

# 带鱼蛋白亚铁螯合肽抗贫血活性及安全性评价

袁宁, 林慧敏, 邓尚贵, 金图南

(浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江海洋学院, 食品与医药学院, 浙江舟山 316000)

**摘要:** 采用饲喂低铁饲料方法制备大鼠缺铁性贫血模型, 灌胃带鱼蛋白亚铁螯合肽及应用急性毒性试验、Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验分别探究带鱼蛋白亚铁螯合肽抗贫血活性及安全性。结果显示: 带鱼蛋白亚铁螯合肽能够提高贫血大鼠血红蛋白(Hb)含量和红细胞数(RBC)等外周血指标, 显著促进大鼠贫血症状的改善。 $LD_{50}=7454.80$  mg/kg, 属于实际无毒性; Ames试验中TA97、TA98、TA100和TA102的4个标准菌株皆为阴性结果; 小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验组与阴性对照组比较差别无统计学意义。因此, Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验结果均为阴性。表明带鱼蛋白亚铁螯合肽具有抗贫血活性且食品安全性良好, 可作为食品添加剂进一步开发利用。

**关键词:** 带鱼蛋白亚铁螯合肽; 抗贫血; 安全性评价; Ames试验; 小鼠微核试验

文章编号: 1673-9078(2016)11-274-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.041

## Safety Evaluation and Anti-anemia Effect of Hairtail Protein Ferrous-chelating Peptide in Mice

YUAN Ning, LIN Hui-min, DENG Shang-gui, JIN Tu-nan

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood, College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** A rat model of iron deficiency anemia was established by feeding rats an iron-deficient diet, and the anti-anemia effect and safety of hairtail protein ferrous-chelating peptide were studied by feeding the animals with hairtail protein ferrous-chelating peptide through gavage, and these effects were evaluated using the acute toxicity test, Ames test, mouse bone marrow micronucleus test, sperm abnormality test and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro*. The results showed that hairtail protein ferrous-chelating peptide increased the hemoglobin (Hb) content and the number of red blood cells (RBC) and other peripheral parameters, and significantly improved the symptoms of anemia in rats. The median lethal dose ( $LD_{50}$ ) was 7454.80 mg/kg, indicating actual non-toxicity. TA97, TA98, TA100, and TA102, four standard strains in Ames test, were all negative in the Ames test of the mice. Meanwhile, compared with the negative control group, the results of the mouse bone marrow micronucleus test, sperm abnormality test, and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro* showed no significant difference, suggesting that the three results were also all negative. Therefore, we concluded that hairtail protein ferrous-chelating peptide has an anti-anemia effect and good food safety, and can be further developed and utilized as a food additive.

**Key words:** hairtail ferrous-chelating peptide, anti-anemia activity, safety evaluation, Ames test, mouse bone marrow micronucleus test

铁缺乏是最常见的营养素缺乏症之一, 其中以妇女、孕妇及儿童为高发人群, 铁摄入不足可引起贫血或相关功能障碍, 在我国缺铁性贫血发病率的居民接近20%, 而治疗缺铁性贫血常用的硫酸亚铁等常规补铁制剂生物利用率较低、成本高, 且还有一定的副作用

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301597, 31471609); 海洋公益性行业科研专项经费资助(201305013)

作者简介: 袁宁(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品精深加工

通讯作者: 邓尚贵(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品精深加工;

林慧敏(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品精深加工

用<sup>[1,2]</sup>。现代生物代谢研究发现: 蛋白质经过人体消化道中的酶系水解后, 并不都是被水解成氨基酸形式再被吸收, 更多的则是以短肽或寡肽的形式被直接吸收, 尤其二肽和三肽的吸收速度比同一组成的氨基酸要快<sup>[3]</sup>。因此, 根据这一特点, 最近的研究已经描述了食物来源的生物活性肽或多糖作为铁螯合剂制备的螯合物具有较高的生物利用度, 对治疗缺铁性贫血重要的改进<sup>[4~6]</sup>。例如, 含5.60%  $Fe^{3+}$ 的酪蛋白肽复合酶解液对缺铁性贫血大鼠的抗贫血功效比硫酸铁显著<sup>[7]</sup>, 铁-多糖复合物也已被广泛用于缺铁性贫血治疗<sup>[8]</sup>。

