

### 朱卫星 汪远亮 李宗军

(湖南农业大学食品科技学院 食品科学与生物技术湖南省重点实验室 湖南长沙 410128)

摘 要:肉制品在贮藏一段时间后,颜色会变成让人难以接受的程度,为肉制品的销售带来不利影响。肉制品颜色的 变化在一定程度上与蛋白质氧化有很大地关系。对肉制品中蛋白质氧化的研究有助于延缓肉制品颜色的劣变,提高 肉制品的货架期。主要就蛋白质氧化的机理、氧化后蛋白质发生的主要变化以及氧化后蛋白质的评价技术作了阐述, 旨在建立食品中蛋白质氧化的完善评价机制。

关键词:蛋白质 氧化 变化 评价

# Research progress of protein oxidation mechanism and evaluation technology

ZHU Wei-xing ,WANG Yuan-liang ,LI Zong-jun

( The College of Food Science and Technology of Hunan Agricultural University Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology Changsha 410128 China)

Abstract: The color of meat products becomes unacceptably when they are stored for a period of time ,it brings adverse impact when they are sold. It has the very big relations between meat color changes and protein oxidation in a certain extent. The research of protein oxidation in meat products may help to slow the meat color deterioration improve the meat shelf life. The article is aim to discuss the principle of protein oxidation ,the main changes after the proteins are oxidized and the evaluation of protein oxidation in order to establish the better evaluation system of protein oxidation in foods.

Key words: protein; oxidation; change; evaluation

中图分类号:TS201.2 + 1 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2011)11-0483-04

蛋白质不仅是生物体的重要组成成分,而且在 生命活动中担负着催化、调节、转运、贮存、运动和支 架作用等功能。蛋白氧化是肉制品功能性质改变的 重要原因。蛋白质在自由基的作用下,可发生包括 脂质过氧化加合物的生成、二硫键的连接、酪氨酸侧 链的硝基化和氨基酸的羰基化等一系列共价修饰作 用[1]。现有关蛋白质氧化的研究主要集中在医药卫 生领域。在体内外环境中,蛋白质是自由基和其它 氧化剂攻击的主要目标。氧化使蛋白质的功能丧 失,可以影响到酶的活性、受体、膜转运蛋白等蛋白 质的正常功能,可引起诸如衰老[2-3]、糖尿病[4]、帕金 森氏病(parkinson disease ,PD) 等一系列疾病。更严 重的是,当机体处于过度运动[5]时也会引起蛋白质的 氧化损伤。蛋白质在体外自由基的作用下,其羰基 含量、巯基含量、二聚酪氨酸含量、表面疏水性等方 面已作为蛋白质氧化测定的指标。有关蛋白氧化产

收稿日期:2010-11-16 \* 通讯联系人

作者简介:朱卫星(1985-),男,硕士研究生,研究方向:营养与食品

基金项目: 长沙市重点科技项目资助(K1001081-21)。

物测定方面的研究还很少,还没有建立起完善的氧 化机制。食品当中蛋白氧化测定指标的进一步研 究 对提高产品质量、保护人体健康方面具有重要的 现实意义。

### 蛋白质氧化的机制

蛋白质氧化[6] 是指血浆或组织细胞的蛋白质在 自由基及其相关氧化物的作用下,某些特定的氨基 酸残基发生反应 导致蛋白质功能与结构上的变化, 对氧化物的亲和力增强,易于水解、聚合、交联作用 而导致细胞功能性损害[7]。

肌肉组织中含有或者产生反应性氧系(reactive oxygen species ROS) ROS 包括: 羟基自由基(HO·)、 超氧自由基阴离子(O2·)、NO、过氧化物自由基 (ROO·)、过氧化氮自由基(ONOO-)、单氧(1O<sub>2</sub>)、 次氯酸(HCIO)、过氧化氢(H,O,)。还有其他一些活 性的醛基和酮基。活性氮(reactive nitrogen species, RNS) RNS 主要指含氮自由基及其衍生物 如 NO・、 ONOO-及 ONOOH。它们都是引起蛋白质氧化损伤 的重要因素。

