

壳寡糖硫酸盐对小鼠体内铁锌铜钙含量的影响

汪连生,王 巍,丁 瑜,李 伟,覃彩芹*

(孝感学院生物资源化学与环境生物技术湖北省重点实验室,湖北 孝感 432000)

摘 要:摄食含 0.75%壳寡糖硫酸盐的饲料 30 天的小鼠与对照组比较,小鼠的肺和心脏内的铁、锌、铜和钙四种元素含量没有明显变化,所测最大器官肝脏内的铁和锌含量没有明显变化,但是其铜含量有所上升,而钙含量下降严重.研究结果建议,服用壳寡糖硫酸盐不会降低体内铁、锌和铜的含量,但是需适当补充钙质.

关键词:壳寡糖硫酸盐;小鼠;金属元素

中图分类号:O636.1

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2011.10.006

0 引 言

壳聚糖是甲壳素脱乙酰产物,来源丰富,作为食品添加剂、保健食品、果汁处理剂^[1],已经被广泛用于食品行业.壳聚糖的单体氨基葡萄糖的盐酸盐和硫酸盐已在欧洲被使用预防和治疗骨关节炎有几十年历史,没有发现产生重要的毒副作用.哺乳动物奶水中的寡糖含有乙酰氨基葡萄糖单元.1983 年美国 FDA 批准了壳聚糖作为饲料添加剂^[2],日本、韩国、西欧、美国、中国都有多种食品壳聚糖在销售.壳寡糖是聚合度小的壳聚糖,在生理 pH 条件下可溶,有许多有益的生理活性作用.上世纪八十年代科学家研究发现甲壳六聚糖和壳六聚糖对小鼠移植性癌细胞有明显的抑制作用^[3].经过研究已显示相对分子质量为 5 000 的水溶性壳聚糖具有更好的抗肿瘤及免疫促进作用^[4].

壳寡糖工业化制备的方法主要是采用酶催化水解,一般将壳聚糖原料先溶解在醋酸、柠檬酸、乳酸等弱酸溶液中,进行水解,所得产物经超滤膜分离,然后冷冻干燥,产物是壳寡糖的弱酸盐.不过,这些产品的货架寿命短,在较高气温条件下易变成棕黑色,失去其水溶性和活性.研究发现壳寡糖的盐酸盐比壳寡糖的弱酸盐稳定,易于产品保存^[5].但是壳寡糖盐酸盐中引入氯离子,不适宜于心血管病及肾病患者,所以,将壳寡糖制备成壳寡糖硫酸盐,从而克服壳寡糖弱酸盐和盐酸盐的不足之处.作为一种新的壳聚糖产品,研究其生理活性作用很有必要.由于壳寡糖硫酸盐与金属离子

的络合能力较强,又含硫酸根,而铁、锌、铜和钙都是生命体中重要的元素,探讨摄食壳寡糖硫酸盐对小鼠体内器官中铁、锌、铜和钙含量的影响确有必要.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖原料由浙江金壳生物化学有限公司提供,壳寡糖硫酸盐由本实验室采用壳聚糖用酶降解制备所得的壳寡糖^[6],产品重均分子量 M_w 约为 3×10^3 .65%浓的 HNO_3 为优级纯试剂,其他试剂均为分析纯.昆明小鼠和其食用的基础饲料(19.1%粗蛋白,12.13%氨基酸,4.80%粗纤维,4.25%粗脂肪,1.08%钙,41.77 mg/kg 磷,164.1 mg/kg 铁和 54.12 mg/kg 锌),由湖北省实验动物中心提供.TAS-986 原子吸收分光光度计是北京普析通用仪器有限责任公司产品.铅空心阴极灯是北京曙光电子光源仪器有限公司产品.

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性试验 以 5 g/kg 体重灌胃剂量配制样品浓度.取昆明小鼠 40 只,分成 2 组,每组 20 只,雌雄各半,以每笼 5 只饲养.一组作为对照组.样品实验组每只小鼠被灌胃样品溶液 0.2 mL 后,观察小鼠的死亡情况、食量、活动状况和体重变化.

1.2.2 喂食小鼠壳寡糖硫酸盐对其体内铁、锌、铜和钙含量影响的实验 将 20 只雌性小鼠,随机分为 2 组(每组 10 只),其中一组为空白对照

组,仅喂食小鼠基础饲料;样品组喂食含 0.75%壳寡糖硫酸盐的基础饲料,观察小鼠的死亡情况、食量、活动状况和体重变化,第 30 天将小鼠断头致死,取出肝脏、肾脏、脾脏和心脏等器官,观察,称重.并采取一定量的肝脏,通过石蜡切片和染色,观察喂食样品对小鼠肝细胞的影响.

