

经典及改进的 CUPRAC 法在多组分抗氧化剂活性研究中的应用

李 辉^{1,2}, 王晓飞^{2*}, 焦海胜^{2*}¹兰州大学药学院, 兰州 730000; ²兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030

摘要: 由于抗氧化反应的复杂性和多样性, 目前测定物质抗氧化活性的方法虽然很多, 但还没有标准的统一的测定方法和测定参数。由于 CUPRAC 法所采用的 CuCl_2 -新亚铜灵试剂具有诸多优点, CUPRAC 法已广泛的应用于多组分抗氧化剂活性的研究。本文综述了经典及改进的 CUPRAC 法在多组分抗氧化剂活性研究中的应用, 同时探讨了其优点和不足。

关键词: 经典 CUPRAC 法; 改进 CUPRAC 法; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.036

Application of Main and Modified CUPRAC Methods in the Study of Antioxidant Capacity of Multicomponent

LI Hui^{1,2}, WANG Xiao-fei^{2*}, JIAO Hai-sheng^{2*}¹College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ² Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: Because of the complexity and diversity of antioxidant reaction, many methods have been used to determine antioxidant capacity. However, there was not a standard and unified method and parameter until now. Because of many advantages of CuCl_2 -neocuproine used in the CUPRAC method, the CUPRAC method has been widely applied to determine antioxidant capacity. In this article, the application of the main and modified CUPRAC methods in the study of antioxidant capacity of multicomponent was reviewed. The advantages and disadvantages of those methods were discussed.

Key words: main CUPRAC method; modified CUPRAC method; antioxidant

20 世纪 80 年代以后, 随着分子生物学和医学的发展, 人们对生物体中包含的大量自由基反应及其对人体产生的危害有了越来越多的认识。机体内的抗氧化防御系统一旦失衡, 就会产生氧化损伤, 进而导致细胞活力下降、机体衰老、血管病变、细胞癌变、糖尿病及并发症等 80 余种疾病^[1-3]。减少机体氧化损伤的最有效方法是补充抗氧化剂。为了测定抗氧化剂活性, 建立了多种方法。根据反应机制的不同可将这些方法分为两种, 即基于质子转移 (TRAP 法和 ORAC 法) 和基于电子转移 (DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法) 的方法^[4,5]。TRAP 法以不稳定的氧化电极作为反应终点指示剂, 由于各抗氧化剂的反应终点不同, 因此各个实验室缺乏可比性。ORAC 法选用的荧光探针为 β -藻红蛋白, 不同批次的荧光探针差别很大^[6], 此外, 检测对温度、氧化

剂、荧光标记物和样品浓度较为敏感^[7], 重复性较差。DPPH 法所用的 DPPH· 试剂溶于亲脂性溶剂, 其只可以用于检测亲脂性抗氧化剂的抗氧化活性^[8], 且其在溶液中对光、空气中的氧及 pH 值敏感, 不能很好的反映抗氧化物质的活性^[7]。ABTS 法所选用的 ABTS^{·+} 虽然既溶于亲水性溶剂又溶于亲脂性溶剂, 但由于其是以氮为中心的自由基, 空间位阻较大, 与抗氧化活性物质酚类聚合物反应的速率较慢^[9]。FRAP 法测定环境 pH3.6, 其所处的环境与体液不同, 此外由于 FRAP 属于电子转移 (SET) 反应, 其不能测定氢转移 (HET) 的起作用的物质, 尤其是巯基和蛋白, 如谷胱甘肽^[10]。由于这些方法存在的缺点, 需要联合采用多种方法反映多组分混合物的总抗氧化活性^[11]。为了克服以上缺点, Apark R 等建立了 CUPRAC 方法用于测定多组分混合物的抗氧化活性。通过改进本方法, 可用于同时测定亲脂性和亲水性抗氧化剂活性、检测维生素 C 和黄酮类化合物混合物中维生素 C 含量、筛选多组分中抗氧化剂等。本文综述了经典及改进的

收稿日期: 2014-10-29 接受日期: 2014-12-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (lzujbky-2013-46); 兰州大学第二医院院内中医药项目 (YJzy2013-14)

* 通讯作者 E-mail: ldeyjh@sohu.com

CUPRAC 法在多组分抗氧化剂活性研究中的应用,同时探讨了其优点和不足。

1 经典的 CUPRAC 法

经典的 CUPRAC 法由土耳其伊斯坦布尔大学 Apark R 课题组首次建立^[12],所选用的试剂为 CuCl_2 -新亚铜灵(Nc)试剂。其反应原理如图 1 所示。

