

香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂的毒理学研究

顾采琴, 温小龙, 朱冬雪, 刘鹏, 赖雅平, 林金莺, 曾庆祝

(广州大学化学化工学院食品系, 广东广州 510006)

摘要: 本文采取微波提取法从香蕉皮中提取得到黄酮粗提物, 利用 H103 大孔树脂对提取物进行纯化, 与丙酸复配得到复配剂。以香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂为受试物, 根据国家卫生部发布的《食品安全性毒理学评价程序和方法》对其进行毒理学试验, 以便在生产实践中推广应该。利用小鼠为试验对象, 进行了急性毒性试验 (LD_{50})、骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验以及哺乳动物微粒体酶试验 (Ames 试验), 对复配剂的毒理性进行了研究。结果表明, 雌小鼠 LD_{50} 为 10.80 g/kg BW, 可信限为 7.41~15.70 g/kg BW; 雄小鼠 LD_{50} 为 12.60 g/kg BW, 可信限为 7.75~20.50 g/kg BW; 骨髓细胞微核试验、精子畸形试验、Ames 试验的结果都为阴性, 表明香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对小鼠体细胞和生殖细胞无诱变作用, 也无直接或间接的致突变作用, 属实际无毒级物质。香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂可作为食品防腐添加剂。

关键词: 香蕉果皮; 黄酮-丙酸复配剂; 小鼠; 毒理学

文章编号: 1673-9078(2015)7-56-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.010

Toxicology of Flavonoid-propionic Acid Mixtures from Banana Peel

GU Cai-qin, WEN Xiao-long, ZHU Dong-xue, LIU Peng, LAI Ya-ping, LIN Jin-ying, ZENG Qin-zhu

(Department of Food, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Crude flavonoid extract was obtained from banana peel by microwave extraction and purified using H103 macroporous resin and combined with propionic acid to produce flavonoid-propionic acid mixtures. Toxicology testing was conducted using these mixtures as per the Procedures for Toxicological Assessment of Food published by Ministry of Health of The People's Republic of China. Toxicology testing included using the acute toxicity test for minimum lethal dose for 50% mice (LD_{50}), bone marrow cell micronucleus test, mice sperm morphology test, and Ames test. The results showed that the LD_{50} values for female and male mice were 10.8 and 12.6 g/kg body weight (BW), respectively; while the fiducial limits for female and male mice were 7.41~15.7 and 7.75~20.5 g/kg BW, respectively. The results from the acute toxicity test, bone marrow cell micronucleus test, and sperm morphology test were all negative, which implied that flavonoid-propionic acid mixtures from banana peel showed no mutagenic effects on somatic and germ cells and that they did not show indirect or direct mutagenicity. Therefore the mixtures are non-toxic and can be used as preservatives.

Key words: banana peel; flavonoid-propionic acid mixture; mice; toxicology

近年来食品安全问题受到广泛关注。目前防止食品腐败变质的主要手段之一是将化学合成防腐剂添加到食品中抑制微生物生长繁殖。但化学防腐剂一旦超标使用, 会对人体和自然界生态环境会造成不利影响。目前, 日本等发达国家已禁止使用化学合成防腐剂苯甲酸钠, 我国新疆自治区也禁止苯甲酸钠作为月饼产品的防腐剂^[1]。因此, 开发和推广使用安全无毒、性能稳定、高效广谱的天然食品防腐剂是食品工业的发展趋势^[2], 具有广阔的市场前景。但天然食品防腐剂大多因其生产成本较高未能得到广泛推广应用。国内外近年来开始采用果实加工过程中的废渣如果皮、种子等为原料, 开发天然食品防腐剂可大大降