带鱼是我国主要的海产经济鱼类之一, 年捕获量

约为110多万吨, 多年占据海产经济鱼类年产量第一, 在加工生产过程中往往会产生大量的带鱼副产物, 这些副产物中含有许多优质蛋白, 一般只有小部分用于饲料生产, 而大部分不经过处理就被丢弃, 这样不仅浪费资源而且会造成环境的污染。本文以带鱼蛋白酶解肽作为铁螯合剂, 以氯化亚铁为铁源制备出带鱼蛋白亚铁螯合肽Fe(II)-FPH, 以缺铁性贫血大鼠为对象来研究Fe(II)-FPH的抗贫血功效, 同时依据《食品安全性毒理学评价程序》<sup>[9]</sup>, 以带鱼蛋白亚铁螯合肽为实验材料, 通过急性毒性试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和外哺乳动物细胞染色体畸变试验对其食用安全性进行评价, 为带鱼蛋白亚铁螯合肽的进一步开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

抗贫血实验选择Wistar大白鼠(雌雄各半), 小鼠急性毒性实验、小鼠微核实验、精子畸形实验选用SPF级BALB/c小鼠(18~22 g), 均由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK-(军)20110011。Ames试验选用经鉴定符合要求的组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌: TA97、TA98、TA100和TA102共4株, 以及S9混合液均由重庆威斯腾有限责任公司提供。

显微镜日本Olympus公司; Mikro-22台式离心机德国Hettich公司; Bp-3100s电子天平(精度0.0001 g)上海精科天美科学仪器有限公司; IR-435红外分光光度计; 日立835-50型氨基酸自动分析仪; CL 8000全自动生化仪日本岛津公司; CD 3700血液分析仪美国Cell-DYN公司; HMS 70染色机德国蔡司公司。

### 1.2 带鱼蛋白亚铁螯合肽的制备

解冻好的带鱼鱼糜加入5倍体积的蒸馏水, 用搅拌机打成均匀的鱼糜液, 以1 mol/L HCl溶液和1 mol/L NaOH溶液调节溶液pH为7.0。先把鱼糜液的温度升高到40 °C后加入木瓜蛋白酶, 酶解过程中用1 mol/L HCl溶液和1 mol/L NaOH溶液控制pH在7.0左右。并连续搅拌8 h, 升温至95 °C并保持15 min灭酶, 冷却至室温, 12000 r/min离心10 min, 除去上部油脂层和底部沉淀物, 收集中间部分并通过浓缩和冷冻干燥获得带鱼蛋白酶解肽。采用FeCl<sub>2</sub>配置成1 mol/L溶液, 按照酶解肽质量的0.1%加入抗坏血酸, 放入恒温水浴震荡锅中, 温度调节到30 °C, 静置10 min, 待溶液温度达到30 °C左右, 按照1 (FeCl<sub>2</sub>溶液):50 (酶解液) (V/V)

把FeCl<sub>2</sub>溶液加入到酶解液中, 震荡螯合30 min后真空浓缩, 冷冻干燥得到粉状带鱼蛋白亚铁螯合肽。

### 1.3 氨基酸组成分析<sup>[10]</sup>

准确称取带鱼蛋白亚铁螯合肽样品10 mg, 放入消化管中, 加入12 mL、6 mol/L的HCl并充入氮气, 置于120 °C烘箱中水解10 h, 用氨基酸自动分析仪测定其中氨基酸组成及含量。

### 1.4 带鱼蛋白肽及其亚铁螯合肽红外光谱分析

采用压片法制备测试样品: 分别取2 mg的样品和200 mg干燥的溴化钾晶体(粉末), 于玛瑙研钵中研磨成粒度≤2.5 μm, 且混合均匀的细粉末, 装入模具内, 在油压机上压制片, 将制得的测试片放入样品检测室内, 以IR-435红外分光光度计对其定性分析, 得到光谱图。

