

叶黄素的毒理学安全性评价

胡 宪¹,张莉华²,许新德² 邵 斌²,刘云凤²

(1.辽宁地质工程职业学院,辽宁丹东 118008;

2.浙江医药股份有限公司新昌制药厂,浙江新昌 312500)

摘 要:目的:评价叶黄素作为食品添加剂和保健食品原料的食品安全性。方法:按照我国卫生部《食品安全毒理学评价程序和检验方法规范》,采用急性毒性实验、Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验进行检测。结果:大、小鼠急性经口 LD₅₀ >10000mg/kg, Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验结果均为阴性。结论:叶黄素属于无毒物质,可以作为一种食品添加剂和保健食品原料进行开发、利用。

关键词:叶黄素,安全性,毒理实验,Ames 实验,微核实验,精子畸形实验

Toxicological assessment of safety of lutein

HU Xian¹, ZHANG Li-hua², XU Xin-de², SHAO Bin², LIU Yun-feng²

(1.Liaoning Geology Engineering Profession College, Dandong 118008, China;

2.Zhejiang Medicine Co., Ltd.Xinchang Pharmaceutical Factory, Xinchang 312500, China)

Abstract: Objective: to evaluate the edible safety of lutein as food additive and health food material. Methods: according to the technical standards for test and toxicological assessment of health food issued by Healthy Ministry of PRC, the acute toxicity LD₅₀ test in mice, the test of micronucleus of polychromatic erythrocyte of young mouse, mouse sperm aberration test and Ames test were performed. Results: the oral LD₅₀ in rats was greater than 10000mg/kg, three terms of hereditary toxicity were all negative. Conclusion: lutein was a kind actual no toxicity substances and may be develop as food additive and health food material.

Key words: lutein; safety; toxicity tests; Ames test; micronucleus test; sperm aberration test

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)05-0296-03

叶黄素属类胡萝卜素之一,属于萜类化合物的衍生物,是由 8 个类异戊二烯单位组成的一类碳氢化合物的氧化衍生物^[1],是一种天然色素,其色泽鲜艳,着色力强^[2,3],抗氧化性好,广泛存在于蔬菜、花卉、水果和某些藻类植物中。叶黄素不仅具有极强的着色力,还能强化添加食品的营养价值,特别是叶黄素和玉米黄质是唯一存在于人眼中的两类胡萝卜素,与人眼的健康息息相关。叶黄素不仅预防肌肉退化症效果良好,而且可以预防和治疗老年性眼视网膜黄斑退化引起的视力下降与失明,还可以预防细胞衰老和机体衰老,提高免疫系统功能,防止因肌体衰老而引发的心血管硬化、冠心病和肿瘤等疾病^[4,5]。目前有关叶黄素的抗氧化、抗癌等功能的研究报道主要来自于国外流行病学研究,有关毒理方面的研究鲜有报道。本文按照我国卫生部《食品安全毒理学评价程序和检验方法规范》,采用急性毒性实验、Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验对叶黄素进行了毒理学安全性评价,为叶黄素的进一步开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

叶黄素粉末 新昌制药厂保健实验中心提供,实验时以食用植物油作溶媒配制成不同浓度的样品液供试, Ames 实验以蒸馏水作溶媒配制成不同浓度的样品悬浮液供试; TA97、TA98、TA100、TA102 菌株

由卫生部食检所提供,经生物学鉴定合格后进行实验; ICR 小鼠、SD 大鼠 由浙江省实验动物中心提供,实验动物许可证号为 SCXK(浙)2003-0001。

1.2 实验方法^[6]

1.2.1 大鼠急性经口毒性实验 体重 180~220g 的健康 SD 大鼠 20 只,雌雄各半。实验用 10000mg/kg 作为最大耐受剂量。灌胃前禁食 16h,自由饮水。采用经口灌胃方式,称取样品 25g 加食用植物油至 100mL,配成 0.25g/mL 的溶液(可灌胃最大浓度),24h 内间隔 3h 按照 20mL/kg 体重两次给受试物。连续观察 14d,记录大鼠中毒症状及死亡情况。

