

同位素稀释技术比较六种不同钙剂的生物利用度

鲍善芬 W. Windisch M. Kirchgessner

摘要: **目的** 测定和比较 6 种不同的有机和无机钙剂的真正吸收率和生物利用度。**方法** 采用同位素稀释技术。在 2 w 的代谢研究中, 60 只生长期雄性 SD 大鼠, 肌肉注射⁴⁵Ca 后, 分为 6 组, 每组 10 只, 分别饲喂含柠檬酸钙、乳酸钙、醋酸钙、牡蛎壳粉、蛋壳粉和 β -磷酸三钙的人工半合成饲料。6 种饲料中含钙、磷、镁的量均相同, 分别为 2.8, 5.3 和 0.65 g/kg。**结果** 柠檬酸钙、乳酸钙和醋酸钙等有机形式钙的真正吸收率和生物利用度(真正吸收率分别为 98.8, 98.3 和 98.6%; 生物利用度分别为 96.8, 96.0 和 96.8%) 略高于生物碳酸钙类的牡蛎壳和蛋壳(真正吸收率分别为 97.7 和 96.3%; 生物利用度分别为 95.3 和 93.8%) 以及无机类的 β -磷酸三钙(94.9 和 92.0%)。然而, 从实际应用角度衡量, 所观察的 6 种钙剂均显示很高的吸收率和生物利用度。**结论** 可以认为, 膳食钙的化学形式并不是影响钙生物利用度的主要因素。

关键词: 柠檬酸钙; 乳酸钙; 醋酸钙; 牡蛎壳; 蛋壳; 吸收率; 生物利用度; 同位素稀释技术

Determination of calcium bioavailability of six different organic and inorganic dietary calcium sources by isotope dilution technique BAO Shanfen, Windisch W, Kirchgessner M. Trace Element Research Lab, Department of Nutrition, Chinese General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective Determination and comparison of calcium true absorption and bioavailability of six different organic and inorganic dietary Ca sources by isotope dilution technique. **Methods** In a 2-week metabolic study, 60 ⁴⁵Ca labeled growing SD rats, divided into six groups, each of 10 were fed restrictively a semisynthetic purified diet supplemented with calcium citrate, calcium lactate, calcium acetate, oyster-shell meal, eggshell meal and β -tri-Ca phosphate. The total dietary contents of Ca, P and Mg were uniformly 2.8, 5.3 and 0.65 g/kg. **Results** True absorption, intermediate utilization and bioavailability was uniform for Ca citrate, lactate and acetate (true absorption: 98.8, 98.3 and 98.6%; bioavailability: 96.8, 96.0 and 96.8%). Oyster-shell and eggshell revealed only slight lower values (true absorption 97.7 and 96.3%; bioavailability: 95.3 and 93.8). β -tri-Ca phosphate were lower in bioavailability (92.0%). However, in total, all tested Ca sources revealed high absorbability and utilizability. **Conclusions** The chemical formulation of dietary Ca does not seems to be the primary factor of Ca bioavailability in practical diets.

Key words: Ca citrate; Ca lactate; Ca acetate; Oyster-shell; Eggshell; Absorption; Bioavailability; Isotope dilution technique

钙在许多疾病如佝偻病、骨质疏松的防治中起着重要作用。近年来, 补钙在医药界和营养界成了一个重要的话题, 对食物及各种钙剂在体内吸收、利用的评价也吸引了众多的研究。我们曾建立了⁴⁵Ca 标记大鼠的同位素稀释技术定量测定钙生物利用度

的方法^[1,2], 在此基础上, 本研究对 6 种不同的有机和无机钙的生物利用度进行了测定和比较。

1 材料和方法

1.1 动物及处理

60 只 SD 大鼠, 初始体重 95 g, 单独喂养在有机玻璃代谢笼中, 饲喂以 EDTA 处理过的酪蛋白、淀粉、糖、矿物质、微量元素及维生素为基础饲料的块状人工半合成饲料^[3]。基础饲料含钙 0.2 g/kg。实