### 1.5 抗贫血实验

新生刚断奶Wistar大鼠70只, 雌雄各半, 将其平均分为5组, 组1(空白对照组)根据AIN<sup>[11]</sup>标准, 整个实验阶段喂养正常饲料(Fe 48 mg/kg 饲料)。贫血模型是通过喂养低铁饲料(Fe 含量8 mg/kg 饲料), 造模时间为60 d, 测定大鼠Hb含量, 当达到中度贫血(Hb<90 g/L)时即为造模成功。贫血模型动物随机分成4组(组2~5): 组2(阴性对照组)整个实验阶段喂养低铁饲料(Fe 8 mg/kg 饲料), 组3(实验组)喂养含带鱼蛋白亚铁螯合肽(Fe 50 mg/kg 饲料)的饲料, 第4组(阳性对照组)喂养含硫酸亚铁的饲料, 标准的贫血治疗(Fe 50 mg/kg 饲料)富含铁的食物, 第5组(实验组)饲喂含带鱼蛋白酶解肽(<Fe 7 mg/kg 饲料)的低铁饲料。正常饲料和缺铁饲料由浙江省动物实验中心提供。

### 1.6 安全性评价

#### 1.6.1 急性毒性试验

选择SPF级雄性BALB/c小鼠, 根据体重按随机分组的方法, 依据LD<sub>50</sub>计算的设计原则将动物分成数个染毒组。一次给予受试物后, 观察受试物毒性反应与剂量的关系, 求出半数致死剂量(LD<sub>50</sub>), 并根据LD<sub>50</sub>值将受试物进行急性毒性分级。

#### 1.6.2 Ames 试验

采用标准平皿掺入法。将Fe(II)-FPH受试品设为0.05、0.10、0.50和2 μg/皿4个剂量组; 同时设自发回

变组、溶剂对照组和阳性对照组；采用平板掺入法在加S9与不加S9混合液条件下进行，每个剂量设3个平行皿。试验在相同条件下重复3次。试验流程和结果判定参照GB 15193.4-2003。

### 1.6.3 小鼠骨髓细胞微核试验

选择SPF级BALB/c小鼠50只，随机分组，每组10只，雌、雄各半。试验设1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>和1/8 LD<sub>50</sub> 3个受试剂量组，1个阳性对照组(环磷酰胺，剂量为40 mg/kg)，1个阴性对照组(双蒸水)。每天染毒1次，连续4 d，末次给药24 h时取样；取胸骨的骨髓，用小型止血钳将骨髓挤于有一小滴小牛血清的清洁载玻片上，混合均匀后推片；将推好晾干的骨髓片放入染色缸中，用甲醇溶液固定15 min，取出晾干，每只动物计数1000个嗜多染红细胞(PCE)，计算微核细胞率(以%表示)，并计数200个PCE及同时见到的NCE(正染红细胞)数，求出PCE/NCE值。采用t检验进行统计分析。

### 1.6.4 小鼠精子畸形实验

选择SPF级BALB/c小鼠50只，随机分组，每组10只，雌、雄各半。试验设1/2 LD<sub>50</sub>、1/4 LD<sub>50</sub>、1/8 LD<sub>50</sub> 3个受试剂量组，1个阳性对照组(环磷酰胺，剂量为40 mg/kg)，1个阴性对照组(双蒸水)。采用1次染毒方式给药，给受试样品后的第35 d处死小鼠，取两侧附睾精子滤液按常规方法制片、镜检。每只小鼠计数1000个结构完整的精子，计算精子畸形发生率(以百分率计)，结果采用秩和检验进行统计分析。

### 1.6.5 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

实验使用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞株。试验分组：空白组、S9、S9+0.50 mg/mL、S9+1 mg/mL、S9+2 mg/mL、S9+4 mg/mL、0.50 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL。试验前一天，将细胞接种于培养皿(瓶)中，放CO<sub>2</sub>培养箱内培养。试验需在加入和不加入S9 mix的条件下进行。作染色体分析时，对每一处理组选200个(阳性对照可选100个)分散良好的中期分裂相进行染色体畸变分析。在分析时应记录每一观察细胞的染色体数目，对于畸变细胞还应记录显微镜视野的坐标位置及畸变类型。对染色体畸变细胞率用 $\chi^2$ 检验，以评价受试物的致突变性。