1.2.2 小鼠急性经口毒性实验 体重 18~22g 的健康 ICR 小鼠 20 只,雌雄各半。实验用 10000mg/kg 作为最大耐受剂量。灌胃前禁食 16h,自由饮水。采用经口灌胃方式,称取样品 25g 加食用植物油至 100mL,配成 0.25g/mL 的溶液(可灌胃最大浓度),

收稿日期:2008-12-17

作者简介:胡宪(1966-),女,在读研究生,主要从事化学方面的教学与科研工作。

表3 叶黄素 Ames 实验结果

剂量(μg/皿)		TA97	TA98	TA100	TA102
自发回变	- S ₀	136 ± 20.1	32 ± 4.6	152 ± 13.8	273 ± 11.9
	+ S ₀	135 ± 7.0	31 ± 4.0	138 ± 12.1	281 ± 17.6
溶剂对照 (蒸馏水)	- S ₀	138 ± 12.3	33 ± 6.2	150 ± 22.7	272 ± 14.9
	+ S ₀	139 ± 8.7	32 ± 5.0	142 ± 6.2	278 ± 19.6
8	- S ₀	142 ± 9.0	32 ± 3.0	156 ± 18.8	279 ± 16.5
	+ S ₀	141 ± 15.5	33 ± 4.6	140 ± 15.7	282 ± 8.3
40	- S ₀	144 ± 22.1	30 ± 3.5	162 ± 25.4	282 ± 16.5
	+ S ₀	149 ± 16.5	32 ± 2.5	147 ± 13.1	278 ± 21.6
200	- S ₀	140 ± 17.6	31 ± 2.0	166 ± 4.9	286 ± 13.8
	+ S ₀	142 ± 16.4	31 ± 4.5	141 ± 13.1	284 ± 13.5
1000	- S ₀	148 ± 14.0	32 ± 6.0	157 ± 9.3	282 ± 10.4
	+ S ₀	148 ± 17.7	33 ± 6.1	143 ± 19.5	279 ± 11.4
5000	- S ₀	157 ± 13.1	30 ± 3.5	174 ± 21.1	292 ± 11.4
	+ S ₀	150 ± 10.6	32 ± 5.9	146 ± 12.7	282 ± 18.2
阳性对照	- S ₀	881 ± 228.4	921 ± 234.6	1168 ± 136.5	1299 ± 133.2
	+ S ₀	1095 ± 118.3	2087 ± 170.7	1524 ± 143.2	877 ± 125.0

24h 内间隔 3h 按照 20mL/kg 体重两次给受试物。连续观察 14d,记录小鼠中毒症状及死亡情况。

1.2.3 Ames 实验 选用组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102,实验采用平板渗入法,用四种菌株的非代谢活化系统进行预试,结果在剂量为 5000μg/皿时未出现增菌或抑菌现象。故正式实验时选择 8、40、200、1000、5000μg/皿五个剂量组,同时设空白组、溶剂对照组(蒸馏水)和阳性对照组(ICR-191、柔毛霉素、NaN₃、丝裂霉素 C、2-AF、1,8-二羟基蒽醌),每种菌株每个测试浓度设三个平行,在加 S₀ 和 不加 S₀ 条件下进行实验,重复测试一次,直接计数培养基上各菌株的回变菌落数。

1.2.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验 选用体重 25~30g 的健康 ICR 小鼠 50 只,随机分成 5 组,雌雄各半。设样品 1250、2500、5000mg/kg 体重三个剂量组,用食用植物油配制,另设阴性对照组(蒸馏水)、溶剂对照组(食用植物油)和阳性对照组(环磷酰胺 60mg/kg 体重),24h 两次给样,于末次给样后处死动物,取其胸骨骨髓制片,甲醇固定,Giemsa 染色。每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞(PCE),记录微核细胞数,同时计数观察每 100 个 PCE 所观察到的正染红细胞(RBC)数。

