

文章编号: 1000-5013(2009)04-0429-03

新氨基酸螯合钙制剂 L-亮氨酸钙的 急性毒性及致突变性

刘 青, 甘林火, 邓爱华, 翁连进

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 研究自制的新型氨基酸螯合钙制剂——L-亮氨酸钙的急性毒性及致突变性, 并对其安全性进行评价。对小鼠分别给予不同质量的 L-亮氨酸钙混悬液灌胃, 连续 7 d 观察小鼠急性毒性。将 50 只小鼠随机分为 5 组: 阴性对照组、质量比为 $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的环磷酰胺组, 以及质量比分别为 $0.5, 2.5, 5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 L-亮氨酸钙混悬液组。通过染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和小鼠精子畸形试验, 观察 L-亮氨酸钙的遗传毒性。结果表明, 为小鼠灌胃 7 d 后半数致死剂量 (LD_{50}) 大于 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, L-亮氨酸钙属实际无毒物质。在染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和小鼠精子畸形试验中均呈阴性反应, 未显示致突变作用, 表明 L-亮氨酸钙无毒性和无致突变性。

关键词: L-亮氨酸钙; 急性毒性; 染色体畸变试验; 微核试验; 精子畸形试验

中图分类号: R 977.4; R 965.3

文献标识码: A

2005 年全国第四次营养调查结果显示, 我国居民的钙摄入量严重不足。钙具有参与机体骨骼的生长发育及维持心脏的正常功能等多种生物学作用, 是体内重要的金属元素, 缺钙可严重危害人体健康。氨基酸螯合钙制剂具有吸收率高、缓释及与骨高度亲和性等优点, 是比较理想的钙源^[1]。张经坤等^[2]认为, 金属离子进入机体后先同氨基酸生成螯合物, 而被整体吸收的氨基酸螯合物在进入细胞以后, 螯合物在细胞中自动断开螯合键, 分解成氨基酸和金属离子并被分别利用。目前, 经报道的氨基酸螯合钙制剂有甘氨酸钙和天冬氨酸钙^[3-4], 而国内外未见 L-亮氨酸钙的研究报道。本试验对自制的新型氨基酸螯合钙制剂——L-亮氨酸钙的安全性进行了毒理学评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

L-亮氨酸钙(自制), 环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司), 秋水仙素(上海善岛化工有限公司), Giemsa Stain(美国 Amresco 公司), 其余试剂均为分析纯。实验用动物为中国昆明(KM)系小鼠(福建医学科学研究所提供)。

1.2 实验方法

(1) L-亮氨酸钙混悬液的制备。依据国家标准 GB 15193.1 - 2003《食品安全性毒理学评价程序和方法》进行实验^[5]。将 L-亮氨酸钙悬浮于质量分数为 0.9 % 生理盐水中, 配制不同质量分数的 L-亮氨酸钙混悬液。

(2) 急性毒性实验。采用霍恩氏(Horn)法。将 KM 系小鼠 40 只, 雌、雄各半, 体质量为 $20 \sim 23 \text{ g}$, 随机分成 4 组。小鼠灌胃给予 L-亮氨酸钙混悬液的质量比分别为 $1.0, 2.15, 4.64, 10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。观察 7 d, 记录中毒症状、死亡和大体解剖情况。

(3) 小鼠骨髓细胞染色体畸变(CA)试验。取 KM 系小鼠 50 只, 雌、雄各半, 体质量为 $25 \sim 30 \text{ g}$, 随

收稿日期: 2008-01-02

通信作者: 刘 青(1970-), 女, 副教授, 博士, 主要从事制药工艺学的研究。E-mail: liuq @hqu.edu.cn.

基金项目: 泉州市科技计划重点项目(2005 G6); 华侨大学科研基金资助项目(05BS301)

机分成 5 组. 实验组给予质量比为 0.5, 2.5, 5.0 g · kg⁻¹ L-亮氨酸钙混悬液, 编号为实验组 1~3. 另设阴性(生理盐水)及阳性(环磷酰胺质量比为 0.04 g · kg⁻¹)对照组, 分别为对照组 1, 2. 经口两次灌胃受试动物, 两次分别间隔 24, 30 h 后处死. 动物被处死前 3 h, 向腹腔注射质量比为 5 μg · g⁻¹ 的秋水仙素, 常规制备小鼠骨髓细胞染色体标本. 每只鼠计数 1 000 个中期相细胞, 其出现具有畸变的细胞数用畸变率表示. 计数的畸变细胞包括染色体断裂、染色体裂隙、无着丝粒断片、核碎裂.

