DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251219004
引用格式: 刘媛, 吴蔚, 李奕阳, 等. 牛磺酸锌硒核桃乳的安全性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 97–104.
LIU Y, WU W, LI YY, *et al*. Safety assessment of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 97–104. (in Chinese with English abstract).

牛磺酸锌硒核桃乳的安全性评价

刘 媛[1,2], 吴 蔚[1,2], 李奕阳[1,2], 李明月[1,2], 贾潘飞[1,2], 田 粟[1,2*]

(1. 河北医科大学公共卫生学院, 石家庄 050017; 2. 河北省环境与人群健康重点实验室, 石家庄 050017)

摘 要: 目的 评价牛磺酸锌硒核桃乳的安全性。**方法** 牛磺酸锌硒核桃乳冷冻干燥成粉末后, 通过急性经口毒性试验和 28 d 经口毒性试验对其安全性进行评估。急性经口毒性试验, 选用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠(20 只, 雌雄各半), 以样品最大溶解浓度和试验动物最大灌胃量给药, 在一日内间隔 6 h 灌胃 2 次后, 连续观察 14 d 内的生理行为及生存状况; 80 只 SPF 级 SD 大鼠被用于 28 d 经口毒性试验, 以样品最大溶解浓度和最大灌胃量 7.2 g/(kg • bw)作为高剂量组, 中、低剂量组的给药量分别为 3.6 g/(kg • bw)和 1.8 g/(kg • bw), 相当于人体推荐摄入量的 16、8 和 4 倍。各组大鼠的临床表现、体质量、摄食量及食物利用率进行动态监测, 并检测血液学、血清生化、尿液指标及主要脏器系数, 同时进行组织病理学观察。**结果** 急性经口毒性试验, 未见动物死亡或中毒症状, 脏器未发现异常, 急性经口半数致死量(acute oral median lethal dose, LD_{50})>18.0 g/(kg • bw), 属实际无毒级。28 d 经口毒性试验, 各剂量组大鼠一般状态良好, 体重增长、摄食量、食物利用率、血液学参数、血生化、尿常规指标和脏器系数与对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。组织病理学检查亦未见实质性病变或细胞损伤。**结论** 牛磺酸锌硒核桃乳在所设最高剂量 7.2 g/(kg • bw)时未引起试验动物的急性或亚急性毒性反应, 对主要脏器无明显影响, 表现出良好的生物安全性。基于上述结果, 确定未观察到有害作用水平(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)为试验最高剂量 7.2 g/(kg • bw)。

关键词: 牛磺酸锌硒核桃乳; 安全性评价; 急性经口毒性; 28 d 经口毒性

Safety assessment of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk

LIU Yuan[1,2], WU Wei[1,2], LI Yi-Yang[1,2], LI Ming-Yue[1,2], JIA Pan-Fei[1,2], TIAN Su[1,2*]

(1. *School of Public Health*, *Hebei Medical University*, *Shijiazhuang* 050017, *China*;
2. *Hebei Key Laboratory of Environment and Human Health*, *Shijiazhuang* 050017, *China*)

ABSTRACT: Objective To assess the safety of a taurine-zinc-selenium fortified walnut milk. **Methods** The fortified walnut milk was lyophilized into a powder prior to toxicological evaluation. Its safety was assessed via an acute oral toxicity test and a 28 d repeated-dose oral toxicity study. For the acute toxicity test, specific pathogen free (SPF) Kunming mice (n=20, half male and half female) were administered the test substance at the maximum feasible dose, which was determined by its maximum solubility and gavage volume. The dose was administered in 2 equal

收稿日期: 2025-12-19
第一作者: 刘媛(1998—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品功效评价。E-mail: lucksa1102@163.com
***通信作者:** 田粟(1971—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品功效评价。E-mail: sutian314@hebmu.edu.cn

portions 6 h apart, followed by a 14 d observation period for clinical signs and mortality. For the 28-day study, a total of 80 SPF Sprague-Dawley rats were randomly allocated to 4 groups and the test substance was administered by gavage at doses of 0 (control), 1.8 (low), 3.6 (medium) or 7.2 g/(kg • bw)/day (high). These dosages corresponded to 4, 8, and 16 times the recommended human intake, respectively. Throughout the study, monitored clinical manifestations, body weight, food consumption and food utilization efficiency. At termination, blood and urine samples were collected for hematological, serum biochemical and urinalysis assessments. Major organs were weighed, and histopathological examinations were performed. **Results** In the acute oral toxicity test, no mortality or treatment-related clinical signs of toxicity were observed. Gross necropsy revealed no organ abnormalities. The median lethal dose (LD_{50}) was therefore determined to be greater than 18.0 g/(kg • bw), classifying the substance as practically non-toxic. In the 28 d oral toxicity study, all animals remained in good health, and there were no statistically significant differences in body weight gain, food consumption, food utilization efficiency, hematological, serum biochemical parameters and organ coefficient between the treatment groups and the control group (P>0.05). All urinalysis parameters were unremarkable. No treatment-related histopathological lesions or cellular damage were found in any major organs. **Conclusion** The taurine-zinc-selenium fortified walnut milk demonstrates a high degree of safety under the conditions of this study. It does not induce acute or subacute toxicity at doses up to 7.2 g/(kg • bw)/day in rats. Based on these findings, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is established at 7.2 g/(kg • bw)/day, the highest dose tested.