## 1.7 统计分析

统计学方法统计分析采用SPSS 13.0版统计分析软件，采用方差分析或秩和检验对均数和标准差进行计算，结果以平均数±标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 带鱼蛋白亚铁螯合肽

表1 带鱼蛋白亚铁螯合肽的氨基酸组成(mg/g)

Table 1 Amino acid composition (mg/g) of the Fe(II)-FPH

Hairtail-FPH		Hairtail-FPH	
Asp	24.28±1.49	Val	22.87±1.14
Thr	7.61±0.96	Met	8.48±0.00
Ser	6.96±0.51	Ile	13.94±1.08
Glu	104.89±1.02	Leu	25.94±1.45
Pro	36.40±0.87	Tyr	23.87±0.39
Gly	51.79±2.23	Phe	17.57±0.37
Ala	45.24±0.16	His	26.32±0.73
Cys	18.30±1.05	Lys	2.20±0.59

酶水解是一种高效利用低值鱼和副产品的有效技术<sup>[12]</sup>。肽的螯合活性与肽段的大小，结构，分子量及氨基酸组成有关<sup>[13]</sup>。表1为带鱼蛋白亚铁螯合肽的氨基酸组成，显示Glu(104.89% m/m)、Gly(51.79%)、Leu(25.94%)和His(26.32%)明显高于其它氨基酸含量。肽的氨基酸组成是该肽段能否与金属螯合的重要因素之一，某些氨基酸如Glu、Gly和His与Fe(II)的亲合力明显高于其他氨基酸<sup>[14]</sup>。而带鱼酶解肽这三种氨基酸的含量成分在总体氨基酸中含量居多，因此带鱼酶解肽与Fe(II)的螯合能力较高。

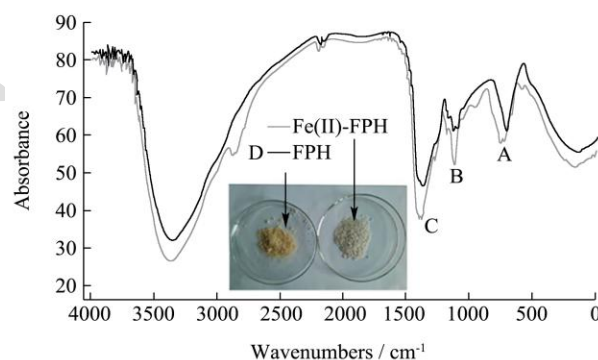


图1 带鱼蛋白肽及其亚铁螯合肽的红外光谱

Fig.1 IR spectra of FPH and Fe(II)-FPH

图1显示了带鱼酶解肽(FPH, 浅黄色粉末)和Fe(II)-FPH(灰色粉末)的红外光谱。FPH图谱的1450 cm<sup>-1</sup>(C)、1156 cm<sup>-1</sup>(B)和653 cm<sup>-1</sup>(A)为COO-和酰胺键的NH-。当与Fe(II)螯合时，对应羧基的D谱带从1450 cm<sup>-1</sup>转移到1425 cm<sup>-1</sup>处。此外1040-953 cm<sup>-1</sup>处出现新吸收峰，这可以归因于CO-Fe键形成。当与Fe(II)螯合后，Fe-N系列键代替N-OH(氢键)，红外光谱上2900 cm<sup>-1</sup>频带锐化明显。这些数据表明Fe(II)的螯合主要位点是羧酸酯基团。

### 2.2 抗贫血实验

铁是人体代谢所必需的微量元素，它不仅在细胞生成中具有重要作用，还通过催化氧化-还原反应参与机体所有组织的能量代谢、解毒等生理过程<sup>[15-16]</sup>。在体内参与细胞能量代谢等重要生理过程的称为功能性铁，如血红蛋白，肌红蛋白中的铁等<sup>[17]</sup>。在缺铁性贫血血红蛋白和平均红细胞体积减小，而血红蛋白分布宽度(HDW)增加<sup>[18]</sup>。在本实验中我们发现第2组(低

