

THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA XANTHAN GUM TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG GIỐNG SWISS

Vũ Văn Hạnh^{1*}, Nguyễn Thị Nguyệt¹, Nguyễn Minh Hương¹, Hoàng Ngọc Thanh¹,
Ngô Thanh Hằng¹, Ngô Kim Chi², Nguyễn Văn Hoan²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *vvhanh@ibt.ac.vn

²Viện Hóa học hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Xanthan gum là một polysaccharide có nhiều đặc tính ưu việt trong chế biến thực phẩm và phụ gia mỹ phẩm, là một nguồn chất xơ có lợi cho cơ thể được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ FDA cho phép sử dụng trên người. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn trên chuột nhắt trắng giống Swiss qua đường uống không xác định được giá trị LD₅₀ ở lượng 1.500 mg/kg thể trọng/ngày. Liều 250 mg/kg/ngày liên tiếp trong 21 ngày cũng không ảnh hưởng đến tăng trọng của chuột, không thay đổi chỉ số huyết học như tế bào hồng cầu, tế bào bạch cầu, tiểu cầu và hemoglobin, các chỉ số gan (glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT)), chỉ số thận (urê, creatinin) nằm trong giới hạn bình thường.

Từ khóa: Chuột nhắt trắng, độc tính bán trường diễn, độc tính cấp, LD₅₀, xanthan gum.

MỞ ĐẦU

Xanthan gum (polysaccharide) là sản phẩm sinh tổng hợp của vi khuẩn *Xanthomonas campestris* trong môi trường lên men tạo dung dịch keo, nhớt. Keo này có thể ăn được và có khả năng trộn với các polysaccharit khác như glucomannans là nguồn chất xơ tốt cho cơ thể [2]. Xanthan gum cũng là một dạng polyme sinh học được sản xuất ở quy mô công nghiệp có thể thay thế cho gum chiết xuất hóa học truyền thống từ thực vật và tảo biển. Xanthan gum có độ nhớt cao ngay cả với lượng nhỏ, và không nhạy cảm với nhiệt độ, pH và nồng độ chất điện phân. Vì tính chất lưu biến đặc biệt của nó, xanthan gum được sử dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm, giấy, sơn, dệt may, chất kết dính trong ngành công nghiệp dầu khí. Ngày nay, nhu cầu sử dụng các loại gum tự nhiên đang giảm xuống, nhưng nhu cầu sử dụng xanthan gum vẫn có xu hướng tăng nhanh trong phụ gia thực phẩm và mỹ phẩm [3, 5].

Độc tính cấp của xanthan gum được xác định theo phương pháp liều cố định được hướng dẫn trong OECD số 425 (Organisation for Economic Co-operation and Development). Một số nghiên cứu độc tính cấp, xác định LD₅₀ đã được thực hiện trên một số loài động vật như chuột, thỏ, chó và mức độ độc cấp tính trên động vật thử nghiệm có thể sẽ tương tự như đối

với con người [5]. Ngoài ra, với liều lượng tích lũy trong thời gian dài cũng là những giá trị đáng quan tâm khi tính toán đến độ độc của xanthan gum đối với người. Vì vậy, nghiên cứu này thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn của xanthan gum thu hồi sau lên men chủng vi khuẩn *Xanthan gum campestris* trên chuột nhắt trắng giống Swiss

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là chuột nhắt trắng Swiss khỏe mạnh, khối lượng trung bình 21±0,43 g/con do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương cung cấp. Chuột được nuôi bằng thức ăn tổng hợp, nước sạch ở khoảng 23-25°C.

Xanthan gum là sản phẩm thu hồi sau khi lên men lỏng từ chủng vi khuẩn *Xanthan gum campestris* được cung cấp bởi phòng Các chất chức năng sinh học, thuộc Viện Công nghệ sinh học.

Xác định độc tính cấp

Độc tính cấp (LD₅₀) của sản phẩm xác định theo chỉ dẫn của OECD: 20 con chuột nhắt được chia làm 5 lô, mỗi lô 4 con, một lô dùng làm đối chứng cho uống nước sạch, 1 lô cho chuột uống xanthan gum của Sigma lượng 1.000 mg/kg thể trọng, 3 lô còn lại uống lần lượt các nồng độ 500 mg/kg, 1.000 mg/kg và 1.500 mg/kg. Quan

sát hành vi, khối lượng chuột và số chuột chết ở từng lô trong thời gian 24, 48, 72 giờ sau thời điểm uống xanthangum và xác định giá trị LD₅₀ [7].

