

中国市售食品接触硅胶制品的细胞毒性评价

郭一凡, 张京伟, 范晓洁, 王文娟, 封棣*

(北京工商大学 轻工科学技术学院, 北京 100048)

摘要: **目的** 为了研究不同细胞毒性测试方法之间的差别, 本研究利用不同体外细胞毒性评价测试体系下的食品接触硅胶制品 (Food Contact Silicone Products, FCSPs) 的整体安全性进行研究。**方法** 样品在体积分数为 95% 的乙醇中模拟迁移 (70°C 保持 2 h) 后, 通过系统优化实验条件, 发展了 FCSPs 迁移液的细胞毒性评价方法。利用 HeLa (子宫颈癌细胞)-NRU、HeLa-CCK-8 (CellCountingKit-8, CCK-8)、HepG2 (Human Hepatoblastoma)-NRU、HepG2-CCK-8 共 4 种测试体系对中国市售的 19 种 FCSPs 进行了细胞毒性评价。**结果** 样品在不同测试体系下的细胞毒性结果不同, 其中 65% 的样品呈现中度毒性。**结论** FCSPs 的整体生物安全性亟须关注并深入研究。本研究为食品接触材料的体外生物测定提供了研究思路和科学依据。

关键词: 食品接触硅胶制品; 模拟迁移; 细胞毒性

中图分类号: TB487; TS206.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2023)19-0042-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2023.19.006

Cytotoxicity Evaluation of Food Contact Silicone Products Marketed in China

GUO Yi-fan, ZHANG Jing-wei, FAN Xiao-jie, WANG Wen-juan, FENG Di*

(School of Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

ABSTRACT: The work aims to study the overall safety of food contact silicone products (FCSPs) by different in vitro cytotoxicity evaluation and test systems to study the difference of different in vitro cytotoxicity test methods. After the samples were simulated in 95% ethanol at 70 °C for 2 h, the cytotoxicity evaluation method of FCSPs migration was developed by systematically optimizing the experimental conditions. Four test systems including HeLa-NRU, HeLa-CCK-8, HepG2-NRU and HepG2-CCK-8 were used to evaluate the cytotoxicity of 19 FCSPs marketed in China. The samples showed different cytotoxicity results under different testing systems. Among them, 65% of the samples showed moderate cytotoxicity. The overall biological safety of FCSPs needs urgent attention and in-depth study. This study provides research ideas and scientific basis for the in vitro bioassay of food contact materials.

KEY WORDS: food contact silicone products; simulated migration; cytotoxicity

食品接触硅胶制品 (Food Contact Silicone Products, FCSPs) 指各种适用于预期与食品接触或已接触食品的由硅橡胶制成的制品。作为食品接触材料 (Food Contact Materials, FCMs) 的一种, 由于性能优良, FCSPs 已广泛用于人们的日常生活中, 如模具、蒸盘/盒、杯、管、垫和密封件等。在与食

品接触过程中, 其中的化学物质可迁移至食品中, 从而给人体带来安全风险。FCSPs 在使用过程中化学物质迁移所引起的食品安全风险不容忽视。目前, FCSPs 的安全性研究仍主要集中在一些高风险化学物质及其迁移的相关研究, 如硅氧烷^[1-4]、重金属^[5-6]、芳香烃^[7]、N-甲基苯胺、N, N-二甲基苯胺、2,6-二叔

丁基对甲苯酚及苯并噻唑等^[8]。但是, 由于受分离分析技术的制约, 对硅胶制品中迁移物质的分析不可能是完整详尽的, 特别是非有意添加物质 (Non Intentionally Added Substances, NIAS) 来源复杂, 且部分 NIAS 化学结构不明, 使得对 NIAS 的识别和量化非常困难且耗时。此外, 在与食品接触过程中, 终产品中的多种化合物可同时迁移, 并共同作用于人体从而造成危害。因此, 考虑到单一物质及其迁移的化学分析研究, 无法评价终产品在使用过程中的整体安全性, 亟须采用体外生物学评价对终产品的整体安全性进行研究。