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院营养科微量元素研究室(鲍善芬); 德国慕尼黑技术大学营养生理研究所(W. Windisch, M. Kirchgessner)

通讯作者: 鲍善芬, Email: baoshanfen@yahoo.com.cn

验开始时,所有大鼠均饲喂以柠檬酸钙形式添加的含钙 2.7 g/kg 的饲料,4 d 后,于乙醚轻度麻醉下,在所有大鼠左侧大腿肌肉处注射 75 μ L 322 kBq 45 Ca 盐水溶液(0.9% NaCl),注射后大鼠分为 6 组,每组 10 只,各组大鼠体重均值和标准差基本一致。第 1 组大鼠继续饲喂柠檬酸钙形式添加的含钙饲料,其余各组饲料中的钙分别为乳酸钙、醋酸钙、牡蛎壳粉钙、蛋壳粉钙及 β -磷酸三钙。其中牡蛎壳钙粉由蓬莱海洋化学公司提供,蛋壳粉为北京市售鸡蛋的蛋壳加工所得,其余均为纯化学试剂。6 种饲料中的钙、磷、镁含量相同,实测值见表 1。

Table 1 Dietary contents of Ca, P and Mg (g/kg)

Elements	Ca source					
	Citrate	Lactate	Acetate	Oyster shell	Egg shell	Phosphate
Calcium	2.7	2.7	2.6	2.9	2.9	2.7
Phosphorus	5.5	5.1	5.3	5.1	5.2	5.3
Magnesium	0.65	0.64	0.68	0.62	0.64	0.66

根据注射 45 Ca前 4 d 对大鼠进食量的记录观察,分组后,每只大鼠第一天投放 9.0 g 饲料,以后以每天增加 0.3 g 的方式递增。大鼠每天在“餐厅”进食 2 次,吃完后退出,尽可能吃完每天投放的食物。大鼠自由饮用含 NaCl 0.14 g/L 的去离子水。饲养室温度 25℃,相对湿度 60%,每天昼夜的时间比为 11:13。

从 45 Ca注射后第 8 d 至 13 d,连续 6 d 收集粪、尿。样品储存于 4℃冰箱内待测。第 13 d 时,乙醚麻醉下,断头处死所有大鼠,收集全血于肝素抗凝管中,1000 g 离心 15 min 后分离收集血浆。分离右侧股骨,与血浆一起储存于 -20℃冰箱待测。

1.2 分析和计算方法

饲料、粪、股骨及 100℃烘干后的尿、血浆置铂金坩埚于马弗炉中灰化后,溶解于 0.3 N HCl 中,原子吸收分光光度计(PE AAS 330)测定总钙;液闪法(Betamatic IV Kontron Instruments Milano, Italy)测定

45 Ca活性,并对所测 45 Ca活性进行放射性蜕变校正。血浆碱性磷酸酶(AKP)活性采用分光光度法测定,试剂药盒为 Boehringer Mannheim, Germany 公司生产。

计算最后 6 d 的钙平衡,以血浆作为参比组织计算内源性钙及钙的真正吸收率^[2],钙的代谢中间利用率定义为内源性粪钙加上所滞留的钙与真正吸收之比,生物利用度为真正吸收率与代谢中间利用率的乘积^[4,5]。

所有数据输入计算机,用 minitab 统计软件系统进行方差分析,结果以平均值和集合标准误(pooled standard error)表示。

2 结果

2.1 体重、血浆及骨骼参数

实验结束时,各组大鼠体重基本一致,平均为 172 $\pm$ 7 g(见表 2),平均血浆钙浓度为 105 ~ 108 μ g/mL 之间,添加磷酸钙组最低,血浆碱性磷酸酶活性不受不同钙剂的影响,平均为 394 U/L。股骨灰份重在磷酸钙组最低,为 50.4%,其余各组在 51.2% ~ 51.8% 的范围内。各组股骨中钙含量分别以湿重、干重及灰份重计算,结果各组基本相同,分别平均为 10.9%、22.3% 和 42.7%。