低其生产成本, 又可减少环境污染, 因而在生产上已有部分进行了推广应用。如日本一家公司以甜菜或果实加工废渣中的果胶分解物为主要成分, 配合其他天然防腐剂, 已广泛应用于酸菜、咸鱼、牛肉饼等食品的防腐^[3]。香蕉在我国广泛种植, 但人们只食其果肉, 而占香蕉全果质量 35%~41% 的香蕉果皮则随意丢弃, 既污染环境又浪费资源^[4]。香蕉果皮中含有多种维生素^[5], 黄酮醇儿茶素^[6]和多巴胺^[7]等。目前香蕉果皮除少部分用于提取果胶^[8]等产品外, 其价值尚未得到有力开发, 产品附加值低。

研究表明, 黄酮类化合物对大肠杆菌等病原菌具有明显的抑制作用^[9]。香蕉果皮黄酮粗提物具有一定的抑菌作用^[10]。丙酸及其盐类为低毒性的微生物生长抑制剂, 对细菌、酵母及霉菌均有一定的抑制作用^[11]。香蕉果皮黄酮粗提物与丙酸复配后对新鲜猪肉、

收稿日期: 2014-10-09

基金项目: 广东省广州市科技计划项目 (2013J4100020)

作者简介: 顾采琴 (1964-), 博士, 教授, 主要从事食品贮藏加工的研究

果汁饮料等食品的防腐保鲜效果比分别单独使用两者的防腐效果好,二者具有明显的协同增效防腐作用^[12]。纯化后的蕉果皮黄酮对酵母菌和大肠杆菌的抑制效果明显优于纯化前的黄酮粗提物,其效果也明显优于在酱油和饮料中普遍使用的化学合成防腐剂苯甲酸钠^[13]。因此,香蕉皮黄酮-丙酸复配剂有望成为新型的食品防腐剂,主要用于食品的防腐保鲜,可用于新鲜猪肉、果汁饮料、酱油、新鲜水果的防腐保鲜。根据国标 GB15193-2003 的 6.4.1.2.3 规定,本复合防腐剂只需要做第一和第二阶段的毒理实验。因此本文对纯化后的香蕉皮黄酮-丙酸复配剂的毒理性进行了研究,并对其安全毒理学进行评价,以期该产品在食品生产企业尤其是饮料、酱油食品生产企业进行推广应用提供科学依据,也使人体健康和食品安全性得到保障。

1 材料与方法

1.1 材料

香蕉:购于广州番禺农贸市场;

昆明种 SPF 级健康小白鼠:广东省医学实验中心提供(动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002,质量合格证编号:NO.44007200007451,44007200008398,44007200007617);

试验菌株:鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 试验菌株。

1.2 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂的制备

1.2.1 香蕉果皮黄酮提取

取八成熟的香蕉果皮,于 80℃ 烘箱中烘干至脆,再放入粉碎机粉碎至过 40 目筛,然后将香蕉果皮粉末于冰箱中密封保存,备用。

精确称取 30 g 香蕉果皮粉于 1000 mL 二口平底烧瓶中,按照料液比 1:15、乙醇浓度 70%、微波提取温度 60℃、提取功率 300 W 以及提取时间 10 min 提取香蕉果皮黄酮,将提取液减压浓缩至无乙醇,利用 HI03 大孔树脂进行纯化。

1.2.2 复配剂的制备及纯度的计算

称取一定量干燥后的黄酮粗提物用 70% 乙醇溶解定容至 100 mL,按照文献^[13]方法测定总黄酮含量。黄酮纯度的计算方法如下:

$$C/\% = M_1/M_2 \times 100$$

式中: C 为黄酮纯度, M₁ 为粗提物中黄酮含量, M₂ 为粗提物质量。

经纯化后,香蕉果皮黄酮纯度达 92%,配置成一定浓度的溶液。丙酸与水按照 1:1 的比例配成水溶液。

按一定比例进行复配得到复配剂。

1.3 小鼠急性毒性试验(LD₅₀)、骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验、Ames 试验

1.3.1 试验方法

在广东省疾病预防控制中心,根据国家卫生部发布的《食品安全性毒理学评价程序和方法》(GB 15193-2003)^[14]进行试验。

1.3.2 急性毒性试验(LD₅₀)

