价方法获得了更多的青睐。以下重点对化学自由基清除方法的特点进行论述。

#### 1.1.1 基于自由基清除计量数的方法

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力法(2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl assay, DPPH assay)和 Trolox 当量法(Trolox equivalence antioxidant capacity assay, TEAC assay)是自由基清除能力测试法的代表,二者分别利用人工合成的 DPPH 自由基和 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS<sup>•+</sup>)自由基做为氧化测试物,二者在可见光范围内均具有最大吸收(515 nm, 734 nm)。检测利用抗氧化物质淬灭自由基,使之生成

无色的稳定产物,通过吸光值的降低程度判定抗氧化物清除上述两类自由基的能力,由于这2种方法操作简单,试剂、仪器价格较低,成为了世界范围内使用最为普遍的体外抗氧化能力评价方法。

然而这两种方法的问题是十分突出的,具体如下:影响 DPPH 方法评价准确性和可比性的主要原因包括1)DPPH 是一种含氮的较为稳定的自由基,氧化势较低( $E = 0.34 \text{ V}$ )<sup>[9]</sup>,有很多抗氧化物质不能被其氧化,表现不出抗氧化能力;2)DPPH 实验中使用的溶剂绝大多数为甲醇,虽是极性溶剂但与生物体环境差别较大;3)DPPH 的颜色可能易被受试样品的颜色干扰;4)DPPH 自由基的氧化机理受到溶剂效应的影响。目前较多的观点认为在甲醇、乙醇溶剂中的 DPPH 自由基反应机理是程序性电子转移机理(sequential proton-loss electron transfer, SPLET)<sup>[10]</sup>,在非极性溶剂中则是氢转移机理(hydrogen atom transfer, HAT)。

影响 TEAC 方法评价准确性和可比性的主要原因包括1)ABTS<sup>•+</sup>自由基见光后有褪色现象,不稳定,操作上需谨慎,易被受试样品的颜色干扰;2)尚缺乏清除 ABTS<sup>•+</sup>自由基的动力学研究,传统习惯把其简单地归为电子转移机理(electron transfer, ET),而清除反应当中是否有质子的转移,其应当归于哪种更为准确的机理类型尚没有十分确切的结论。

上述两种实验方法的实验结果都属于终点法的范畴。结果指标关注的是清除自由基数目的多少。

#### 1.1.2 基于自由基清除动力学的测定方法

与自由基清除计量数法相对应的是自由基清除动力学法,几乎所有有关脂质过氧化自由基(ROO•)的评价方法均属于此类方法,实验中最多运用的是过氧化自由基做为链式反应的发生诱发物,代表性方法有活性氧清除能力测试法(oxygen radical absorbance capacity, ORAC),总过氧化自由基捕获抗氧化检测法(total radical trapping antioxidant parameter, TRAP)等。实验结果反映了抗氧化物质清除自由基的速度或效率,数据意义完全不同于终点法(清除自由基的化学计量数),因此结果差异巨大,不可比<sup>[11]</sup>。

ORAC 和 TRAP 两种方法最大的区别在于动力学参数选择不同,TRAP 选择的是迟滞时间,而 ORAC 选择的是动力学曲线面积。ORAC 实验将迟滞时间,初始速度以及清除自由基的化学计量数等参数合于一个指标参数之中,这既适合于有迟滞阶

段的样品也适合于没有迟滞阶段的样品,但该参数并不一定能准确反映抗氧化物质清除脂质过氧化自由基的能力,实验结果取决于探针物的活性<sup>[12]</sup>,当探针物的反应活性远小于抗氧化物时,反应曲线将出现明显的迟滞阶段,曲线净面积将在很大程度上取决于反应物清除自由基的化学计量数或者反应物的浓度.当探针的反应活性强于抗氧化物时,反应曲线将不会出现明显的迟滞阶段,实验结果则主要反映的是抗氧化物质与自由基反应的活性而不是清除化学计量数.目前广泛接受的荧光探针是荧光素(Fluorescein, FL),由于其反应活性较弱,大多数抗氧化物质在该物质做探针的条件下都会产生明显迟滞曲线,因此,ORAC<sub>FL</sub>方法可能会高估受试物的抗氧化能力<sup>[7]</sup>.

## 1.2 还原氧化物能力

### 1.2.1 阳离子还原法

除了自由基以外,一些非自由基氧化物也常常在抗氧化评价方法中使用,例如铁离子,铜离子等.

