

龙安柚花毒理学安全性评价

李蕊瑞^{1,2}, 刘科亮³, 吴德举⁴, 陈锦瑶^{1,2}, 张立实^{1,2*}

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 成都 610041; 2. 四川省食品安全监测与风险评估重点实验室, 成都 610041;
3. 四川省疾病预防控制中心, 毒理检验所, 成都 610041; 4. 四川省食品安全学会, 成都 610041)

摘要: **目的** 评估龙安柚花的食用安全性。**方法** 按现行食品安全国家标准进行急性经口毒性试验、细菌回复突变(Ames)试验、哺乳动物红细胞微核试验、体外哺乳类细胞染色体畸变试验、90 d 经口毒性试验和致畸试验, 并进行统计分析。**结果** 在本试验条件下, SD 大鼠和 KM 小鼠摄入龙安柚花后均未表现出急性经口毒效应, 急性经口半数致死量(lethal dose 50, LD₅₀)大于 10 g/(kg·BW), 该花属实际无毒级; 龙安柚花未引起 TA_{97a}、TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₀₂、TA₁₅₃₅ 菌种发生回复突变; 哺乳动物红细胞微核试验与体外哺乳类细胞染色体畸变试验结果均为阴性; 90 d 经口毒性试验中, 与对照组相比, 各剂量组各性别动物的体重、摄食量、食物利用率、血液学指标、血生化指标和组织病理学检查均未见特异的毒性改变, 龙安柚花的未观察到有害作用剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)为 8 g/(kg·BW); 未观察到致畸作用。**结论** 龙安柚花属实际无毒级, 本试验条件下龙安柚花无急性毒性、遗传毒性、致畸性和亚慢性毒性。

关键词: 龙安柚; 柚花; 毒理学试验; 安全性评价

Toxicological safety evaluation on the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou

LI Rui-Rui^{1,2}, LIU Ke-Liang³, WU De-Ju⁴, CHEN Jin-Yao^{1,2}, ZHANG Li-Shi^{1,2*}

(1. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Chengdu 610041, China; 3. Institute of Toxicology, Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China; 4. Sichuan Institute of Food Safety, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the toxicity on the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou. **Methods** Acute oral toxicity test, bacterial revert mutation (Ames) test, mammalian erythrocyte micronucleus test, chromosome aberration test of mammalian cells *in vitro*, 90 d oral toxicity test and teratogenicity test were conducted according to the current national food safety standards. Statistical analysis was conducted. **Results** In the acute oral toxicity test, there was no acute oral toxic effect on the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats and KM mice, and its acute lethal dose 50 (LD₅₀) was greater than 10 g/(kg·BW), thus, the flower was classified as the actual non-toxic level. No reverse-mutation of TA_{97a}, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂, TA₁₅₃₅ were induced by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou. The results were negative in mammalian erythrocyte micronucleus test as well as chromosome aberration test of mammalian cells *in vitro*. In the 90-day oral toxicity test, compared with the control group, the weight, food intake, food utilization rate, hematology, blood biochemistry and histopathology of animals of all sexes in each dose group did not manifest toxic effects. No observed adverse effect level (NOAEL) of the flower was 8 g/(kg·BW), and

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2019ZYF0122)

Fund: Supported by the Key R & D Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (2019ZYF0122)

*通信作者: 张立实, 教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: lishizhang_56@163.com

*Corresponding author: ZHANG Li-Shi, Professor, Department of Nutrition and Food Safety, West China School of Public Health, Sichuan University, 16#, Section 3, Renmin South Road, Chengdu 610041, China. E-mail: lishizhang_56@163.com

no teratogenic effect was observed. **Conclusion** The flower of *Citrus grandis* var. Longanyou is actually non-toxic. Acute toxicity, genetic toxicity, teratogenicity and sub-chronic toxicity are negative under the conditions of these experiments.

KEY WORDS: *Citrus grandis* var. Longanyou; pomelo flower; toxicology experiment; safety evaluation

0 引言

在探索健康的生活方式和饮食习惯过程中,花类的营养价值和保健功效近年来备受关注^[1-2],食用可能成为花类的一个重要应用方向^[3]。柚是芸香科柑橘属植物^[4],龙安柚(*Citrus grandis* var. Longanyou)是种植于四川省广安市境内的一个品种,其花香气浓郁。目前,柚的经济产物仍以柚子为主,对柚花的应用相对较少。研究表明柚花富含黄酮类和多酚类^[5]以及萜烯类、酯类、烷烃类等香气成分^[6-7],这些成分具有抗氧化^[8]、抗炎^[5]、抗菌^[8]、保护心血管^[9]、抗骨质疏松^[10]、抗肿瘤^[11]等功效。部分记载称柚花可用于制茶^[12]、提取精油用于食物保鲜^[13]或香气成分用于制作香料^[7],柚花煮猪肚的食疗法可健脾、行气、暖胃^[14],由此可见柚花在食品领域有被开发利用的潜能。

