

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01R 33/60

G01N 24/10 G01N 33/02



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812983.0

[43] 公开日 2004 年 8 月 11 日

[11] 公开号 CN 1520520A

[22] 申请日 2002.11.1 [21] 申请号 02812983.0

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 26 [33] JP [31] 126287/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2002/011469 2002. 11. 1

[87] 国际公布 WO2003/091744 日 2003. 11. 6

[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 26

[71] 申请人 毬山利一

地址 日本东京都

共同申请人 中神倭文夫 吉川敏一

[72] 发明人 吉川敏一

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 钟守期 庞立志

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 通过测定体内氧化还原平衡度进行  
抗氧化能力评价的方法

[57] 摘要

提供通过测定生物体的氧化还原平衡度评价抗氧化能力的方法。氧化还原平衡度用下式代表：  
氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数)/(施用前抗氧化指数/施用前氧化指数)。抗氧化指数是用磁共振自旋装置定量测定用 5, 5 - 二甲基 - 1 - 吡咯啉 - N - 氧化物 (DMPO) 捕获丁基过氧化氢自由基而产生的 DMPO - OOL 自由基的血清添加后所产生的信号强度的衰减率，将由此得到的抗氧化能力在 1 - 10 的 10 级范围进行频度分布而得的指数；氧化指数是指对尿中的 8 - 羟基脱氧鸟苷 (8 - OHdG) 定量测定所得的氧化能力在 1 - 10 的 10 级范围进行频度分布而得的指数。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 食品和/或药物抗氧化能力的评价方法, 包括使用食品和/或药物施用前后的血清和尿求出氧化还原平衡度的步骤, 及根据氧化还原平衡度评价食品和/或药物抗氧化能力的步骤; 其中, 氧化还原平衡度用下式代表: 氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数) / (施用前抗氧化指数/施用前氧化指数), 其中抗氧化指数是用磁共振自旋装置定量测定用 5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 捕获丁基过氧化氢自由基而产生的 DMPO-00L 自由基的血清添加后所产生的信号强度的衰减率, 将由此得到的抗氧化能力在 1-10 的 10 级范围进行频度分布而得的指数; 氧化指数是指对尿中的 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 定量测定所得的氧化能力在 1-10 的 10 级范围进行频度分布而得的指数。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中用磁共振自旋装置进行定量测定的方法包括: 将 100mM 丁基过氧化氢, 50  $\mu$ /g ml 高铁血红蛋白, 10 mM DMPO, 0.1 mM 二亚乙基三胺五醋酸在 10 mM 磷酸缓冲液中反应的步骤, 上述反应开始 1 分钟后, 用磁共振自旋装置测定 DMPO-00L 自由基信号强度的步骤, 和用下式

自由基氧化能力 = DMPO 浓度 / 信号强度 50% 抑制浓度

求出自由基氧化能力的步骤。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中对尿中 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 的定量测定是应用单克隆抗体通过酶免疫测定方法进行的。

## 通过测定体内氧化还原平衡度进行抗氧化能力评价的方法

### 技术领域

- 5 本发明涉及食品和/或药物抗氧化能力的测定技术，特别地，涉及通过测定体内氧化还原平衡度而评价食品和/或药物抗氧化能力的方法。

### 技术背景

- 10 到目前为止，有许多测定食品·药物抗氧化能力的方法。例如，通过应用吸光度测定法、化学发光法或磁共振自旋装置等，定量测定施用食品·药物前后活性氧种类而测定目的食品·药物的活性氧清除能力的方法；通过对由脂质过氧化反应产生的过氧化物进行定量或测定溶解的氧浓度变化，而测定目的食品·药物的活性氧清除能力的方法。

- 15 关于食品·药物在试管内的抗氧化能力的评价，包括活性氧和反应速度常数的测定在内的详细的研究已成为可能。但是，当生物体内施用实际的食物·药物时所测定的抗氧化能力，是反映食品·药物其自身的功能，还是食品·药物的分解/代谢产物的效果，这一点尚不明确。另外，有必要考虑食品·药物的摄入对生物体应答的影响等，但是，进行测定的过程中，目前的方法很难考虑到这个问题。因此，目  
20 前的现状是：将食品·药物施用给生物体时，它们到底发挥多大程度的抗氧化能力，仍逃不出推测的领域。

- 近年来，随着替代医疗的进步，暗示出摄取的食物、中药等东洋医学的药物在生物体内，对癌、糖尿病、动脉硬化等生活习惯病有效，  
25 但对其作用机制尚不完全理解。因此，有必要建立对摄取的食物、中药等东洋医学的药物在生物体内到底发挥多大程度的抗氧化能力进行定量评价的方法。

### 发明公开

- 30 本专利提供评价食品·药物抗氧化能力的方法，其应用具有相同基因、在同一环境下饲养的动物，应用食品和/或药物施用前后的血清、尿测定氧化还原平衡，根据该氧化还原平衡度评价该食品·药物的抗氧化能力。根据本发明的方法，通过测定与食品·药物的吸收、