还原铁离子能力法(ferric ion reducing antioxidant power assay, FRAP assay)是测定抗氧化物质还原三价铁-2,4,6-三吡啶基三嗪复合物至蓝色二价铁-2,4,6-三吡啶基三嗪复合物的能力检测实验,习惯上把FRAP法检测称为总还原力测定.  $[\text{Fe}(\text{III}) (\text{TPTZ})_2]^{3+} / [\text{Fe}(\text{II}) (\text{TPTZ})]^{2+}$  氧化还原电势约为0.7 V 接近  $\text{ABTS}^{\cdot+} / \text{ABTS}$  的0.68 V,但FRAP往往在酸性水溶液(pH = 3.6)中进行抗氧化检测,而多酚的抗氧化能力和反应速率由于酚羟基的解离的原因而受到溶液环境很大的影响,特别是在强酸性的水溶液条件下,多酚分子上的活跃酚羟基解离受到抑制,供电子速率降低,反应活性下降.这就会导致FRAP的抗氧化结果同其他的抗氧化实验结果缺乏可比性,而酸性环境不符合多数生物体内实际环境,因此FRAP并不适合作为抗氧化评价方法.

福林肖卡法(Folin-Ciocalteu reagent assay, FCR assay)是基于福林肖卡试剂测定总酚含量实验,其本质是测定的受试样品的“总还原力”,而并非传统意义的总酚或者酚含量.所以一些报道将该方法定义为一种基于电子转移机理的抗氧化方法<sup>[13]</sup>,但该方法的不足之处也十分明显:1)反应条件为强碱性条件(pH  $\approx$  10),在此条件下的多酚类物质都去质子化而形成了苯氧阴离子,是彻底的电子转移而没有质子转移,不符合生物环境下的抗氧化规律;2)福林肖卡试剂的化学性质尚不十分清楚,是何种氧

化物在起反应作用仍认识模糊;3)当测试样品为提取物,发酵液时,反应体系容易产生沉淀浑浊.

由以上分析可知,此两种方法由于反应环境与生物环境条件(二者溶液环境处于酸性和碱性环境)差距较大,其实验结果难以真实反映受试物的抗氧化能力.

### 1.2.2 电化学方法

清除自由基或活性氧的化学本质是同自由基或活性氧发生氧化还原反应,在反应过程中转移电子(氢),这实质是一种电化学行为,电化学分析技术可以在非自由基存在的条件下,使抗氧化物质在工作电极上充分失去电子(氢),表现出全面的还原能力,这样通过改变电极电势,实现不同电势下的氧化就可以模拟热力学性质各异的自由基同抗氧化成分间发生的氧化还原反应,因此存在模拟替代自由基/活性氧清除实验的可能性.

近年来,越来越多的研究报道采用电化学分析技术中的循环伏安法,差分脉冲伏安法,流动注射安培法评价受试样品的抗氧化能力<sup>[13-16]</sup>,其中利用循环伏安法得到受试物的阳极峰电流( $I_a$ )和峰电位( $E_{pa}$ )来评价黄酮的抗氧化性已成为了经典模式. Chevion 等于2000年首次阐述了利用循环伏安阳极峰面积评价抗氧化能力的方法,证明了一定终止电势下峰面积(主要与转移电子数相关)同物质抗氧化能力之间存在较高的相关性<sup>[17]</sup>.近年来,此方法在农业食品领域的抗氧化评价中得到了广泛地应用<sup>[18-20]</sup>. He 等利用循环伏安串联紫外/可见薄层光谱技术证明了山奈酚、桑色素对于过氧化氢、 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 清除能力的评价结果受到自由基热力学性质,以及黄酮多步骤氧化这一特点的影响<sup>[21]</sup>. Zhang 等利用循环伏安法,分析了14种黄酮标准品在不同化学抗氧化评价方法中结果差异的原因<sup>[22]</sup>.通过以上研究报道可以证明,电化学分析法既可以反映受试物的氧化还原性质,又能在氧化程度及反应条件上做出灵活的变化,从而搭建起不同热力学性质的氧化物之间的桥梁.这些优势都有利于电化学方法最终模拟替代其他化学抗氧化评价方法,成为研究抗氧化物质清除自由基/活性氧机理的有效手段.

## 2 体外细胞抗氧化评价方法

由于体外化学抗氧化评价方法反映的是受试物



对于各种氧化物的直接清除能力,而受试物在细胞水平上吸收、分布、代谢的情况不可能在化学评价体系下得到体现。近年来,已有一些研究运用细胞培养技术,在细胞水平上对受试物进行抗氧化评价<sup>[23]</sup>。将细胞这一载体应用于抗氧化评价的优势在于:1)能够体现抗氧化物质在生物环境下的吸收、分布等特点,更为全面的反映它们的抗氧化能力。2)可以针对于人体不同部位的细胞和不同的氧化应激方式来具体评价受试物的抗氧化能力。