称取 0.1~0.2 g 取出的脏器,向其中加 1.0 mL 高氯酸,5.0 mL 浓硝酸加热消化,冷却后定容至 10.00 mL.采用金属离子标准液制定标准曲线,用火焰原子吸收分光光度计测定样品中金属元素的含量(乙炔气流量:1.6 L/min;钙:3.0 mA,0.4 nm,422.7 nm;锌:3.0 mA,0.4 nm,213.89 nm;铁:4.0 mA,0.2 nm,248.3 nm;铜:3.0 mA,0.4 nm,324.7 nm).最后采用 *t* 测验的方法比较实验组与对照组的差异.

2 结果与分析

2.1 急性毒性

根据前期研究结果,小鼠对壳寡糖的最大耐受量大于 10 g/kg 体重^[7].本实验仅选择 5 g/kg 体重剂量配制样品浓度对小鼠灌胃,相当于成年人的拟口服用量为 4~6 g/d^[8].在 7 天观察期内没有发现小鼠出现明显的中毒症状和死亡,小鼠食量没有改变,活动和其它行为如常,毛色光亮贴身,体重正常增加,说明壳寡糖硫酸盐对小鼠没有急性毒性.

表 2 小鼠脏器指数

Table 2 Organ/body weight index of the mice (body weight)						mg · g ⁻¹
组别	肝	肺	心	脾	胸腺	肾
CK	51.8±4.2	6.2±1.7	4.6±1.1	2.7±0.7	1.9±0.8	11.7±1.5
COS	56.3±3.3	6.1±1.4	5.0±0.5	3.8±1.3*	2.7±0.5*	11.6±1.2

注: * *P* < 0.05.

表 3 显示了摄食壳寡糖硫酸盐的小鼠与对照组小鼠器官中铁、锌、铜和钙含量情况.摄食壳寡糖硫酸盐的小鼠肝、肺、心脏器官中铁含量与对照组相比有所上升,但是没有统计学意义(*P* > 0.05),脾、胸腺和肾脏中含量降低,有统计学意义(*P* < 0.05);摄食壳寡糖硫酸盐的小鼠脾和胸腺中锌含量与对照组相比有降低,有

2.2 喂食小鼠壳寡糖硫酸盐对其体内铁、锌、铜和钙含量影响

添加 0.75%壳寡糖硫酸盐(COS)的饲料对小鼠进行 30 天的喂养.一个月内的观察发现小鼠的食量没有改变,各试验组动物反应灵敏且活动正常,毛色光亮贴身,体重正常增加,其体重变化如表 1 所示.样品组比对照组的体重略高,但是均无统计学意义,体重变化无显著性差异(*P* > 0.05).

表 1 小鼠体重的变化(*X* ± *S*/g, *n* = 10)

Table 1 Body weight changes of mice(*X* ± *S*/g, *n* = 10)

组别	始重	终重
CK	18.62±0.91	32.77±2.27
COS	19.05±0.78	34.11±2.87

表 2 是喂养 30 天后小鼠的脏器指数,可以看出对肝、肺、心、肾等的脏器指数没有明显影响.喂食壳寡糖硫酸盐的小鼠的脾和胸腺指数有明显增加.胸腺、脾脏是动物体内主要的免疫器官,免疫器官的重量是反映机体非特异性免疫功能的重要而直观的指标.说明喂食壳寡糖硫酸盐可能提高小鼠免疫功能.

把随机分离出来的肝脏经固定、浸蜡、包埋和切片后,各随机抽出 10 组染色制片,分别在显微镜下经高倍镜观察.根据在显微镜下观察到的结果拍下的照片表明,对照组与样品组肝细胞核膜完整,核仁清晰,胞浆正常,肝组织没有明显的病理改变.

统计学意义,其他器官中锌含量变化没有统计学意义(*P* > 0.05);摄食壳寡糖硫酸盐的小鼠肝和肾脏中铜含量有所上升,有统计学意义(*P* < 0.05),其他器官中锌含量变化没有统计学意义(*P* > 0.05);摄食壳寡糖硫酸盐的小鼠中肝和脾中钙含量降低,有统计学意义(*P* < 0.05),严重影响钙吸收.