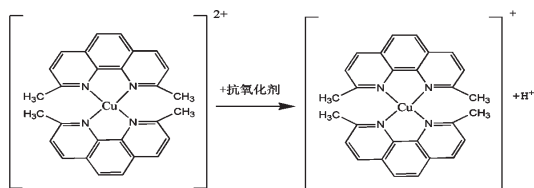


图 1 CUPRAC 法反应原理

Fig. 1 Reaction principle of CUPRAC method

在 CuCl_2 溶液中依次加入 NH_4Ac 缓冲溶液 (pH7.0)、Nc 溶液,生成 Cu^{2+} -Nc,显淡蓝色。加入抗氧化剂后其与 Cu^{2+} -Nc 反应生成 Cu^+ -Nc 和 H^+ ,其中 Cu^+ -Nc 显黄色在 450 nm 处有最大吸收, H^+ 被 NH_4Ac 缓冲溶液中和^[13]。 Cu^{2+} -Nc/ Cu^+ -Nc 的氧化还原电位(0.7V)比 Cu^{2+} / Cu^+ 的氧化还原电位(0.16V)高,因此多酚类抗氧化剂与 Cu^{2+} -Nc/ Cu^+ -Nc 的反应比与 Cu^{2+} / Cu^+ 的快^[13]。

表 1 经典的 CUPRAC 法在多组分抗氧化活性测定中的应用

Table 1 The application of main CUPRAC method in determination of antioxidant activity of multicomponent

样品 Sample	检测条件 Detection conditions				参考文献 Reference
	温度 Temperature	时间 Time	溶剂 Solvent	是否水解 Hydrolysis	
扁轴木	室温	30 min	水	否	16
石刁柏	不详	不详	水	否	17
大蒜	37 ℃	30 min	水	否	18
裙带菜	室温	30 min	水	否	19
葡萄	25 ℃	30 min	水	否	20
椰子	不详	1 h	水	否	21
苹果	室温	30 min	水	是	
	50 ℃	30 min	水	是	22
欧亚山茱萸	室温	1 h	水	否	23
日本柿	室温	1 h	水	否	23
月桂樱	室温	1 h	水	否	23

Apark R 等指出经典的 CUPRAC 法测定抗氧化剂时,测定条件(混合时间、混合温度、溶媒 pH)对检测结果影响较大^[12,14]。研究表明,当室温下混合 30 min 时,一些与 Cu^{2+} -Nc 反应较快的抗氧化剂(如维生素 C、没食子酸和槲皮素),采用 CUPRAC 法测定的抗氧化活性与实际较一致;而 50 ℃ 混合 20 min 时,一些与 Cu^{2+} -Nc 反应较慢的抗氧化剂(如柚皮苷、柚皮素、尿酸和胆红素),采用 CUPRAC 法测定的抗氧化活性与实际较一致;黄酮苷类抗氧化剂,水解后采用 CUPRAC 法测定的抗氧化活性与实际较一致^[12,14]。此外,Celik SE 等还研究了溶剂对 CUPRAC 法检测结果的影响^[15],研究表明,不论何种抗氧化剂(亲脂性和亲水性)的抗氧化活性均可采用 CUPRAC 法在极性和非极性溶剂中进行测定,采用 CUPRAC 法测定的抗氧化活性随着溶剂的溶解性、介电常数及类型的变化而变化,但在乙醇/水溶液中其随溶剂的溶解性、介电常数的变化较小。同时,Apark R 等指出在采用 CUPRAC 法测定多组分抗氧化剂时,需要采用氮气排除溶液中的氧气,以免其中的氧气影响检测结果;由于 CuCl_2 -Nc 试剂与抗氧化单体的反应速度比氧气快,因此在测定抗氧化单体时则不需要排除溶液中的氧气^[13]。

经典的 CUPRAC 法在多组分抗氧化活性测定中的应用见表 1。

2 改进的 CUPRAC 法

2.1 同时测定亲脂性和亲水性抗氧化剂活性的 CUPRAC 法

采用 CUPRAC 法的测定抗氧化活性随着溶剂的溶解性、介电常数及类型的变化而变化,由于不同抗氧化剂(亲脂性和亲水性)在溶剂中的溶解性不同,因此很难采用 CUPRAC 法在同一溶剂中同时测定亲脂性和亲水性抗氧化剂的抗氧化活性。为了克服以上缺点,Özyürek M^[24] 等对 CUPRAC 法进行了改进,改进的措施包括采用溶有甲基-β-环糊精的丙酮-水(1:9, v/v)溶液溶解样品,由于有甲基-β-环糊精呈筒状结构,其两端与外部为亲水性,而筒的内部为疏水性,其借范德华力将一些大小和形状合适的亲脂性抗氧化剂包含于筒状结构中,增加亲脂性抗氧化剂在丙酮-水(1:9, v/v)溶液的溶解性。此外,他们还还对甲基-β-环糊精在丙酮-水(1:9, v/v)溶液中的浓度进行了优化,研究表明,当甲基-β-环糊精在丙酮-水(1:9, v/v)溶液中的浓度为 2% 时测定结果最好。