Kuo 团队陆续开展了食源性黄酮对于肠细胞(Caco-2 cell)中抗氧化酶的作用,黄酮结构对于抑制 Caco-2 细胞脂质过氧化的影响,以及茶多酚与维生素 C、维生素 E 协同抗脂质过氧化等方面的研究,在运用 Caco-2 细胞进行抗氧化评价方面形成了比较系统的思路<sup>[24-26]</sup>。Wolfe 等于 2007 年运用偶氮二异丁基脒盐酸盐[2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH]诱导的肝细胞(HepG2 cell)氧化应激模型,评价了多种抗氧化物质和食物的细胞抗氧化能力(cellular antioxidant activity, CAA)<sup>[27]</sup>。该方法成为世界上首个标准化的细胞抗氧化能力评价方法。此外,红细胞(erythrocyte),内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell)等也在其他一些研究报告中作为抗氧化评价的载体<sup>[28-29]</sup>。

在造模方式上,目前的方法多是采用化学诱发物直接诱导细胞在较短时间内出现氧化应激和氧化损伤,同时测定目标产物的含量,以此衡量受试物保护细胞抵御氧化应激的能力。常见的诱导物有 AAPH 和叔丁基过氧化氢(*t*-BOOH)等<sup>[30]</sup>。

衡量抗氧化物质在细胞内抵御氧化应激效果的指标主要有:自由基/活性氧水平、脂质过氧化水平、细胞凋亡水平等<sup>[31-32]</sup>。检测目标物包括荧光探针二氯荧光黄双乙酸盐(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA),氢化乙啶(dihydroethidium, DHE)等。脂质氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA),4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)等<sup>[33-34]</sup>。

当前,细胞方法所存在的最大的问题是氧化诱导物属于化学合成物,不存在于人体环境中,它们所造成的氧化应激状态并不符合退行性疾病的发病机理,而且,评价结果往往受到诱导物化学性质的影响<sup>[35]</sup>。因此,这样的细胞抗氧化模型只能称之为“准细胞方法”。选择更贴近病理机制的损伤方式去造成细胞的氧化损伤,并利用这样的细胞模型去评价抗氧化能力才可能得到更为准确的评价结果。

此外,细胞抗氧化评价方法还有如下问题亟需解决:1)抗氧化评价指标需要统一,检测手段有待创新。自由基/活性氧水平是最能反映细胞氧化应激程度的指标,但是目前商业化的荧光探针都只能检测一种或较少种类的自由基/活性氧,很难体现细胞整体的自由基/活性氧水平。2)不同细胞由于在代谢调控、氧化应激防御系统等方面存在差别,因此抗氧化物质在不同细胞环境下的抗氧化能力有何差异尚不清楚。3)细胞氧化应激同疾病病理状态间的关系尚待进一步明确。只有直接相关的细胞模型才能成为评价方法的有效载体。

### 3 体外抗氧化评价方法发展展望

从氧化的内涵而言,仅仅以清除特定活性氧/自由基为基础的化学评价方法难以实现受试样品抗氧化能力的全面评价,因为生命体的氧化应激是由多种活性氧/自由基以及信号调控通道所组合成的复杂体系。从社会公众和研究者的意愿出发,更希望将防治疾病,延缓衰老同抗氧化研究紧密相连,研究食物或药物缓解病症的功效与其降低氧化应激能力之间的关系。因此,体外抗氧化评价方法将逐渐脱离单纯的分析化学技术,向着更加生物化的方向迈进<sup>[23]</sup>。细胞是生物体内发生氧化应激的基本场所,受试物在细胞水平所表现出的抗氧化能力更具有生物学意义。

未来细胞抗氧化评价方法应当向体系化、标准化的方向发展。所谓体系化,就是将主要的人体细胞组成一个完整的模型体系。所谓标准化,就是在明确氧化应激发生机制的前提下,确定各细胞所对应的诱导方式和测试指标。

同时,电化学分析技术,分子生物学技术将作为抗氧化评价的重要补充。这是因为,受试物在细胞内的抗氧化行为可能是通过多种途径实现的,是一个复杂的调控机制。既可能有对活性氧/自由基的直接清除,又可能包含对细胞因子的生物调控。因此,在利用细胞方法整体评价受试物抗氧化能力的基础上,我们更需要运用电化学分析手段和分子生物学技术去研究受试物细胞内的抗氧化机制以及构效关系。只有将抗氧化能力评价、抗氧化机制和构效关系三者紧密结合,形成一个研究的整体,才能更好地为我们开发功能性食品,提升人类健康水平服务。