KEY WORDS: taurine-zinc-selenium fortified walnut milk; safety assessment; acute oral toxicity; 28 d oral toxicity

0 引 言

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科胡桃属植物，在我国广泛栽培，是居民日常食用的坚果之一。现代研究表明，坚果类食物富含氨基酸、肽、蛋白质、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸等脂类、膳食纤维、维生素 E、维生素 K、叶酸、镁、钾和酚类化合物等营养物质和植物化学物[1]。其中核桃仁中含有较其他坚果更高的 *n*-3 多不饱和脂肪酸和多酚等抗氧化物质，与维持和改善细胞膜功能促进心血管健康[2]、神经炎症的保护作用[3–4]、改善认知功能和记忆力[5–6]等潜在的健康益处有关。核桃乳是以核桃仁为主要原料加工的植物蛋白饮品，既保留了核桃的主要营养成分，又具有独特的坚果香气和良好的口感，因此在市场上具有广泛的消费基础。近年来，随着居民营养健康意识的增强，基于坚果的植物蛋白饮料的功能化与营养强化已成为食品科学领域的重要研究方向。

本研究的牛磺酸锌硒核桃乳是在传统核桃乳的基础上添加牛磺酸、葡萄糖酸锌和富硒酵母的营养强化产品。牛磺酸是一种稳定的含硫内源性氨基酸，广泛存在于脑、心及视网膜组织中，具有调节神经传导、抗氧化及维持细胞渗透压平衡等作用[7–9]。锌和硒均是维持机体免疫稳态[10]与抗氧化系统功能的关键微量元素[11–13]，锌参与核酸合成、细胞分化及多种酶的活性调控[14–15]，硒则是谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的必需组分[16]。已有研究表明，合理补充牛磺酸、锌和硒有助于增强抗氧化防御、改善代谢功能及促进神经发育[17–21]。因此，将这些成分营养强化于核桃乳，对提升其营养价值和潜在保健功效具有重要意义。

新型复合营养配方的产品开发应以科学的安全性验证为前提。在我国，保健食品及功能性食品的安全性评价体系通常包括急性毒性、28 d 经口毒性、遗传毒性和致畸性试验等环节，其中急性毒性试验和 28 d 经口毒性试验是判定新原料及复合配方安全性的基础研究内容。

现有研究多侧重于单一营养素的强化效果，然而核桃乳在多种营养素强化后，原料及营养组分间可能产生复杂的相互作用。这种复合体系的安全性特征不能简单由单一成分的毒理数据进行外推，且目前关于其整体食用安全性的研究尚不充分。因此，本研究以牛磺酸锌硒核桃乳为研究对象，通过急性经口毒性及 28 d 经口毒性试验，评价其安全性，旨在为核桃乳类功能饮品的安全性评估和配方优化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃仁购于超市。健康无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠(体重 18~22 g)及 SD 大鼠(体重 70~80 g)，由北京斯贝福生物技术有限公司提供，许可证号 SYXK(冀)2020-002。试验动物饲养于河北医科大学试验动物公共服务平台 SPF 级屏障环境内，饲养温度 20~25 ℃，相对湿度 40%~70%，昼夜交替 12 h，普通标准饲料和饮用水自由摄取。所有动物试验操作过程均按照相关动物管理规章进行。

牛磺酸(纯度 98.5%，潜江永安药业股份有限公司)；

富硒酵母(纯度 100%, 安琪酵母股份有限公司); 葡萄糖酸锌(纯度 99.52%, 郑州普瑞生物工程有限公司); 麦芽糖醇(纯度 99.2%, 山东绿健生物技术有限公司); 复配乳化增稠剂[纯度 99%, 丹尼斯克(中国)有限公司]; 氢氧化钠(纯度 99.8%, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 生化分析所用试剂盒天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST, 批号 140225007)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT, 批号 140125008)、甘油三酯(triglyceride, TG, 批号 141724023)、总胆固醇(total cholesterol, TC, 批号 141625007)、血糖(blood glucose, GLU, 批号 141525005)、总蛋白(total protein, TP, 批号 148624013)、白蛋白(albumin, ALB, 批号 148325010)、肌酐(creatinine, CRE, 批号 141125012)、尿素(blood urea nitrogen, BUN, 批号 141325012)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP, 批号 140325004)、谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transferase, GGT, 批号 140424010)(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2　仪器与设备

AX224ZH 电子分析天平[精度 0.1 mg, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司]; HW30 实验室搅拌机(上海恒川机械设备有限公司); JMS-80A 胶体磨(廊坊市惠友机械有限公司); GYB60-6S 高压均质机(上海市东华高压均质机厂); LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌器(上海市申安医疗器械厂); BS-1000M 全自动生化仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); Chemray 240 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技有限公司); TEK8520 全自动血液分析仪(江西特康科技有限公司); URIT-500B 尿液分析仪(桂林优利特电子集团有限公司); RM2016 病理切片机(上海莱卡仪器有限公司); JM-P5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司); Donatello 全自动封闭式组织脱水机(意大利 DIAPATH 公司); D3024R 台式高速冷冻离心机[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司]。

1.3　试验方法

1.3.1　牛磺酸锌硒核桃乳的制备

将适量的核桃仁和 0.2%氢氧化钠溶液以 1:5 (*m*:*V*)的比例搅拌混合, 静置脱色 4 min, 高压冲水去皮待用。将去皮核桃仁和 80 ℃纯净水按照 1:4 (*m*:*V*)的比例放入胶体磨, 2980 r/min 研磨 3 min, 进行 3 次后, 加入牛磺酸、葡萄糖酸锌、富硒酵母和提前剪切乳化的增稠剂, 定容至所需重量, 在 70 ℃ 38~40 Mpa 条件下均质 2 次, 121 ℃杀菌 25 min, 冷却后获得牛磺酸锌硒核桃乳。其中, 每 100 mL 中含有 9.2 g 核桃仁、牛磺酸 200 mg、锌 4.0 mg、硒 22 μg。为了便于剂量精确换算, 也考虑到在急性毒性试验中液体样品直接给药时受限于动物可耐受的最大灌胃体积, 难以实现高剂量暴露, 试验材料经冷冻干燥处理, 得到的冻干粉(100 mL 核桃乳可获得相当于 11.2 g 冻干粉)经蒸馏水溶解后用于灌胃, 前期试验确定最大溶解浓度为 0.36 g/mL。参考市场上同类产品常见的 240 mL/罐规格, 本研究将单罐(240 mL)作为人推荐摄入量标准。