铁饲料)的Hb水平下降，平均75.40±3.70 g/L，第3组(Fe(II)-FPH喂养组)Hb升高到124±12.80 g/L，HDW则下降到27.10±3.10 g/L(第3组)。MCV、RBC及铁蛋白浓度变化与Hb一致，与对照组差异显著( $p<0.01$ )。Fe(II)-FPH能显著改善贫血大鼠的Hb和MCV等指标( $p<0.01$ )，与组4(补充硫酸亚铁)效果相当。

表2 鱼蛋白亚铁螯合肽的抗贫血

Table 2 Anti-anemia effect of Fe(II)-FPH

		组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	
n		8	10	10	8	8	
膳食铁含量	mg/kg	48	8	50	50	7	
红细胞(RBC)	10 <sup>12</sup> /L	A	7.05±0.52	5.75±0.52	5.69±0.44	5.74±0.26	5.79±0.36
		B	7.09±0.46	5.50±0.52	7.25±0.46**	7.17±0.52**	6.25±0.46
血红蛋白(Hb)	g/L	A	122.40±8.30	87.60±4.40	85.80±6.20	83.60±4.70	87.60±10.40
		B	125.10±14.90	75.40±3.70	124±12.80**	120±10.40**	97.50±9.30
平均红细胞体积(MCV)	fL	A	56.90±1.30	42.60±2.10	42.10±1.70	43.20±2.00	42.60±2.10
		B	57.60±1.20	40.80±1.90	55.50±1.70**	57.20±2.20**	43.60±3.20
血红蛋白分布宽度(HDW)	g/L	A	26.20±2.20	35.70±3.10	36.20±3.60	35.30±2.90	36.70±2.10
		B	25.60±3.10	36.50±2.40	27.10±3.10**	26.40±1.90**	40.50±3.50
铁蛋白浓度	g/L	A	0.42±0.02	0.19±0.04	0.20±0.03	0.19±0.02	0.20±0.04
		B	0.44±0.03	0.21±0.01	0.41±0.02**	0.44±0.01**	0.24±0.01

注：组1，标准膳食铁(48 mg Fe/kg diet)；组2，低铁饲料(less 8 mg Fe/kg diet)；组3，低铁饲料加 Fe(II)-FPH(50 mg Fe/kg diet)；组4，低铁饲料加硫酸亚铁(50 mg Fe/kg diet)；组5，低铁饲料加带鱼酶解肽(less 7 mg Fe/kg diet)。A：实验第0 d；B：实验第35 d；\*\* $p<0.01$ 。

### 2.3 安全性评价

#### 2.3.1 急性经口毒性试验

根据预实验结果，取参考剂量120 mg/kg的80X为最高剂量，剩下的组别按1:0.8的比例等比级数排列。即5个分组分别为80X(9.60 g/kg)组、64X(7.68 g/kg)

组、51X(6.12 g/kg)组、41X(4.92 g/kg)组和33X(3.96 g/kg)组。

回归方程 $y(\text{Probit}) = -49.183 + 13.992 \text{ Log}(D)$ ，半数致死量 $LD_{50} = 7454.80 \text{ mg/kg}$ ，根据经口毒性分级标准评价，属于实际无毒性。

表3 鱼蛋白亚铁螯合肽的半数致死量(Bliss法计算)

Table 3 LD<sub>50</sub> of Fe(II)-FPH calculated using Bliss method

剂量(x)	对数剂量/只	动物数/只	死亡数/%	死亡百分率(Y)	实验机率单位(Y)	回归机率单位
3960	3.5977	5	0	0.00	-	1.1558
4920	3.6920	5	0	0.00	-	2.4748
6120	3.7868	5	1	20.00	4.1585	3.8011
7680	3.8854	5	2	40.00	4.7471	5.1808
9600	3.9823	5	5	1E2	-	6.5368

#### 2.3.2 Ames 实验结果

受试物经上述测定后，菌株TA97、TA98、TA100和TA102在未加S9混合液时，各剂量组间无明显变化；在加S9混合液后，受试物的回变菌落数与溶剂对照回变菌落数差别无统计学意义，表明该受试物对鼠伤寒沙门氏菌无致突变作用。

