

樟树籽仁油的遗传毒性评价

彭婷^{1,2,3}, 梁丽军⁴, 曾哲灵^{1,2,5}, 张淑虹^{1,5}, 鄢祥辉^{1,2,6}, 夏佳恒^{1,2,5}, 余平^{1,2,5},
万冬满^{1,2,3}, 文学方^{7,8}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌 330047; 2. 江西省药食同源植物资源高值化利用重点实验室, 南昌 330031; 3. 南昌大学食品学院, 南昌 330031; 4. 谱赛科(江西)生物技术有限公司, 江西赣州 341108; 5. 南昌大学化学化工学院, 南昌 330031; 6. 南昌大学资源与环境学院, 南昌 330031; 7. 江西省科学院应用化学研究所, 南昌 330096; 8. 中国中医科学院中医药健康产业研究所, 南昌 330115)

摘要:为评价樟树籽仁油的食用安全性,通过细菌回复突变试验、体外哺乳类细胞TK基因突变试验及哺乳动物红细胞微核试验探究樟树籽仁油的致突变和潜在致癌作用。结果表明:樟树籽仁油对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA1535、TA97、TA98、TA100、TA102均无致突变作用;樟树籽仁油未抑制L5178Y小鼠淋巴瘤细胞的生长,对体外哺乳类细胞TK基因无致突变作用;樟树籽仁油未导致小鼠细胞微核率上升,对哺乳动物红细胞无致突变作用,无遗传毒性。综上,樟树籽仁油无细胞致突变和潜在致癌作用,没有遗传毒性,具有一定的食用安全性。

关键词:樟树籽仁油;食用安全性;遗传毒性

中图分类号:TS225.1;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)08-0075-07

Genotoxicity evaluation of *Cinnamomum camphora* seed kernel oil

PENG Ting^{1,2,3}, LIANG Lijun⁴, ZENG Zheling^{1,2,5}, ZHANG Shuhong^{1,5},
YAN Xianghui^{1,2,6}, XIA Jiaheng^{1,2,5}, YU Ping^{1,2,5},
WAN Dongman^{1,2,3}, WEN Xuefang^{7,8}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Edible and Medicinal Resources Exploitation, Nanchang 330031, China; 3. School of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 4. Pure Circle (Jiangxi) Co., Ltd., Ganzhou 341108, Jiangxi, China; 5. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 6. School of Resources and Environment, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 7. Institute of Applied Chemistry, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China; 8. Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330115, China)

收稿日期:2023-04-21;修回日期:2024-04-25

基金项目:国家国际科技合作专项项目(2011DFA32770);国家自然科学基金项目(31701651,32060516);江西省科技支撑计划重大项目(20143ACG70015);南昌大学食品与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-202135, SKLF-ZZB-201916);江西省重点研发计划项目(20212BBF63035);江西省科学院省级包干制项目(2022YSBG21021);江西省科学院省级科研院基础研究项目(2022YJC2016)

作者简介:彭婷(1998),女,在读硕士,研究方向为食物资源开发与利用(E-mail)ncu_pt@163.com;梁丽军(1985),男,工程师,研究方向为天然产物分离与纯化(E-mail)lianglijun8599@126.com。彭婷与梁丽军为共同第一作者。

通信作者:文学方,副研究员(E-mail)wx198508@163.com。

Nanchang 330096, China; 8. Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330115, China)

Abstract: To evaluate the edible safety of *Cinnamomum camphora* seed kernel oil (CCSKO), the mutagenicity and potential carcinogenic effects of CCSKO were investigated by bacterial reverse mutation tests, *in vitro* mammalian cell TK gene mutation tests, and mammalian erythrocyte micronucleus tests. The results showed that CCSKO had no mutagenic effect on *Salmonella typhimurium* strains TA1535, TA97, TA98, TA100 and TA102 with histidine deficiency. CCSKO did not inhibit the growth of

L5178Y mouse lymphoma cells, and had no mutagenic effect on TK gene in mammalian cells *in vitro*. CCSKO did not increase the micronucleus rate of cell in mice, had no mutagenic effect on mammalian erythrocytes and had no genotoxicity. To sum up, CCSKO has no mutagenicity and potential carcinogenic effect, no genotoxicity, and has certain edible safety.