1.3.2　试验设计依据

参照 GB15193.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》、GB15193.22—2014《食品安全国家标准 28 天经口毒性试验》《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则》(2020 年版)[22]、《药物重复给药毒性试验技术指导原则》要求设计试验方案, 试验过程遵循试验方案及相关动物管理规程执行。

1.3.3　急性经口毒性试验

20 只 SPF 级昆明小鼠(雄雌各半), 适应性饲养 1 周后, 以试验样品最大溶解浓度 0.36 g/mL 和每次最大灌胃量 25.0 mL/(kg • bw)为灌胃方式, 间隔 6 h, 灌胃 2 次, 即日总灌胃量为 18.0 g/(kg • bw), 相当于人体推荐摄入量的大约 40 倍, 设为样品的最大可灌胃剂量。然后连续观察 14 d 动物的中毒症状及死亡情况。试验结束后称重、处死动物, 并进行大体解剖检查。

1.3.4　28 d 经口毒性试验

80 只 SPF 级 SD 大鼠, 适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组(每组 20 只, 雌雄各半)。其中, 高剂量组按样品最大可溶解质量浓度(0.36 g/mL)和每日最大灌胃体积 20 mL/kg (分两次给予)计算, 确定每日给药剂量为 7.2 g/(kg • bw), 中、低剂量组分别为 3.6 g/(kg • bw)和 1.8 g/(kg • bw), 相当于人体推荐摄入量的大约 16 倍、8 倍和 4 倍。每天间隔 6 h, 灌胃 2 次, 持续 28 d。对照组给予等体积蒸馏水。

试验期间每天观察大鼠的被毛、皮肤、眼、黏膜、分泌物、排泄物、自主活动及行为表现, 每周称重 1 次, 记录摄食量 2 次, 并计算食物利用率等指标; 试验结束时收集各组大鼠的尿液用于尿常规测定; 麻醉后经腹主动脉采血进行血常规、血生化指标检测, 并进行大体解剖, 摘取心、肝、脾、肾、肾上腺、胸腺、睾丸、卵巢等主要脏器, 称量脏器绝对重量, 计算脏器系数, 进一步进行组织病理学检查。

食物利用率的计算公式(1)为:

$$\text{食物利用率}/\% = (\text{动物增加的体重}/\text{消耗的食物量}) \times 100\% \quad (1)$$

脏器系数的计算公式(2)为:

$$\text{脏器系数}/\% = (\text{脏器绝对重量}/\text{禁食后体重}) \times 100\% \quad (2)$$

采用全自动血液分析仪测定全血中白细胞数量(white blood cell, WBC)、淋巴细胞数量(lymphocyte, LY)百分比、中性粒细胞(neutrophils, NE)百分比、单核细胞(monocyte, MO)百分比、嗜酸性粒细胞(eosinophils, EO)百分比、嗜碱性粒细胞(basophilic granulocyte, BA)、血红蛋白含量(hemoglobin, HGB)、红细胞数量(red blood cell, RBC)、红细胞压积(hematocrit, HCT)、平均红细胞体积(mean

corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均红细胞血红蛋白质量浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、血小板数量(platelet count, PLT)、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)等指标。

血清生化指标包括天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、甘油三酯、总胆固醇、血糖、总蛋白、白蛋白、肌酐、尿素、碱性磷酸酶、谷氨酰转肽酶、钠、钾、氯。

尿液样本的 pH、比重(specific gravity, SG)、葡萄糖(glucose, GLU)、隐血(blood, BLD)、WBC 计数被检测。

1.4 数据处理

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以平均值±标准偏差表示。所有数据均经正态性检验及方差齐性检验, 满足参数检验条件后, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性经口毒性试验

经口灌胃受试物后, 14 d 观察期间试验动物未见明显中毒症状, 无死亡, 体重平稳增长。试验结束后, 解剖动物, 大体观察心、肝、脾、肺、肾等主要脏器, 均未见明显病理性改变。雌雄小鼠在最大可灌胃剂量 18.0 g/(kg • bw)下均未出现动物死亡或急性毒性反应, 可判定其急性经口半数致死量(acute oral median lethal dose, LD_{50})> 18.0 g/(kg • bw), 根据急性经口毒性分级标准, 牛磺酸锌硒核桃乳属实际无毒级。

2.2 大鼠 28 d 经口毒性试验

各组试验动物在试验期间进食、饮水、排便均正常, 亦未见精神状态、自主活动、行为改变和中毒表现。眼部检查显示, 各组大鼠眼睛健康状况良好, 角膜、虹膜清晰, 未见结膜出血和水肿、以及晶状体浑浊等异常表现。

2.2.1 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠体重增长量、总摄食量、总食物利用率的影响

由表 1 可知, 试验期间各剂量组雌雄大鼠的体重增长量、总摄食量、和总食物利用率与对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 提示添加了牛磺酸、锌和硒的核桃乳在最高剂量[7.2 g/(kg • bw)]下, 未对大鼠的消化吸收功能及正常的能量代谢产生干扰, 也未因强化了锌、硒等微量元素或者牛磺酸而引起大鼠的抑制摄食的情况, 这为该产品的长期食用安全性提供了初步的证据。

