

Borojo果酶解浓缩粉的毒理学安全性评价

杨颖¹, 焦红², 陈瑞仪¹, 李庆¹, 黄俊明¹, 王凤岩¹, 陈美芬¹, 陈秀娟¹

(1. 广东疾病预防控制中心, 广东广州 510300) (2. 广东出入境检验检疫局, 广东广州 510623)

摘要: 本文通过动物实验, 研究Borojo果酶解浓缩粉的食用安全性。采用急性毒性试验、小鼠骨髓微核试验、小鼠精子畸形试验及大鼠30天喂养试验对Borojo果酶解浓缩粉进行评价。结果表明, 雌雄小鼠经口急性毒性 $LD_{50} > 21.5$ g/kg-bw, 根据急性毒性分级, 受试物Borojo果酶解浓缩粉属无毒级物质; 小鼠骨髓微核试验、小鼠精子畸形试验结果与对照组比较均无显著性差异; 大鼠30d喂养试验表明各剂量组动物体重增重、食物利用率、脏器比、血液学检查及血液生化检查与对照组比较均无显著性差异; 病理检查主要脏器未见明显中毒性病理改变, 说明Borojo果酶解浓缩粉属于安全性食品。

关键词: Borojo果; 酶解浓缩粉; 急性毒性; 亚急性毒性; 遗传毒性

文章编号: 1673-9078(2012)8-1064-1068

Toxicological Evaluation of Enzymatically-Hydrolyzed Borojo Concentrated Powder

YANG Ying¹, JIAO Hong², CHEN Rui-yi¹, LI Qing¹, HUANG Jun-ming¹,
WANG Feng-yan¹, CHEN Mei-fen¹, CHEN Xiu-juan¹

(1. Guangdong Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 510300, China)

(2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: The safety of enzymatically treated Borojo concentrated powder was evaluated through animal experiments, including acute toxicity test, mouse bone marrow micronucleus test, sperm shape abnormality test in mice and 30-day feeding study. Results showed that the oral acute toxicity LD_{50} of male and female mice was above 21.5g/kg-bw. Enzymatically treated Borojo concentrated powder was nontoxic substances based on the acute toxicity grading. The mouse bone marrow micronucleus test and mouse sperm abnormality test results showed no significant differences with the control group. The 30-day feeding study in rats showed that the weight gain, food utilization, the ratio of dirty and body, hematologic and blood biochemical index of the animals in each dose group had no significant differences with the control group. The pathological examination showed little obvious toxic pathological changes in major organs. The enzymatically treated Borojo concentrated powder was considered as a safe food.

Key words: Borojo fruit; enzymatic concentrated powder; acute toxicity; subacute toxicity; genotoxic

Borojo果是一种生长在南美洲热带雨林的水果, 具有丰富的营养物质, 在当地俗称有天然的调节血糖、提高性功能、稳定血压等功效^[1,2]。林海丹等2010年对Borojo果中多糖的单糖成分进行了分析^[3], 认为Borojo果肉中含有半乳糖、葡萄糖和鼠李糖等。孟平等2011年用火焰原子吸收光谱法测定Borojo果及其制品中的8种微量元素, 认为Borojo酶解浓缩粉中的8种微量元素的总含量比水果肉中高5倍左右^[4]。但国内外未见Borojo果及其制品的食用安全性研究文献报道。本研究对来自厄瓜多尔东方食品集团的Borojo果酶解浓缩粉

收稿日期: 2012-05-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B010500014); 广州市科技计划项目 (11A61030347)

作者简介: 杨颖, 主任医师, 研究方向: 食品毒理学

(食品原料) 进行急性、亚急性毒性和遗传毒性研究, 为Borojo果及其同类产品的毒理学安全性评价提供依据。

1 材料和方法

1.1 样品

由广州某公司代理厄瓜多尔东方食品集团提供的Borojo果酶解浓缩粉, 性状为黄白色粉状, 具有Borojo固有的香气。全部成分均来自Borojo果加果胶酶解浓缩喷雾所得产品。样品用纯净水调配至所需浓度, 置4℃冰箱内保存备用。

1.2 实验动物及环境

南方医科大学实验动物中心提供的SPF级SD种健康大白鼠和昆明种小鼠, 生产许可证号: SCXK(粤)