Key words: *Cinnamomum camphora* seed kernel oil; edible safety; genotoxicity

中国樟树 (*Cinnamomum camphora*) 资源丰富, 以樟树籽仁为原料制备的樟树籽仁油 (*Cinnamomum camphora* seed kernel oil, CCSKO) 含辛酸 0.11% ~ 2.57%、癸酸 46.56% ~ 60.25% 和月桂酸 35.88% ~ 43.70%^[1-3], 中链脂肪酸含量达 95.0%^[2] 以上, 是至今发现的全球唯一天然中链油, 为生产中链甘油酯 (MCT)、中长链甘油酯 (MLCT) 及结构脂的理想原料。MCT 因具有体内消化、吸收、转运、代谢及产能快^[4-10] 且不会转化为脂肪而储存于体内^[11] 的特性, 已被广泛用于生产食用油^[12], 口服和肠外给药介质^[13-14], 以及能量食品、减肥食品、婴幼儿食品、运动营养食品、口服和肠外 MCT 脂肪乳、口服和肠外 MLCT 脂肪乳、生酮食品等特殊膳食食品^[15-17]。但富含中链脂肪酸, 尤其是 MCT 的油脂种类非常少。全球市售 MCT 至今仍是棕榈仁油 (含辛酸 1.9% ~ 6.2%、癸酸 2.6% ~ 5.0%、月桂酸 40.0% ~ 55.0%)^[18] 和椰子油 (含辛酸 4.6% ~ 10.4%、癸酸 4.5% ~ 8.0%、月桂酸 43.0% ~ 53.2%)^[19] 为原料, 通过水解、分馏、酯化合成辛酸癸酸甘油酯, 可见樟树籽仁油具有广阔的开发利用前景。

前期研究表明, 樟树籽仁油对肥胖大鼠具有减轻体质量、降低体脂、改善脂代谢紊乱等生理作用^[20-22]。在此基础上, 本研究根据 GB 15193.1—2014《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》所推荐的遗传毒性检测试验组合通过细菌回复突变试验研究樟树籽仁油对鼠伤寒沙门氏菌的致突变性及其剂量-反应关系, 通过体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验研究樟树籽仁油对 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞 TK 基因突变频率的影响及其剂量-反应关系, 通过哺乳动物红细胞微核试验研究樟树籽仁油对 ICR 小鼠嗜多染红细胞微核率的影响及其剂量-反应关系, 探明樟树籽仁油是否具有细胞致突变和潜在致癌作用, 评价樟树籽仁油的遗传毒性, 为全面评价樟树籽仁油的食用安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

樟树籽仁油, 依据曾哲灵等^[23] 的方法制备; 一级大豆油, 采用市售非转基因大豆, 经过热榨、脱酸和脱色过程制得。

大鼠肝微粒体酶 (S9), 实验室自制, -80℃ 冰箱中储存备用; 环磷酸胺 (CP), 合肥博美生物科技有限公司; 2-氨基苄 (2-AF), 西安齐岳生物科技有限公司; 敌克松, 上海一基生物试剂有限公司; 1,8-二羟基蒽醌, 上海源叶生物科技有限公司; 叠氮钠 (NaN₃), ACROS 公司; 甲基磺酸甲酯 (MMS), 郑州艾克姆化工有限公司; RPMI1640 培养基, 赛默飞世尔科技公司; 马血清, 赛业 (广州) 生物科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 北京索莱宝科技有限公司; THG 培养基及 THMG 培养基, 汇智和源生物技术 (苏州) 有限公司。

1.1.2 试验动物与基础饲料

7~12 周龄、体质量 18~22 g 的 SPF 级 ICR 小鼠 (雌雄各半), 许可证号为 SCXK (湘) 2016-0002, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。ICR 小鼠在温度 21.2~24.6℃、相对湿度 50%~56% 的动物房 [合格证号 SYXK (赣) 2012-0003] 内进行 5 d 的环境适应及隔离观察后再用于动物试验。

基础饲料为普通饲料, 许可证号为 SCXK (湘) 2016-0002, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.1.3 试验菌株

组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 菌株, 测试菌株经鉴定符合要求, 齐一生物科技 (上海) 有限公司; tk^{+/+} 基因型小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y-3.7.2C, 通派 (上海) 生物科技有限公司。

1.1.4 仪器与设备

赛多利斯 BSA124S 型电子天平, 奥林巴斯生物显微镜, CO₂ 培养箱, 恒温振荡器, TG16G 型 JA3003 离心机, C1109C 型超净台工作, 2102C 型恒温摇床等。