近年来, 作为化学分析的补充, FCMs 的体外生物测定已被广泛关注。体外生物测定法可以检测出不能通过化学分析或定量结构-活性关系 (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) 预测 FCMs 的潜在毒性, 能够提供 FCMs 化学迁移 (混合物) 的实际危险和质量评估的综合信息。其中, 细胞毒性评价是 FCMs 体外生物测定的基本方法, 也是遗传毒性以及内分泌干扰活性等研究的先行实验^[9-10]。FCMs 的细胞毒性评价方法可通过检测不同的毒性途径, 如细胞通透性损伤和细胞增殖破坏等来进行, 常见的方法有中性红摄入 (Neutral Red Uptake, NRU) 测定、噻唑蓝 MTT 或衍生物 MTS 测定、细胞中总蛋白质含量 (Total Protein Content, TPC) 测定、5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-Bromodeoxyuridine, BrdU) 掺入实验等^[11], 其中前 2 种是较为常用的方法。近年来, 对 FCMs 的细胞毒性测定已被应用于塑料^[12]、纸质^[13]、罐头涂层^[14]、纳米材料^[15-16]等 FCMs 化学迁移物的毒性评价, 但目前鲜见 FCSPs 迁移物的细胞毒性研究。

实验室前期已经使用 HeLa 细胞-中性红方法对 FCSPs 的细胞毒性进行了研究^[17], 在此基础上, 本研究考察了不同细胞系、不同细胞毒性测试方法、不同样品处理条件对细胞毒性的影响。通过系统优化实验条件, 发展了 FCSPs 的模拟迁移液的细胞毒性评价方法, 并利用 HeLa-NRU、HeLa-CCK-8、HepG2-NRU、HepG2-CCK-8 共 4 种测试体系对中国市售的 19 种 FCSPs 进行了细胞毒性评价。

1 实验

1.1 材料

测试材料: 通过市场及电商购买了 19 种硅胶厨具 (1 号、4~7 号、12 号、15~18 号为模具; 2 号、8~10 号为蒸盘; 3 号为马卡龙垫; 11 号为蒸盒; 13 和 14 号为刻度量杯; 19 号为伸缩杯)。

细胞株: 人宫颈癌细胞株 (HeLa) 和人肝癌细胞株 (HepG2), 由中日友好医院临床研究所提供。

阳性对照材料为有机锡作稳定剂的聚氯乙烯; 阴性对照材料为高密度聚乙烯。

1.2 主要试剂与耗材

主要试剂与耗材: 无水乙醇、二甲基亚砜, 均为分析纯, 北京化工厂; DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、磷酸盐 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 缓冲液 (1x), 北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶 (Trypsin)、青霉素/链霉素 (Penicillin/Streptomycin), Hyclone 公司; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 北京四季青生物科技有限公司; 中性红细胞增殖及毒性试剂盒, 上海碧云天生物科技有限公司; Cell Counting Kit-8 试剂盒, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.3 仪器与设备

主要仪器与设备: Axiovert 200 倒置显微镜, 蔡司光学仪器上海国际贸易有限公司; 细胞 CO₂ 培养箱, 上海鄂禾仪器有限公司; ME104E 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; LMQ.C-100E 高压灭菌锅, 济南存昌生物技术有限公司; TGL-2150 低温高速微量离心机, 四川蜀科仪器有限公司; TTL-DC1 水浴氮吹仪, 禾缘天地仪器 (北京) 科技有限公司; BIOBASE2001 型酶标仪, 山东博科科学仪器有限公司; HY-4 型振荡器, 常州市瑞华仪器制造有限公司。

2 生物学检测

2.1 样品处理

样品迁移液的制备: 样品用超纯水清洗、晾干、剪碎。准确称取 20 g (± 0.001 g) 样品至 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 体积分数为 95% 的乙醇, 盖紧塞子并用封口膜密封, 70 °C 下保持 2 h, 降至室温后将迁移液转移至氮吹管中使用高纯氮气将迁移液吹干, 加入 1 mL DMSO 复溶制成测试液, 将测试液保存于 4 °C 冰箱, 24 h 内进行细胞毒性实验。阴性和阳性对照样品用上述相同方法进行处理。

2.2 细胞培养、种板与暴露

细胞培养: 由体积分数为 10% 的胎牛血清、体积分数为 1% 的双抗 (青霉素和链霉素)、体积分数为 89% 的 DMEM 高糖培养液配制完全培养基。细胞在 CO₂ 体积分数为 5% 和温度为 37 °C 的二氧化碳培养箱中培养。