全面且充足的安全性评估是确保柚花在食品领域被开发利用的前提。但由于缺乏充足、大规模、长时期的人群安全食用证据,柚花不被认为是普通食品。现有研究中尚未有针对柚花的毒理学安全性研究报道,本研究根据《新食品原料申报与受理规定》的要求,以现行食品安全国家标准为依据,对龙安柚花进行了急性经口毒性试验、三项遗传毒性试验、90 d 经口毒性试验和致畸试验,以期评估其食用安全性提供依据。

1 材料与方法

1.1 受试物

受试物由广安森林雨茶业有限责任公司提供,为龙安柚花经烘干打粉后的淡黄色粉末。

1.2 受试物配制

因剂量高时受试物遇水粘聚成团,急性经口毒性试验和哺乳动物红细胞微核试验采用食用植物油作溶剂。细菌回复突变(Ames)试验、体外哺乳类细胞染色体畸变试验和致畸试验剂量较低,选蒸馏水作溶剂。90 d 经口毒性试验采用拌饲法。

1.3 试验动物及其饲养条件

无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级 SD 大鼠、KM 小鼠(四川省中医药科学院试验动物中心)[许可证号:SCXK(川)2018-19, SPF 级试验动物使用许可证号:SYXK(川)2016-043]。饲养环境温度 20~25 °C,相对湿度

40%~70%。饲料来自四川省医学科学院、四川省人民医院试验动物研究所和邛州市小河科技发展有限公司,饲料生产许可证号:SCXK(川)2015-01 和苏饲证(2019)03058。在动物完成检疫后开始试验。

1.4 细胞系

中国地鼠肺细胞(Chinese hamster lung cell, CHL)由上海赛笠生物科技有限公司提供。

1.5 菌株

TA_{97a}、TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₀₂、TA₁₅₃₅ 购自美国 MOLTOX 公司,经鉴定合格。

1.6 仪器与主要试剂

AU-400 全自动生化分析仪、OLYMPUSBH-2 型显微镜(日本奥林巴斯株式会社);XT-2000i 型全自动血细胞分析仪(日本 SYSMEX 株式会社);ACL TOP 全自动血凝分析仪(美国 BECKMAN COULTER 公司);URIT-180 尿液分析仪、URIT-910A 电解质分析仪(桂林优利特医疗电子有限公司);JJ200 电子天平(美国双杰兄弟有限公司)。

环磷酰胺(纯度≥99%)、1,8-二羟基蒽醌(纯度 96%)、丝裂霉素 C(纯度>98%)(美国 Sigma 公司);叠氮化钠(纯度≥99.0%,沈阳化学试剂厂);2-氨基苄(纯度 99%,瑞士 Adamas Reagent 公司);4-硝基喹啉-N 氧化物(纯度>97%,德国 FLUKA AG 公司)。

1.7 试验方法

1.7.1 急性经口毒性试验(限量法)

参照 GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》进行试验。SD 大鼠、KM 小鼠各 10 只,雌雄各半,设 10 g/(kg·BW)一个剂量组。染毒后 14 d 内观察动物的中毒表现及死亡,试验结束后称重,处死动物后进行大体解剖。

1.7.2 Ames 试验(平板掺入法)

参考 GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》,用经 β-萘黄酮与苯巴比妥钠联合诱导雄性大鼠肝 S9 按标准方法制成 S9 混合液。试验选用 5 种菌株(见 1.5 菌株),设 8、40、200、1000、5000 μg/皿 5 个剂量组及溶剂(蒸馏水)对照组、未处理对照组、二甲基亚砜对照组和阳性对照组,在±S9 试验条件下进行。每组 3 个平行。-S9 阳性对照物:TA_{97a} 和 TA₉₈ 用 0.5 μg/皿的 4-硝基喹啉-N-氧化物;TA₁₀₀ 和 TA₁₅₃₅ 用 1.5 μg/皿的叠氮化钠;

TA₁₀₂ 用 1.0 μg/皿的丝裂霉素 C; +S9 阳性对照物 TA₁₀₂ 用 50 μg/皿的 1, 8-二羟基蒽醌, TA₁₅₃₅ 用 200 μg/皿的环磷酰胺, 其余菌株均用 20 μg/皿的 2-氨基苄。阳性对照的加样体积为 0.1 mL。

1.7.3 哺乳动物红细胞微核试验

参考 GB 15193.5—2014《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》, 将 50 只雌雄各半的 KM 小鼠随机分为 5 组, 分性别分笼饲养。设 2.5、5.0、10.0 g/(kg·BW) 3 个剂量组, 另设溶剂对照及阳性对照[环磷酰胺: 40 mg/(kg·BW)], 每隔 24 h 灌胃 1 次, 单次灌胃量为 20 mL/(kg·BW), 首次给药后观察 30 h; 第 2 次给药 6 h 后处死动物, 取胸骨骨髓进行制片、固定、Giemsa 染色。在油镜下每只动物观察 2000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE), 计数其中含微核的 PCE 数, 由此得出含微核细胞率(%); 观察 200 个红细胞(red blood cell, RBC)中嗜多染红细胞的比例(PCE/RBC)。