代谢、生物体应答无关的，食品和/或药物施用前后氧化还原平衡度，可定量评价食品·药物的抗氧化能力。

本发明者们对此进行了广泛研究，结果发现：如下式定义的食品和/或药物施用前后的抗氧化指数和氧化指数而得出的氧化还原平衡度，对评价食品·药物的抗氧化能力极其有用。

氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数) / (施用前抗氧化指数/施用前氧化指数)

这里所讲的抗氧化指数是指，如后所述，将用磁共振自旋装置通过新方法从血清测得的自由基的清除能力，用 1-10 任意数值表示。

另外，氧化指数是指，将通过尿中 8-羟基鸟苷 (8-OHdG) 的定量测定生物体内的 DNA 损伤而得到的生物体内氧化度，用 1-10 任意数值表示。

氧化还原平衡度的数值为 0.01-100，超过 1.0 时可评价所施用的食品·药物具有抗氧化作用，当氧化还原平衡度为 100 时，可评价所施用的食品·药物具有最佳的抗氧化作用，由此，可定量测定食品·药物的抗氧化能力。

#### 实施本发明的最佳方案

本发明应用具有相同基因、在同一环境下饲养的动物。本发明提供评价食品·药物抗氧化能力的方法，其给前述动物施用预评价其抗氧化能力的食品和/或药物，使用施用前后的血清、尿测定氧化还原平衡度，由此评价食品·药物抗氧化能力。

通过下式定义用于评价抗氧化能力的氧化还原平衡度。

氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数) / (施用前抗氧化指数/施用前氧化指数)

<抗氧化指数>

抗氧化指数是指，将用磁共振自旋装置如下测得的自由基清除能 R，用 1-10 任意数值表示。用磁共振自旋装置进行的测定如下：用磁共振自旋装置定量测定自旋捕获剂 5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 捕获丁基过氧化氢自由基而产生的 DMPO-00L 自由基，通过添加血清可测定所产生的信号强度的衰减率。可根据信号强度的 50% 抑制率和 DMPO 浓度用下式计算自由基清除能 R 值。

自由基清除能 R = [DMPO] / 50%抑制浓度

优选的，用磁共振自旋装置进行的测定如下：将 100mM 丁基过氧化氢，50  $\mu\text{g/ml}$  高铁血红蛋白，10 mM DMP0，0.1 mM 二亚乙基三胺五醋酸在 10 mM 磷酸缓冲液中反应，开始 1 分钟后，用磁共振自旋装置测定 DMP0 - 00L 信号强度。

- 5 用上述方法求出的各种自由基清除剂的自由基清除能力 R 如下所示。

各种活性酶清除剂的自由基清除能力

清除剂	50% 抑制浓度	R
Cu,Zn-SOD	>100 U/ml	—
Catalase	>4,000 U/ml	—
$\beta$ -Carotene	>0.2 mg/ml	—
Ascorbic acid	$4.4 \times 10^{-5}\text{M}$	227
Uric acid	$3.6 \times 10^{-4}\text{M}$	28
$\alpha$ -Tocopherol	$7.0 \times 10^{-4}\text{M}$	14
Glucose	> $4.5 \times 10^{-3}\text{M}$	—
Glutathione	$4.1 \times 10^{-4}\text{M}$	24
Albumin	>5.0 g/ml	—
Bilirubin	>10mg/dl	—

- 10 本发明的方法比目前的技术有利的特征在于能从信号强度的抑制率 F ( $0 < F < 1$ ) 可测定出血清等的自由基消除能力。也就是说，本发明通过将相当于 1M DMP0 的自由基消除能力定义为 1U/L，可对血清的自由基消除能力进行定量。应用本发明的方法测定的 9 名健康成人的平均值为  $0.293 \pm 0.014\text{U/L}$ 。

#### [氧化指数]

- 15 作为与癌症、糖尿病、动脉硬化等病因密切相关的现象，基因异常表达备受瞩目。最近的研究表明与凋亡、细胞周期相关的基因的表达异常常常启动疾病的发生、发展。这些基因异常表达的诱因包括环境因素、炎症等造成的氧化应激等，最具代表性且可靠的氧化 DNA 损伤的指标是 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)。本发明中，将对尿中的
- 20 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 定量测定所得的生物体内氧化度用 1 - 10 任意数值表示，作为其氧化指数。

这里，用单克隆抗体，通过酶免疫测定法对 8-OHdG 进行定量测定。

应用糖尿病动物的实验数据如下，其表明尿中 8-OHdG 的测定对食品抗氧化能力的评价是极其有用的。

#### 实验

应用 Leptin 受体缺陷自然发病的糖尿病 db/db 小鼠(人 2 型糖尿病类似的动物模型)进行实验。与一组 Leptin 受体缺陷自然发病的糖尿病 db/db 小鼠相对，将在试管内证明具有抗氧化能力的虾青素(类胡萝卜素色素的一种，大量存在于海洋甲壳类中)做成 0.02%混饵给予。对照组的 Leptin 受体缺陷自然发病的糖尿病 db/db 小鼠不给予虾青素。表 2 中显示了两组 6 周龄的 db/db 小鼠饲养 3 个月的结果。