Xác định độc tính bán cấp

Lô thí nghiệm gồm 32 con chuột cho uống xanthan gum với hàm lượng 250 mg/kg/ngày trong 21 ngày liên tục. Lô đối chứng gồm 8 con chuột được uống nước sạch ở cùng thời điểm với lô thí nghiệm.

Theo dõi tình trạng chung, khối lượng của chuột, các triệu chứng bất thường, các rối loạn tiêu hóa. Chuột chết được mổ quan sát đại thể phủ tạng. Máu tĩnh mạch được lấy bằng xilanh 5 ml đã tráng Heparin (50 UI/ml) ở các thời điểm: trước khi cho uống xanthan gum, ngày thứ 11, ngày thứ 21 lấy máu và mổ chuột, quan sát ruột, dạ dày, cân gan, thận của chuột ở cả lô

đối chứng và lô uống xanthan gum Các chỉ số huyết học và chức năng gan thận được xác định trên máy tự động K-4500 (Nhật Bản) và Autohumanalyzer 900 Plus của hãng Human (Đức).

Xử lý số liệu bằng phần mềm *Excel*.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm của chuột trong quá trình thử độc tính cấp

Biến động về khối lượng của chuột

Chuột ở các lô thí nghiệm và đối chứng được cân khi đói ở các mốc thời gian sau thử nghiệm 24, 48 và 72 giờ nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của xanthan gum đến khối lượng của chuột. Kết quả theo dõi được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Khối lượng (g) của chuột trước và sau thí nghiệm thử độc tính cấp

Lô TN	Khối lượng trung bình trước thí nghiệm			Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	24	48 giờ	72 giờ
A	21,6 ±0,92	22,71±0,85	23,65±1,53	22,26±1,8	22,98±2,1	23,95±1,3
B	22,75±3,9	24,45±3,7	26,70±2,7	25,92±3,8	26,34±4,4	24,69±3,2
C	23,47±0,2	24,05±0,2	26,11±0,3	25,40±1,8	27,56±3,4	26,02±2,8
D	22,78±0,3	21,23±0,2	24,99±0,3	27,14±1,05	28,17±0,8	25,54±1,1
E	22,05±1,6	19,60±1,3	22,0±1,7	22,98±3,1	22,43±2,4	24,0±2,6

E, D, C: lô thí nghiệm uống xanthangum với nồng độ tương ứng là 1.500, 1.000, 500 mg; B: lô thí nghiệm uống 1.000 mg của Sigma; A: lô chuột đối chứng.

Khối lượng cơ thể của chuột ở tất cả các lô thí nghiệm và đối chứng đều tăng ở mốc trước và sau khi cho uống xanthan gum. Chuột của lô E uống xanthan gum với liều 1.500 mg/kg tăng trọng chậm hơn so với các lô còn lại. Chuột ở lô B uống xanthan gum từ Sigma với liều lượng tương đương với lô D kết quả là khối lượng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p=0,193>0,05$)

Đặc điểm sinh lý của chuột sau thử nghiệm 72 giờ và giá trị LD₅₀

Tất cả chuột ở các lô đều khỏe mạnh, phân và nước tiểu không có hiện tượng bất thường, một số chuột tỏ ra hung hăng hơn ngay sau khi uống thuốc, tuy nhiên hiện tượng này không còn sau 24, 48, 72 giờ theo dõi. Sau khi uống thuốc, chuột vẫn ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc trên

chuột và không có con nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Do đó chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD₅₀ của xanthan gum trên chuột theo đường uống. Woodard et al. (1973) [8] đã thử nghiệm trên chuột cống với nồng độ xanthan gum cho uống là: 0; 0,25; 0,5 g/kg/ngày. Các tiêu chí sử dụng để đánh giá ảnh hưởng độc chất lên chuột gồm: sự sống còn, khối lượng cơ thể, hành vi, số lượng chuột sinh ra, tình trạng thể chất của chuột con, khối lượng lúc sinh và cai sữa. Kết quả của thí nghiệm Woodard cho thấy không có tác dụng không mong muốn nào xuất hiện có ý nghĩa.