2011-0015号, 质量合格证编号: NO.0099033, NO.0081726, 颗粒饲料亦由南方医科大学实验动物中心提供; 动物实验室为SPF级, 实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2008-0011。室温20~25℃, 湿度40~70%。

1.3 实验仪器

日立7600全自动生化仪、雅培3700全自动血球计数仪。

1.4 试验方法^{5,6}

1.4.1 急性毒性试验

采用霍恩氏法, 设受试物剂量为21.5、10.0、4.64、2.15 g/kg·bw, 选用体重18~22 g的健康NIH种小白鼠40只, 随机分为4个剂量组, 每组10只, 雌雄各半, 禁食不禁水16 h后, 按21.5、10.0、4.64、2.15 g/kg·bw剂量给予受试物, 灌胃量0.02 mL/g·bw, 灌胃两次, 间隔4 h, 观察一周, 记录小鼠中毒表现及死亡情况。

1.4.2 微核试验

采用30小时给受试物法进行试验。选择NIH种小鼠50只, 体重25~30 g, 随机分为5组, 每组10只, 雌雄各半。根据急性毒性试验结果, 设受试物最高剂量为10.0 g/kg·bw, 该剂量以下设5.00、2.50 g/kg·bw两个剂量, 阴性对照组给予等量的纯净水, 阳性对照组选用40 mg/kg·bw环磷酰胺。灌胃量均为0.02 mL/g·bw, 24 h后以同样的剂量进行第二次染毒, 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200个PCE时观察到的正染红细胞(NCE), 求出嗜多染红细胞数与成熟红细胞比值(PCE/RBC), 按泊松分布方法作统计学处理。

1.4.3 精子畸形试验

选择NIH种雄性小鼠25只, 体重25~35 g, 随机分成5组, 每组5只, 根据急性毒性试验结果, 设受试物最高剂量为10.0 g/kg·bw, 该剂量以下设5.00、2.50 g/kg·bw两个剂量, 阴性对照组给予等量的纯净

水, 阳性对照组选用40 mg/kg·bw环磷酰胺。每天灌胃一次, 连续灌胃5天, 灌胃量均为0.02 mL/g·bw, 首次染毒后第35 d处死动物取双侧副辜按常规制片、染色, 高倍镜下每只小鼠观察1000条完整精子, 计数含有精子畸形的数量和类型, 计算各组精子畸形发生率(%), 按Wilcoxon秩和检验方法作统计学处理。

1.4.4 亚急性试验(30 d喂养)

80只大鼠在实验室条件下适应3 d后, 随机分成四组, 分别为受试物低、中、高三个剂量组和纯水对照组, 每组20只, 雌雄各半, 分笼饲养。给样方法为灌胃, 灌胃量为每日0.02 mL/g·bw, 纯水对照组每日灌胃给以0.02 mL/g·bw纯净水, 依据每周体重调整受试物量, 连续30 d。每鼠保证有充足饮水和饲料供应。试验期间动物单笼饲养, 每天观察动物活动和生长情况, 记录大鼠每周进食量与体重。

1.5 数据统计

应用SPSS13.0统计软件对试验数据进行单因素方差分析和两两比较。

2 结果

2.1 急性毒性试验结果

表1 Borojo果酶解浓缩粉急性毒性试验结果

Table 1 Result of acute toxicity test of rates fed with enzymatically treated Borojo concentrated powder

剂量/(g/kg·bw)	动物数/只	始重/g	终重/g	死亡数/只	
雄性	21.50	5	18.81±0.50	28.93±0.71	0
	10.00	5	19.34±0.82	29.60±1.02	0
	4.64	5	19.36±1.13	27.62±0.65	0
	2.15	5	19.73±0.80	28.33±1.37	0
雌性	21.50	5	19.80±0.91	27.32±1.05	0
	10.00	5	19.41±0.83	26.95±1.74	0
	4.64	5	19.04±0.82	27.10±0.71	0
	2.15	5	18.90±0.73	26.56±0.33	0

表2 Borojo果酶解浓缩粉小鼠骨髓微核试验

Table 2 Result of micronucleus test of the rats fed with enzymatically treated Borojo concentrated powder