1.7.4 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

参考 GB 15193.23—2014《食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验》, 根据预试验结果, ±S9 组设 1.25、2.50、5.00 mg/mL 3 个剂量组及阴性(蒸馏水)对照和阳性对照。-S9 阳性对照为丝裂霉素 C (0.5 μg/mL); +S9 阳性对照为环磷酰胺(15 μg/mL)。按 1×10^5 个/mL 的密度接种细胞, 待贴壁后进行试验。加入受试物作用 3 h 后弃培养液, 用 Hanks 液洗涤 3 次, 再加入 5 mL 1640 培养液, 培养至 24 h。第 20 h 加入终质量浓度为 1 μg/mL 秋水仙碱, 4 h 后收获细胞, 低渗、固定后用 Giemsa 染色, 对每一份样品在油镜下观察 100 个分裂中期相细胞, 记录畸变类型, 计算细胞染色体畸变率(%)。

1.7.5 90 d 经口毒性试验

按照 GB 15193.13—2015《食品安全国家标准 90 天经口毒性试验》将 80 只 SD 大鼠随机分成 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 分性别分群饲养, 自由进食饮水。试验设 2、4、8 g/(kg·BW) 3 个剂量组和基础饲料对照组, 用拌饲法连续干预 90 d。高剂量掺入饲料比例按 10% 计算, 大鼠每日摄食量按 8% 计算。分别称取 2.0、1.0、0.5 kg 受试物, 及 0.5、0.25 以及 0.125 kg 干酪素, 分别依次加入 3 kg 全价颗粒饲料中充分搅拌, 再将所剩饲料 17.5、18.75、19.375 kg 加入至总量 20 kg, 搅拌均匀后加工成型, 钴 60 照射, 制备得到高中低 3 个剂量组所需饲料, 试验期间共制备 3 次。对照组给予基础饲料。每天观察动物的一般表现、行为、中毒表现及死亡。试验前 4 周每周称重 2 次, 之后每周称重 1 次, 据此调整灌胃量; 记录每周摄食量, 计算每周食物利用率(第 13 周只计算 6 d)。试验开始前和结束时, 为对照组及高剂量组动物进行眼科检查。试验结束时, 计算总增重、总摄食量、总食物利用率; 收集动物尿液, 检测尿常规; 动物禁食 16 h 后, 于次

日称重麻醉采血, 测定各项血液学血生化指标, 解剖动物观察内脏改变, 称重要脏器湿重, 计算脏体比, 取对照及高剂量组多种器官组织作病理学检查。若有病变再对较低剂量组相应器官组织进行检查。

1.7.6 致畸试验

根据 GB 15193.14—2015《食品安全国家标准 致畸试验》将雌雄 SD 大鼠按 1:2 配对。将孕鼠随机分 4 组, 每组 18 只以上, 试验设 1、2、4 g/(kg·BW) 3 个剂量组和(蒸馏水)阴性对照。在妊娠第 6~15 d, 每天按 20 mL/(kg·BW)经口灌胃染毒。妊娠第 0 d 称重, 给药期间每 3 d 称重 1 次, 据此调整灌胃量。妊娠第 20 d 称重、麻醉后股动脉放血处死动物, 取出子宫, 检查总着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数和黄体数, 称子宫连活胎总重、活胎重、卵巢重、胎盘重, 测量胎鼠身长, 逐个检查胎鼠的外观, 将一半胎鼠放入鲍氏液中固定两周后检查内脏, 其余胎鼠去内脏后经固定、染色、透明后检查骨骼。

1.8 数据分析

用 SPSS 16.0 软件分析。哺乳动物红细胞微核试验选择泊松分布或 U 检验。体外哺乳类细胞染色体畸变试验采用 χ^2 检验, Bonferroni 法调整检验水准后进行两两比较。90 d 经口毒性试验和致畸试验数据先进行方差齐性检验, 方差齐时进行方差分析, 当 $P < 0.05$, 两两比较用 Dunnett- t 法; 若方差不齐, 采用秩和检验, 如果 $P < 0.05$, 则用 Dunnett's T3 法进行两两比较。分类资料用卡方检验或秩和检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

给药后 14 d 内, SD 大鼠和 KM 小鼠均未出现中毒表现及死亡。大鼠解剖结果肉眼未见异常。龙安柚花对 SD 大鼠和 KM 小鼠中的急性经口 LD₅₀ 均大于 10 g/(kg·BW), 为实际无毒级。

2.2 Ames 试验

各试验组背景菌苔生长均匀一致, 无沉淀, 阳性对照组的平均回变菌落数均超过溶剂对照组的 2 倍以上, 而各剂量组的平均回变菌落数均未超过溶剂对照组 2 倍。即龙安柚花未能引起受试菌株发生回复突变。

2.3 哺乳动物红细胞微核试验

阳性对照组雄鼠和雌鼠的含微核细胞率分别为 $(15.90 \pm 2.53)\%$ 和 $(13.20 \pm 3.09)\%$, 高于阴性对照组含微核细胞率[雄鼠: $(1.50 \pm 0.50)\%$; 雌鼠: $(2.00 \pm 0.35)\%$], 差异有统计学意义($P < 0.01$); 各性别的 3 个剂量组的含微核细胞率与阴性对照组相比均无统计学差异; 各组 PCE/RBC 均高于对照组的 20%, 由此认为本次微核试验剂量设计合理、结果可靠。