细胞接种: 选取显微镜下生长状态良好的细胞, 在超净台内经 PBS 缓冲液清洗、胰蛋白酶 (质量浓度为 0.25 g/mL) 消化、离心后 (1 800 r/min、5 min), 弃上清, 向离心管内加入适量完全培养基, 充分吹打混匀, 形成单细胞悬液; 使用细胞计数板对细胞悬液

进行计数,将密度调整到 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板中;设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和实验样品组,每孔中加入 100 μ L 细胞悬液,每组至少 6 孔;接种后的 96 孔板置于温度为 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数为 5%的培养箱中培养 24 h。

暴露:显微镜下观察 96 孔板中细胞长势,生长至 70%~80%即可进行下一步操作。弃去孔中原培养液,空白对照组加入体积分数为 1%的 DMSO,阴性对照组加入高密度聚乙烯测试液,阳性对照组加入有机锡作稳定剂的聚氯乙烯测试液,实验样品组加入用培养基稀释得到的 200、100、50、25、12.5 mg/mL 样品测试液。每孔接种 100 μ L,混合均匀,放回培养箱继续培养 24 h。

2.3 细胞毒性实验

NRU 检测:弃孔板中原培养液,用 PBS 洗涤细胞,随后加入 100 μ L 不含血清的 DMEM 细胞培养液,并加入 10 μ L 中性红染色液,在细胞培养箱内孵育;2 h 后去除孔板中含有中性红染色液的细胞培养液,用 PBS 溶液洗涤细胞 1~2 次;加入 100 μ L 中性红检测裂解液,在室温下,放置于平板摇床上,裂解 10 min 后取出,全自动酶标仪检测 540 nm 波长处的测吸光度。

CCK-8 检测:弃孔板中原培养液,参照 CCK-8 说明书进行实验,96 孔板每孔加入 CCK-8 和不含血清的 DMEM 培养液混合液 100 μ L (现配现用,CCK-8 与 DMEM 的体积比为 1:9),放回培养箱继续培养,2 h 后取出,在 450 nm 波长处测吸光度。

2.3.1 细胞毒性评价

各组细胞进行其相对增殖率(Relative Growth Rate, RGR)的计算,RGR 值为实验组平均吸光度值与空白对照组吸光度值之比的百分数。根据相关标准^[18],RGR 值对应的细胞毒性分级见表 1。

表 1 细胞毒性分级
Tab.1 Cytotoxicity grade

细胞毒性	毒性级别	RGR 值/%
无毒性	0 级	≥ 100
轻微毒性	1 级	80~99
轻度毒性	2 级	50~79
中度毒性	3 级	30~49
重度毒性	4 级	0~29

2.4 数据处理及统计学分析

应用统计学软件 SPSS20.0 进行数据统计处理,实验结果用平均值 \pm 标准差表示,组间差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示数据有显著性差异。应用

GraphPad Prism 8 软件进行半抑制浓度(Half Maximal Inhibitory Concentration, IC₅₀) 计算。

3 结果与分析

3.1 FCSPs 的模拟迁移条件

根据欧盟法规(EU) No 10/2011^[19]规定,一般采用蒸馏水作为水性食品模拟物,将体积分数 3%的乙酸作为酸性食品模拟物,体积分数 95%的乙醇作为脂类食品模拟物,体积分数 50%的乙醇作为乳类食品模拟物,模拟迁移的温度与时间依据样品实际使用温度和时间设定。在本研究中,由于样品种类丰富,检测量大,且样品形状不规则、薄厚不均,比表面积差异较大,因此最终选择相同质量的样品进行测试。考虑到“最严苛的使用条件(脂类食品接触)”和后续生物学实验检测相容性,最终选择体积分数 95%的乙醇作为本研究的食品模拟液。此外,根据法规和文献,选择 70 $^{\circ}$ C 持续 2 h 作为加速模拟的迁移条件^[3]。

3.2 不同处理条件对细胞毒性的影响

尽管近年来 FCMs 的细胞毒性研究越来越多,但 FCMs 的细胞毒性评价尚无标准可依。不同的实验条件可能导致不同的实验结果。因此,本研究考察了 1 号样品的料液比(制品与食品模拟液用量比例)、浓缩程度(氮吹至 1 mL 和氮吹至干)、复溶介质(DMSO 和体积分数为 95%的乙醇)、暴露时间(12、24、48 h)等不同处理条件对 HeLa 细胞 RGR 值的影响(NRU 检测)。