2.2 钙的平衡及生物利用度

如表 3 所示,各组大鼠钙的日摄入量是相同的,平均为 30.9 mg/d。饲喂有机酸钙的 3 个组中(柠檬酸钙、乳酸钙和醋酸钙)大鼠总粪钙排出相似,平均为 0.7 mg/d,其中内源性粪钙约占 0.2 mg/d,3 个组大鼠钙的表观吸收率和真正吸收率分别平均为 97.8% 和 98.6%;尿钙排出量平均为 0.7 mg/d,钙在体内的滞留量为 29.5 mg/d。牡蛎壳组大鼠钙的吸收率和滞留率比 3 个有机钙组稍低,相差约 1 ~ 2 个百分点,差异没有显著性。蛋壳组和磷酸钙组大鼠

Table 2 Body weight, blood plasma parameter and bone characteristics

Item	Ca source						SE
	Citrate	Lactate	Acetate	Oyster shell	Egg shell	Phosphate	
Final body weight (g)	176	171	171	173	171	172	6.5
Plasma parameter							
Ca (μ g/L)	108 ^a	107 ^{ab}	106 ^{ab}	106 ^{ab}	108 ^{ab}	105 ^b	3.3
AKP (U/L)	369	365	441	368	431	405	75
Bone parameter							
Ash (% of DM)	51.2 ^{ab}	51.8 ^{ab}	51.9 ^{ab}	51.9 ^{ab}	52.8 ^a	50.4 ^b	1.7
Ca (% of wet weight)	10.2	10.5	11.1	10.6	11.2	10.4	1.1
Ca (% of DM)	21.4	21.7	23.0	21.9	22.5	21.6	1.7
Ca (% of ash)	41.8	41.8	44.2	42.4	42.5	43.0	3.0

Note: SE: Standard error; ^{ab} means of the same line without a common subscript are statistically different

Table 3 Ca intake, excretion, absorption and bioavailability

Item	Ca source						SE
	Citrate	Lactate	Acetate	Oyster shell	Egg shell	Phosphate	
Ca intake (mg/d)	31.17	31.02	30.46	33.50	33.27	31.20	-
Fecal Ca							
Total (mg/d)	0.58 ^b	0.82 ^b	0.64 ^b	1.04 ^b	1.61 ^a	1.78 ^a	0.55
Endogenous (mg/d)	0.19	0.29	0.21	0.25	0.36	0.20	0.13
Urinary Ca (mg/d)	0.60 ^c	0.72 ^{bc}	0.67 ^{bc}	0.75 ^{bc}	0.83 ^{ab}	0.94 ^a	0.17
Ca retention (mg/d)	30.00 ^c	29.49 ^{cd}	29.15 ^{de}	31.72 ^a	30.83 ^b	28.48 ^f	0.74
Absorption							
Apparent(% intake)	98.1 ^a	97.4 ^a	97.9 ^a	96.9 ^a	95.2 ^b	94.3 ^b	1.5
True (% intake)	98.8 ^a	98.3 ^a	98.6 ^a	97.7 ^a	96.3 ^b	94.9 ^c	1.3
Intermediate utilization(%)	98.1 ^a	97.8 ^a	97.9 ^a	97.6 ^{ab}	97.6 ^{ab}	97.0 ^b	0.7
Bioavailability (%)	96.8 ^a	96.0 ^a	96.8 ^a	95.3 ^a	93.8 ^b	92.0 ^c	1.7

Note: SE: Standard error; ^{a, b, c} means of the same line without a common subscript are statistically different