2.2.2 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠血液学指标的影响

表 2 显示的是牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠血液学指标的影响。与对照组相比, 各剂量雌雄鼠的各血液学指标, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。白细胞计数及分类计数的正常, 表明此产品未诱发机体的炎症反应, 也排除了其具有免疫毒性的潜在可能; 同时, 红细胞相关参数与血小板计数的稳定, 进一步证实了强化牛磺酸、锌、硒在设定剂量下未对骨髓造血功能及红细胞渗透脆性产生不良影响。

2.2.3 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠血清生化指标的影响

如表 3 所示, 低、中、高剂量组雄性大鼠的血清钠均显著低于对照组($P<0.01$, $P<0.05$), 但是此差异未表现出剂量-反应关系, 故认为无生物学意义。各剂量组雌雄大鼠的其他各项生化指标与对照组相比, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。肝肾功能指标的稳定性表明, 牛磺酸锌硒核桃乳未对大鼠的主要代谢和排泄器官造成实质性损伤; 各组大鼠血脂和血糖指标未出现显著性差异, 说明此产品也未干扰机体的糖脂代谢。鉴于血清钠指标的波动幅度微小, 且处于动物正常生理参考值范围之内, 临床表现上也未出现脱水或电解质紊乱相关的行为异常, 因此判定此差异不具有毒理学意义。

2.2.4 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠尿常规指标的影响

表 4 显示, 各剂量组雌雄大鼠的各项指标与对照组相比, 均未见明显异常($P>0.05$)。结果表明, 牛磺酸锌硒核桃乳在受试剂量下对大鼠泌尿系统具有良好的安全性。

表 1 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠体重增长量、总摄食量和总食物利用率的影响(n=10)

Table 1 Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on total body weight gain, total food intake and overall food utilization rate in rats (n=10)

性别	组别	剂量/[g/(kg • bw)]	初始体重/g	终体重/g	总增长量/g	总摄食量/g	总食物利用率/%
雌性	对照组	0.0	112.7±5.0	199.2±16.3	86.5±15.1	548.7±75.5	15.75±1.94
	低剂量组	1.8	114.6±6.8	195.0±11.5	80.4±16.1	522.9±94.2	15.81±1.46
	中剂量组	3.6	114.4±5.9	193.3±13.0	78.9±14.5	498.0±84.7	15.92±2.45
	高剂量组	7.2	113.4±5.5	192.7±12.2	79.3±14.8	474.8±79.1	17.19±1.91
雄性	对照组	0.0	119.4±9.0	277.2±17.7	157.8±11.8	692.7±104.6	22.08±1.66
	低剂量组	1.8	118.1±7.4	271.3±16.6	153.2±16.5	654.4±90.0	23.42±1.36
	中剂量组	3.6	117.9±10.1	288.2±27.6	170.3±26.2	686.3±116.8	24.88±2.58
	高剂量组	7.2	117.7±5.1	272.3±22.8	154.6±22.3	633.4±95.0	24.43±1.18

注: 各组未有任何标识, 经统计学检验, 各组间差异均不显著($P>0.05$), 下同。

表 2　牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠血液学指标的影响

Table 2　Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on hematological indices in rats

性别	组别	WBC/(10^9/L)	LY/%	MO/%	NE/%	EO/%	BA/%	HGB/(g/L)
雌性	对照组	6.39±2.39	85.21±2.77	5.78±1.16	8.79±2.43	0.07±0.08	0.15±0.07	176.50±10.90
	低剂量组	7.54±3.87	80.13±8.50	7.57±3.29	11.98±6.08	0.14±0.15	0.18±0.23	176.90±11.86
	中剂量组	6.79±0.95	82.18±8.90	6.44±2.17	11.19±7.51	0.06±0.07	0.13±0.11	175.40±6.85
	高剂量组	7.63±1.73	76.74±12.90	7.57±2.80	15.42±10.93	0.08±0.06	0.19±0.13	179.40±17.02
雄性	对照组	8.34±2.27	80.77±4.59	8.04±2.40	10.12±1.36	0.07±0.07	0.14±0.11	175.00±29.23
	低剂量组	8.26±1.62	84.59±5.67	6.08±1.80	9.10±4.34	0.09±0.10	0.14±0.07	172.60±18.51
	中剂量组	11.19±3.40	80.42±4.42	6.97±1.86	12.40±4.40	0.11±0.09	0.10±0.05	179.70±6.26
	高剂量组	9.74±3.42	77.37±8.15	7.43±2.97	15.01±6.66	0.06±0.07	0.13±0.09	175.80±10.09

性别	组别	RBC/(10^{12}/L)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/(g/L)	PLT/(10^9/L)	MPV/fL
雌性	对照组	7.49±0.42	41.73±2.48	55.74±1.25	23.57±0.57	423.10±11.97	346.70±77.37	15.96±1.29
	低剂量组	7.26±0.46	41.00±2.71	56.49±1.32	24.39±1.15	431.80±18.54	352.80±68.55	15.47±1.27
	中剂量组	7.16±0.41	39.81±1.91	55.64±2.15	24.55±1.55	441.00±17.22	289.60±61.95	15.91±1.27
	高剂量组	7.54±0.63	42.14±4.60	55.81±2.05	23.78±0.87	426.60±18.03	338.30±60.32	16.00±1.07
雄性	对照组	7.68±0.54	44.46±3.77	57.87±2.04	24.12±0.96	417.40±19.00	351.30±91.36	15.78±1.00
	低剂量组	7.31±0.88	41.81±5.42	57.06±1.61	23.64±0.53	414.10±15.62	328.50±62.74	15.79±1.00
	中剂量组	7.60±0.52	43.84±2.19	57.79±2.10	23.74±1.43	410.30±15.63	450.20±213.01	15.82±1.16
	高剂量组	7.41±0.55	42.92±2.57	57.98±1.77	23.77±1.21	410.00±17.10	381.80±124.92	15.62±1.01