#### 2.3.3 小鼠骨髓微核试验

表5结果显示，受试物经测定后，1/2 LD<sub>50</sub>剂量、1/4 LD<sub>50</sub>剂量和1/5 LD<sub>50</sub>各剂量组间对小鼠骨髓微核影响相比正常对照组无明显变化，而与环磷酰胺对照组相比差异明显，表明该受试物对小鼠骨髓微核无致突变作用。

表4 Ames试验菌株的回变结果(平均值±标准差)

**Table 4 Results of the Ames test**

组别	剂量/(μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-(S9)	+(S9)	-(S9)	+(S9)	-(S9)	+(S9)	-(S9)	+(S9)
受试物	0.05	124	231	50	186	153	253	252	496
	0.10	120	256	47	195	124	227	245	456
	0.50	125	221	48	187	152	243	248	432
	2	149	2246	120	165	159	257	259	453
自发回变	无	115		45		124		248	
溶剂对照	H <sub>2</sub> O	98		42		116		240	
阳性对照	0.50	448		407		2253		399	

表5 鱼蛋白亚铁螯合肽的小鼠骨髓微核试验

Table 5 Mouse bone marrow micronucleus test of Fe(II)-FPH

分组	小鼠个数	观察细胞数(约)	微核数(总数)	微核率/%
正常对照组	5	5000	10	2.00
1/2 LD <sub>50</sub> 剂量	5	5000	12	2.40
1/4 LD <sub>50</sub> 剂量	5	5000	13	2.60
1/8 LD <sub>50</sub> 剂量	5	5000	12	2.40
环磷酸胺对照组	5	5000	40	8.00

### 2.3.4 小鼠精子畸形试验

表6 鱼蛋白亚铁螯合肽的小鼠精子畸形试验

Table 6 Mouse sperm abnormality test of Fe(II)-FPH

分组	小鼠个数	精子数	畸变数	畸变率
正常对照组	5	1000	178	17.80% <sup>a</sup>
1/2 LD <sub>50</sub> 剂量	5	1000	182	18.20% <sup>a</sup>
1/4 LD <sub>50</sub> 剂量	5	1000	160	16.00% <sup>a</sup>
1/8 LD <sub>50</sub> 剂量	5	1000	121	12.10% <sup>a</sup>
环磷酸胺对照组	5	1000	254	25.40%

表6结果显示,受试物经上述测定后,1/2 LD<sub>50</sub>剂量、1/4 LD<sub>50</sub>剂量、1/5 LD<sub>50</sub>各剂量组间对小鼠精子畸变影响无明显变化,而与环磷酸胺对照组相比差异明显,表明该受试物小鼠精子无致畸变作用。

### 2.3.5 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

表7 带鱼蛋白亚铁螯合肽的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

Table 7 Mammalian chromosome aberration test of

**Fe(II)-FPH in vitro**

分组	小鼠个数	观察细胞数(约)	染色体畸变数(总数)	畸变率/%
空白组	5	200	4	2.00
S9	5	100	14	14.00
S9+0.50 mg/mL	5	200	4	2.00
S9+1 mg/mL	5	200	5	2.50
S9+2 mg/mL	5	200	5	2.50
S9+4 mg/mL	5	200	6	3.00

0.50 mg/mL	5	200	5	2.50
1 mg/mL	5	200	5	2.50
2 mg/mL	5	200	6	3.00
4 mg/mL	5	200	6	3.00

表7结果显示,受试物经测定后,空白组、S9、S9+0.50 mg/mL、S9+1 mg/mL、S9+2 mg/mL、S9+4 mg/mL、0.50 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL和4 mg/mL各剂量组对中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞株染色体畸变影响无统计学差异,表明该受试物在体外对哺乳动物细胞染色体无致畸变作用。