1.2 试验方法

1.2.1 樟树籽仁油品质指标测定

参照文献[24]对樟树籽仁油品质指标进行测定。

1.2.2 樟树籽仁油的细菌回复突变试验

参照 GB 15193.4—2014, 采用 TA1535、TA97、TA98、TA100 和 TA102 5 种组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌作为试验菌株, 采用平板掺入法, 设置 5 个剂量组及未处理对照组、溶剂对照组 (DMSO) 和阳性对照组 (NaN₃、2-AF、敌克松、1,8-二羟基蒽醌、CP), 以多氯联苯诱导的大鼠肝脏微粒体酶 (S9) 作为体外代谢活化系统, 分别在有 S9 (+S9) 和无 S9 (-S9) 的条件下进行细菌回复突变试验。

不同质量浓度受试物配制: 准确称取 1 g 樟树籽仁油, 加入 DMSO 配制成质量浓度为 50 mg/mL 的溶液, 高压灭菌, 作为最高浓度样品。取 2.0 mL 最高浓度样品, 加入 4.32 mL 无菌 DMSO 混匀, 如此依次 $\sqrt{10}$ 倍 (约 3.16 倍) 稀释成质量浓度分别为 15 820、5 010、1 585、502 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

分别取 0.1 mL 5 种试验菌株的新鲜增菌液, 依次加入顶层培养基中, 混合均匀, 再分别加 0.1 mL 不同质量浓度 (对应剂量分别为 5 000、1 582、501、158.5、50.2 $\mu\text{g}/\text{皿}$) 的受试物 (需要活化时额外加入 0.5 mL 10% 的 S9), 混合均匀后迅速倒入已铺好底层培养基的培养皿中, 并确保顶层培养基分布均匀。每个剂量组做 3 个平行。适宜条件下培养 48 h, 观察并计数每个平板回复突变菌落数。溶剂对照组加 0.1 mL DMSO, 阳性对照组每培养皿分别加 1.5 μg NaN₃、10.0 μg 2-AF、50.0 μg 敌克松、50.0 μg 1,8-二羟基蒽醌、200 μg CP, 培养方法同上。

验证试验: 取 1.0 mL 最高浓度样品, 加入 4 mL 无菌 DMSO 混匀, 如此依次稀释 5 倍至试验剂量分别为 5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}/\text{皿}$ (以每皿添加 0.1 mL 受试物计算)。其余操作同上。

1.2.3 樟树籽仁油的体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验

参照 GB 15193.20—2014 进行试验。受试物剂量设定采用平板掺入法, 樟树籽仁油用 DMSO 依次稀释至质量浓度分别为 500、250、125 mg/mL 的受试物溶液, 以总体积的 1% 计算得到对应受试物剂量为 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (高剂量组)、2 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (中剂量组)、1 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低剂量组), 阴性对照组加总体积 1% 的 H₂O、阳性对照组加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMS (-S9) 和 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP (+S9), 溶剂对照组加总体积 1%

的 DMSO, 分别在 +S9 和 -S9 条件下进行试验。

细胞的表达培养: 试验前将细胞先在 THMG 培养基中培养 24 h, 经离心、洗涤后, 在 THG 培养基中培养 2 d, 以清除 tk^{+/+} 基因型的 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞中自发突变的 tk^{-/-} 基因型细胞。细胞在 RPMI 1640 培养液 (含 10% 马血清) 中作常规悬浮培养, 选取生长良好的细胞, 将细胞密度调整为 5×10^5 个/mL, 加入高、中、低剂量组受试物并处理 3 h, 离心取细胞沉淀, 洗涤后细胞重新悬浮于 RPMI 1640 培养液 (含 10% 马血清) 中, 将细胞密度调整为 2×10^5 个/mL, 表达培养 2 d, 每日计数细胞密度, 计算相对悬浮生长 (RSG), 具体计算见式 (1)。

平板接种效率测定: 取适量上述细胞悬液逐步稀释至细胞密度为 8 个/mL, 按每孔 200 μL 接种到 96 孔板中 (平均每孔 1.6 个细胞), 每个剂量组做 2 个平行, 适宜条件下培养 12 d, 计数每块平板中有集落生长的孔数, 计算 0 d 的平板接种效率 (PE₀) 及相对存活率 (RS₀)。剩余细胞悬液再进行 2 d 的表达培养, 用同样的方法测定并计算 2 d 的平板接种效率 (PE₂) 及相对存活率 (RS₂)。平板接种效率 (PE) 计算见式 (2), 相对存活率 (RS) 计算见式 (3), 相对总生长 (RTG) 计算见式 (4)。