## 参考文献:

- [1] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298 – 300.
- [2] Harman D. The aging process: major risk factor for disease and death[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(12): 5360 – 5363.
- [3] Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7915 – 7922.
- [4] Cai H, Harrison D G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress[J]. *Circulation Research*, 2000, 87: 840 – 844.
- [5] Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest and Liver Physiol*, 2002, 282: 193 – 199.
- [6] Steinmetz K A, Potter J D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review[J]. *J Am Diet Assoc*, 1996, 96(10): 1027 – 1039.
- [7] Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49: 503 – 515.
- [8] Yamashita N, Murata M, Inoue S.  $\alpha$ -Tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions[J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11: 855 – 862.
- [9] Zhuang Q K, Scholz F, Pragst F, et al. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles [J]. *Electrochem Commun*, 1999 (1): 406 – 410.
- [10] Litwinienko G, Ingold K U. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals [J]. *Acc Chem Res*, 2007, 40: 222 – 230.
- [11] Tabart J, Kevers C, Pincemail J, et al. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests [J]. *Food Chem*, 2009, 113: 1226 – 1233.
- [12] Alarcóna E, Camposb A M, Edwards A M, et al. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies[J]. *Food Chem*, 2008, 107: 1114 – 1119.
- [13] Huang D J, Ou B X, Prior R L. The chemistry behind antioxidant capacity assays [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 1841 – 1856.
- [14] Blasco A J, Crevillén A G, González M C, et al. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems [J]. *Electroanal*, 2007, 19 (22): 2275 – 2286.
- [15] Magalhães L M, Santos M, Segundo M A, et al. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity[J]. *Talanta*, 2009, 77: 1559 – 1566.
- [16] Barros L, Falcão S, Baptista P, et al. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays[J]. *Food Chem*, 2008, 111: 61 – 66.
- [17] Chevion S, Roberts M A, Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity [J]. *Free Rad Bio Med*, 2000, 28(6): 860 – 870.
- [18] Zielinska D, Szawara-Nowak D, Zielinski H. Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 6124 – 6131.
- [19] Roginsky V, Barsukova T, Hsu C F. Chain-breaking antioxidant activity and cyclic voltammetry characterization of polyphenols in a range of green, oolong, and black teas[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 5798 – 5802.
- [20] Kilmartin P A, Zou H, Waterhouse, A L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1957 – 1965.
- [21] He J B, Yuan S J, Du J Q, et al. Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity [J]. *Bioelectrochemistry*, 2009, 75: 110 – 116.
- [22] Zhang D, Chu L, Liu Y, et al. Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18): 10277 – 10285.
- [23] Zhang J, Greenwood J, Skinner M A, et al. Oxidative stress and antioxidants: from the test tube to cell-based assays. *Methods in Redox Signaling* [M]. New York: Mary Ann Liebert Inc., 2010: 45 – 62.
- [24] Kameoka S, Leavitt P, Chang C, et al. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids[J]. *Cancer Lett*, 1999, 146(2): 161 – 167.
- [25] Peng W, Kuo S M. Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations [J]. *J Nutr*, 2003, 133: 2184 – 2187.

- [26] Intra J, Kuo S M. Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells [J]. *Chem-Biol Interact*, 2007, 169: 91–99.
- [27] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 8896–8907.
- [28] Blasa M, Angelino D, Gennari L, et al. The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): A new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts [J]. *Food Chem*, 2011, 125: 685–691.
- [29] Łuczaj W, Zapora E, Szczepański M, et al. Polyphenols action against oxidative stress formation in endothelial cells [J]. *Acta Pol Pharm*, 2009, 66(6):617–24.
- [30] Alía M, Ramos S, Mateos R, et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 212(2):110–118.
- [31] Rosenkranz A R, Schmaldienst S, Stuhlmeier K M, et al. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate [J]. *J Immunol Methods*, 1992, 156: 39–45.
- [32] Deng D, Zhang J, Cooney J M, et al. Methylated polyphenols are poor chemical antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5247–5250.
- [33] Pandey K B, Rizvi S I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(1):2–12.
- [34] Wilhelm J, Vytášek R, Ošťádalová I, et al. Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 328: 167–176.
- [35] Piga R, Saito Y, Yoshida Y, et al. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: Involvement of oxidative stress and effect of antioxidants [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28: 67–75.

## Advances in Antioxidant Activity Assessment Assays for Food

ZHANG Di<sup>1</sup>, JI Bao-Ping<sup>1</sup>, ZHOU Feng<sup>1</sup>, WU Wei<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The assessment of antioxidant activity in vitro is an important area in functional food research. However, there were many problems, such as the confusing specification of antioxidant capacity and the improper application of antioxidant activity assessment assays, which hampered the comparison and selection of antioxidant functional foods greatly. Thus, development of a validated method for antioxidant activity assessment is a worldwide problem. In this study, the characteristics and shortcomings of the antioxidant activity assessment methods (the chemical and cellular assays) were discussed in terms of inducing method, reaction mechanisms, and result indicators. In addition, the development prospects of the antioxidant activity assessment methods were proposed.

**Key words:** oxidative stress; free radicals; electrochemistry; cell model

(责任编辑:李 宁)