1.2.5 小鼠精子畸形实验 选用体重 29~35g 的健康雄性 ICR 小鼠 42 只,随机分成 6 组,每组 7 只,实验组剂量分别为 5000、2500、1250mg/kg,同时另设阴性对照组(蒸馏水)、溶剂对照组(食用植物油)和阳性对照组(丝裂霉素 C 2.0mg/kg 体重)。连续 5d 给样,对照组也作相同处理,在给样后 35d 颈椎脱臼处死小鼠,随机选 5 只小鼠取两侧附睾,放入盛有适量生理盐水的平皿中,用眼科剪将附睾剪碎,四层擦镜纸吸滤,直接涂片,自然干燥,甲醇固定,用 1% 伊红染色。在高倍镜下检查精子形态,每只小鼠检查完整精子 1000 个,计算畸变精子类型和数目,计算精子畸形率(%)。

1.2.6 统计学方法 用 SPSS 统计软件进行卡方检验。数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 大鼠急性经口毒性实验结果

实验结果如表 1 所示。叶黄素以 10000mg/kg 灌胃大鼠,连续观察 14d,未出现中毒症状和死亡情况。结果表明,该样品大鼠雌雄性经口毒性 LD₅₀ > 10000mg/kg,根据急性毒理性分级标准,属实际无毒物。

表1 叶黄素对 SD 大鼠的急性经口毒理实验结果

性别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	死亡动物数 (只)	死亡率 (%)
雌	10000	10	0	0
雄	10000	10	0	0

2.2 小鼠急性经口毒性实验结果

实验结果如表 2 所示。叶黄素以 10000mg/kg 灌胃小鼠,连续观察 14d,未出现中毒症状和死亡情况。结果表明,该样品小鼠雌雄性经口毒性 LD₅₀ > 10000mg/kg,根据急性毒理性分级标准,属实际无毒物。

表2 叶黄素对 ICR 小鼠的急性经口毒理实验结果

性别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	死亡动物数 (只)	死亡率 (%)
雌	10000	10	0	0
雄	10000	10	0	0

2.3 Ames 实验结果

Ames 实验结果见表 3,由表 3 可知,叶黄素对伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 四株实验菌株,在加 S₀ 和 不加 S₀ 时,8、40、200、1000、5000μg/皿五个剂量组的回变菌落数均未超过空白对照组、溶剂对照组(蒸馏水)回变菌落数的两倍,且各剂量组间无明显的剂量-反应关系,叶黄素的 Ames 实验结果为阴性。

2.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验结果

实验结果如表 4 所示,阳性对照组的微核率明显高于阴性对照组(P < 0.01),说明该实验系统对致突变物是敏感的;各剂量组不同性别动物骨髓嗜多染红细胞微核细胞率与阴性对照组、溶剂对照组比

表4 叶黄素小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验

	组别(mg/kg)	动物数(只)	PCE(个)	MN PCE(个)	MN(‰)	PCE/RBC
雄 性	阴性对照(H ₂ O)	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.15 ± 0.12
	溶剂对照(油)	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.14 ± 0.19
	1250	5	5000	8	1.6 ± 0.9	1.24 ± 0.21
	2500	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.15 ± 0.17
	5000	5	5000	7	1.4 ± 0.6	1.38 ± 0.22
	阳性对照 60	5	5000	118	23.6 ± 9.6	1.08 ± 0.25
雌 性	阴性对照(H ₂ O)	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.12 ± 0.13
	溶剂对照(油)	5	5000	7	1.4 ± 0.6	1.09 ± 0.13
	1250	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.16 ± 0.23
	2500	5	5000	8	1.6 ± 0.9	1.13 ± 0.09
	5000	5	5000	7	1.4 ± 0.9	1.35 ± 0.21
	阳性对照 60	5	5000	122	24.4 ± 8.1	1.10 ± 0.22

较,差异无显著性($P > 0.05$),且无剂量-反应关系,PCE/RBC 均大于 0.1。表明叶黄素在最高剂量 5000mg/kg 下,没有诱发小鼠骨髓微核细胞率增高的作用,微核实验结果为阴性。