突变频率 (MF) 测定: 取适量表达培养 2 d 的细胞悬液, 将细胞密度调整为 1×10^4 个/mL, 加入三氟胸苷 (TFT) 至其终质量浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 混合均匀, 按每孔 200 μL 接种到 96 孔板中 (每孔含有 2 000 个细胞)。每个剂量组做 2 个平行, 适宜条件下培养 12 d, 计数有突变集落生长的孔数。MF 计算见式 (5), 小集落突变百分率或缓慢生长集落突变百分率 (SCM) 计算见式 (6)。

$$R = \frac{N_0}{N_1} \times 100\% \quad (1)$$

$$x = \frac{-\ln(E/T)}{1.6} \times 100\% \quad (2)$$

$$d = \frac{x_1}{x_2} \times 100\% \quad (3)$$

$$w = R \times d_2 \times 100\% \quad (4)$$

$$F = \frac{-\ln(E/T)/2\,000}{y} \quad (5)$$

$$M = \frac{S}{S_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中: R 为 RSG 值; N_0 、 N_1 分别为处理组、阴性对照组表达期间细胞增殖倍数; x 为 PE 值; E 为无集落生长的孔数; T 为总孔数; d 为 RS 值; x_1 、 x_2 分别为处理组、阴性/溶剂对照组的 PE 值; w 为 RTG

值; d_2 为 RS_2 值; F 为 MF 值; y 为 PE_2 值; M 为 SCM 值; S 为小集落突变频率; S_0 为总突变频率。

1.2.4 樟树籽仁油的哺乳动物红细胞微核试验

参照 GB 15193.5—2014 进行试验。将 25 只雄性和 25 只雌性 ICR 小鼠随机分成 5 组,每组雌/雄各 5 只。设高、中、低 3 个剂量组,以樟树籽仁油作为高剂量组受试物,樟树籽仁油与大豆油依次对半稀释作为中、低剂量组受试物,高、中、低剂量组剂量分别为 3.44、1.72、0.86 g/kg,同时设阴性对照组(大豆油)及阳性对照组(CP,剂量为 40 mg/kg)。按 4 mL/kg 的灌胃容量灌胃 2 次,间隔 24 h,第二次灌胃 6 h 后,通过颈椎脱臼处死小鼠,采集小鼠骨髓样品,用常规方法制片,在光学显微镜下,每只动物观察 2 000 个嗜多染红细胞(PCE),计数带微核的细胞数,以带微核的细胞数占总红细胞数比例计算细胞微核率。同时每只动物观察 200 个红细胞,计算嗜多染红细胞与正染红细胞(NCE)的比值。

1.2.5 数据处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,试验结果均以“平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示,采用单因素方差分析进行多个试验组与对照组之间平均数比较,以 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 樟树籽仁油品质指标

樟树籽仁油的脂肪酸组成和分布见表 1,其甘油三酯组成见表 2,其黄樟素、异黄樟素、樟脑和芳樟醇含量及其他理化性质见表 3。

表 1 樟树籽仁油脂肪酸组成和分布 %

脂肪酸	总脂肪酸	sn-2 位脂肪酸	sn-1,3 位脂肪酸
辛酸 C8:0	0.41 \pm 0.02	0.48 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01
癸酸 C10:0	61.23 \pm 0.90	59.01 \pm 0.72	62.35 \pm 0.58
月桂酸 C12:0	35.83 \pm 0.69	37.09 \pm 0.53	35.21 \pm 0.41
肉豆蔻酸 C14:0	0.77 \pm 0.03	0.83 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02
棕榈酸 C16:0	0.18 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01
油酸 C18:1	1.17 \pm 0.02	1.76 \pm 0.19	0.87 \pm 0.08
亚油酸 C18:2	0.33 \pm 0.03	0.62 \pm 0.04	0.18 \pm 0.02
α -亚麻酸 C18:3n-3	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03
饱和脂肪酸	98.42 \pm 0.15	97.55 \pm 0.16	98.86 \pm 0.23
不饱和脂肪酸	1.58 \pm 0.01	2.45 \pm 0.03	1.14 \pm 0.01
中链脂肪酸	97.47 \pm 0.21	96.58 \pm 0.29	97.93 \pm 0.16
长链脂肪酸	2.53 \pm 0.01	3.42 \pm 0.02	2.07 \pm 0.02