2.2 用于检测维生素 C 和黄酮类化合物混合物中维生素 C 含量的 CUPRAC 法

采用 CUPRAC 法的测定抗氧化活性时,多种抗氧化剂均能与 Cu^{2+} -Nc 反应,生成 Cu^{+} -Nc,在 450 nm 处有最大吸收。因此,在测定抗氧化剂维生素 C 的含量时,其他抗氧化剂(如黄酮类化合物)会产生干扰。为了测定抗氧化剂维生素 C 的含量,Özyürek M^[25] 等对 CUPRAC 法进行了改进以便排除黄酮类化合物的干扰。改进的措施包括在待测样品中加入 LaCl_3 溶液,然后采用乙酸乙酯萃取,由于 La^{3+} 与黄酮类化合物反应,生成 La^{3+} -黄酮类化合物复合物,该复合物溶于水,采用乙酸乙酯萃取后,维生素 C 可富集与有机相中。此外 Özyürek M^[25] 等还研究了排除芦丁干扰的方法。芦丁由于其具有 3-O-芸香糖基团,不能与 LaCl_3 反应,因此再加入 LaCl_3 溶液之前,须对待测样品进行水解。

2.3 用于筛选多组分中抗氧化剂的 CUPRAC 法

经典的 CUPRAC 法只能测定多组分抗氧化剂的抗氧化活性,不能筛选多组分中的抗氧化剂。为了筛选多组分成分中的抗氧化剂,Celik SE^[26] 等建立了在线 HPLC-柱后 CUPRAC 法用于筛选多组分中的抗氧化剂。其筛选系统结构如图 2 所示。

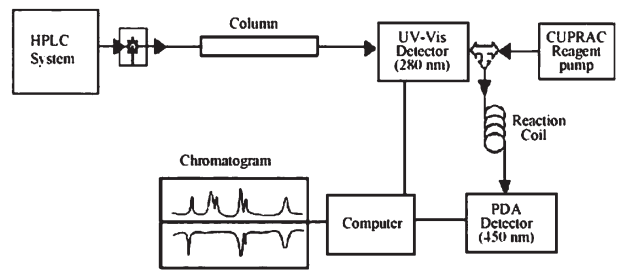


图 2 在线 HPLC-柱后 CUPRAC 法技术筛选多组分中抗氧化剂系统结构^[26]

Fig. 2 Flow chart of screening the antioxidant compounds from multicomponent by HPLC-CUPRAC assays^[26]

在该方法中,天然产物经 HPLC 分离,流出物在柱后进入活性检测单元与 Cu^{2+} -Nc 作用后,利用作用前后在 517 nm 处吸光度的变化,即作用后在色谱图中形成倒峰,进行抗氧化剂的筛选。此外,Celik SE^[26] 等还对 Cu^{2+} -Nc 的浓度及流速进行了优化,研究表明,在筛选维生素 E 时, Cu^{2+} -Nc 的浓度为 3.33 mmol/L Cu^{2+} /2.5 mmol/L Nc/333 mmol/L NH_4Ac 、 Cu^{2+} -Nc 的流速为 0.5 mL/min 时,筛选灵敏度最高。

2.4 用于测定抗氧化剂羟自由基清除活性的 CUPRAC 法

羟自由基与某些疾病及衰老有着密切的关系,为了测定水溶性抗氧化剂羟自由基清除活性,Bektasoğlu B^[27] 对 CUPRAC 法进行了改进。在改进的 CUPRAC 法中,羟自由基由 Fe^{2+} -EDTA 与过氧化氢反应生成,以 2,4-二甲氧基苯甲酸、3,5-二甲氧基苯甲酸或 *p*-氨基苯甲酸为探针物质,当加入抗氧化剂时,抗氧化剂与探针物质竞争性的与羟自由基反应,反应 2 h 后,加入 HCl 终止反应,其中由探针物质与羟自由基反应生成的羟基化探针物质由乙酸乙酯富集于有机相,其可以与 Cu^{2+} -Nc 反应,生成 Cu^{+} -Nc,在 450 nm 处有吸收。通过测定 A_0/A 可以反应水溶性抗氧化剂羟自由基清除活性,其中 A_0 为未加入抗氧化剂时的吸光度; A 为加入抗氧化剂的吸光度。