2.4 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

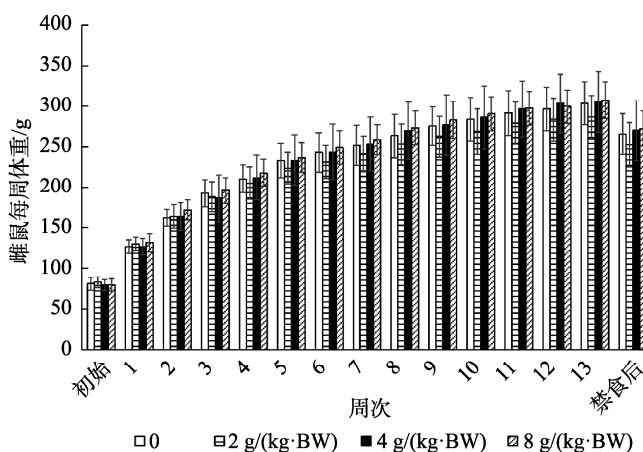
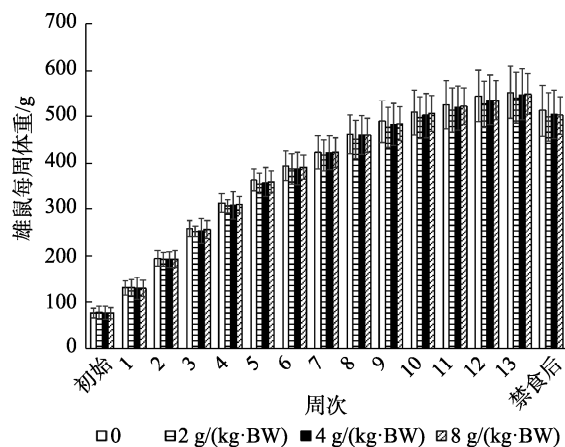
染色体总畸变率在各剂量组与阴性对照组(+S9: 3%; -S9: 2%)间均无统计学差异($P>0.05$),而阳性对照组的染色体总畸变率(+S9: 29%; -S9: 26%)高于阴性对照组($P<0.01$),说明本试验中龙安柚花不引起 CHL 细胞染色体畸变率增加。

2.5 90 d 经口毒性试验

试验期间动物健康状况良好,体重持续增长,大鼠每天经口摄入 2、4、8 g/(kg·BW)龙安柚花后均未出现中毒表现,试验期间无动物死亡。试验前后,对照组和高剂量组 SD 大鼠的眼科检查均未见异常。

2.5.1 龙安柚花对大鼠体重及其变化的影响

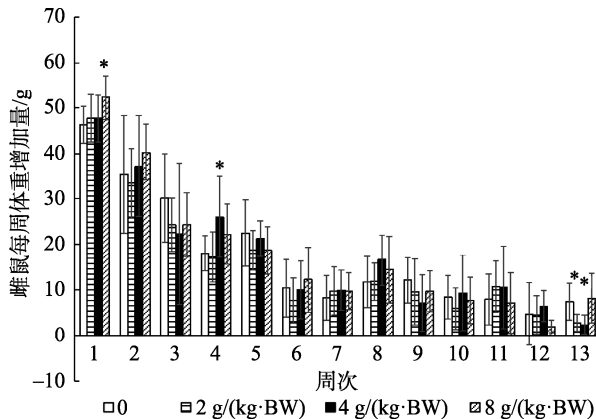
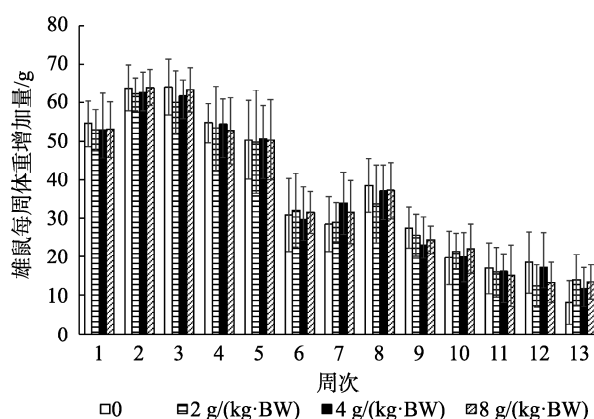
如图 1 所示,与对照组相比,剂量组的初始体重、1~13 周体重均无统计学差异($P>0.05$)。如图 2 所示,雌性 SD 大鼠高剂量组第 1 周增重较多($P<0.05$),中剂量组第 4 周增重较多($P<0.05$),低、中剂量组第 13 周增重较少($P<0.05$),但无剂量/时间-反应关系。



注: 第 13 周增重只计算 6 d。

图 1 龙安柚花对 SD 大鼠每周体重的影响($n=10$)

Fig.1 Effects on body weight per week by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats ($n=10$)



注: 第 13 周增重只计算 6 d; *表示与对照组比较, $P<0.05$ 。

图 2 龙安柚花对 SD 大鼠每周增重的影响($n=10$)