表 2 樟树籽仁油甘油三酯组成 %

CCC (ECN30)	CCLa (ECN32)	CLaLa (ECN34)
5.36 \pm 0.07	84.86 \pm 3.56	9.78 \pm 0.34

注:ECN. 等效碳数

表 3 樟树籽仁油理化性质

项目	指标
相对密度 (20 $^{\circ}$ C/20 $^{\circ}$ C)	0.931
折光指数 (20 $^{\circ}$ C)	1.451
色泽、透明度、气味	淡黄色,透明,无异味
水分及挥发物/%	0.12
不溶性杂质/%	0.03
溶剂残留量	ND
酸值(KOH)/(mg/g)	0.295
不皂化物/%	0.32
皂化值(KOH)/(mg/g)	285
碘值/(g/100 g)	5.052
过氧化值/(mmol/kg)	1.665
加热试验	无析出物,罗维朋比色 红色不变、黄色增加 1.0
砷	ND
铅	ND
黄樟素	ND
异黄樟素	ND
樟脑	ND
芳樟醇	ND
苯并(a)芘	ND
黄曲霉毒素 B ₁	ND

注:ND. 未检出

由表 1 可看出,樟树籽仁油主要由中链脂肪酸组成,总含量达 97.47%,且在 sn-2 位和 sn-1,3 位分布相当。由表 2 可知,樟树籽仁油中甘油三酯主要由三癸酸甘油三酯(CCC)、二癸酸月桂酸甘油三酯(CCLa)和二月桂酸癸酸甘油三酯(CLaLa)组成。由表 3 可知,樟树籽仁油中不含樟树精油(黄樟素、异黄樟素等),并且符合植物油食品安全国家标准(GB 2716—2018)。

2.2 樟树籽仁油对细菌的致突变作用

樟树籽仁油细菌回复突变试验结果见表 4。

由表 4 可知:阳性对照组的平均回复突变菌落数均超过未处理对照组的 2 倍,呈现明显阳性反应,说明本试验体系对致突变物敏感;溶剂对照组的平均回复突变菌落数与未处理对照组相近,说明本试验采用的溶剂无致突变作用;无论加与不加 S9,各剂量组的回复突变菌落数均未超过未处理对照组的 2 倍,亦无剂量-反应关系。上述结果表明,樟树籽仁油未诱导 5 种菌株回复突变菌落数增加,细菌回复突变试验结果为阴性。

樟树籽仁油细菌回复突变验证试验结果见表 5。

由表 5 可知,验证试验亦未见樟树籽仁油各剂量组诱导 5 种菌株回复突变菌落数增加,无剂量-

反应关系,试验结果均为阴性。

两次细菌回复突变试验结果均说明,无论加与不加 S9,樟树籽仁油对 5 种鼠伤寒沙门氏菌回复突变试

验结果均为阴性,无剂量-反应关系,说明樟树籽仁油对鼠伤寒沙门氏菌 TA1535、TA97、TA98、TA100、TA102 未呈现回复致突变毒性,无潜在致癌作用。

表 4 樟树籽仁油细菌回复突变试验结果

组别	TA97		TA98		TA100		T102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
剂量组										
5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	115 \pm 9	114 \pm 20	29 \pm 3	38 \pm 9	124 \pm 5	182 \pm 17	278 \pm 37	325 \pm 36	18 \pm 3	20 \pm 2
1 582 $\mu\text{g}/\text{ml}$	127 \pm 10	117 \pm 15	31 \pm 4	32 \pm 4	125 \pm 12	174 \pm 19	261 \pm 8	330 \pm 19	16 \pm 5	18 \pm 4
501 $\mu\text{g}/\text{ml}$	95 \pm 13	117 \pm 30	30 \pm 5	42 \pm 6	154 \pm 16	158 \pm 17	279 \pm 21	314 \pm 26	14 \pm 4	14 \pm 3
158.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	110 \pm 14	119 \pm 20	31 \pm 5	42 \pm 6	137 \pm 15	148 \pm 4	279 \pm 9	295 \pm 38	17 \pm 3	11 \pm 1
50.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	113 \pm 26	123 \pm 28	31 \pm 5	39 \pm 5	149 \pm 29	180 \pm 12	263 \pm 27	298 \pm 15	13 \pm 2	16 \pm 5
未处理对照组	136 \pm 6	130 \pm 16	31 \pm 5	45 \pm 3	148 \pm 21	164 \pm 10	295 \pm 14	287 \pm 53	17 \pm 4	17 \pm 4
溶剂对照组	121 \pm 21	138 \pm 30	34 \pm 3	33 \pm 3	154 \pm 18	170 \pm 24	283 \pm 40	352 \pm 13	16 \pm 3	17 \pm 4
阳性对照组										
NaN ₃					1 367 \pm 153				1 021 \pm 167	
2-AF		962 \pm 96		1 392 \pm 119		1 436 \pm 133				
敌克松	2 307 \pm 234		1 086 \pm 197				1 662 \pm 166			
1,8-二羟基蒽醌							891 \pm 115			
CP										275 \pm 45