10

表 2

虾青素对 Leptin 受体缺陷自然发病的糖尿病 db/db 小鼠的效果

组别	尿中白蛋白量 ( $\mu\text{g/day}$ )	尿中 8-OHdG 量 ( $\text{ng/day}$ )
对照组	234.4+71.6	336.1+68.7
虾青素组	68.6+13.4#	135.6+41.1#

# $p < 0.05$  vs 对照组

表 2 表明：未给予虾青素的对照组的 db/db 小鼠随时间的增加尿中白蛋白排泄量增加。另外，虽未显示，但对照组的 db/db 小鼠肾脏的组织切片中可以看到肾小球膜细胞增加，这与人糖尿病性肾病类似。该实验表明，具有抗氧化能力的虾青素，可显著性抑制尿中的 8-OHdG 排泄量，显著性抑制糖尿病肾病的进展。通过以上实验表明，测定尿中的 8-OHdG 可成为小鼠中氧化的 DNA 损伤的有用的指标。

本发明的方法可容易地用于人尿。对健康人进行测定的值如下。

#### 健康人尿中 8-OHdG 排泄量

性别	数	8-OHdG 浓度 ( $\mu\text{g/mg}$ 肌酸)
男性	25	6.818 $\pm$ 0.364
女性	34	8.394 $\pm$ 0.376

各值用平均值  $\pm$  标准误差来表示。

如上所示，尿中 8-OHdG 的测定方法，无论在动物中还是在人中，

25

均可作为氧化的 DNA 损伤的指标应用，对食品·药物的氧化能力的测定有用。

- 更普遍地，为了确立作为食品·药物等抗氧化能力的筛选方法，与抗氧化指标同样，对多个被验者（人 200 名，动物 100 只）进行测定，其结果用 10 级频度分布表示，最低值组为 1，最高值组为 10，从中测定氧化指数。

[氧化还原平衡度的测定及抗氧化能力的评价]

将如上求出的抗氧化能力及氧化能力插入到下式中求出氧化还原平衡度。

- 10 氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数) / (施用前抗氧化指数/施用前氧化指数)

求出的氧化还原平衡度的值为 0.01-100 的值，当数值超过 1.0 时可评价所施用的食品·药物具有抗氧化作用，当氧化还原平衡度为 100 时，评价为具有最佳抗氧化作用的食品·药物。

- 15 如上应用本发明的方法的话，与食品·药物的吸收、代谢、生物体应答无关地，通过测定食品和/或药物施用前后氧化还原平衡度，可定量评价食品·药物的抗氧化能力。

专利名称(译)	通过测定体内氧化还原平衡度进行抗氧化能力评价的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1520520A</a>	公开(公告)日	2004-08-11
申请号	CN02812983.0	申请日	2002-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	Kasayama俊 中上师祖丈夫 吉川俊		
申请(专利权)人(译)	毬山利一 中神倭丈夫 吉川敏一		
当前申请(专利权)人(译)	毬山利一 中神倭丈夫 吉川敏一		
[标]发明人	吉川敏一		
发明人	吉川敏一		
IPC分类号	G01N24/08 G01N24/10 G01N33/02 G01N33/483 G01N33/493 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 G01R33/60		
CPC分类号	G01R33/60 G01N33/02 G01N24/10 G01N33/50		
代理人(译)	庞立志		
优先权	2002126287 2002-04-26 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供通过测定生物体的氧化还原平衡度评价抗氧化能力的方法。氧化还原平衡度用下式代表：氧化还原平衡度 = (施用后抗氧化指数/施用后氧化指数)/(施用前抗氧化指数/施用前氧化指数)。抗氧化指数是用磁共振自旋装置定量测定用5, 5 - 二甲基 - 1 - 吡咯啉 - N - 氧化物(DMPO)捕获丁基过氧化氢自由基而产生的DMPO - OOL自由基的血清添加后所产生的信号强度的衰减率，将由此得到的抗氧化能力在1 - 10的10级范围进行频度分布而得的指数；氧化指数是指对尿中的8 - 羟基脱氧鸟苷(8 - OHdG)定量测定所得的氧化能力在1 - 10的10级范围进行频度分布而得的指数。

清除剂	50%抑制浓度	R
Cu,Zn-SOD	>100 U/ml	-
Catalase	>4,000 U/ml	-
$\beta$ -Carotene	>0.2 mg/ml	-
Ascorbic acid	$4.4 \times 10^{-5}M$	227
Uric acid	$3.6 \times 10^{-4}M$	28
$\alpha$ -Tocopherol	$7.0 \times 10^{-4}M$	14
Glucose	$>4.5 \times 10^{-3}M$	-
Glutathione	$4.1 \times 10^{-4}M$	24
Albumin	>5.0 g/ml	-
Bilirubin	>10mg/dl	-