剂量/(g/kg·bw)	动物数/只		PCE数/个		微核数/个		微核率/%		PCE/RBC	
	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
10.0	5	5	5000	5000	10	13	2.00±1.01	2.65±1.12	0.68±0.02	0.70±0.02
5.00	5	5	5000	5000	13	9	2.64±0.93	1.83±0.80	0.70±0.03	0.69±0.02
2.50	5	5	5000	5000	7	11	1.42±0.57	2.26±0.83	0.70±0.03	0.68±0.01
0.00	5	5	5000	5000	8	9	1.63±0.92	1.84±0.45	0.71±0.02	0.71±0.01
CP(0.04)	5	5	5000	5000	92	103	18.44±2.41	20.68±4.03	0.65±0.02	0.66±0.02

注: 与阴性对照组比较 p<0.01。

观察期内各小鼠均未见中毒症状和死亡, 观察期结束处死动物, 大体解剖观察未见异常。由表1结果可

判断雌雄小鼠经口急性毒性LD₅₀>21.5 g/kg·bw, 根据急性毒性分级, 受试物Borojo果酶解浓缩粉属无毒级。

2.2 小鼠骨髓微核试验结果

表2结果经统计学分析, Borojo果酶解浓缩粉各剂量组的微核率与阴性对照组比较均无显著性差异

(P>0.05), 试验结果为阴性。

2.3 小鼠精子畸形试验结果

表3为小鼠精子畸形试验结果, 由表3经统计学分析, Borojo果酶解浓缩粉各剂量组的精子畸形率与阴性对照组比较均无显著性差异 (P>0.05), 结果为阴性。

表3 Borojo果酶解浓缩粉小鼠精子畸形分析结果

Table 3 Result of sperm aberration test of the rats fed with enzymatically treated Borojo concentrated powder

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	不定形	胖头	香蕉形	尾部畸形		
10.0	5	5000	16	42	5	3	13	79	15.82±2.33
5.00	5	5000	19	25	4	3	15	66	13.20±2.32
2.50	5	5000	15	33	5	4	13	70	14.06±2.01
0.00	5	5000	11	31	5	3	13	63	12.64±3.63
CP(0.04)	5	5000	49	96	32	32	50	259	51.80±11.92

注: **与阴性对照组比较 p<0.01。

2.4 大鼠30d喂养试验结果:

皮毛等均未见异常。体重、摄食量和食物利用率表明本受试物对大鼠生长、摄食量和食物利用率无明显影响。

2.4.1 一般情况及体重、摄食量和食物利用率的变化
各剂量组大鼠生理体征、外观、行为、大小便、

表4 Borojo 酶解浓缩粉 30 天喂养试验终期血常规指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Result of blood routine of the rats in the 30-day feeding test

剂量/(g/kg·bw)	动物数/只	红细胞数/(10 ¹² /L)	血红蛋白/(g/L)	白细胞数/(10 ⁹ /L)	血小板/(10 ⁹ /L)
0.00	10	6.75±0.30	135.61±4.50	10.85±1.61	1084.62±104.43
雄性	2.50	6.68±0.22	133.92±4.43	10.67±1.43	1042.85±84.30
	5.00	6.65±0.21	135.70±5.01	9.89±2.04	1006.51±57.84
	10.00	6.44±0.33	131.63±4.62	10.21±1.77	1021.44±100.51
	0.00	10	6.51±0.35	132.24±4.85	8.60±2.34
雌性	2.50	6.62±0.34	132.13±6.67	8.29±2.19	1050.42±166.65
	5.00	6.72±0.56	134.91±10.54	8.40±2.69	1000.71±132.84
	10.00	6.49±0.31	129.72±2.96	9.01±1.83	1037.90±77.62

表5 Borojo 酶解浓缩粉 30 天喂养试验终期白细胞分类指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Result of WBC classification of rats in the 30-day feeding test

剂量/(g/kg·bw)	动物数/只	淋巴细胞数/%	中性粒细胞数/%	单核细胞数/%	嗜酸性粒细胞数/%	嗜碱性粒细胞数/%
0.00	10	86.42±3.04	8.36±2.34	3.52±0.85	0.75±0.31	0.95±0.43
雄性	2.50	85.37±3.75	9.15±2.54	3.73±1.28	0.85±0.24	0.89±0.30
	5.00	82.86±2.10	11.03±2.00	4.09±0.92	1.29±0.63	0.74±0.32
	10.00	82.54±2.63	11.33±2.62	4.03±0.52	0.98±0.46	1.15±0.41
	0.00	10	84.90±3.64	8.91±3.60	4.35±0.98	1.15±0.46
雌性	2.50	86.86±3.12	8.33±2.36	2.93±0.88	1.31±0.82	0.59±0.36
	5.00	86.94±3.57	7.70±2.48	3.43±1.40	1.32±0.53	0.60±0.26
	10.00	89.23±2.34	5.77±1.19	3.24±0.83	1.02±0.54	0.76±0.18