表 5 樟树籽仁油细菌回复突变验证试验结果

组别	TA97		TA98		TA100		T102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
剂量组										
5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	111 \pm 19	127 \pm 22	30 \pm 3	36 \pm 1	157 \pm 8	155 \pm 9	278 \pm 11	345 \pm 8	16 \pm 1	20 \pm 1
1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	128 \pm 8	125 \pm 12	28 \pm 1	39 \pm 7	158 \pm 7	183 \pm 22	287 \pm 3	290 \pm 4	18 \pm 2	18 \pm 3
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	125 \pm 22	134 \pm 17	30 \pm 2	42 \pm 5	144 \pm 28	169 \pm 11	305 \pm 17	332 \pm 24	18 \pm 5	19 \pm 3
40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	115 \pm 21	110 \pm 7	31 \pm 2	38 \pm 4	150 \pm 18	181 \pm 27	263 \pm 8	306 \pm 43	16 \pm 4	18 \pm 3
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	102 \pm 12	119 \pm 3	34 \pm 4	33 \pm 5	135 \pm 9	143 \pm 16	267 \pm 25	316 \pm 21	16 \pm 4	18 \pm 3
未处理对照组	98 \pm 13	109 \pm 12	33 \pm 4	45 \pm 2	161 \pm 24	153 \pm 32	294 \pm 17	295 \pm 57	12 \pm 1	18 \pm 4
溶剂对照组	118 \pm 7	109 \pm 13	30 \pm 3	39 \pm 5	135 \pm 8	136 \pm 13	285 \pm 25	291 \pm 31	17 \pm 3	14 \pm 2
阳性对照组										
NaN ₃					1 156 \pm 135				938 \pm 116	
2-AF		980 \pm 83		1 383 \pm 183		1 219 \pm 85				
敌克松	2 268 \pm 266		1 128 \pm 196				1 450 \pm 156			
1,8-二羟基蒽醌							863 \pm 82			
CP										323 \pm 48

2.3 樟树籽仁油对体外哺乳类细胞 TK 基因的致突变作用

樟树籽仁油的体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验结果见表 6、表 7。

由表 6 及表 7 可知,本试验中 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞的自发突变频率在合理范围内 ($50 \times 10^{-6} \sim 200 \times 10^{-6}$),阴性/溶剂对照组的 PE₀ 在 89.40% ~ 98.05% 之间,阳性对照组总突变频率与

溶剂对照组有显著性差异 ($p < 0.05$),表明本试验系统可靠。无论加与不加 S9,樟树籽仁油各剂量组中 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞的突变频率均未超过阴性对照组的 3 倍,亦无剂量-反应关系,表明樟树籽仁油在本试验条件下的体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验结果为阴性,说明樟树籽仁油对体外哺乳类细胞 TK 基因未显示出致突变作用。

表6 樟树籽仁油 TK 细胞毒性

组别	PE ₀ /%		PE ₂ /%		RS ₀ /%		RS ₂ /%		RSG/%		RTG/%	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
高剂量组	79.48	75.06	72.96	81.81	88.90	76.55	67.49	73.14	93.88	81.78	63.36	59.81
中剂量组	95.03	72.96	79.48	68.96	106.30	74.41	73.52	61.65	92.65	89.75	68.12	55.33
低剂量组	75.06	77.23	98.05	89.40	83.96	78.77	90.69	79.93	93.88	94.30	85.14	75.37
阴性对照组	89.40	98.05	86.76	101.22	100.00	100.00	80.25	90.50	100.00	80.65	80.25	72.99
阳性对照组												
MMS	33.24*		56.73*		37.18*		52.47*		43.77*		22.97*	
CP		38.93*		77.23*		39.70*		69.05*		52.19*		36.04*
溶剂对照组	92.15	98.05	108.10	111.85	103.08	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