Trong một nghiên cứu khác của Baig (1983) và Jenkins & David (1981) [1, 6] với thời gian ngắn bán trường diễn về độc tính của xanthan gum trên chuột lang và chó cũng không xác

định được giá trị LD₅₀. Liều lượng dùng trong thí nghiệm với chó 45 g/kg và 20 g/kg với chuột lang cũng không có dấu hiệu bị ngộ độc, không có biến đổi trong nội tạng của động vật thí nghiệm.

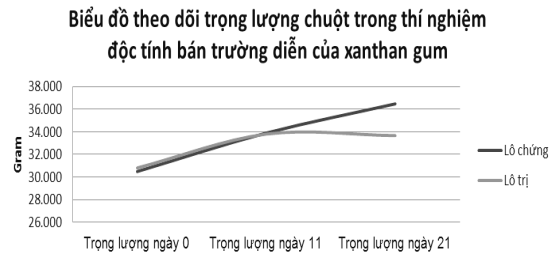
Độc tính bán trường diễn của xanthan gum tích lũy trên chuột thử nghiệm

Sử dụng xanthan gum với liều lượng là 250mg/kg thể trọng trong 21 ngày liên tục, như vậy liều lượng tích lũy đến thời điểm lấy máu lần 2 là 2.500 mg/con cuối đợt đạt 5.250 mg/kg/con. Các thay đổi về cân nặng của 2 lô chuột ở 3 thời điểm 1 ngày, 11 ngày và kết thúc thí nghiệm được ghi nhận ở bảng 2.

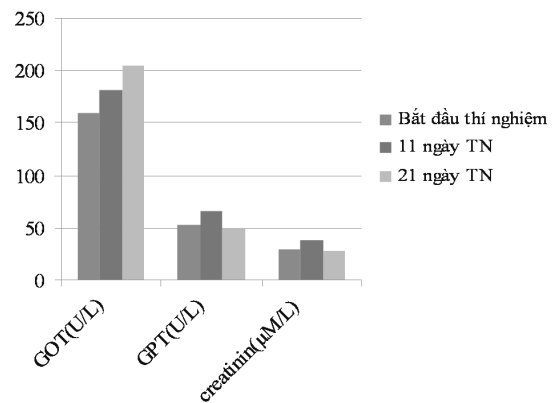
Kết quả theo dõi hành vi của chuột không có đặc điểm gì bất thường trừ một số chuột tỏ ra hung hăng hơn sau khi bị cho uống xanthan gum, nhưng biểu hiện này sẽ chấm dứt ngay sau đó. Trên hình 2, cân nặng của chuột ở lô đối chứng và lô thí nghiệm gần như nhau ở 10 ngày đầu thử nghiệm, tuy nhiên 10 ngày còn lại số chuột ở lô thí nghiệm giảm cân. Sự giảm cân của chuột uống xanthan gum so với lô đối chứng là không có ý nghĩa thống kê theo *T-test* ($p=0,37>0,05$).

Sự thay đổi chức năng gan, thận ở ngày thứ 21 của chuột được xác định qua các chỉ số enzyme glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT), creatin. Các chỉ số này được xác định trên máy

tự động Olympus AU400 của Nhật Bản, kết quả tính toán trên các giá trị nhận được ở bảng 3, hình 3.



Hình 2. Khối lượng chuột ở các mốc thời gian thí nghiệm



Hình 3. Các chỉ số gan thận so sánh ở các thời điểm thí nghiệm

Bảng 2. Cân nặng (gram) của chuột trước và trong thí nghiệm độc tính bán trường diễn

Lô chuột	Khối lượng ngày 0	Khối lượng ngày 11	Khối lượng ngày 21
Đối chứng	30,48±2	33,89±2	36,48±3
Thí nghiệm	30,8±12,5	33,8±7,7	33,66±7,4