(4) 小鼠骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核试验. 取 KM 系小鼠 50 只, 雌、雄各半, 体质量为 25~30 g, 随机分成 5 组. 实验组小鼠分别给予质量比为 0.5, 2.5, 5.0 g · kg⁻¹ L-亮氨酸钙混悬液. 另设阴性(蒸馏水)及阳性(环磷酰胺质量比为 0.04 g · kg⁻¹)对照组, 经口两次灌胃, 两次间隔 24 h. 于第 2 次给药后 6 h 处死动物, 取胸骨髓涂片, 甲醇固定, Giemsa(过氧化酶-抗过氧化酶)染色. 每只鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞中出现的微核细胞数, 计算其微核率 m .

(5) 小鼠精子畸形试验. 取 KM 系小鼠 25 只, 雄性, 体质量为 25~30 g, 随机分为 5 组, 每组 5 只. 实验组小鼠分别给予质量比为 0.5, 1.5, 2.5 g · kg⁻¹ L-亮氨酸钙混悬液. 另设阴性对照组(生理盐水)和阳性对照组(环磷酰胺质量比为 0.04 g · kg⁻¹). 连续灌胃 5 d, 于末次染毒 30 d 后处死小鼠, 剪开腹膜, 取出睾丸, 分离附睾, 常规制片, 甲醛固定, 伊红染色. 每只动物检查完整的精子 1 000 个, 不同畸形精子分类计数后, 计算出每组动物精子畸形率 g .

(6) 统计分析. 所有数据均采用 SPASS 统计学软件分析.

2 实验结果

2.1 急性毒性分析

实验期间, 雌、雄小鼠各剂量组动物饮食和活动正常, 生长发育良好, 均未见明显中毒反应, 无一死亡. 雌、雄小鼠分别为 5 只, 细胞数分别为 5 000, 其半数致死剂量(LD_{50})均大于 10.0 g · kg⁻¹. 根据急性毒性分级标准判定, L-亮氨酸钙属实际无毒级物质^[3].

2.2 小鼠骨髓细胞染色体畸变分析

小鼠骨髓细胞染色体畸变分析, 结果如表 1 所示. 表 1 中, 各剂量组的雌、雄小鼠分别为 5 只, 其细胞数均为 5 000, 畸变细胞数为 n_c . 由表 1 可见, 骨髓细胞染色体畸变率与阴性对照组相比, 无显著性差异($P>0.05$); 而阳性对照组小鼠骨髓细胞染色体畸变率与阴性对照组相比, 具有高度显著性差异($P<0.01$). 表明, L-亮氨酸钙小鼠骨髓细胞染色体畸变试验结果为阴性.

2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核分析

小鼠骨髓嗜多染红细胞微核分析, 如表 2 所示. 表 2 中, 各剂量组的雌、雄小鼠分别为 5 只, 细胞数均为 5 000, 微核细胞数为 n_m . 由表 2 可见, 骨髓嗜多染红细胞微核率与阴性对照组相比, 无显著性差异($P>0.05$); 而阳性对照组微核率与阴性对照组相比, 具有高度显著性差异($P<0.01$). 表明, L-亮氨酸钙小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验结果为阴性.