注: * 表示阳性对照组与阴性对照组相比有显著性差异($p < 0.05$)

表7 樟树籽仁油诱导 L5178Y 细胞 TK 基因突变频率

组别	T - MF/ 10^{-6}		S - MF/ 10^{-6}		L - MF/ 10^{-6}		SCM/%	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
高剂量组	84.00	89.43	79.92	82.07	36.94	29.50	95.14	91.77
中剂量组	77.02	88.94	73.37	76.12	23.50	23.19	95.26	85.59
低剂量组	59.26	61.81	53.31	58.61	16.24	26.97	89.96	94.82
阴性对照组	87.73	54.52	77.33	51.62	21.50	21.11	88.15	94.68
阳性对照组								
MMS	853.99*		840.77*		230.48*		98.45	
CP		356.88*		295.40*		106.65*		82.77
溶剂对照组	61.93	73.34	59.15	65.16	22.26	21.50	95.51	88.85

注: T - MF. 总突变频率; S - MF. 小集落实变频率; L - MF. 大集落实变频率。* 表示与溶剂对照组相比有显著性差异($p < 0.05$)

2.4 樟树籽仁油对哺乳动物红细胞的致突变作用

樟树籽仁油哺乳动物红细胞微核试验结果见表8。

由表8可知:阳性对照组的雌、雄小鼠微核率分别为1.232%和0.965%,与阴性对照组及各剂量组相比有显著性差异($p < 0.05$),表明本试验体系可靠;樟树籽仁油各剂量组PCE/NCE值均处于正常范围内,与阴性对照组相比无显著性差异($p >$

0.05),表明哺乳动物红细胞的增殖未受樟树籽仁油明显抑制,不会影响对PCE微核的观察。樟树籽仁油各剂量组雌、雄小鼠微核率与阴性对照组相比无显著性差异($p > 0.05$),说明樟树籽仁油在最高剂量达3.44 g/kg时仍未导致小鼠PCE微核率上升,说明樟树籽仁油对哺乳动物红细胞无致突变作用,无遗传毒性。

表8 哺乳动物红细胞微核试验结果

性别	组别	动物数(只)	受检PCE数(个)	含微核PCE数(个)	微核率/%	PCE/NCE
	剂量组/(g/kg)					
雄	3.44	5	10 105	13	0.129 ± 0.046	1.19 ± 0.01
	1.72	5	10 099	15	0.149 ± 0.097	1.17 ± 0.02
	0.86	5	10 113	15	0.148 ± 0.043	1.17 ± 0.02
	阴性对照组	5	10 082	13	0.129 ± 0.027	1.19 ± 0.02
	阳性对照组	5	10 360	100	0.965 ± 0.124*	1.10 ± 0.03
	剂量组/(g/kg)					
雌	3.44	5	10 112	16	0.158 ± 0.062	1.19 ± 0.02
	1.72	5	10 111	20	0.198 ± 0.042	1.17 ± 0.01
	0.86	5	10 113	17	0.168 ± 0.032	1.17 ± 0.02
	阴性对照组	5	10 089	12	0.119 ± 0.043	1.19 ± 0.03
	阳性对照组	5	10 143	125	1.232 ± 0.259*	1.10 ± 0.03

注: * 表示与阴性对照组及各剂量组相比有显著性差异($p < 0.05$)

3 结论

对樟树籽仁油进行遗传毒性评价,结果表明:樟树籽仁油对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA1535、TA97、TA98、TA100、TA102 均无致突变作用和潜在致癌作用,对体外哺乳类细胞 TK 基因无致突变作用,对哺乳动物红细胞无致突变作用、无遗传毒性。三项遗传试验充分说明樟树籽仁油无细胞致突变和潜在致癌作用,无遗传毒性。

参考文献:

- [1] 毛锦远, 马晓雨, 胡振瀛, 等. 以樟树籽仁油、油茶籽油、全氢化棕榈油为原料的起酥油基料油的表征[J]. 中国油脂, 2019, 44(11): 23-28.
- [2] 冯绍贵, 李彦宸, 董春怡, 等. 樟树籽仁油的结构和特性分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(1): 22-26.
- [3] FU J, WANG B, GONG D, et al. Camphor tree seed kernel oil reduces body fat deposition and improves blood lipids in rats[J]. J Food Sci, 2015, 80(8): H1912-H1917.
- [4] FERREIRA L, LISENKO K, BARROS B, et al. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: A systematic review[J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2014, 98(1): 1-8.
- [5] TAKEUCHI H, SEKINE S, KOJIMA K, et al. The application of medium-chain fatty acids: Edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2008, 17(Suppl 1): 320-323.
- [6] RUBIN M, MOSER A, VASERBERG N, et al. Structured triacylglycerol emulsion, containing both medium- and long-chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: A double-blind randomized cross-over study[J]. Nutrition, 2000, 16(2): 95-100.
- [7] ASHBROOK J D, SPECTOR A A, FLETCHER J E. Medium chain fatty acid binding to human plasma albumin[J]. J Biol Chem, 1972, 247(21): 7038-7042.
- [8] SCHÖNFELD P, WOJTCZAK L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective[J]. J Lipid Res, 2016, 57(6): 943-954.
- [9] SCHULZ H. Regulation of fatty acid oxidation in heart[J]. J Nutr, 1994, 124(2): 165-171.
- [10] RINALDO P, MATERN D, BENNETT M J. Fatty acid oxidation disorders[J]. Annu Rev Physiol, 2002, 64: 477-502.
- [11] LONGO N, FRIGENI M, PASQUALI M. Carnitine transport and fatty acid oxidation[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(10): 2422-2435.
- [12] 周盛敏, 张余权, 姜元荣. 中链脂肪酸在烹饪油中的应用研究进展[J]. 食品科技, 2011, 36(6): 205-208, 212.
- [13] DAULL P, PATERSON C A, KUPPERMANN B D, et al. A preliminary evaluation of dexamethasone palmitate emulsion: A novel intravitreal sustained delivery of corticosteroid for treatment of macular edema[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29(2): 258-269.
- [14] SOLER V J, LAURENT C, SAKR F, et al. Preliminary study of the safety and efficacy of medium-chain triglycerides for use as an intraocular tamponading agent in minipigs [J]. Albrecht Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 2017, 255(8): 1593-1604.
- [15] ZHAO M L, TANG L, ZHU X M, et al. Enzymatic production of zero-trans plastic fat rich in α -linolenic acid and medium-chain fatty acids from highly hydrogenated soybean oil, *Cinnamomum camphora* seed oil, and *Perilla* oil by Lipozyme TL IM[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(6): 1189-1195.
- [16] ZOU X G, HU J N, ZHAO M L, et al. Lipozyme RM IM-catalyzed acidolysis of *Cinnamomum camphora* seed oil with oleic acid to produce human milk fat substitutes enriched in medium-chain fatty acids[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(43): 10594-10603.
- [17] AUGUSTIN K, KHABBUSH A, WILLIAMS S, et al. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders[J]. Lancet Neurol, 2018, 17(1): 84-93.
- [18] TAN C P, NEHDI I A. The physicochemical properties of palm oil and its components[M]//Palm oil. Amsterdam: Elsevier, 2012: 377-391.
- [19] MARINA A M, CHE MAN Y B, AMIN I. Virgin coconut oil: Emerging functional food oil[J]. Trends Food Sci Technol, 2009, 20(10): 481-487.
- [20] 傅婧. 樟树籽仁油改善肥胖大鼠脂代谢紊乱的作用及机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [21] FU J, ZENG C, ZENG Z, et al. *Cinnamomum camphora* seed kernel oil ameliorates oxidative stress and inflammation in diet-induced obese rats[J]. J Food Sci, 2016, 81(5): H1295-H1300.
- [22] FU J, ZENG C, ZENG Z, et al. *Cinnamomum camphora* seed kernel oil improves lipid metabolism and enhances β 3-adrenergic receptor expression in diet-induced obese rats[J]. Lipids, 2016, 51(6): 693-702.
- [23] 曾哲灵, 曾桂炳, 余平, 等. 一种食用安全的樟树籽仁油的提取方法: CN114015496B[P]. 2022-12-09.
- [24] ZHU Q, YANG Y, ZENG Z, et al. Effect of processing method on chemical composition, physicochemical property, antioxidant activity and volatile compound of *Cinnamomum camphora* seed kernel oil [J/OL]. Ind Crops Prod, 2023, 201: 116907 [2023-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116907>.