表 3　牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠血清生化指标的影响

Table 3　Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on blood biochemical parameters in rats

性别	组别	AST /(U/L)	ALT /(U/L)	TG /(mmol/L)	TC /(mmol/L)	GLU /(mmol/L)	TP /(g/L)	ALB /(g/L)
雌性	对照组	138.63±23.46	27.58±5.28	0.66±0.27	2.01±0.31	6.21±1.56	58.30±4.61	36.67±2.81
	低剂量组	141.81±24.73	29.54±6.22	0.57±0.17	2.12±0.27	6.36±2.01	56.30±3.27	35.88±1.35
	中剂量组	138.16±19.90	31.45±5.75	0.61±0.12	2.25±0.26	6.95±1.80	57.06±2.35	36.19±0.91
	高剂量组	138.41±22.57	32.82±6.10	0.68±0.23	2.02±0.25	6.32±0.77	56.16±2.44	36.00±1.50
雄性	对照组	135.53±25.19	32.18±6.37	0.60±0.22	1.98±0.24	8.18±0.90	57.42±2.95	35.26±1.15
	低剂量组	161.50±46.96	33.45±7.73	0.64±0.27	1.68±0.31	8.34±1.60	54.83±2.85	35.06±1.06
	中剂量组	143.58±18.57	35.48±6.50	0.75±0.26	1.84±0.16	7.77±1.20	56.25±1.75	34.92±1.15
	高剂量组	149.93±36.10	38.11±5.12	0.68±0.25	1.76±0.33	8.48±1.70	56.36±2.25	35.57±0.77

性别	组别	CRE /(μmol/L)	BUN /(mmol/L)	ALP /(U/L)	GGT /(U/L)	Na /(mmol/L)	K /(mmol/L)	Cl /(mmol/L)
雌性	对照组	33.14±4.33	6.53±1.24	145.67±32.07	1.03±4.67	141.61±2.22	5.58±0.52	106.71±3.75
	低剂量组	35.32±5.57	6.30±1.33	173.42±44.52	1.15±0.46	140.67±0.66	5.64±0.53	107.24±3.86
	中剂量组	34.12±4.49	6.64±0.92	149.70±21.55	1.03±0.39	141.10±1.35	5.80±0.34	108.68±2.95
	高剂量组	33.14±4.33	6.75±1.42	164.06±42.99	0.81±0.52	140.40±2.45	6.00±0.59	106.16±4.00
雄性	对照组	31.60±2.53	6.36±1.06	213.38±40.97	0.41±0.48	144.69±1.95	5.69±0.23	110.63±2.43
	低剂量组	31.91±4.21	6.14±0.67	217.90±31.01	0.44±0.27	142.45±1.33**	5.73±0.27	112.15±1.56
	中剂量组	34.04±6.80	5.89±0.93	216.25±42.80	0.38±0.26	142.08±1.11**	5.84±0.26	111.39±1.03
	高剂量组	33.50±6.15	6.41±1.14	226.26±41.09	0.40±0.49	142.76±1.59*	5.96±0.50	110.07±1.49

注: *表示与对照组相比, 具有显著差异, $P<0.05$; **表示与对照组相比, 具有极显著差异, $P<0.01$。

表 4 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠尿常规指标的影响

Table 4 Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on urinalysis in rats

性别	组别	pH	SG	GLU (*P*/*N*)	BLD (*P*/*N*)	WBC (*P*/*N*)
雌性	对照组	6.50±0.67	1.019±0.003	0/10	0/10	0/10
	低剂量组	6.85±0.41	1.017±0.002	0/10	0/10	0/10
	中剂量组	6.75±0.63	1.017±0.002	0/10	0/10	0/10
	高剂量组	6.85±0.34	1.018±0.005	0/10	0/10	0/10
雄性	对照组	6.85±0.53	1.020±0.004	0/10	0/10	0/10
	低剂量组	6.95±0.44	1.019±0.003	0/10	0/10	0/10
	中剂量组	6.70±0.35	1.022±0.003	0/10	0/10	0/10
	高剂量组	6.55±0.55	1.023±0.004	0/10	0/10	0/10

注: [a]数据显示的是阳性动物数与阴性动物数之比。

2.2.5 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠脏器绝对重量及脏器系数的影响

脏器绝对重量和脏器系数是毒理学评价中判断靶器官损伤的核心指标。表 5 显示的是牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠脏器绝对重量和脏器系数的影响。结果显示, 与对照组相比, 各剂量组雌雄大鼠各脏器绝对重量和脏器系数, 差异均无统计学意义(P>0.05), 提示该产品在受试剂量下未引起脏器的器质性损伤。

2.2.6 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠主要脏器病理组织学检查的影响

试验结束后, 解剖动物, 未发现异常改变。病理组织学检查结果也显示各剂量组试验动物各器官的结构完整、细胞排列紧密, 胞浆清晰、核形态规则(图 1)。由此可见, 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠主要器官的组织病理学无明显影响。

表 5 牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠脏器绝对重量和脏器系数的影响

Table 5 Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on absolute weight and organ coefficient of organs in rats