表 1 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验结果

Tab.1 The results of chromosome shape abnormality test in mice

组别	雄小鼠		雌小鼠	
	n_c /个	c/%	n_c /个	c/%
实验组 1	66	1.3	64	1.3
实验组 2	60	1.2	70	1.4
实验组 3	67	1.3	64	1.3
对照组 1	62	1.2	61	1.2
对照组 2	1 420	28.4	1 345	26.9

与阴性对照组相比, $P<0.01$

表 2 小鼠骨髓微核试验结果

Tab.2 The results of micronucleus test of bone marrow cell in mice

组别	雄小鼠		雌小鼠	
	n_m /个	m/%	n_m /个	m/%
实验组 1	9	1.9	9	1.9
实验组 2	8	1.6	11	2.2
实验组 3	10	2.0	9	1.9
对照组 1	9	1.9	8	1.6
对照组 2	870	17.4	836	16.7

与阴性对照组相比, $P<0.01$

2.4 小鼠精子畸形分析

对小鼠精子进行畸形实验, 结果如表 3 所示. 表 3 中, 各剂量组的雄小鼠都是 5 只, 受检精子数为

5 ×1 000 个,精子畸形数为 n_g 。由表 3 可以看出,各剂量组精子畸形率与阴性对照组比较,差别无显著性 ($P>0.05$);而阳性对照组精子畸形率与阴性对照组比较差别具有高度显著性 ($P<0.01$)。表明,L-亮氨酸钙小鼠精子畸形实验结果为阴性。

3 讨论

L-亮氨酸钙小鼠急性经口毒性试验结果显示,在实验过程中未见动物中毒和死亡, LD_{50} 大于 $10.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 属实际无毒物质。小鼠骨髓微核、小鼠精子畸形等致突变试验,是简单、快速的化学致突变物的短期筛选试验。微核试验结果为阴性,表明受试物未对小鼠骨髓嗜多染红细胞染色体产生损害作用;精子畸形试验用于检验化学物是否具有突变性和对生殖细胞的损伤作用^[6]。

该受试物小鼠染色体、骨髓微核、小鼠精子畸形的 3 项致突变试验结果均为阴性,表明 L-亮氨酸钙无致突变作用,属安全性保健食品。

氨基酸螯合钙是较理想的补钙剂,氨基酸螯合钙能以分子形式被动扩散进入血浆,使血钙有充足时间进行新陈代谢,而达到高生物利用度^[7]。新氨基酸螯合钙——L-亮氨酸钙进入机体后既能提供人体必须氨基酸,又能实现补钙,使用安全无毒,是一种有前途的补钙及营养制剂。

参考文献:

[1] 段惠敏,李淑芳,郭光美,等. 补钙与钙营养强化剂[J]. 食品科技,2002(1):64-65.
[2] 张经坤,张泽民,于 傲. 人体钙吸收理论探讨[J]. 科学通报,2000,45(1):1114-1120.
[3] 王立升. 天门冬氨酸钙和葡萄糖酸钙兔体内吸收度的研究[J]. 广西大学学报:自然科学版,2000,25(4):270-281.
[4] 张丽萍,赵红杰,王 岑,等. 络合钙在小鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(2):71-72.
[5] 中华人民共和国卫生部. GB 15193.1-2003 食品安全性毒理学评价程序和方法[S]. 北京:标准出版社,2003.
[6] 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法[J]. 杭州:浙江科学技术出版社,1985.
[7] 张丽萍,许 国,姚 杰,等. 络合物用于补钙的研究[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版,2000,18(2):28-29.

Experimental Study on Acute Toxicity and Mutagenicity of L-Leucine Calcium of a New Amino Acid Chelate Calcium

LIU Qing , GAN Lin-huo , DENG Ai-hua , WENG Lian-jin

(College of Chemical Engineering , Huaqiao University , Quanzhou 362021 , China)

Abstract : Studies were carried out on the acute toxicity and mutagenicity of as-prepared L-leucine calcium , and its safety was evaluated. The different density L-leucine calcium solution was given by the stomach , the acute toxicity tests was observed in seven days continuously. Fifty mice were divided into five groups randomly: the negative control group , Cyclophosphamide group ($0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) , L-leucine calcium solution group ($0.5, 2.5, 5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) , and mutagenicity tests were evaluated through chromosome shape abnormality test , micronucleus test of bone marrow cell and sperm shape abnormality test in mice. LD_{50} was higher than $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, indicating that L-leucine calcium was non-toxic , and no significant difference was found between each test group and the control group in mutagenicity tests. These results indicate the L-leucine calcium has non-toxic and can't induce mutation.

Keywords : L-leucine calcium ; acute toxicity ; chromosome shape abnormality test ; micronucleus test ; sperm shape deformity test

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 陈国华)