在体内环境和体外实验中,吞噬细胞的活化作

Science and Technology of Food Industry

用被认为通过呼吸作用产生  $H_2O_2$  和过氧阴离子 ( $O_2^-$ ·)并释放亚铁血红素过氧化物酶。这种酶可以催化  $H_2O_2$  和通过生理作用产生的  $Cl^-$ 形成具有强氧化活性的 HClO。HClO 可以和许多具有生物意义的物质反应,比如:蛋白质、DNA、脂肪、胆固醇等,其中的蛋白质是细胞内 HClO 最大的攻击目标,但要取决于它们各自的量的多少。通过对反应速度常数的确定,与 HClO 反应的氨基酸顺序如下:

Met > Cys>Cystine ~ His ~  $\alpha$  – amino > Lys>Tyr ~ Arg > Gln~ Asn<sup>[8]</sup> .

羟自由基(·OH)是人体内最重要的自由基。因此对羟自由基的消除率作为反映药物抗氧作用的重要指标。羟自由基(·OH)有反应活性大、寿命短(小于 10<sup>-4</sup>s)、存在浓度低的特点。韩鹤友<sup>[9]</sup>等、王仕良<sup>[10]</sup>等都对羟自由基的产生及测定进行了研究。

蛋白氧化和脂类的氧化被证实都是由自由基链式反应引起的,ROS与蛋白质的氧化反应历程包括:去氢、电子传递、加成、断裂和重排、二聚、歧化和取代。跟脂肪氧化一样,同样包括:起始、传递、终止三个阶段[11]。

表 1 蛋白质被氧化的脂类催化发生氧化的 可能作用机制(L=lipid; P=protein)

引发	L→L •
传递	$L \cdot + O_2 \rightarrow LOO \cdot$
抽氢	$LOO \cdot + P \rightarrow LOOH + P \cdot (-H)$
延伸	$LOO \cdot + P \rightarrow \cdot LOOP$
复合	• LOOP + P + $O_2 \rightarrow \bullet$ POOLOOP
聚合	$P-P \cdot + P \cdot + P \rightarrow P-P-P \cdot + P-P-P$

### 2 氧化过程中蛋白质所发生的主要变化

自由基介导的蛋白质氧化致使多肽链发生氧化断裂、蛋白质侧链氨基酸发生氧化修饰、以及蛋白质-蛋白质发生交联。

蛋白质不含有天然存在的羰基基团,它们主要是靠氧化机制引入到蛋白质中的。如赖氨酸的 α-氨基的氧化脱氨基作用、脯氨酸和精氨酸中第二位上碳原子的氧化作用都可以形成羰基基团<sup>[12]</sup>。蛋白质的羰基物质能够通过以下四种途径产生<sup>[14]</sup>:氨基酸侧链的直接氧化; 肽骨架的断裂; 和还原糖反应; 结合非蛋白羰基化合物。蛋白质氧化过程中的脱氨反应可能是产生蛋白质羰基的主要反应。此外,羟自由基可引起蛋白质一级结构的破坏,在断裂处产生羰基。

蛋白质在氧化过程中,巯基转换成二硫键是蛋白质氧化过程中的显著变化,它可以作为蛋白质氧化的指标之一。

蛋白质分子中半胱氨酸的-SH 可被氧化形成二硫键 酪氨酸可氧化形成二酪氨酸 ,这样可造成蛋白质交联。在乳中的研究也证明 ,通过半胱氨酸的巯基氧化形成二硫键连接、两个氧化的酪氨酸残基的络合作用可生成由 ROS 介导的蛋白质间交联衍生物。但二酪氨酸作为蛋白质氧化损伤的指标要受到蛋白质样品种类的限制。