Fig.2 Effects on weight gain per week by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats ($n=10$)

2.5.2 龙安柚花对大鼠进食情况的影响

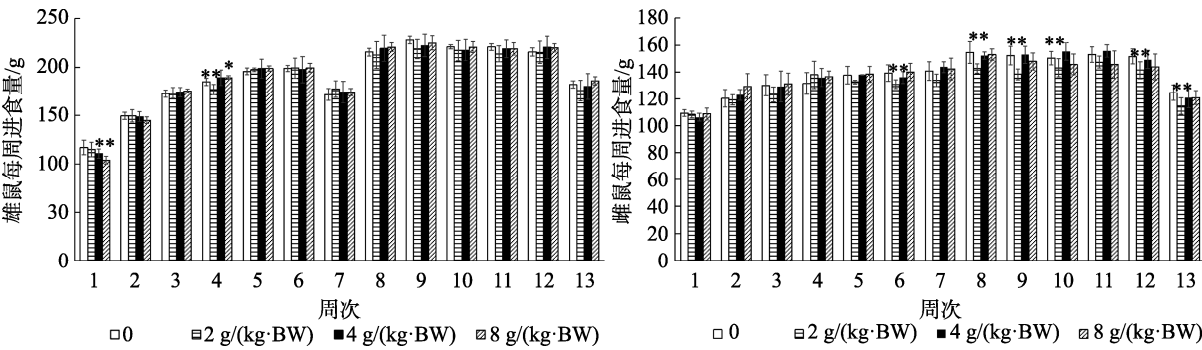
如图 3 所示, SD 大鼠在试验期间的每周进食量基本呈平稳趋势,与对照组相比,雄性高剂量组第 1 周进食量减少($P<0.01$),低剂量组第 4 周进食量减少($P<0.01$),高剂量组第 4 周进食量增加($P<0.05$)。雌性低剂量组第 6、8、9、10、12、13 周进食量减少($P<0.01$),但无剂量/时间-反应关系。

2.5.3 龙安柚花对大鼠每周食物利用率的影响

如图 4 所示,试验动物每周食物利用率呈下降趋势;相比于对照组,雌性大鼠低剂量组和中剂量组第 13 周食物利用率低于对照组($P<0.05$),其余各组均与对照组无差异($P>0.05$),也无剂量/时间-反应关系。

2.5.4 龙安柚花对大鼠总进食量、总增重、总食物利用率的影响

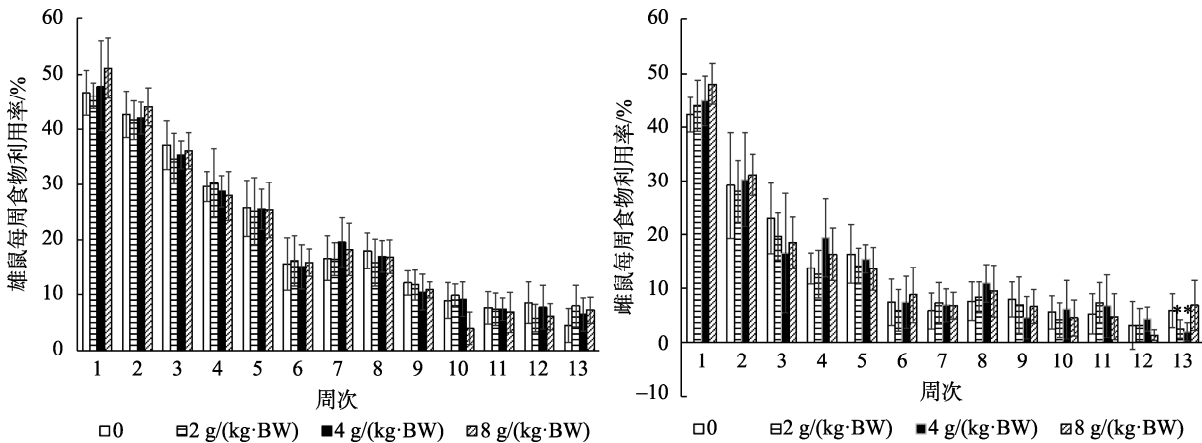
由表 1 可知,雌鼠低剂量组总进食量显著低于对照($P<0.05$);各剂量组的总增重、总进食量、总食物利用率均与对照组无差异。



注：第 13 周只计算 6 d；*表示与对照组相比， $P < 0.05$ ，**表示与对照组相比， $P < 0.01$ 。

图 3 龙安柚花对 SD 大鼠每周进食量的影响($n=10$)

Fig.3 Effects on food intake per week by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats ($n=10$)



注：第 13 周只计算 6 d；*表示与对照组相比， $P < 0.05$ ，**表示与对照组相比， $P < 0.01$ 。

图 4 龙安柚花对 SD 大鼠食物利用率的影响($n=10$)

Fig.4 Effects on food availability per week by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats ($n=10$)

表 1 龙安柚花对 SD 大鼠总进食量、总增重、总食物利用率的影响($\bar{X} \pm S$)
Table 1 Effects on total food intake, total weight gain, and total food availability by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD rats ($\bar{X} \pm S$)