性别	组别	心脏/g	肝脏/g	脾脏/g	肾脏/g	肾上腺/g	胸腺/g	卵巢(睾丸)/g
雌性	对照组	0.83±0.10	5.77±0.51	0.51±0.07	1.37±0.12	0.06±0.01	0.40±0.09	0.12±0.03
	低剂量组	0.86±0.08	5.81±0.34	0.52±0.08	1.41±0.11	0.05±0.01	0.40±0.08	0.13±0.01
	中剂量组	0.83±0.07	6.18±1.09	0.49±0.06	1.33±0.11	0.05±0.01	0.34±0.04	0.12±0.02
	高剂量组	0.89±0.14	5.61±0.28	0.54±0.06	1.33±0.21	0.05±0.01	0.38±0.62	0.11±0.02
雄性	对照组	1.09±0.11	8.59±0.76	0.61±0.08	1.96±0.13	0.04±0.01	0.49±0.13	3.31±0.22
	低剂量组	1.12±0.16	7.92±1.13	0.61±0.06	1.90±0.26	0.04±0.01	0.49±0.09	3.16±0.20
	中剂量组	1.17±0.14	8.85±0.96	0.65±0.10	2.03±0.21	0.04±0.01	0.53±0.06	3.23±0.19
	高剂量组	1.07±0.08	8.03±1.14	0.59±0.08	1.95±0.23	0.05±0.02	0.45±0.12	3.26±0.31
性别	组别	心脏系数/%	肝脏系数/%	脾脏系数/%	肾脏系数/%	肾上腺系数/%	胸腺系数/%	卵巢(睾丸)系数/%
雌性	对照组	0.42±0.03	2.92±0.11	0.26±0.03	0.69±0.03	0.03±0.00	0.20±0.04	0.06±0.02
	低剂量组	0.45±0.05	3.00±0.15	0.27±0.03	0.73±0.05	0.03±0.00	0.20±0.04	0.06±0.02
	中剂量组	0.43±0.03	3.18±0.52	0.25±0.04	0.68±0.06	0.03±0.00	0.18±0.02	0.06±0.01
	高剂量组	0.45±0.07	2.88±0.18	0.28±0.09	0.61±0.03	0.02±0.01	0.20±0.03	0.06±0.01
雄性	对照组	0.39±0.03	3.08±0.14	0.22±0.03	0.71±0.04	0.02±0.00	0.18±0.05	1.19±0.13
	低剂量组	0.42±0.07	2.93±0.29	0.23±0.02	0.70±0.07	0.01±0.00	0.18±0.03	1.18±0.09
	中剂量组	0.40±0.04	3.06±0.22	0.25±0.04	0.71±0.09	0.01±0.00	0.19±0.02	1.12±0.13
	高剂量组	0.40±0.03	2.95±0.24	0.22±0.02	0.73±0.06	0.02±0.01	0.17±0.04	1.22±0.13

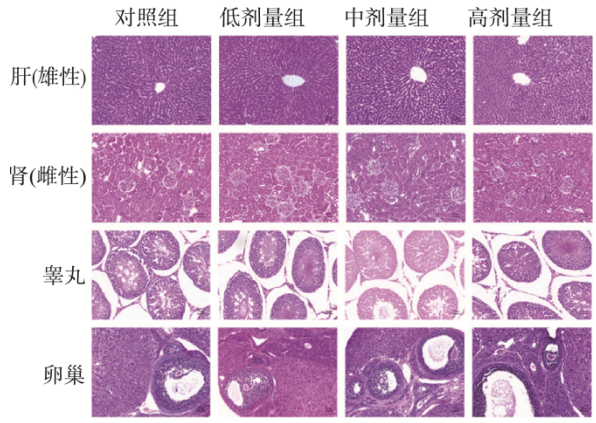


图 1　牛磺酸锌硒核桃乳对大鼠主要脏器病理组织学检查的影响(苏木精-伊红染色, ×200 倍)

Fig.1　Effects of taurine-zinc-selenium fortified walnut milk on histopathological examination of major organs in rats (hematoxylin and eosin staining, ×200)

3　结论与讨论

本研究以核桃乳为基料，复合添加牛磺酸、葡萄糖酸锌和富硒酵母等营养强化成分，通过急性经口毒性试验和 28 d 经口毒性试验系统评价其安全特性。

在急性经口毒性试验中，以牛磺酸锌硒核桃乳冻干粉最大可溶解浓度(0.36 g/mL)和可耐受的最大灌胃体积给予昆明小鼠，最终的剂量达到 18.0 g/(kg • bw)，相当于人体推荐摄入量的大约 40 倍；连续观察 14 d，所有试验动物均存活良好，未出现明显中毒症状或异常行为表现，主要脏器大体解剖未见病理性改变。根据急性毒性分级标准，属于实际无毒级。结果表明，此产品在极大剂量单次暴露下无急性毒性风险，初步证实了其作为日常摄入食品的安全性基础。

28 d 经口毒性试验，选用的是 SD 大鼠，高剂量组设定为受试物在灌胃条件下可实现的最大可行浓度和灌胃体积剂量设计，最终的剂量为 7.2 g/(kg • bw)，对应人体推荐摄入量的 16 倍；中、低剂量则分别为 8 倍和 4 倍，剂量设计能够体现剂量-反应关系。

既往研究表明，高水平锌摄入可出现恶心、呕吐、食欲减退等胃肠道症状影响体重[23]，而且长期高剂量补硒可能与糖代谢异常有关[24]。本研究结果显示 28 d 试验期间，各剂量组大鼠的生长状态良好，体重增长、摄食量和食物利用率与对照组无显著差异(P>0.05)，表明即使在最高剂量下也未见对动物生长发育和营养代谢产生不良的影响。