另一种测定氧化剂羟自由基清除活性的 CUPRAC 法由 Özyürek M^[28] 等建立。该方法与 Bektasoğlu B 建立的方法相比较,其采用水杨酸作为探针物质,加入抗氧化剂时,抗氧化剂与探针物质竞争性的与羟自由基反应,反应 10 min 后,加入过氧化氢酶与过量的过氧化氢反应,以减少过氧化氢产

生的干扰。

2.5 用于测定抗氧化剂黄嘌呤氧化酶抑制活性的 CUPRAC 法

Özyürek M^[29] 等对 CUPRAC 法进行了改进用于测定多酚及黄酮类化合物黄嘌呤氧化酶抑制活性。在改进的方法中黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的催化下于 37 °C 反应 30 min, 生成尿酸与过氧化氢, 尿酸与过氧化氢均能与 Cu^{2+} -Nc 反应, 生成 Cu^{+} -Nc, 在 450 nm 处有吸收。当加入抗氧化剂时, 抗氧化剂由于具有黄嘌呤氧化酶抑制活性, 抑制了生成尿酸与过氧化氢的生成, 进而抑制了 450 nm 处的吸收。因而 $1-A_0/A$ 可以表示抗氧化剂的黄嘌呤氧化酶抑制活性。其中 A_0 为未加入抗氧化剂时的吸光度; A 为加入抗氧化剂的吸光度。此外, Özyürek^[29] 等还对溶液 pH 及反应时间进行了优化, 研究结果表明, 当溶液 pH 值在 6-9, 反应时间为 30 min 时, 测定结果最好。

2.6 用于测定抗氧化剂过氧化氢清除活性的 CUPRAC 法

Özyürek M^[30] 等对 CUPRAC 法进行了改进用于测定多酚及黄酮类化合物过氧化氢清除活性。在改进的方法中过氧化氢可与 Cu^{2+} -Nc 反应, 生成 Cu^{+} -Nc, 在 450 nm 处有吸收; 当加入抗氧化剂时, 在氯化铜的催化下, 过氧化氢首先与抗氧化剂反应。因此通过测定以下三种溶液与 Cu^{2+} -Nc 反应的吸光度值: a) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CuCl}_2$; b) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CuCl}_2 + \text{抗氧化剂}$; c) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CuCl}_2 + \text{抗氧化剂} + \text{过氧化氢酶}$, 以 $[A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0$ 表示抗氧化剂的过氧化氢清除活性, 其中 A_0 为溶液 a 与 Cu^{2+} -Nc 反应的吸光度值; A_1 为溶液 b 与 Cu^{2+} -Nc 反应的吸光度值; A_2 为溶液 c 与 Cu^{2+} -Nc 反应的吸光度值。此外 Özyürek M^[30] 等还优化了溶液 a、b、c 混合时间, 研究表明, 混合 30 min 后, 其与 Cu^{2+} -Nc 反应的吸光度值趋于稳定。

2.7 用于测定含巯基蛋白抗氧化活性的 CUPRAC 法

Çekiç SE^[31] 等对 CUPRAC 法进行了改进用于测定含巯基蛋白的抗氧化活性。该方法与经典的 CUPRAC 法比较, 由于 NH_4Ac 缓冲溶液可使蛋白沉淀, 其采用了尿素缓冲溶液取代 NH_4Ac 缓冲溶液。

2.8 用于测定多组分抗氧化活性的基于 CUPRAC 法的光学感应器

为了将 CUPRAC 法制作成便于携带的检测试剂盒, Benner M^[32] 等发明了基于 CUPRAC 法的光学

感应器。该感应器的制作方法如下: 首先将聚四氟乙烯离子交换薄膜浸泡于 2 mL 的 1.0×10^{-2} mol/L CuCl_2 -Nc + 2 mL 的 7.5×10^{-3} mol/L Nc + 2 mL 的 1.0 mol/L NH_4A + 2.2 mL 的 H_2O 中, 摇动 30 min, 取出聚四氟乙烯薄膜, 即得基于 CUPRAC 法的光学感应器。该感应器测定多组分抗氧化活性的过程如下: 将该感应器置于所测多组分的乙醇溶液中摇动 30 min 以生成 Cu^{+} -Nc, 然后将光学感应器置于盛有水的比色皿中, 以防止感应器附着于比色皿壁上, 于 450 nm 处检测。