氧化诱导蛋白质分子结构展开,使非极性残基 不断暴露,这将导致蛋白质分子的疏水性发生变化。

### 3 食品中蛋白质氧化的评价及主要研究方法

崔旭海<sup>[6]</sup>等在对乳蛋白氧化的研究中指出,由蛋白质氧化引起的蛋白物理化学改变,会增加或降低乳蛋白质凝胶能力,并进一步影响乳蛋白的乳化及保水能力。在肉和肉制品的研究方面,蛋白质氧化可使蛋白质的结构发生变化,这一变化将引起蛋白质溶解性的损失,进而改变肉制品中凝胶性、乳化性、粘性、溶解性和水合作用。氧化引起的肉制品的变色问题,可能是其中的血红素铁或者多肽部分被氧化,或者是二者皆有的氧化所引起的,还需做进一步的研究[[4]。

### 3.1 蛋白质氧化与羰基含量

羰基的形成(醛基和酮基)是被氧化蛋白质中的一个显著变化。蛋白质羰基含量是蛋白质氧化损伤的敏感指标,且相对较容易测量[13]。

孔保华<sup>[15]</sup> 等利用体外羟自由基(  $\cdot$  OH) 产生氧化体系( hydroxyl radical generating system ,HRGS) ,主要由 FeCl<sub>3</sub>、Asc( 抗坏血酸) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过铁的氧化还原反应产生羟自由基。 Fenton 类型的反应是生物体系中形成羟自由基的主要反应。 Asc 是强还原剂 ,可将 FeCl<sub>3</sub> 中的 Fe<sup>3+</sup>还原成 Fe<sup>2+</sup> ,之后 Fe<sup>2+</sup>又和强氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应生成  $\cdot$  OH ,其反应方程式如下:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^-$$
 Fenton 反应

上述反应生成的羟自由基攻击蛋白质的侧链或 肽键 形成蛋白过氧化物。他们认为 如果这些过氧化物是在  $\alpha$ -碳原子或其他氨基酸残基的碳原子上 ,就会使羰基含量增加 ,转化成羰基基团。这就是蛋白氧化后蛋白质羰基含量增加的原因。

常用的检测蛋白质羰基含量的方法主要有: 硼氢化钠法<sup>[16]</sup>、荧光素肼法、荧光胺法、免疫杂交法<sup>[17]</sup>和酶联免疫法<sup>[18]</sup>等。2 A-二硝基苯肼( DNPH) 比色法是测定蛋白羰基含量的最常用的方法。其原理为: 蛋白氧化后形成的羰基可与 2 A-二硝基苯肼反应生成红棕色的 2 A-二硝基苯腙沉淀,此沉淀用盐酸胍溶解后,在分光光度计上 370nm 处有吸光度值,从而测出蛋白质中的羰基含量<sup>[19]</sup>。 其含量用每毫克蛋白中含有多少 µmol 的羰基来表示。这是测定的经典方法,适合实验室的一般测定。也可以利用与2 A-二硝基苯肼作用,生成棕色物质后再采用紫外分光光度法、HPLC或质谱检测。也可用抗 - 2 A-DNP 抗体,利用 Western 印迹、免疫组化及 ELISA 法检测。

# 3.2 蛋白质氧化与巯基含量

蛋白质在氧化过程中,巯基转换成二硫键是初期的一个反应产物<sup>[20]</sup>。崔旭海<sup>[21]</sup>等在乳制品中的研究认为,巯基的降低可能是因为氧化在乳清蛋白多肽分子之间或内部形成了二硫键,或者是进一步氧化成磺酸类或其他氧化产物,从而导致蛋白结构表面的总巯基含量的下降。

Ellman 法是目前测定蛋白质中游离巯基和二硫键含量的快速、简便的方法。欧仕益<sup>[22]</sup>等、刘莉<sup>[23]</sup>等均采用 Ellman 法分别测定了豆奶蛋白及血清中总巯基含量。它是 Ellman 在 1959 年发明的,即利用 5,

Vol.32, No.11, 2011

5'-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB)与游离-SH反应,反应产物是一种在412nm处生成有最大吸收峰的黄色物质采用分光光度法测定。该法简单、快速、直接,是测定纯蛋白质溶液中巯基的一种理想方法。