3.2.1 迁移比例对细胞毒性的影响

尽管欧盟法规(EU) No 10/2011^[19]规定在进行 FCMs 化学迁移研究时采用 6 dm² 材料接触 1 kg 的食品或食品模拟物,但在 FCMs 的细胞毒性研究中,采用的迁移比例不尽相同。如 Binderup 等^[20]用 150 mL 体积分数为 99%的乙醇回流提取 5 g 食品接触用纸;Mittag 等^[14]将 3 dm² 罐头涂层在 200 mL 体积分数为 95%的乙醇中模拟迁移;也有将 0.5 dm² 的塑料片浸入 100 mL 食品模拟物中的迁移过程^[21]。本实验将 20 g 样品及 20 mL 体积分数为 95%的乙醇(模拟液没过样品的最小体积)设料液比(g/mL)为 1:1,考察 3 种料液比(g/mL)(1:1、1:2、1:3)对细胞毒性的影响(图 1a)。结果表明,3 种料液比对 HeLa 细胞的 RGR 值不存在显著性差异,考虑实验效率(减少后期大体积浓缩时间)和成本,最终选择 20 g 样品在 20 mL 体积分数为 95%的乙醇中进行模拟迁移。

3.2.2 浓缩方式对细胞毒性的影响

已有研究中对进行细胞毒性实验的 FCMs 迁移液浓缩处理方式不同,如将乙醇迁移液干燥后用

DMSO 复溶^[14, 19], 或是乙醇提取液直接经过浓缩后上样^[13]。本研究探究了 2 种处理方式对细胞毒性的影响 (图 1b), 结果显示, 体积分数为 95% 的乙醇氮吹至干后加 1 mL 的 DMSO 复溶得到的 RGR 值显著低于体积分数为 95% 的乙醇氮吹至 1 mL 上样 ($P < 0.01$) 的 RGR 值。这可能是由于 DMSO 比体积分数为 95% 的乙醇具有更好的溶解性, 使得更多的物质作用于细胞而导致了更大的细胞毒性。考虑到更极端的迁移情况对细胞毒性的影响, 最终迁移液的浓缩方式选择为氮吹至干, 再加入 1 mL 的 DMSO 复溶。

3.2.3 复溶介质对细胞毒性的影响

体积分数为 95% 的乙醇和 DMSO 是 FCMs 细胞毒性实验中的常用溶剂^[13-14], 但细胞对两者的耐受程度不同。本研究分别考察了体积分数为 95% 的乙醇和不同体积分数的 DMSO (0、0.1%、0.25%、0.5%、1%、3%、5%、10%、20%) 下对细胞毒性的影响 (图 1c)。结果表明, 乙醇体积分数为 95% 并且 DMSO 体积分数在 0.5% 以内时, 对细胞无明显影响。但是当 DMSO 体积分数超出 0.5% 时, 随着体积分数的不断

增加, RGR 值逐渐呈下降趋势, 且当 DMSO 体积分数为 1% 时, RGR 值出现显著下降。DMSO 体积分数在 0.1%~1% 时, 细胞 RGR 值与对照组均无差异, 但是当体积分数超出 1% 时, 随着浓度的增加, RGR 值呈下降趋势, 且可以看到体积分数为 3% 时, RGR 值出现显著下降。这说明细胞对 DMSO 的耐受浓度比体积分数为 95% 的乙醇的耐受浓度高, 因此最终选择 DMSO 作为氮吹至干后的复溶介质, 且进行后续细胞实验时的浓度不大于 1%。

3.2.4 暴露时间对细胞毒性的影响

根据已有研究^[22]报道的细胞暴露时间, 本次研究考察了不同暴露时间 (12、24、48 h) 对细胞的毒性影响 (图 1d)。结果表明, 在迁移液中暴露 24 h 和 48 h 对 HeLa 细胞 RGR 值无显著性差异 ($P > 0.05$), 这与 Vlad-bubulact 等^[23]、Ezati 等^[24]的研究结果一致。根据已有标准^[25]规定, 细胞在迁移液中暴露 24 h 后可以确定细胞毒性反应。此外, 也有研究发现, 暴露于 FCMs 迁移液 48 h 后, 细胞对中性红摄取能力低于 24 h^[22]。本研究最终选择细胞在迁移液中暴露 24 h。