## 3 结论

带鱼蛋白亚铁螯合肽能够提高贫血大鼠血红蛋白(Hb)含量、红细胞数(RBC)等外周血指标,显著促进大鼠贫血症状的改善。按照《食品安全性毒理学评价程序和方法》对带鱼蛋白亚铁螯合肽进行了急性毒性实验、小鼠骨髓微核实验、小鼠精子畸形试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验, LD<sub>50</sub>=7454.80 mg/kg,属于实际无毒性;Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验、验证组与阴性对照组比较差别无统计学意义。实验证实带鱼蛋白亚铁螯合肽具有抗贫血的功能,且食品安全性良好,可作为食品添加剂进一步开发利用。

## 参考文献

- [1] 周张章,赵国华,周才琼,等.铁强化剂的研究应用现状[J].中国食品添加剂,2005,1:95-98  
ZHOU Zhang-zhang, ZHAO Guo-hua, ZHOU Cai-qiong, et al. Investigating and utilizing status of iron fortifier [J]. China Food Additives, 2005, 1: 95-98
- [2] Clark S F. Iron deficiency anemia [J]. Nutrition in Clinical Practice, 2008, 23(2): 128-141
- [3] 钟明杰.带鱼下脚料蛋白水解螯合物制备及生物特性研究[D].中国海洋大学,2009

- ZHONG Ming-jie. Preparation of chelate of proteolysis from *Harengula Zunasi Bleeker's* leftover and its biological character study [D]. Ocean University of China, 2009
- [4] Lee S H, Song K B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(3): 378-381
- [5] 陈升军.米蛋白肽及米蛋白肽铁螯合物生产工艺研究[D].南昌大学,2008
- CHEN Sheng-jun. Investigation for preparing the rice peptide and ferrous chelate with peptide by hydrolyzing rice residue protein [D]. Nanchang University, 2008
- [6] Toblli J E, Cao G, Oliveri L, et al. Effects of Iron deficiency anemia and its treatment with iron polymaltose complex in pregnant rats, their fetuses and placentas: Oxidative stress markers and pregnancy outcome [J]. *Placenta*, 2012, 33(2): 81-87
- [7] Chaud M V, Izumi C, Nahaal Z, et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(4): 871-877
- [8] Zheng J, Yue X, Dai Z, et al. Novel Iron-polysaccharide Multilayered Microcapsules for Controlled Insulin Release [J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(5): 1499-1507
- [9] GB 15193.1-2003.食品安全性毒理学评价程序[S]  
GB 15193.1-2003. Food Safety Toxicology Evaluation Program [S]
- [10] 高菲,王维有,鲁军,等.海洋鱼骨胶原肽钙螯合物的制备及红外光谱表征[J].中国海洋大学学报,2015,45(1):47-54
- GAO Fei, WANG Wei-you, LU Jun, et al. Preparation and Infrared spectrum identification for marine fish ossein peptide chelated calcium [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(1): 47-54
- [11] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. *The Journal of Nutrition*, 1993, 123(11): 1939-1951
- [12] Kristinsson H G, Rasco B A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(1): 43-81
- [13] Carrasco-Castilla J, Hem Ndez-Álvarez A J, Jim Nez-Mart N C, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1789-1795
- [14] Abdel-Rahman L H, El-Khatib R M, Nassr L A, et al. Metal based pharmacologically active agents: Synthesis, structural characterization, molecular modeling, CT-DNA binding studies and *in vitro* antimicrobial screening of iron (II) bromosalicylidene amino acid chelates [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 117(1): 366-378
- [15] 宋晨,张钧.铁与心血管系统疾病的研究进展[J].临床心血管病杂志,2003,19(12):761-763
- SONG Chen, ZHANG Jun. The research progress of iron and cardiovascular diseases [J]. *Journal of Clinical Cardiovascular Diseases*, 2003, 19(12): 761-763
- [16] 许加生.铁与人体健康[J].微量元素与健康研究,2004, 21(5): 62-63
- XU Jia-sheng. Iron and human health [J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2004, 21(5): 62-63
- [17] Haas J D, Brownlie T. Iron deficiency and reduced work capacity: A critical review of the research to determine a causal relationship [J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131(2): 676S-90S
- [18] Wharton B A. Iron deficiency in children: Detection and prevention [J]. *British Journal of Haematology*, 1999, 106(2): 270-80