总的粪钙排出量约为其余各组的 2 倍,由于内源性粪钙的差异不大,所以这 2 个组钙的表观吸收率和真正吸收率均有所下降,分别为蛋壳组:95.2% 和 96.3%,磷酸钙组:94.3% 和 94.9%,饲喂磷酸钙组大鼠尿钙的排出也高于其他各组,因而该组钙的滞留量最低,为 28.48 mg/d。牡蛎壳组和蛋壳组大鼠钙的滞留量与 3 个有机钙组接近,分别为 31.72 和 30.83 mg/d。除了磷酸钙组稍低外(97.0%),其余 5 个组大鼠真正吸收钙的中间代谢利用率相同为 97.8%。3 个有机钙组钙的生物利用度平均 96.5%,牡蛎壳组稍低(95.2%),蛋壳组和磷酸钙组分别递减为 93.8% 和 92.0%。

3 讨论

从营养学角度讲,钙的生物利用度定义为从某一食物来源的钙,经消化道的溶解、消化、吸收后,最终能被机体所利用的部分。这是对食物营养价值的定量描述。目前许多对钙生物利用度的研究是通过测定吸收率的方法完成的,大体上可分为体外(*in vitro*)^[6] 和体内(*in vivo*)两大类方法。体外方法由于无法完全模拟胃肠道的组分、模拟钙的主动吸收以及机体内环境稳定机制对钙吸收的调节,因而这类测量均属于相对测定,常表示为肠道吸收(*intestinal absorption*)或部分吸收(*fractional absorption*),对结果的解释仅限于特定的实验条件。不同的实验设计和实验条件往往得到完全不同的结论;一般的体内代谢实验只能给出表观吸收率,或者通过血液或骨骼的参数间接推测吸收率的大小;目前世界上惟有同位素稀释技术可以从总的粪钙中扣除来自内源性的钙,从而对钙的吸收进行绝对测量并给出真正吸收率,在此基础上计算钙的生物利用度。

由于机体内环境调节机制的作用,钙的吸收随摄入量的增加而减少^[7]。因此,在测定钙生物利用度的实验中,有一个先决条件,即膳食钙的摄入量必须控制在最低需要量,只有这样,才能获得不受机体内环境调节机制影响而仅仅由食物性质所决定的钙的真正吸收^[4]。在本项研究中,各组大鼠饲料中钙的含量均为 2.7 ~ 2.8 g/kg 饲料,低于生长期大鼠钙的需要量(5 g/kg)。此外,各组大鼠饲料中影响钙代谢的因素如磷、镁和维生素 D 等营养成分的含量均保持一致,各组大鼠钙的摄入量相等,惟独钙的来源不同。只有这样,钙的生物利用度的不同才可能解释为不同钙源的性质所决定。

实验动物血浆中的钙及有关酶如碱性磷酸酶的活性、骨灰份中钙含量等常被用于间接评价钙吸收的参数,这些参数的应用取决于饲料中钙含量有较大差异时(从缺乏到足够)。然而,本项实验表明,这些指标在比较吸收率方面较小的差异时,其灵敏度尚有限。饲料中钙含量基本相同的情况下,不同组大鼠的各项参数基本相同。实验结束时,各组大鼠体重基本一致,平均为 172 ± 7 g(见表 2),平均血浆钙浓度为 105 ~ 108 μg/mL 之间,添加磷酸钙组最低,血浆碱性磷酸酶活性不受不同钙剂的影响,平均为 394 U/L。股骨灰份重在磷酸钙组最低,为 50.4%,其余各组在 51.2% ~ 51.8% 的范围内。各组股骨以湿重、干重及灰份重中的钙含量基本相同,分别平均为 10.9%、22.3% 和 42.7%。

相对于上述间接参数,钙的真正吸收以及代谢的中间利用率可以对钙的生物利用度给出实质性的更详尽的图谱。柠檬酸盐、醋酸盐和乳酸盐在吸收方面优于无机酸盐,特别表现在真正吸收率上。这可能由于有机钙在消化道有较好的溶解度,而且易