设受试物剂量为 46.40、21.50、10.00、4.64 g/kg BW,试验时称取样品 46.40、21.50、10.00、4.64 g 用纯净水稀释至 60.00 mL 供试。

采用霍恩氏法(Horn's),选用体重 18~22 g 的健康昆明种小白鼠 40 只,随机分为 4 个剂量组,每组十只,雌雄各半,禁食不禁水 16 h 后,按 46.40、21.50、10.00、4.64 g/kg BW 剂量给予受试物,灌胃 3 次,间隔 4 h,每次灌胃量为 0.20 mL/10 g BW,观察一周,记录小鼠中毒表现及死亡情况。

1.3.3 骨髓细胞微核试验

雄小鼠设 6.30、3.15、1.58 g/kg BW 三个剂量组;雌小鼠设 5.40、2.70、1.35 g/kg BW 三个剂量组,试验时称取样品 6.30、3.15、1.58、5.40、2.70、1.35 g 分别用纯净水稀释至 20.0 mL 供试。试验另设阴性对照组和阳性对照组,阴性对照组给予等量的纯净水,阳性对照组选用受试剂量为 40 mg/kg BW 的环磷酰胺(CP),配制方法为称取 40.00 mg 环磷酰胺用纯净水稀释至 20.00 mL 供试。

采用 30 h 给受试物进行试验。选择昆明种小鼠 50 只,体重 25~30 g,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。灌胃量均为 0.20 mL/10g BW,24 h 后以同样的剂量第二次染毒,6 h 后,处死小鼠取胸骨骨髓材料制片、染色、油镜下每只小鼠观察 1000 个嗜多染红细胞(PCE),计数含有微核的嗜多染红细胞数,计算各组微核发生率(%);同时计数观察到 200 个 PCE 时所见到的正染红细胞(NCE)数,求出嗜多染红细胞数与红细胞总数的比值(PCE/RBC),按泊松分布方法作统计学处理。

1.3.4 小鼠精子畸形试验

雄小鼠设 6.30、3.15、1.58 g/kg BW 三个剂量组,试验时称取样品 6.30、3.15、1.58 g 分别用纯净水稀释至 20.00 mL 供试。试验另设阴性对照组和阳性对照组,阴性对照组给予等量的纯净水,阳性对照组选用受试剂量为 40.00 mg/kg BW 的环磷酰胺(CP)。

选择昆明种小鼠 25 只,体重 25~35 g,随机分成

5组, 每组5只。每天灌胃一次, 连续灌胃5d, 灌胃量均为0.20 mL/10 g BW, 首次染毒后第35 d处死小鼠取双侧副辜按常规制片、染色, 高倍镜下镜检观察, 每只小鼠计数1000条完整精子, 每组共检查5000条精子, 求出精子畸形发生率(%), 按Wilcoxon秩和检验方法作统计学处理。

1.3.5 哺乳动物微粒体酶试验 (Ames)

根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》进行试验。代谢活化系统为多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆S9液(代谢活化时加入)。

根据受试物情况, 设5个剂量组, 分别为5000、1000、200、40、8 μg/皿, 同时设自发回变、溶剂对照组和阳性对照组。试验前称取样品5.00 g, 以无菌蒸馏水为溶剂, 带样品溶解后, 用无菌蒸馏水加至100.00 mL, 配至成5%的母液作为最高剂量, 0.103 MPa 20 min 灭菌, 然后以无菌蒸馏水对灭菌后的母液依次←倍稀释至所需各剂量受试物溶液, 振摇混匀, 供试验用。

1.3.6 数据分析

采用SPSS 数据统计软件。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性毒性试验

表1 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂急性毒性试验结果

Table 1 Results of acute toxicity test of flavonoids-propionic acid

mixtures				
剂量 (g/kg BW)	动物数 /只	始重 /g	终重 /g	死亡数 /只
46.40	5	20.30±1.30	/±/	5
雄性	21.50	20.00±1.40	27.30±/	4
	10.00	20.80±0.80	28.10±0.40	2
	4.64	19.90±1.20	27.30±1.00	0
雌性	46.40	19.40±1.30	/±/	5
	21.50	19.10±1.30	/±/	5
	10.00	20.50±1.10	26.90±1.20	2
	4.64	19.90±1.00	26.30±0.90	0