考虑到锌的长期补充会干扰铜代谢，进而发展为贫血、白细胞减少和中性粒细胞减少等情况，影响机体免疫功能[25–26]。同时，已有研究报道硒过量亦可引起贫血和出血、溶血等不良反应[27–28]。本研究中，各组间血液学参数与对照组相比，均未见统计学差异。需要指出的是，本研究未直接检测凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间等凝血相关指标，这是本研究的局限性。但整个试验过程中以及最终的解剖时，均未见皮下瘀点或内脏器官出血等提示凝血功能障碍的表现，间接提示在本研究条件下受试物未对凝血系统造成明显不良影响。

肝脏是牛磺酸、锌和硒的主要代谢器官，肾脏是营养素的主要排泄途径，长期过量锌和硒的摄入被报道可能引起肝脏损伤和伴随血清尿素、肌酐等指标升高的肾毒性[29–30]。28 d 经口毒性试验的血生化指标结果显示，肝脏 ALT、AST、ALP 等酶活性，以及总蛋白和白蛋白等肝功能相关指标、肝脏系数均未见随剂量增加而呈系统性偏离对照组的趋势。此外，各剂量组尿素、肌酐等肾功能指标均与对照组无差异，尿常规指标亦在正常范围内波动。肝肾组织病理亦未见与受试样品相关的病理改变。这些结果提示，即使在相当于人体推荐摄入量 16 倍的高剂量长期暴露条件下，牛磺酸、锌和硒的联合强化亦未产生可检测到的肝脏损伤和肾脏毒性。在血脂、血糖等代谢指标及电解质指标中，仅血清钠水平存在统计学差异，但该差异在性别和剂量分组间缺乏一致的变化趋势，且其数值总体仍处于正常生理范围内；结合其他脏器的组织病理学观察均未发现与受试物相关的病变或细胞损伤，认为牛磺酸锌硒核桃乳在本试验条件下未引起糖脂代谢或电解质平衡的生物学意义上紊乱。

值得注意的是，核桃乳作为一种富含脂质、植物蛋白及多酚类物质的食品基质，在强化了牛磺酸、锌及硒等营养成分后，各成分间可能发生物理化学相互作用，进而影响终产品的生物利用度及毒理学特征。然而，本研究的 28 d 经口毒性试验结果证实，各剂量组大鼠的肝肾功能及组织病理学均未见异常，且未观察到非预期的毒性反应。这表明，在当前的配方比例下，强化剂与基质间并未产生具有毒理学意义的有害代谢物或协同毒性。此外，根据《中国居民膳食营养素参考摄入量(2023 版)》，牛磺酸、锌和硒的可耐受最高摄入量(tolerable upper intake level, UL)分别为 3000 mg/d、40 mg/d 和 400 μg/d[31]。而在该产品推荐日摄入量 240 mL 下，上述 3 种营养素的摄入水平分别为 480 mg、9.6 mg 和 52.8 μg，仅为 UL 值的 13.2%~24.0%，均远低于人体每日耐受限值，这也进一步证实了牛磺酸锌硒核桃乳在推荐饮用量下的食用安全性。

因此，综合临床观察、血液学、血清生化指标，以及病理形态学结果，可判定牛磺酸锌硒核桃乳的未观察到有害作用的剂量水平(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)为 7.2 g/(kg • bw)/d，即本次试验的最高剂量，相当于人体推荐摄入量的 16 倍。

需要说明的是，本研究仅进行了 28 d 经口毒性观察，对于计划长期、每日摄入的营养强化食品而言，进行周期更长的 90 d 经口毒性试验的毒理学评价将能更充分地暴露

潜在的蓄积性毒性或慢性损伤。因此，未来的研究有必要补充凝血功能检测以提供直接证据，并开展 90 d 喂养试验，同时结合遗传毒性、生殖发育毒性等研究，以构建更为完整和系统的牛磺酸锌硒核桃乳安全性评价体系。

参考文献

[1] GONCALVES B, PINTO T, AIRES A, *et al*. Composition of nuts and their potential health benefits-an overview [J]. Foods, 2023, 12(5): 942.

[2] JARAI D, KOLLER A. Walnut consumption may contribute to healthy cardiovascular/endothelial function by maintaining membrane integrity [J]. Life (Basel), 2024, 14(11): 1426.

[3] MATES L, POPA DS, RUSU ME, *et al*. Walnut intake interventions targeting biomarkers of metabolic syndrome and inflammation in middle-aged and older adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(7): 1412.

[4] TAN B, WANG YX, ZHANG XD, *et al*. Recent studies on protective effects of walnuts against neuroinflammation [J]. Nutrients, 2022, 14(20): 4360.

[5] MUTHAIYAH B, ESSA MM, LEE M, *et al*. Dietary supplementation of walnuts improves memory deficits and learning skills in transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Journal of Alzheimer’s Disease, 2014, 42(4): 1397–1405.

[6] VALLS-PEDRET C, SALA-VILA A, SERRA-MIR M, *et al*. Mediterranean diet and age-related cognitive decline: A randomized clinical trial [J]. JAMA Internal Medicine, 2015, 175(7): 1094–1103.

[7] 尤佳伟, 陈芬, 刘媛, 等. 牛磺酸的功效及其在保健食品中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(24): 27–34.
YOU JW, CHEN F, LIU Y, *et al*. Research progress on the efficacy of taurine and its application in the health food [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(24): 27–34.

[8] SENEFF S, KYRIAKOPOULOS AM. Taurine prevents mitochondrial dysfunction and protects mitochondria from reactive oxygen species and deuterium toxicity [J]. Amino Acids, 2025, 57(1): 6.