2.5 小鼠精子畸形实验结果

实验结果见表 5,由表 5 可见,叶黄素诱发小鼠精子畸变率与阴性对照组、溶剂对照组相比,经秩和检验统计,无统计学差异($P > 0.05$),且无剂量-反应关系;而阳性对照组与阴性对照组之间存在显著差异($P < 0.01$),表明叶黄素在本实验范围内,对小鼠生殖细胞无致突变作用,叶黄素小鼠精子畸形实验为阴性。

表5 叶黄素小鼠精子畸形实验

组别(mg/kg)	动物数(只)	观察精子数(个)	畸形精子数(个)	畸形率(%)
阴性对照(H ₂ O)	5	5000	105	2.10
溶剂对照(油)	5	5000	113	2.26
2500	5	5000	106	2.12
5000	5	5000	108	2.16
10000	5	5000	117	2.34
阳性对照 2.0	5	5000	338	6.76

3 讨论

本研究中,采用整体动物实验、Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验相结合的原则来测试叶黄素可能具有的毒性。

以 10000mg/kg 叶黄素经灌胃途径进行动物毒理实验,大鼠和小鼠皮毛生长、粪便、饮食、活动和神经反射等情况正常,无死亡情况发生。表明叶黄素对大鼠和小鼠行为和精神情况没有明显影响。

根据对遗传物质作用终点的差别,并兼顾原核细胞与真核细胞、体内实验与体外实验以及体细胞和生殖细胞相配套原则,进行了三项遗传毒性实验,即 Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验。Ames 实验主要是针对生物的基因突变进行评估,它是一种快速检测化学物质致突变以及潜在致癌的有效且常用方法;小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验主要是对染色体结构完整性变化进行评估;小鼠精子畸形实验所反映的遗传学终点主要是对生殖细胞的遗传性进行评估,而精子畸形率升高从本质上也能代表一定的生殖毒理学意义^[7]。

当不加 S₀ 时,阳性物质能诱导菌株 TA97、TA98、

TA100、TA102 回复突变菌落增加;当加 S₀ 时,阳性物质也能诱导菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 回复突变菌落增加。这表明用菌株回复突变特性是良好的,并且显示外源激活系统 S₀ 是具有激活能力的。另外,从本研究结果来看,无论加与不加 S₀ 的情况下,受试叶黄素均未表现出诱发测试菌株回复突变的能力。

小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验,没有发现叶黄素具有诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核生成的能力,且从 PCE/RBC 比值大于 0.1 来看,受试叶黄素对红细胞的分化和成熟是没有影响的。另外,小鼠精子畸形实验试图检测受试叶黄素对精子生成和发育的影响。结果表明,小鼠精子畸形实验结果均为阴性。

受试叶黄素大、小鼠经口染毒 LD₅₀ > 10000mg/kg;反映体细胞和反应生殖细胞遗传毒性的 Ames 实验、骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验结果均为阴性,说明受试叶黄素在本实验条件下未见明显毒性,未见遗传毒性作用。综合各项毒理学实验结果,可以判定叶黄素作为天然食用色素和食品营养强化剂使用,是安全无毒的,可以在化妆品、饮料和食品行业中作为食品添加剂和保健食品原料来进行开发利用。

参考文献:

- [1] Hart DJ, Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK[J]. Food Chem, 1995, 54: 101~111.
- [2] 张慧,李涛,徐公世. 一种前景广阔天然食品着色剂-叶黄素[J]. 中国食品添加剂, 2004(5): 45~49
- [3] 许秀兰,赵国华. 叶黄素研究进展[J]. 粮食与油脂, 2004(10): 3~7.
- [4] Hulten K. Carotenoids alpha-tocopherol and retinal in plasma and breast cancer risk in northern Sweden[J]. Cancer Causes Control, 2001, 12(6): 529~537.
- [5] Toniolo P. Serum carotenoids and breast cancer[J]. Am J Epidemiol, 2001, 153(12): 1142~1147.
- [6] GB15193.1~15193.21. 食品安全性毒理学评价程序和方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [7] 张锐,刘毓谷. 毒理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 300.