3 结论

由于抗氧化反应的复杂性和多样性, 目前测定物质抗氧化活性的方法虽然很多, 但还没有统一的标准的测定方法和测定参数, 相信随着 CUPRAC 法的引进, CUPRAC 法与其他抗氧化活性测定方法的联合应用能更加准确的反映多组分抗氧化剂的活性。

此外, 经典和改进 CUPRAC 法多用于抗氧化活性的测定, 其在多组分物质中抗氧化剂筛选方面的研究较少。目前文献报道的有以 Cu^{2+} -Nc 为活性检测试剂的 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术, 由于该方法需要对 HPLC 仪器进行改装, 该装置目前尚未商品化。相信以的 Cu^{2+} -Nc 为显影试剂的 TLC 自显影技术将会应用于多组分物质中抗氧化剂的筛选。

参考文献

- 1 Valko M, *et al.* Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39: 44-84.
- 2 Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res*, 1991, 250 (1-2): 3-16.
- 3 Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease; use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutri*, 2003, 133: 933-940.
- 4 Huang D, *et al.* The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 1841-1856.
- 5 Prior RL, *et al.* Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 4290-4302.
- 6 Ou B, *et al.* Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 4619-

- 4626.
- 7 Schaich KM. Critical considerations in ORAC, TRAP, ABTS/TEAC and DPPH assay of antiradical action. Plenary Lecture, International Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods, Istanbul University, Istanbul. Turkey.
 - 8 Ozcelik B, *et al.* Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci*, 2003, 68:487-490.
 - 9 Lee JH, *et al.* Electron donation mechanisms of beta-carotene as a free radical scavenger. *J Food Sci*, 2003, 68:861-865.
 - 10 Apark R, *et al.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 2007, 12:1496-1547.
 - 11 Prior RL, *et al.* Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005, 53:4290-4302.
 - 12 Apark R, *et al.* Noval total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and Vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 2004, 5:7970-7981.
 - 13 Apark R, *et al.* Mechanism of antioxidant capacity assay and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 2008, 160:413-419.
 - 14 Apark R, *et al.* Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant; The CUPRAC method. *Free Radic Res*, 2005, 39:949-961.
 - 15 Çelik SE, *et al.* Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP method. *Talanta*, 2010, 81:1300-1309.
 - 16 Sonia A, Adarsh PV. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of *Parkinsonia aculeate* Linn. *Biomed Res Int*, DOI:10.1155/2014/756184.
 - 17 Lee JW, *et al.* Bioactive compounds, antioxidant and binding activities and spear yield of *Asparagus officinalis* L. *Plant Foods Hum Nutri*, 2014, 69:175-181.
 - 18 Chen S, *et al.* Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties. *PLoS One*, 2013, 8:e79730.
 - 19 Fung A, *et al.* Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem*, 2013, 136:1055-1062.
 - 20 González-Centeno MR, *et al.* Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem*, 2012, 60:11850-11858.
 - 21 Oliveira MB, *et al.* *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber ethanolic extract; antioxidant capacity and electrochemical investigation. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2013, 16:121-129.
 - 22 Karaman S, *et al.* Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J Sci Food Agric*, 2013, 93:867-875.
 - 23 Celep E, *et al.* A comparative study on the *in vitro* antioxidant potentials of three edible fruits; cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:3329-3335.
 - 24 Özyürek M, *et al.* Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta*, 2008, 630:28-39.
 - 25 Özyürek M, *et al.* Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La (III) complexes. *Anal Chim Acta*, 2007, 588:88-95.
 - 26 Çelik SE, *et al.* Determination of antioxidants by a noval online HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection. *Anal Chim Acta*, 2010, 674:79-88.
 - 27 Bektasoğlu B, *et al.* Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using modified CUPRAC method. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345:1194-1200.
 - 28 Özyürek M, *et al.* Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal Chim Acta*, 2008, 616:196-206.
 - 29 Özyürek M, *et al.* Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta*, 2009, 636:42-50.
 - 30 Özyürek M, *et al.* A noval hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *J Food Comp Anal*, 2010, 23:689-698.
 - 31 Öekiç SD, *et al.* Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols. *Talanta*, 2009, 79:344-351.
 - 32 Benner M, *et al.* Development of low-coat optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts. *Anal Chem*, 2010, 82:4252-4258.