性别	剂量/[g/(kg·BW)]	动物数/只	总增重/g	总进食量/g	总食物利用率/%
雄	0	10	476.9±59.5	2474.5±30.1	19.28±2.43
	2	10	463.2±64.0	2442.5±86.9	18.95±2.39
	4	10	471.5±51.1	2473.1±113.6	19.07±1.90
	8	10	473.0±47.0	2478.0±27.8	19.07±1.74
雌	0	10	223.2±32.5	1797.2±66.1	12.39±1.47
	2	10	204.0±25.8	1715.3±38.7*	11.89±1.40
	4	10	226.7±36.0	1799.9±60.3	12.58±1.84
	8	10	228.7±22.3	1784.8±80.8	12.83±1.29

注：*表示与对照组相比， $P < 0.05$ 。

2.5.5 龙安柚花对 SD 大鼠血液学的影响

与对照组相比, 雄性 SD 大鼠低剂量组血红蛋白含量高于对照[(174.9±7.8) mmol/L vs (164.1±6.4) mmol/L, $P<0.05$]、低剂量组和高剂量组的红细胞压积增加(0.50±0.02、0.49±0.02 vs 0.47±0.02, $P<0.05$), 但未观察到剂量-反应关系; 雌性 SD 大鼠中、高剂量组活化部分凝血酶时间分别减少了(4.9±1.0)和(5.8±2.0) ($P<0.05$), 此外, 各指标在不同性别的各剂量组均未见统计学差异($P>0.05$)。

2.5.6 龙安柚花对 SD 大鼠末期尿常规及电解质的影响

不同性别低剂量组血清钾含量均高于对照[雄鼠: (5.59±0.54) mmol/L vs (5.07±0.36) mmol/L, 雌鼠: (5.66±0.57) mmol/L vs (5.04±0.41) mmol/L, $P<0.05$]; 雌鼠低剂量组 pH 低于对照(6.35±0.41 vs 7.15±0.53, $P<0.05$), 雌鼠低、中、高剂量组血清钠低于对照[(144.93±2.19) mmol/L、(144.68±1.11) mmol/L、(143.97±1.49) mmol/L vs (147.04±1.32) mmol/L, $P<0.05$]。其余指标均未见统计学差异。

2.5.7 龙安柚花对 SD 大鼠末期血生化的影响

与对照组相比, 雄性 SD 大鼠的中剂量组碱性磷酸酶较高[(118.98±12.52) U/L vs (94.63±14.08) U/L, $P<0.05$], 且高剂量组血糖较低[(7.83±0.84) mmol/L vs (9.52±1.23) mmol/L, $P<0.05$]; 雌鼠高剂量组总蛋白较低[(57.42±3.73) g/L vs (62.55±5.12) g/L, $P<0.05$], 雌鼠低剂量组谷草转氨酶较高[(190.40±52.09) U/L vs (140.54±33.03) U/L, $P<0.05$], 雌鼠低剂量组和高剂量组的血糖均低于对照[(7.90±0.57) mmol/L、(7.92±0.89) mmol/L vs (9.57±1.34) mmol/L, $P<0.05$], 但无剂

量反应关系, 其余指标均无统计学差异。

2.5.8 龙安柚花对 SD 大鼠脏器体比的影响

与对照组相比, 3 个剂量组雌雄 SD 大鼠的肝脏湿重、肝体比、肾脏湿重、肾体比、脾脏湿重、脾体比、睾丸(或卵巢)重、睾丸(或卵巢)体比、心脏湿重、心体比在组间均无统计学差异。

2.5.9 病理学检查

大体解剖检查结果表明各组动物脏器均未见明显异常。对照组及高剂量组动物肝脏、肾脏、脾脏、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、睾丸、卵巢、脑、心脏、肾上腺、胰腺、甲状腺、胸腺、肠系膜淋巴结、膀胱、垂体、肺及气管、附睾、前列腺、子宫的病理组织学检查均未见被检查脏器与受试物有关的特异性毒性病理改变。

2.6 致畸试验

2.6.1 龙安柚花对 SD 孕鼠体重的影响

由表 2 可知, 与对照组相比, 3 个剂量组 SD 孕鼠各时点的体重、体重增重、体重净增重均无统计学差异($P>0.05$)。

2.6.2 龙安柚花对 SD 大鼠妊娠结局的影响

表 3 显示了各组动物的妊娠结局。除中剂量组吸收胎发生率高于阴性对照组($P<0.05$), 各剂量组 SD 大鼠胎仔的窝平均活胎数、吸收胎数、死胎数、子宫连胎总重、胎仔平均体重及胎仔平均身长与阴性对照组均无统计学差异($P>0.05$), 吸收胎和死胎分别见图 5a 和图 5b。