# 3.3 蛋白质氧化后的二聚酪氨酸含量

蛋白经过·OH 氧化修饰后,二聚酪氨酸是一个 有效的测定指标[24]。崔旭海[21]等在乳清蛋白氧化的 研究中 是参考 Davies 描述的方法测定乳清蛋白中 二聚酪氨酸含量的[25]。孔保华[15]等在乳清分离蛋白 氧化的研究中 二聚酪氨酸含量也是采用上述方法。 此方法是将蛋白溶解在 pH 为 6.0 的高离子强度的磷 酸盐缓冲液中,该溶液中含有浓度为 0.6 mol/ L 的 KCI 溶液经滤纸过滤除去不溶性物质后用荧光分光 光度计进行测定。李冰冰<sup>[32]</sup> 等研究指出二酪氨酸可 以作为蛋白质氧化损伤的指标,但这种指标受到蛋 白质样品种类的限制。具体使用 Amado 方法,采用 325nm 的激发光 415nm 处发射荧光 测定其荧光值。 Hanan 等<sup>[26]</sup>和 Kristensen 等<sup>[27]</sup>研究发现肌球蛋白经 氧化修饰后二聚酪氨酸的含量增加。采用气相色 谱/质谱联用(gas chromatography/ mass spectrometry, GC/MS) 也可以检测酪氨酸残基氧化产物。GC/MS 法可以在复杂的混合物中准确定量痕量的待分析 物 是一种特异、敏感和精确定量蛋白质氧化损伤产 物的方法。而有关蛋白氧化后二聚酪氨酸其它方面 的研究还未见报导。

### 3.4 蛋白质氧化与其表面疏水性

蛋白质分子的表面疏水性比整体的疏水性对蛋白质功能的影响更大。测定蛋白表面疏水性的方法有两种,一种是目前使用比较广泛的,可以测定蛋白质平均疏水值的荧光探针法<sup>[28]</sup>;另一种是后来Kato<sup>[29]</sup>等提出的,是疏水探针法的一种,即 SDS 结合法。耿玮蔚<sup>[30]</sup>等在实验中用这两种方法作了比较,结果表明两种方法具有较好的相关性。有关蛋白质表面疏水性的经验方法已得到肯定,为进一步探索表面疏水性的方法奠定了基础。

#### 3.5 蛋白质氧化中的游离氨

孙研<sup>[33]</sup>等在测定上述常规指标外,还提出了游离氨的测定。他参照管军军<sup>[34]</sup>的方法并进行改进,采用邻苯二甲醛(OPA)法对蛋白中游离氨基进行测定。实验得出,游离氨含量的变化虽然跟羰基变化相关,但并不是线性关系。而在其它的文献中未见把游离氨含量作为测定蛋白氧化的指标。

### 4 展望

对由蛋白质氧化引起乳及其制品如胶凝作用、乳化作用、水合作用或持水能力、搅打起泡性、微胶囊化等的变化、肉及肉制品胶凝作用和肉颗粒间的结合作用、乳化作用和水合作用或持水能力等功能性质的改变有了一定的认识,但蛋白质化学结构的变化与功能性质的改变还没有细致深入的研究,尤其是蛋白质氧化的评价才刚刚建立,有待更加完善。目前有关蛋白质氧化方面的研究多集中在医学领域,人体内自由基引起的蛋白质氧化可引起如糖尿病、冠心病、肾病、帕金森氏病等众多疾病,在医学领

域已有了相应的检测指标。近年来,蛋白质组学的发展使蛋白质氧化的研究也得到了较大的进步,在近期的研究中,越来越多的氧化蛋白质通过蛋白质组学[31]的研究方法被鉴定出来,并且从分子角度提出了一些影响蛋白质氧化的因素。食品做为人类生活所必需,是以后蛋白质氧化方面研究的重点,蛋白质氧化检测方法的研究任重而道远。