急性毒性试验结果见表1。46.40 g/kg BW 剂量组, 第一次给样后小鼠呆卧少动, 第二次给样后4 h, 小鼠陆续死亡, 至第三天, 小鼠全部死亡, 死亡小鼠大体解剖见胃胀气症状; 21.50 g/kg BW 剂量组, 第一次给样后小鼠呆卧少动, 第二次给样后4 h, 小鼠陆续死亡, 至第三次给样后2 h, 雌小鼠全部死亡, 雄小鼠4只死亡, 余雄小鼠1只第二天恢复正常, 观察期内存活, 死亡小鼠大体解剖见胃胀气症状; 10.00 g/kg BW 剂

组, 第一次给样后次雌小鼠5只、雄小鼠2只呆卧少动, 第二天, 小鼠陆续死亡, 至第三天, 雌小鼠2只死亡, 雄小鼠2只死亡, 余小鼠第二天恢复正常, 观察期内存活, 死亡小鼠大体解剖见胃胀气症状; 4.64 g/kg BW 剂量组未观察到动物出现不良反应和死亡, 获得雌小鼠LD50为10.80 g/kg BW, 可信限为7.41~15.70 g/kg BW; 雄小鼠LD50为12.60 g/kg BW, 可信限为7.75~20.50 g/kg BW, 根据急性毒性分级, 受试物香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂属实际无毒级物质。

2.2 小鼠骨髓细胞微核试验

小鼠骨髓细胞微核试验结果见表2、3。经统计学分析, 雌小鼠1.35~5.40g/kg BW 剂量的微核试验结果为阴性; 雄小鼠1.58~6.30g/kg BW 剂量的微核试验结果为阴性, 受试物香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对体细胞无诱变作用。

表2 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂雌性小鼠骨髓微核试验结果

Table 2 Results of the bone marrow cell micronucleus test of flavonoid-propionic acid mixtures in female mice

剂量 (g/kg BW)	动物数 /只	PCE 数 /个	微核数 /个	微核率 /‰	PCE/RBC
5.40	5	5000	11	2.20±0.80	0.68±0.02
2.70	5	5000	9	1.80±0.80	0.70±0.03
1.35	5	5000	10	2.00±1.00	0.72±0.04
0.00	5	5000	6	1.20±0.80	0.71±0.02
CP(0.04)	5	5000	77	15.40±3.50**	0.67±0.02

注: **与阴性对照组比较 p<0.01。

表3 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂雄性小鼠骨髓微核试验结果

Table 3 Results of the bone marrow cell micronucleus test of flavonoid-propionic acid mixtures in male mice

剂量 (g/kg BW)	动物数 /只	PCE 数 /个	微核数 /个	微核率 /‰	PCE/RBC
6.30	5	5000	8	1.60±0.90	0.70±0.02
3.15	5	5000	12	2.40±0.90	0.74±0.02
1.58	5	5000	7	1.40±0.50	0.69±0.03
0.00	5	5000	6	1.20±0.40	0.71±0.02
CP(0.04)	5	5000	81	16.20±3.90**	0.68±0.02

注: **与阴性对照组比较 p<0.01。

2.3 小鼠精子畸形试验

小鼠精子畸形试验结果见表4。经统计学分析, 1.58~6.30g/kg BW 剂量的精子畸形试验结果为阴性, 受试物香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对生殖细胞无诱变作用。

表 4 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂小鼠精子畸形试验结果

Table 4 Results of the mouse sperm abnormality test of flavonoid-propionic acid mixtures