Bảng 3. Chỉ số GOT, GPT, creatin của chuột ở các thời điểm thí nghiệm

Các chỉ số	GOT(U/L)	GPT(U/L)	Creatinin(μM/L)
Bắt đầu thí nghiệm	160±2,8	53±12,7	29,5±1,5
Ngày thứ 11	181,1±33,2	65,5±4,9	37,5±13,43
Ngày thứ 21	205,25±90,79	49,75±21,83	27,25±3,21

Sử dụng hàm *T-test* so sánh chỉ số men gan GOT, GPT giữa các cá thể chuột đối chứng và thí nghiệm cho uống xanthan gum với liều lượng tích lũy lên đến 5,25 g/con cho thấy các

khác biệt giữa các chỉ số không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Khối lượng gan của các cá thể ở 2 lô đối

chứng và thí nghiệm đều nặng khoảng 1,9 g chiếm tỷ trọng khoảng 0,05%, không thấy có sự biến đổi nào về tỷ trọng giữa gan và khối lượng

co thể chuột giữa 2 lô đối chứng và thí nghiệm (bảng 4).

Bảng 4. Tỷ trọng của gan trên cân nặng của chuột

	Khối lượng gan (gram)	Khối lượng cơ thể (g)	Tỷ trọng (%)
Lô đối chứng	1,9±0,35	34,83±3,12	0,053819
Lô thí nghiệm	1,9±0,42	40,06±3,5	0,047819

Trong bảng 3, lượng creatinin có tăng nhẹ ở thời điểm 11 ngày, nhưng sau 21 ngày lại giảm về giá trị như lúc chưa uống xanthan gum.

Công thức hồng cầu, bạch cầu của chuột thí nghiệm

Kết quả phân tích các chỉ số huyết học của chuột lô đối chứng và thí nghiệm được lấy vào ngày 0; ngày 11; ngày 21, thể hiện trong bảng 5.

Sử dụng hàm *T-test* để đánh giá các kết quả

cho thấy sự khác biệt giữa các lô đối chứng và lô thí nghiệm về các chỉ số hồng cầu, bạch cầu là không có ý nghĩa. Điều đó có nghĩa là không có dấu hiệu ngộ độc ở chuột khi cho uống xanthan gum nồng độ tích lũy lên đến 5,25 g/con hoặc liều lượng tức thời lên đến 1500 mg/con/ngày. Trong bảng 5, có liệt kê một số chỉ số công thức máu của chuột nhắt trắng dòng 129S do Elzbieta et al. (2009) [4], nhìn chung chuột nhắt trắng lô đối chứng như trong thí nghiệm của Elzbieta et al. (2009) [4].

Bảng 5. Công thức máu chuột ở các thời điểm thí nghiệm

Lô	Công thức máu	RBC (10 ¹² /L)*	WBC (10 ⁹ /L)	HGB (g/L)	HCT (L/L)	PLT (10 ⁹ /L)	LYM	NEU
Đối chứng	TB	5,93	4,12	90,80	0,36	327,00	1,24	0,63
0 ngày	SD	0,13	0,86	1,41	0,09	53,74	0,29	0,59
TN	TB	4,767	5,292	101,75	0,365	304,5	1,37	3,28
11 ngày	SD	0,75	1,28	11,67	0,06	21,92	0,04	0,31
Chứng	TB	5,7	5,115	159,5	0,41	331	1,375	3,35
21 ngày	SD	0,57	0,83	13,44	0,01	29,70	0,18	0,35
TN	TB	6	4,65	149,5	0,465	357	1,565	3,7
21 ngày	SD	0,42	0,64	6,36	0,06	45,25	0,46	0,14
Swiss129S	TB	9,5	4,7	159	53,8%	748,2	-	-
	SD	0,2	0,8	0,4	1,0	154,8	-	-

*RBC. Hồng cầu; WBC. Bạch cầu; HGB. Haemoglobin; HCT. Hematocrit; PLT. Tiểu cầu; LYM. lymphocyte; NEU. Bạch cầu đa nhân trung tính.