[9] SHTILBANS A. Combination supplement therapy: A new frontier in treatment of neurodegenerative diseases [J]. The Journal of Nutrition, 2025, 155(9): 2811–2824.

[10] YAO JH, ORTEGA EF, PANDAA. Impact of zinc on immunometabolism and its putative role on respiratory diseases [J]. Immunometabolism (Cobham), 2025, 7(1): e00057.

[11] SHAHIDIN, WANG Y, WU YL, *et al*. Selenium and selenoproteins: Mechanisms, health functions, and emerging applications [J]. Molecules, 2025, 30(3): 437.

[12] SONG B, ZHANG MH, TANG SY, *et al*. Effects and impact of selenium on human health, a review [J]. Molecules, 2024, 30(1): 50.

[13] LEE JG, JANG JY, BAIK SM. Selenium as an antioxidant: Roles and clinical applications in critically ill and trauma patients: A narrative review [J]. Antioxidants (Basel), 2025, 14(3): 294.

[14] STILES LI, FERRAO K, MEHTA KJ. Role of zinc in health and disease [J]. Clinical and Experimental Medicine, 2024, 24(1): 38.

[15] KIOURI DP, CHASAPIS CT, MAVROMOUSTAKOS T, *et al*. Zinc and its binding proteins: Essential roles and therapeutic potential [J]. Archives of Toxicology, 2025, 99(1): 23–41.

[16] GENCHI G, LAURIA G, CATALANO A, *et al*. Biological activity of selenium and its impact on human health [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2633.

[17] VALI R, SHIRVANIAN K, FARKHONDEH T, *et al*. A review study on the effect of zinc on oxidative stress-related neurological disorders [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2025, 88: 127618.

[18] SUN Q, WANG JP, WANG HY, *et al*. Effect of long-term taurine supplementation on the lipid and glycaemic profile in adults with overweight or obesity: A systematic review and meta-analysis [J]. Nutrients, 2024, 17(1): 55.

[19] TOKARCZYK J, KOCH W. Dietary Zn-recent advances in studies on its bioaccessibility and bioavailability [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2025, 30(13): 2742.

[20] NOGUEIRA-DE-ALMEIDA CA, GUTIERREZ CAC, RAMOS LR, *et al*. Role of micronutrient supplementation in promoting cognitive healthy aging in Latin America: Evidence-based consensus statement [J]. Nutrients, 2025, 17(15): 2545.

[21] PEREIRA ME, SOUZA JV, GALICIOLLI MEA, *et al*. Effects of selenium supplementation in patients with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis [J]. Nutrients, 2022, 14(15): 3205.

[22] 国家市场监督管理总局. 市场监管总局关于发布《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则(2020 年版)》《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则(2020 年版)》《保健食品理化及卫生指标检验与评价技术指导原则(2020 年版)》的公告[EB/OL]. (2020-10-31) [2025-11-13]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxxgk/fdzdgknr/tssps/art/2023/art_d0c45ed1dc6d4ff4a7eb6bb9baac0bb1.html
State administration for market regulation. *Announcement on issuing the technical guiding principles for toxicological testing and evaluation of health foods and their ingredients* (*2020 edition*), *technical guiding principles for safety testing and evaluation of microbial strains used as health food ingredients* (*2020 edition*), and *technical guiding principles for testing and evaluation of physicochemical and sanitary indicators of health foods* (*2020 edition*) [EB/OL]. (2020-10-31) [2025-11-13]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxxgk/fdzdgknr/tssps/art/2023/art_d0c45ed1dc6d4ff4a7eb6bb9baac0bb1.html

[23] SAMMAN S, ROBERTS DC. The effect of zinc supplements on plasma zinc and copper levels and the reported symptoms in healthy volunteers [J]. The Medical Journal of Australia, 1987, 146(5): 246–249.

[24] STRANGES S, MARSHALL JR, NATARAJAN R, *et al*. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: A randomized trial [J]. Annals of Internal Medicine, 2007, 147(4): 217–223.

[25] POREA TJ, BELMONT JW, MAHONEY DHJ. Zinc-induced anemia and neutropenia in an adolescent [J]. The Journal of Pediatrics, 2000, 136(5): 688–690.

[26] 卿笃兴, 吴诚, 文利新, 等. 高锌毒性研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2009(3): 4–6.
QING DX, WU C, WEN LX, *et al*. Research progress on high zinc toxicity [J]. Hunan Journal of Animal Science & Veterinary, 2009(3): 4–6.

[27] 陈明涛, 陈一资. 微量元素硒对机体健康的影响[J]. 肉类研究, 2008(8): 12–16.
CHEN MT, CHEN YZ. Effect of the trace element selenium on the organism health [J]. Meat Research, 2008(8):12–16.

[28] 王晓楠, 李士泽. 雏鸡补硒过量引起的中毒[J]. 四川畜牧兽医, 2010, 37(6): 51–52.
WANG XN, LI SZ. Toxicity caused by excessive selenium supplementation in chicks [J]. Sichuan Animal & Veterinary Sciences, 2010, 37(6): 51–52.

[29] YANAGISAWA H, MIYAZAKI T, NODERA M, *et al*. Zinc-excess intake causes the deterioration of renal function accompanied by an elevation in systemic blood pressure primarily through superoxide radical-induced oxidative stress [J]. International Journal of Toxicology, 2014, 33(4): 288–296.

[30] LV Q, LIANG X, NONG K, *et al*. Advances in research on the toxicological effects of selenium [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2021, 106(5): 715–726.

[31] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量(2023 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
Chinese Nutrition Society. Chinese dietary reference intakes (2023 edition) [M]. Beijing: People’s Medical Publishing House, 2023.

(责任编辑：冯东慧 韩晓红)