### 参考文献

- [1] Rabek JP ,William H ,Papaconstantionou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver [J]. Biochem Bioph Co 2003 305:566-572.
- [2] Ufuk C, Akataya, Refik K, et al. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle [J]. Clin Biochem 2003 36:51-55.
- [3] Chandan K J , Nilanjana D , Rajindar S , et al . Specificity of agerelated carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat [J]. Arch Biochem Biophys 2002 397: 433–439.
- [4] Cakatayl U ,Telcil A ,K ayali R ,et al .Effect of α-lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin -diabetic rat [J].Res Exp Med 2000 ,199:243-251.
- [5] Zsolt RA, Takao K, Shoichi T, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle [J]. Free Radical Bio Med, 1999, 27:69–74.
- [6]崔旭海 孔保华.蛋白氧化及对肉制品品质和功能性的影响[J].肉类研究 2008(11):27-31.
- [7]吴志贤 薜耀明.蛋白质氧化的研究进展[J].临床检验杂志 2007 25(6):476-477.
- [8] Hawkins C L , Pattison D I , Davies M J. Hypochlorite—induced oxidation of amino acids , peptides and proteins [J]. Amino Acids , 2003 25: 259–274.
- [9] 韩鹤友 何治柯 .曾云鹗 .羟自由基的分析研究进展[J].分析科学学报 2001 ,17(1):84-86.
- [10] 王仕良, 张曾, 黄干强. 羟基自由基的产生与测定 [J]. Paper Science and Technology 2003 22(6):45-47.
- [11] Schaich K M. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation III: Free radical transfer from oxidizing lipids [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition ,1980(13):189-244.
- [12] Dragsted L O. Biomarkers of exposure to vitamins A ,C ,and E and their relation to lipid and protein oxidation markers [J]. Eur J Nutr 2008 47(2):3–18.
- [13] Levine R L, Garland D, Oliver C N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [J]. Methods in Enzymology, 1990, 186: 464–477.
- [14] Xiong Y L. Protein oxidation and implications for muscle food quality [M]. Antioxidations in Muscle Foods. Edited by Eric Decker , Cameron Faustman , Clemente [J]. Lopez Bote , 2000: 85–111
- [15] 孔保华.抗氧化剂对羟自由基引起的乳清分离蛋白氧化抑制效果的研究[J].食品科学 2010 31(3):5-10.
- [16] Yan LJ, Rajindar SS. Gel electrophoretic quantitation of protein carbonyls derivatized with tritiated sodium borohydride [J]. Anal Biochem J998 265:176–182.
- [17] Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, et al. Determination

### Science and Technology of Food Industry

- of protein carbonyl groups by immunoblotting [J]. Anal Biochem , 1999 266:48–57.
- [18] Hendrikje B ,Timothy PC ,Karl B ,et al. Winterbourn protein carbonyl measurement by aensitive Elisa method [J]. Free Radical Bio Med ,1997 23:361–366.
- [19] Akio S, Takahiro Y, K azuya I, et al. Trace analysis of carbonyl compounds by liquid chromatography mass spectrometry after collection as, dinitrophenylhydrazine derivatives [J]. J Chromatogr A, 1999, 844:403–408.
- [20] DEAN R T ,FU S ,STOCHKER R ,et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [J]. J Biol Chem , 1997 324: 1-18.
- [21]崔旭海 . 孔保华 熊幼翎. 自由基氧化引起乳清蛋白理化性质变化的研究[J]. 中国乳品工业 2008 36(9): 31-34.
- [22]欧仕益 ,郭乾初 ,包惠燕 ,等 .豆奶蛋白质中琉基含量的 测定 [J].中国食品学报 2003  $\mathfrak{Z}(2)$ : 59-62.
- [23]刘莉 李梅.血清总巯基含量的测定[J].实用医学进修杂志,1996,24(2):97-99.
- [24] DAVIES K J A , DELSIGNORE M E , LIN S W. Protein damage and degradation by oxygen radicals II: Modification of amino acids [J]. Journal of Biological Chemistry ,1987 ,262: 9902 –9907.
- [25] DAVIES K J A , DELSIGNORE M E , LIN S W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II: Modification of amino acids [J]. J Biol Chem , 1987 262: 9902–9907.