Thí nghiệm của Knott et al. (1973) [7] trên 5 con chuột cống trong 14 ngày với tổng lượng là 19 g xanthan gum, kết quả không thấy độc tính qua các quan sát về hành vi, đặc tính sinh học cũng như giải phẫu mô của chuột thử nghiệm. Một thử nghiệm khác trên người được tiến hành trên đối tượng là nam giới tiêu thụ xanthan gum với liều lượng 150 mg/kg thể trọng/ngày và lấy mẫu 3 lần/ngày trong 23 ngày liên tục. Kết quả cho thấy không có ảnh hưởng bất lợi rõ rệt về huyết học, lâm sàng, hoặc các thông số phân

tích nước tiểu. Nghiên cứu dài hạn khác trong hai năm trên chuột cũng không nhận được bất kỳ hiệu ứng gây ung thư do ăn kẹo cao su có chứa xanthan gum hoặc bất kỳ tác dụng phụ nào trên người thậm chí ở hàm lượng lên đến 10-13 g/ngày.

KẾT LUẬN

Không xác định được giá trị LD₅₀ của xanthan gum trên chuột nhắt trắng dòng Swiss với nồng độ lên tới 1.500 mg/kg thể trọng và không có

biểu hiện ngộ độc nào sau 72 giờ, không có sự khác biệt về tăng trọng giữa các lô thí nghiệm và lô đối chứng. Sau 21 ngày uống xanthan gum liều lượng 5,25 g/con, chuột không có biểu hiện ngộ độc nào, không có sự khác biệt về tăng trọng giữa các lô thí nghiệm và lô đối chứng. Các đặc điểm sinh học khác như hành vi, chỉ số men gan, chức năng thận, công thức hồng cầu, bạch cầu ở lô chuột thí nghiệm không khác biệt với lô đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baig M. C., 1983. Citrus pectic polysaccharide-their in vitro interaction with low density serum lipoproteins. Unconventional Sources of Dietary Fiber Furda ed American Chemical Society Wash DC 227:185
2. Burkitt D. P., Painter, 1974. Dietary fiber and disease. JAMA, 229: 1069-1074.
3. Commission E., 2011. Health and Consumers Cosmetic Cosing Database. [Http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/](http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/).
4. Elzbieta W. D., Jadwiga K., Kazimiera P. M., 2009. Selected peripheral blood cell parameters in twelve inbred strains of laboratory mice. Animal Science Papers and Reports, 27: 69-77.
5. James D., 2011. Food and Drug Administration (FDA). [Http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearchcfm?FR=172695&CFRPart=&FRSe](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearchcfm?FR=172695&CFRPart=&FRSe).
6. Jenkins A., David J., 1981. Slow release carbohydrate and the treatment of diabetes. Symposium proceeding Nutriton and diabetes, 40: 227-235.
7. Knott W. B., Keltrol C. D., Woodard R., 1973. Acute inhalation toxicity to rats. Research Corporation, 227.
8. Woodard G., Woodard M. W., McNeely W. H., Kovacs P., Cronin M. T., 1973. Xanthan gum: safety evaluation by two-year feeding studies in rats and dogs and a three-generation reproduction study in rats. Toxicol Appl Pharmacol., 24: 30-36.

A STUDY ON ACUTE - AND SUBCHRONIC TOXICITY OF XANTHAN GUM ON WHITE SWISS MICE

Vu Van Hanh¹, Nguyen Thi Nguyet¹, Nguyen Minh Huong¹,
Hoang Ngoc Thanh¹, Ngo Thanh Hang¹, Ngo Kim Chi², Nguyen Van Hoan²

¹Institute of Biotechnology, VAST

² Institute of Natural Products Chemistry, VAST

SUMMARY

Xanthan gum is a polysaccharide that have many important properties in food processing and cosmetic additives. It is a beneficial source of fiber admitted by the FDA for use in human. Xanthan has been successfully produced and purified from liquid fermentation of *Xanthomonas campestris* Xan0813. In this study, the acute and subchronic toxicity of xanthan gum have been tested and evaluated. The results showed that by oral administration of xanthan on Swiss mice at a dose of 1,500 mg/kg, the LD₅₀ value was not determined. At a dose of 250 mg/kg/day for 21 continuous days on Swiss mice didn't affect the normal increment of body weight of mice didn't change hematological indices, red blood cell, white blood cell, platelet and hemoglobin contents, hepatic indices (glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT)), renal indices (urea, creatinin levels) were within normal limits.

Keywords: Acute toxicity, LD₅₀, subchronic toxicity, xanthan, white swiss mice.

Ngày nhận bài: 21-3-2014