注: 与纯水对照组比较, *为 P<0.05。

2.4.2 血常规指标

从表4~5可见, 雌雄高剂量组淋巴细胞数、雌性低剂量组单核细胞数与纯水对照组比较, 差异有显著性意义 (P<0.05), 但数值仍在本实验室参考值范围内

(淋巴细胞数: 雄 77.41~90.60%, 雌: 79.55~92.25%, 雌性单核细胞数: 2.31~8.69%), 其它各剂量组血常规指标与纯水对照组比较, 差异均无显著性意义, 结果显示该受试样品 30d 喂养试验血常规指标无异常。

2.4.3 血生化指标

从表 6 可见,雌雄高剂量组谷草转氨酶与纯水对照组比较降低,差异有显著性意义 ($P<0.05$),但不具

生理学意义。其余指标各剂量组与纯水对照组比较,差异无显著性意义,结果显示该受试样品 30 d 喂养试验生化指标无异常。

表 6 Borojo 酶解浓缩粉 30 d 喂养试验终期血清生化指标 (n=10)

Table 6 Result of serum biochemical parameters of the rats in the 30-day feeding test for borojo

剂量/(g/kg·bw)	谷丙转氨酶/(U/L)	谷草转氨酶/(U/L)	总蛋白/(g/L)	白蛋白/(g/L)	A/G	
0.00	42.10±5.72	114.43±24.81	56.36±1.68	27.94±0.58	1.02±0.04	
雄性	2.50	41.53±12.51	119.82±17.10	56.45±2.36	28.29±1.08	1.00±0.05
	5.00	38.64±9.60	107.76±10.41	55.00±2.81	27.73±1.48	1.01±0.07
	10.00	34.41±7.56	88.65±11.14	53.87±2.23	27.18±1.03	1.01±0.05

0.00	25.92±4.74	95.03±11.22	58.58±4.88	29.63±2.16	1.04±0.08	
雌性	2.50	31.67±8.31	91.61±11.54	58.61±2.97	30.01±2.19	1.02±0.06
	5.00	32.06±8.52	84.87±6.93	57.94±2.22	29.25±1.27	1.03±0.04
	10.00	27.65±4.63	79.40±12.58	56.52±2.35	28.58±1.30	1.04±0.05
=====						
剂量/(g/kg·bw)	肌酐/(μmol/L)	尿素氮/(mmol/L)	血糖/(mmol/L)	甘油三酯/(mmol/L)	总胆固醇/(mmol/L)	
0.00	48.60±1.51	6.87±1.29	5.26±0.86	0.74±0.22	1.52±0.27	
雄性	2.50	48.60±1.71	6.90±1.22	5.26±0.61	0.63±0.13	1.42±0.18
	5.00	49.60±2.46	6.79±1.85	5.13±0.65	0.68±0.18	1.44±0.29
	10.00	48.00±2.62	6.69±1.14	5.50±0.72	0.65±0.22	1.43±0.19

0.00	49.90±2.38	5.71±0.77	5.51±0.60	0.49±0.14	1.97±0.24	
雌性	2.50	51.90±4.72	6.54±1.30	6.06±0.60	0.42±0.18	1.90±0.21
	5.00	50.20±2.15	6.00±0.86	5.71±0.51	0.47±0.14	2.11±0.32
	10.00	49.00±2.67	5.72±1.33	6.11±0.57	0.46±0.09	1.99±0.28