剂量 (g/kg BW)	动物数 /只	精子数 /条	精子畸形类型					精子畸形 数/条	精子畸形 率/‰
			无钩	不定型	胖头	香蕉形	尾部畸形		
6.30	5	5000	12	48	4	3	11	78	15.60±2.30
3.15	5	5000	11	50	5	2	8	76	15.20±1.90
1.58	5	5000	9	49	6	4	13	81	16.20±1.90
0.00	5	5000	10	46	3	3	10	72	14.40±2.10
CP(0.04)	5	5000	40	170	35	34	45	324	64.80±10.60**

注: **与阴性对照组比较 p<0.01。

表 5 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对鼠伤寒沙门氏菌的回变结果 (第 1 次)

Table 5 Reverse mutation caused by flavonoid-propionic acid mixtures in the Ames test (1)

受试物	剂量 (μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		
		-	+	-	+	-	+	-	+	
样品组	1	5000	122±1	162±1	47±4	51±4	164±9	177±8	379±4	335±23
	2	1000	146±5	174±4	41±3	52±6	162±2	169±10	344±24	328±16
	3	200	138±5	160±22	44±4	50±5	160±8	152±5	314±9	336±19
	4	40	137±8	164±10	40±3	49±6	155±0	173±7	355±3	319±18
	5	8	134±7	149±4	39±6	45±6	157±1	163±7	315±8	326±23
自发回变			127±4	125±6	36±3	44±4	148±2	150±6	288±8	310±15
蒸馏水对照组			124±6	123±9	38±4	45±3	153±9	151±8	283±10	312±20
阳性质物对照(μg/皿)										
NaN ₃	1.50						876±104			
2-AF	10.00			1338±119		2020±130		1262±91		
敌克松	50.00		1989±129		987±37					
丝裂霉素	4.00							2253±113		
1,8-二羟蒽醌	50.00									1050±65

表 6 香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对鼠伤寒沙门氏菌的回变结果 (第 2 次)

Table 6 Reverse mutation caused by flavonoid-propionic acid mixtures in the Ames test (2)

受试物	剂量 (μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		
		-	+	-	+	-	+	-	+	
样品组	1	5000	139±8	152±4	49±5	53±4	146±10	153±13	329±3	344±17
	2	1000	142±6	146±1	41±5	54±6	151±3	150±6	321±7	339±18
	3	200	132±8	155±1	50±6	48±3	145±2	158±1	342±9	347±20
	4	40	135±8	141±7	44±4	42±3	149±1	147±2	313±3	341±12
	5	8	129±5	136±7	43±6	41±3	140±3	144±1	318±1	323±17
自发回变			123±10	120±7	37±3	43±4	125±1	138±10	272±3	285±20
蒸馏水对照组			126±8	129±4	42±1	40±3	129±9	131±9	280±5	288±28
阳性质物对照 (μg/皿)										
NaN ₃	1.50						1010±58			
2-AF	10.00			1379±134		2271±179		1347±109		
敌克松	50.00		1881±115		1145±91					
丝裂霉素	4.00							1992±123		
1,8-二羟蒽醌	50.00									1110±140

2.4 Ames 试验

Ames 试验结果见表 5、6。由表 5 和表 6 可见香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 四株试验菌株,在加及不加 S9 时,5000、1000、200、40、8 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 五个剂量组的回变菌落数均未超过溶剂对照组回变菌落数的 2 倍,各剂量组均未引起试验菌株的回变菌落数显著增加,Ames 试验结果为阴性,受试物香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂无直接或间接的致突变作用。

3 结论

以香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂为受试物,利用小鼠进行急性毒性试验、骨髓细胞微核试验、精子畸形试验和 Ames 试验,结果表明,雌小鼠和雄小鼠的 LD_{50} 分别为 10.80 g/kg BW 和 12.60g/kg BW,香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂属无毒级物质;小鼠的骨髓细胞微核试验、精子畸形试验和 Ames 试验的结果都为阴性,香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂对体细胞和生殖细胞无诱变作用,也无直接或间接的致突变作用。毒理学试验结果说明:香蕉果皮黄酮-丙酸复配剂是一种安全的食品防腐剂,可用于饮料、酱油以及新鲜猪肉等食品的防腐保鲜。