表 2 龙安柚花对 SD 孕鼠体重的影响($\bar{X} \pm S$)						
Table 2 Effects on body weight by the flower of <i>Citrus grandis</i> var. Longanyou in SD pregnant rats ($\bar{X} \pm S$)						
剂量/[g/(kg·BW)]	孕鼠数/只	妊娠天数/d			体重增重/g	体重净增重/g
		0	6	20		
0	16	277.1±24.7	322.2±26.4	455.6±39.1	133.4±23.3	46.6±22.3
1	16	270.5±12.0	317.8±11.5	433.2±41.0	115.4±41.2	39.2±20.8
2	16	280.5±24.4	324.9±26.5	446.8±32.7	121.8±26.5	45.9±12.5
4	17	277.4±21.1	319.3±20.9	444.1±52.8	124.8±39.3	43.6±22.5

表 3 龙安柚花对 SD 孕鼠妊娠结局的影响($\bar{X} \pm S$)												
Table 3 Effects on pregnancy outcomes by the flower of <i>Citrus grandis</i> var. Longanyou in SD pregnant rats ($\bar{X} \pm S$)												
剂量/[g/(kg·BW)]	交配鼠数/只	孕鼠数/只	活胎数/只	窝平均活胎数/只	吸收胎数/只	死胎数/只	着床数/只	黄体数/只	子宫连胎总重/g	胎仔平均体重/g	胎仔平均身长/cm	
0	20	16	203	13±4	5	0	13±3	23±5	86.7±20.7	4.5±0.6	4.1±0.2	
1	20	16	173	11±5	5	0	11±5	22±4	76.1±33.0	4.6±0.7	4.1±0.2	
2	21	16	178	11±5	12*	0	12±4	24±4	75.9±30.2	4.4±0.3	4.0±0.1	
4	20	17	201	12±4	7	4	13±5	24±4	81.1±26.6	4.4±0.7	4.0±0.2	

注: *表示与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.6.3 龙安柚花对 SD 大鼠胎仔外观、内脏发育和骨骼发育的影响

如表 4 所示, 本试验的 3 个剂量组和阴性对照组的 SD 大鼠个别胎仔均有发生胸骨缺损(图 5c)和胸骨发育不全(图 5d), 高剂量组和低剂量组各发生 1 例和 2 例趾骨异常(图 5e)。对对照组和 1、2、4 g/(kg·BW)剂量组的 203、173、178、201 只活胎以及 106、89、93、105 只活胎分别进行了外观畸形和内脏畸形检查, 相应组别中均未见脑膨出、脑积水、脐疝、腹裂、无指、并指、短指等外观畸形以及侧脑室扩张、第三脑室扩张、马蹄肾、肾缺失等内脏畸形。

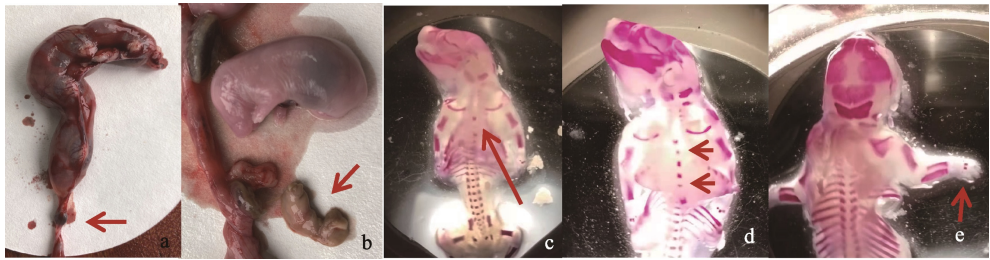
3 结论与讨论

为评估龙安柚花的食用安全性, 本研究根据新食品原料的相关规定进行了毒理学试验。结果表明龙安柚花在大鼠和小鼠中均未表现出急性毒性、遗传毒性、亚慢性毒性和致畸性, 属实际无毒级, LD₅₀>10 g/(kg·BW), NOAEL>8 g/(kg·BW)。现有文献中尚未见柚花的毒理学安全性研究报道, 而柚花成分的安全性记载可作为柚花食用安全性的间接证据。柚花中的柚皮苷、橙皮苷、柚皮素等成分不仅无毒且对外源性因素的毒作用有保护作用^[15-17]。本试验室检

测结果表明龙安柚花中柚皮苷含量丰富(84.5~94.1 mg/g)。SD 大鼠中, 柚皮苷的 LD₅₀>16 g/(kg·BW), 连续灌胃 13 周和 6 个月的 NOAEL 均大于 1.25 g/(kg·BW)^[18-19]。比格犬中, 柚皮苷的急性经口 LD₅₀>5 g/(kg·BW); 经口摄入柚皮苷 3 个月和 6 个月的 NOAEL 均大于 0.5 g/(kg·BW)^[20]。综上, 本试验结果结合相关资料表明: 本试验条件下, 龙安柚花无毒性。这一结论有助于为龙安柚花的安全食用和开发利用提供科学依据。

表 4 龙安柚花对 SD 大鼠胎仔骨骼发育的影响
Table 4 Effects on skeletal development by the flower of *Citrus grandis* var. Longanyou in SD pregnant rats

检查指标	剂量/[g/(kg·BW)]			
	0	1	2	4
受检活胎窝数/个	16	16	16	16
受检活胎仔数/个	97	84	85	96
胸骨缺损发生数/个	6	4	3	6
胸骨发育不全发生数/个	4	1	3	2
趾骨异常发生数/个	0	2	0	1
骨骼畸形窝发生数/个	5	5	4	5



注: 箭头表示 a 为吸收胎; b 为死胎; c 为胸骨缺损; d 为胸骨发育不全; e 为趾骨异常。

图 5 致畸试验中观察到的异常妊娠结局和骨骼畸形

Fig.5 Abnormal pregnancy outcomes and skeletal deformities observed in teratogenicity test

参考文献

[1] CHEN Q, XU B, HUANG W, *et al.* Edible flowers as functional raw materials: A review on anti-aging properties [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 106: 30–47.