形成络合物。这尤其适用于柠檬酸钙,可以解释为什么它在本实验所试的所有钙源中具有最高的真正吸收率。

在无机钙中,磷酸钙的生物利用度最低,这主要是因为其在消化道的溶解度较低而使真正吸收率低下造成的,此外,与其他所试钙源相比,其中间代谢利用率也较低。

尽管蛋壳钙和牡蛎壳钙均为碳酸钙,但蛋壳钙的生物利用度稍低于牡蛎壳。牡蛎壳中完全是碳酸钙,而蛋壳中尚含 5% 的有机物,主要是蛋白质。这些蛋白可能会因其包盖作用而降低蛋壳中钙的消化度,从而间接影响其吸收率。在无机钙类中,碳酸钙的吸收高于磷酸钙,吸收率最高的是牡蛎壳钙。

然而,从实际应用的角度看,不同钙源生物利用度方面的差异是微乎其微的。本项实验中所观察的所有钙源均显示出非常高的真正吸收率和中间利用度。在以前的观察中也有关于钙和其他阳离子的相似报道,但是文献提供的钙的吸收均相对较低^[8]。这是因为在以往的研究中均忽略了生物利用度研究的一个先决条件,即膳食钙的供给量必须低于最小需要量。因此,在这些研究中都反映出内环境稳定机制对钙吸收的调节作用,而并不是钙源的生物利用度。

4 结论

与膳食中存在的一些化合物与钙之间的相互作用相比,膳食中钙存在的形式与钙的生物利用度的关系似乎应在次要地位。比如,众所周知,对钙吸收不利的一种化合物为植酸,它主要存在于所有的种子类,并且富集在种子加工的副产品中,如谷糠或油籽的提取物中。此外,膳食纤维也可影响钙的吸收;大量蛋白摄入造成的高尿钙也可以减少钙的中间利用率。另一方面,在蛋白消化过程中,络合的氨基酸如半胱氨酸,组氨酸释放进入肠道,这些氨基酸又可

以促进钙的吸收,这一现象在其他二价阳离子的吸收中也已观察到。最后,溶解度高的钙的补充会抑制膳食中其他溶解度低的钙的吸收,从而降低膳食中总钙的吸收。总之,钙的生物利用度,就其实际应用而言,首要的影响因素是钙与膳食中其他化合物的相互作用,而不是膳食中钙源本身的化学形式。

【参 考 文 献】

- [1] Windisch W, Bao SF, Kirchgessner M. Isotope dilution technique for determination of endogenous fecal excretion and true absorption of calcium in ⁴⁵Ca labeled rats. J Anim Physiol Anim Nutr, 1997, 189-197.
- [2] 鲍善芬, Windisch W, Kirchgessner M. 同位素稀释技术测定 ⁴⁵Ca 标记大鼠钙的生物利用度. 营养学报, 1998, 20(4): 460-464.
- [3] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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 Nutr, 1993, 123: 1939.
- [4] Kirchgessner M, Windisch W, Weigand E. True Bioavailability of zinc and manganese by isotope dilution technique. In: Schlemmer U. (ed). Bioavailability '93: Nutritional, Chemical and Food Processing Implication of Nutrient Availability. Vol. 1. Bundesforschungsanstalt fur Ernährung, Karlsruhe, 213-222.
- [5] Weigand E, Kirchgessner M. Total true efficiency of zinc utilization determination and homeostatic dependence upon the zinc supply status in young rats. J Nutr, 1980, 110(3): 469-580.
- [6] Shen L, Robberecht H, Van Dael P, et al. Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's goat, and sheep milk by an *in vitro* method. Biol Trace Elem Res, 1995, 49: 107-118.
- [7] Kirchgessner M. Homeostasis and homeorhesis in trace element metabolism. In Anke, M; Meissner, D; Mills, CF. (eds) Trace Elements in Man and Animals-TEMA 8. Verlag Media Touristik, Gersdorf, Brd, 1993, 4-21.
- [8] Greger JL, Krzykowski CE, Khazen RR, et al. Mineral utilization by rats fed various commercially available calcium supplements or milk. J Nutr, 1987, 117: 717-724.

(收稿日期: 2006-11-09)