参考文献

- [1] 唐春红.天然防腐剂与抗氧化剂[M].北京:中国轻工业出版社,2010
TANG Chun-hong. Natural Preservatives and Antioxidants [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010
- [2] Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance Measurement to Study Antimicrobial Activity of Essential Oils from Lamiaceae and Compositae [J]. Int. J. Food Microbiol., 2001, 67: 187-195
- [3] 陆志科,谢碧霞.植物源天然食品防腐剂的研究进展[J].食品工业科技,2003,24(1):94-96
LU Zhi-ke, XIE Bi-xia. Research Progress of Natural Food Preservatives from Plant Source [J]. Science and Technology of Food Industry, 2003, 24(1): 94-96
- [4] 宋维春,徐云升.香蕉皮的综合利用研究[J].琼州大学学报,2005,5:43-45
SONG Wei-chun, XU Yun-sheng. Study on The Comprehensive Utilization of Banana Peel [J]. Journal of Qiongzhou University, 2005, 5: 43-45
- [5] Davey M W, Keulemans J, Swennen R. Methods for The Efficient Quantification of Fruit Provitamin A Contents [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1136: 176-184
- [6] Someya S, Yochiki Y, Okubo K. Antioxidant Compounds from Bananas (Musa Cavendish) [J]. Food Chemistry, 2002, 79: 351-354
- [7] Kanazawa K, Sakakibara H. High Content of Dopamine, A Strong Antioxidant, in Cavendish Banana [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48: 844-848
- [8] YUAN Zhen-yuan, LIN Fu-yao. The Comprehensive Utilization of Banana [J]. Food Science, 1987, 8(5): 22-24
- [9] Emaga T H, Ronkart S N, Robert W B, et al. Characterisation of Pectins Extracted from Banana Peels (MusaAAA) under Different Conditions Using An Experimental Design [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 463-471
- [10] Wu T, Zang X, He M, et al. Structure-Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-Escherichia coli Activity and Inhibition of DNA Gyrase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(34): 8185-8190
- [11] 曹伯兴,许玉凤,等.食品添加剂-丙酸及丙酸钙的制造[J].化学世界,1991,3:136-137
CAO Bo-xing, XU Yu-feng, et al. Food Additive-Synthesis of Propanoic Acid and Calcium Propionat [J]. Chemical World, 1991, 3: 136-137
- [12] 顾采琴,钟逸玲,赖建平,等.香蕉果皮提取物抑菌特性研究[J].广州大学学报(自然科学版),2009,8(4):27-31
GU Cai-qing, ZHONG Yi-ling, LAI Jian-ping. Studies on Antibacterial Characteristics of Banana Peel Extract [J]. Journal of Guangzhou University, 2009, 8(4): 27-31
- [13] 顾采琴,朱冬雪,邱文婷,等.香蕉皮黄酮-丙酸复配剂对猪肉保鲜效果的研究[J].肉类研究,2011,25(11):43-46
GU Cai-qing, ZHU Dong-xue, QIU Wen-ting et al. Effect of Banana Peel Flavonoids-Propionic Acid Mixtures on Pork Preservation [J]. Meat Research, 2011, 25(11): 43-46
- [14] 顾采琴,谢琳琳,张织芬,等.香蕉皮黄酮的分离纯化及抑菌活性研究[J].食品科学,2013,(16):98-102
GU Cai-qin, XIE Lin-lin, ZHANG Zhi-fen, et al. Research on Separation and Purification and Inhibition Microorganism of Total Flavonoid in Banana Peel [J]. Food Science, 2013,(16):98-102
- [15] GB 15193.1-2003,食品安全性毒理学评价程序和方法[S]
GB 15193.1-2003, Evaluation Procedure and Method of Food Safety Toxicology [S]