[2] RIVAS-GARC AL, NAVARRO-HORTAL MD, ROMERO-MARQUEZ JM, *et al.* Edible flowers as a health promoter: An evidence-based review [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.007

[3] PIRES TCSP, BARROS L, SANTOS-BUELGA C, *et al.* Edible flowers: Emerging components in the diet [J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 93: 244–258.

[4] 黄成就. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

HUANG CJ. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1997.

[5] SHEN CY, JIANG JG, HUANG CL, *et al.* Polyphenols from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. Amara Engl. show significant anti-complement and anti-inflammatory effects [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(41): 9061–9068.

[6] 郑云云, 黄锐敏, 陈美卿, 等. SPME-GC/MS 联用技术比较分析不同品种蜜柚花的香气成分[J]. 中国南方果树, 2021, 50(2): 44–47.

ZHENG YY, HUANG RM, CHEN MQ, *et al.* Comparative analysis of aroma components in the flowers of different pomelo varieties by combined SPME-GC/MS technology [J]. South China Fruits, 2021, 50(2): 44–47.

[7] 侯韬, 郭胜兰, 李永生, 等. 梅州蜜柚(*Honey pomelo*)柚花不同部位的香气成分和水蒸气精油组成成分差异分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 231–238.

HOU T, GUO SL, LI YS, *et al.* Analysis of aroma and essential oil constituents in different parts of honey pomelo flower Meizhou [J]. Mod Food Technol, 2019, 35(7): 231–238.

[8] 刘蕊, 李晓丹. 柑橘属黄酮类化合物橙皮苷和橙皮素的抗氧化和抗炎特性分子机制综述[J]. 中国医药导刊, 2019, 21(12): 749–752.

LIU R, LI XD. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus

- flavonoids hesperidin and hesperetin: An review of their molecular mechanisms [J]. *Chin J Med Guide*, 2019, 21(12): 749–752.
- [9] BAHARE S, PATRICK VTF, MEHDI S, *et al.* The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials [J]. *Pharmaceuticals*, 2019, 12(1): 1–18.
- [10] SHARMA A, BHARDWAJ P, ARYA SK. Naringin: A potential natural product in the field of biomedical applications [J]. *Carbohydrate Polym Technol Appl*, 2021, 2: 100068.
- [11] 王丹, 彭莉, 周燕红. 柚皮素抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3151–3156.
- WANG D, PENG L, ZHOU YH. Research progress on anti-tumor effect of naringenin [J]. *Chin Tradit Herbal Drug*, 2021, 52(10): 3151–3156.
- [12] 徐小忠, 郑浩, 郑湾湾, 等. 常山胡柚花茶窰制技术研究初探[J]. *浙江柑橘*, 2020, 37(3): 22–24.
- XU XZ, ZHENG H, ZHENG WW, *et al.* Reliminary study on scenting technology of hupomelo flower tea from Changshan [J]. *Zhejiang Citrus*, 2020, 37(3): 22–24.
- [13] JING L, LEI Z, LI L, *et al.* Antifungal activity of citrus essential oils [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(14): 3011–3033.
- [14] 袁克. 肠胃病中医辩证有效食疗[M]. 广州: 广州出版社, 2004.
- YUAN KE. Traditional Chinese medicine dialectical effective diet therapy for gastroenteropathy [M]. Guangzhou: Guangzhou Press, 2004.
- [15] ZHANG XH, ZHANG YZ, GAO W, *et al.* Naringin improves lipid metabolism in a tissue-engineered liver model of NAFLD and the underlying mechanisms [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119487.
- [16] JAMSHID T, HOSSEIN H, MAHMOUD H, *et al.* A review of the hepatoprotective effects of hesperidin, a flavanone glycoside in citrus fruits, against natural and chemical toxicities [J]. *Daru J Pharm Sci*, 2020, 28(1): 305–317.
- [17] NARAKI K, REZAEI R, KARIMI G. A review on the protective effects of naringenin against natural and chemical toxic agents [J]. *Phytother Res*, 2021, (2): 1–17.
- [18] LI P, WANG S, GUAN X, *et al.* Acute and 13 weeks subchronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 1–9.
- [19] LI P, WANG S, GUAN X, *et al.* Six months chronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 66: 65–75.
- [20] LI P, WU H, WANG Y, *et al.* Toxicological evaluation of naringin: Acute, subchronic, and chronic toxicity in Beagle dogs [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2020, 111: 104580.

(责任编辑: 李磅礴 张晓寒)

作者简介



李蕊瑞, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 2839137449@qq.com



张立实, 教授, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: lishizhang_56@163.com