表 3 小鼠器官中铁、锌、铜和钙含量

Table 3 The levels of Fe,Zn,Cu and Ca in organs of the mice (organ,X±S,n=10)							μg·g ⁻¹
元素	组别	肝	肺	心	脾	胸腺	肾
Fe	CK	212.6±112.4	409.4±219.0	269.9±156.6	813.0±297.2	653.7±258.6	264.1±79.5
	COS	226.7±139.1	473.1±250.3	311.1±156.1	528.6±164.1*	372.3±238.9*	131.8±82.3*
Zn	CK	23.17±4.29	33.87±11.98	21.43±4.02	45.08±13.43	63.62±33.49	17.88±2.43
	COS	22.89±4.03	25.48±10.18	21.91±2.41	23.55±7.68*	36.80±11.90*	17.34±3.56
Cu	CK	2.44±0.39	3.78±0.92	6.58±1.46	7.53±2.07	1.48±0.59	3.28±0.28
	COS	3.11±0.38*	3.44±0.89	6.16±0.64	4.81±1.48	2.21±0.39	3.78±0.48*
Ca	CK	261.6±152.9	440.8±297.9	142.2±95.7	1232.5±616.1	1374.8±551.2	183.6±120.9
	COS	79.6±39.2*	404.9±118.5	152.2±84.3	450.3±287.2*	731.7±434.9	129.5±67.3

注：* P< 0.05.

3 结 语

哺乳动物体内所需的金属元素主要由小肠从消化后的食物中吸收后进入血液. 一些植物成分如植酸、酚类物质对一些矿物质金属元素的体内吸收有很强阻碍作用^[9-10]. 金属元素以可溶性形态存在容易被吸收. 钙和铜是吸收利用率较高的元素,而锌和铁的吸收利用率较差^[11],体内所需铜的含量远低于锌、铁和钙,因而在喂养小鼠的饲料中锌、铁和钙含量较高. 哺乳动物体内所需铜元素含量易于从普通饲料中满足,不易受到膳食纤维的阻碍而影响正常水平^[12].

壳寡糖是可溶的,与这四种金属元素的配合物也是可溶的,且小分子壳寡糖可以被肠道吸收,少量摄食不会对铁、锌和铜的吸收有阻碍作用^[13]. 另外,壳寡糖有利肠道益生菌的生长,促使营养物质的吸收. 壳寡糖硫酸盐是可溶的,在溶液中可以电离出硫酸根阴离子和壳寡糖的阳离子,由于硫酸钙溶解性较弱,壳寡糖硫酸盐与饲料一起食用,降低了钙的吸收,而铁、锌和铜的硫酸盐是可溶的,不会因引入硫酸根后其吸收受到明显影响. 为了避免钙吸收降低,壳寡糖硫酸盐与食物的摄取需要间隔进行.

因此,摄食壳寡糖硫酸盐不会明显影响体内铁、锌和铜的吸收,但是摄食壳寡糖硫酸盐期间需要补钙,进一步详细的研究有待进行.

参考文献:

[1] 匡银近,池伟林,覃彩芹. 壳聚糖在食品工业中的应用的研究进展[J]. 孝感学院学报,2006,26(3):30-35.

[2] Knorr D. Nutritional quality, food processing and biotechnology aspects of chitin and chitosan;a review [J]. Process Biochemistry,1986(6):90-92.

[3] Koide S S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks[J]. Nutrition Research,1998,18:1091-1101.

[4] Qin C Q,Du Y M,Xiao L,et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2002(311):111-117.

[5] Zeng L T,Qin C Q,Li W,et al. A simple method for the preparation of stable chitooligomers[J]. Journal of Applied Polymer Science,2009(114):956-961.

[6] 王巍,曾林涛,池伟林,等. 壳低聚糖硫酸盐的制备及其特性研究[J]. 孝感学院学报,2006,26(6):15-18.

[7] Qin C Q,Gao J N,Wang L S,et al. Safety evaluation of short-term exposure to chitooligomers from enzymic preparation[J]. Food Chemistry Toxicology, 2006,44(6):855-861.

[8] 覃容贵,吴建伟,国果,等. 蝇蛆壳聚糖急性毒性实验 [J]. 时珍国医国药,2009,20(3):555-556.

[9] Brune M,Rossander L, Hallberg L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures[J]. European Journal of Clinical Nutrition,1989(43):547-557.

[10] Hallberg L, Rossander L, Skinberg A B. Phytates and the inhibitory effect of bran on iron. absorption in man[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1987(45):988-996.

[11] Fairweather-Tait S, Hurrell R F. Bioavailability of mineral and trace elements[J]. Nutrition Research Reviews,1996(9):295-324.

[12] Turnlund J R,Keyes W R, Hudson C A, et al. A stable-isotope study of zinc, copper, and iron absorption and retention by young women fed vitamin B-6-deficient diets[J]. American Journal of Clinical Nutrition,1991(54):1059-1064.

[13] Zeng L T,Qin C Q,He G H,et al. Effect of dietary chitosans on trace iron,copper and zinc in mice[J]. Carbohydrate Polymers,2008(74):279-282.