2.4.4 脏器重量与脏/体比值

各剂量组脏器重量和脏/体比值与纯水对照组比较,差异均无显著性意义,结果显示该受试样品 30 d 喂养试验脏器重量和脏/体比值指标正常。

整,未见糜烂、出血、坏死或溃疡形成,腺体排列整齐,未见萎缩或增生;肌层未见肥厚或萎缩。

脾脏:脾脏被膜完整,未见增厚,脾红、白髓结构清晰。未见脾小体萎缩、分离或消失、坏死,未见脾窦扩张充血、脾梗塞等病理改变。

2.4.5 病理学检查

2.4.5.1 大体检查

各剂量组大鼠心、肝、脾、肾、胃、小肠和性腺等器官大体检查,未见异常。

性腺:睾丸白膜完整,未见增厚,曲细精管结构正常,未见基底膜增厚、变性等改变;各级生精细胞依次排列有序,未见生精上皮细胞减少、变性、或坏死等病理改变;未见间质水肿、出血。雌性动物卵巢表面上皮完整,各级卵泡结构正常,未见卵泡囊肿、黄体囊肿、卵巢萎缩、纤维化及肿瘤等病理学改变。

2.4.5.2 组织病理学检查

高剂量组和对照组动物在肝脏、肾脏、胃及小肠、脾脏和性腺组织病理学结果如下:

肝脏:肝脏被膜完整,未见增厚,肝小叶结构完整。未见肝细胞明显水样变性、脂肪变性或坏死等病理改变。肝细胞内及胆管内未见胆汁淤积。门管区无扩大,无渗出等异常表现。

3 结论

3.1 安全性毒理学评价的目的是通过快速、灵敏、经济、特异的方法对外来化合物的安全性作出评价,通常采用组合试验对受试物进行检测。急性毒性试验可了解受试物的毒性强度、性质和可能的靶器官。Borojo 果浓缩酶解粉急性毒性试验显示给药后实验动物无明显中毒反应,根据急性毒性分级标准,其属无毒级。遗传毒性试验中我们根据不同的遗传终点,按原核细胞与真核细胞、生殖细胞与体细胞、体内与体外试验相结合的原则,选择了反映哺乳类动物体细胞染色体

肾脏:雄性高剂量组 1 例动物肾皮质间质内可见一慢性炎症灶,其间有少量炎症细胞浸润。其余动物肾脏皮髓质结构清晰,肾小球未见明显肿胀或萎缩、纤维化,也未见变性、坏死等病理改变。肾小管上皮细胞未见变性、坏死,集合管未见各类管型。间质未见炎症细胞浸润。

胃及小肠:镜下可见各层结构清晰,粘膜上皮完

和生殖细胞损伤作用的小鼠骨髓微核试验和小鼠精子畸形试验。在对Borojo果浓缩酶解粉进行检测中发现上述两项试验结果均为阴性,提示该样品对基因、哺乳类动物体细胞染色体及生殖细胞无损伤作用。亚急性毒性(大鼠30天喂养)结果表明,本品对Wistar大鼠的亚急性无作用剂量大于10.00g/kg·bw,则人体ADI均值大于0.1 g/kg·bw。综上所述,在推荐剂量范围内长期使用Borojo果浓缩酶解粉是安全的^[7]。

3.2 Borojo 果产自亚马逊河流域厄瓜多尔热带雨林,属于地震和火山多发地区。由于 Borojo 果成分复杂,成熟后粘性强,直接食用口感酸涩,深加工难度很大,除当地土著人食用外尚未开发成食品,医学和科学界还未对 Borojo 功效营养成分进行系统研究^[8]。上述研究结果为以 Borojo 果浓缩酶解粉为原料的同类食品研发的安全性评价提供一定依据。

参考文献

- [1] L H Mosquera, G Moraga, N Martínez-Navarrete. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) powder [J]. Journal of Food Engineering, 2010, 97: 72-78
- [2] 焦红,孟平,李丹,等.热带水果Borojo全营养素分析[J].中国食物和营养2011,17(8):68-71
- [3] 林海丹,Ka-Hing Wong,焦红,等.热带雨林博罗霍果多糖的单糖组分分析[J].现代食品科技,2010,11(26):1264-1266
- [4] 孟平,焦红,孙超,等.火焰原子吸收光谱法测定Borojo果及其制品中的8种微量元素[J].现代食品科技,2012,28(2):223-225
- [5] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[M].2003
- [6] GB15193-2003.食品安全性毒理学评价程序和方法[S].
- [7] 金宗濂,文镜,唐粉芳.功能食品评价原理及方法[M].北京:北京大学出版社,1995
- [8] Polyphenolic Content of Borojo, Center For Advanced Food Technology Rutgers University [J], Feb, 2008