- [26] HANAN T , SHAKLAI N. The role of  $\rm H_2O_2$  generated myoglobin radical in cross linking of myosin [J]. Free Radical Research ,1995 22(3):215–227.
- [27] KRISTENSEN L, MOLLER A J, ANDERSEN H J. Degradation myosin by cathepsin B. Comparison of native and oxidatively modified protein. Proceedings of 43rd international congress of meat science and technology [C]. New Zealand: Auckland, 1997.
- [28] 黄曼 ,卞科 .蛋白质疏水性测定方法研究进展 [J].粮油食品科技 2004 ,12(2):31-32.
- [29] KATO A, MATSUDA T, MATSUDOMI N, et al. Determination of protein hydrophobicity using sodium dodecyl sulfate binding method [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(2):284–288.
- [30]耿玮蔚 杨光 谢欣怡 等.SDS 结合法测定蛋白质的疏水性[J].食品科学 2009 30(24):416-418.
- [31]伏毅,谭晓荣.植物体内的蛋白质氧化研究进展[J]. 2008 29(6):82-85.
- [32]李冰冰 赵倩 张龙富.活性氧与蛋白质氧化损伤[J].平顶山工学院学报 2005 ,14(5):16-17.
- [33]孙妍,孔保华,刘骞.羟基自由基氧化体系对乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白化学结构的影响[J].食品科学,2009,30(11):17-21.
- [34]管军军,裘爱泳,刘晓亚,等.加热方式对大豆分离蛋白-糖接枝反应的影响[J].中国油脂 2005 30(6):53-56.

#### (上接第482页)

- [J]. Journal of Chromatography A 2008 1210: 121-134.
- [17] Shui G , Leong L. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A 2004, 1022: 67–75.
- [18] Shui G ,Leong L. An improved method for the analysis of major antioxidants of Hibiscus esculentus Linn [J]. Journal of Chromatography A 2004 ,1048:17–24.
- [19] Shui G, Leong L. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A 2002 977:89-96.
- [20] Shui G , Leong L. Screening and identification of antioxidants in biological samples using high performance liquid chromatography–mass spectrometry and its application on salacca edulis reinw [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005 53: 880–886.
- [21] Toshiya M, Yuzuru I, Tomomi M, et al. Simple detection method of powder antiradical compounds in the raw extracts of plants and its application for the identification of antiradical constituents [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003, 51:1831–1838.
- [22] Yao Y ,Tian C ,Cao W.Anti-oxidative constituents of ethanol extract from buckwheat seeds by HPLC-electro-spray-MS [J] . Agricultural Sciences in China 2008 7(3):356-362.
- [23]符军放.中国蜂胶中酚类化合物的色谱分析方法研究 [D].西北大学硕士学位论文 2006.
- [24] Choi C W ,Kim S C ,Hwang S S ,et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal

- plants and flavonoids by assay guided comparison [J]. Plant Science 2002 ,163:1161-1168.
- [25] McGaw L J ,Steenkamp V ,Eloff J N. Evaluation of athrixia bush tea for cytotoxicity ,antioxidant activity ,caffeine content and presence of pyrrolizidine alkaloids [J]. Journal of Ethnopharmacology 2007 ,110(1):16–22.
- [26] Torres P Avila J G Romo de Vivar A et al. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from Yucca periculosa [J]. Phytochemistry 2003 64: 463–473.
- [27] Silva D H S ,Pereira F C ,Zanoni M V B ,et al. Lipophylic antioxidants from Iryanthera juruensis fruits [J]. Phytochemistry , 2001 57:437-442.
- [28] Dapkevicius A ,Van Beek T A ,Niederländer H A G ,et al.On line detection of antioxidative activity in high performance liquid chromatography eluatesby chemiluminescence [ J ] . Analytical Chemistry ,1999 ,71:736–740.
- [29] Dapkevicius A, Van Beek T A, Niederländer H A G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on—line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates [J]. Journal of Chromatography A 2001 912:73—82.
- [30] Koleva I I Niederländer H A G Nan Beek T A.An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72: 2323–2328.
- [31] Koleva I I Niederlalnder H A G Nan Beek T A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. Analytical Chemistry ,2001 ,73: 3373-3381.