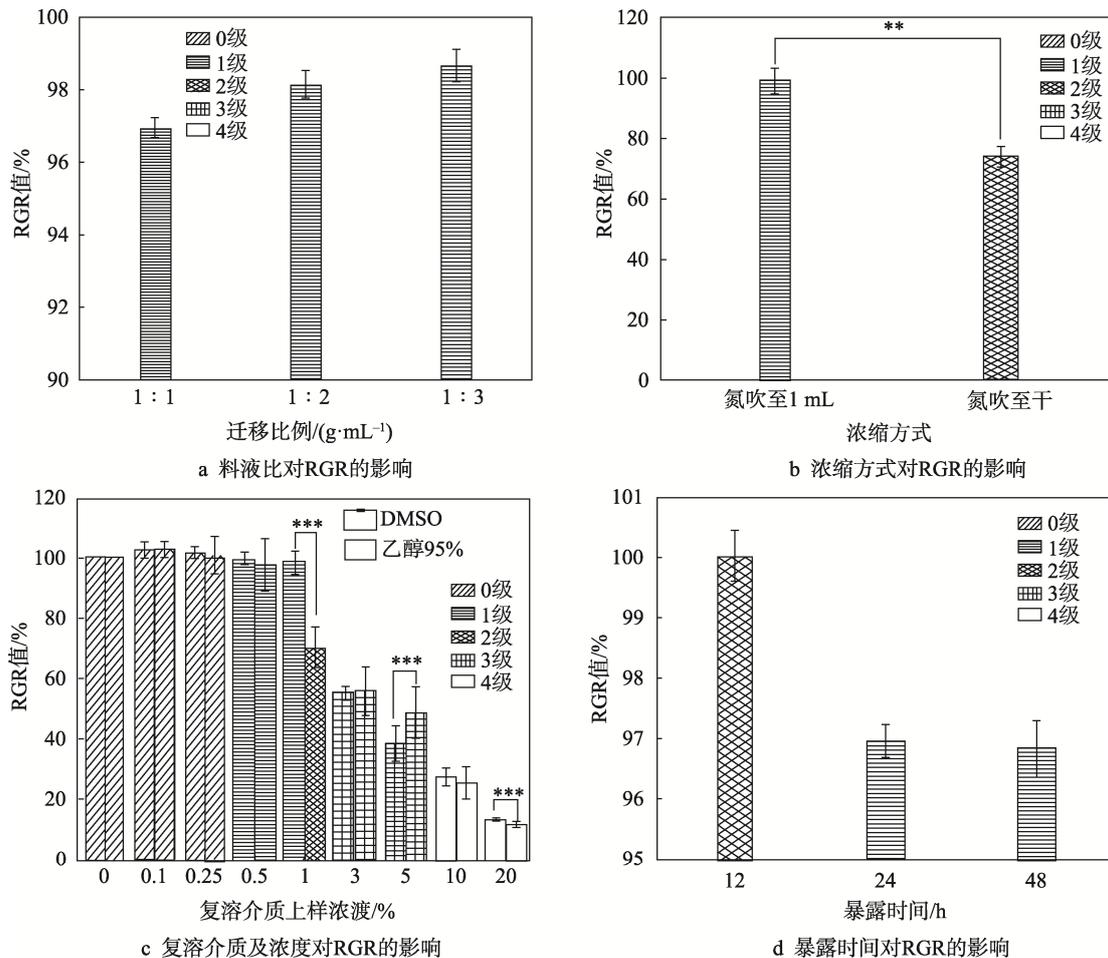


图 1 不同处理条件对细胞毒性的影响

Fig.1 Effects of different treatment conditions on cytotoxicity

注: *表示差异较显著, $P < 0.05$; **表示差异显著, $P < 0.01$; ***表示与空白对照组相比差异极其显著, $P < 0.001$ 。

3.3 食品接触硅胶制品迁移液的细胞毒性

分别利用NRU和CCK-8 2种测试方法,以及HeLa和HepG2 2种细胞构建了4种测试体系,即HeLa-NRU、HeLa-CCK-8、HepG2-NRU、HepG2-CCK-8,考察了19种FCSPs在不同质量浓度下(200、100、50、25、12.5 mg/mL)的细胞毒性。结果表明,4种测试体系中的阴性对照组RGR值大于80%,阳性对照组RGR值小于30%,说明测试体系均可靠。随着样品测试液浓度增大,其RGR值减小,细胞毒性增大,样品在HeLa-NRU测试体系中呈现剂量-效应关系,如图2中5号和7号样品所示。

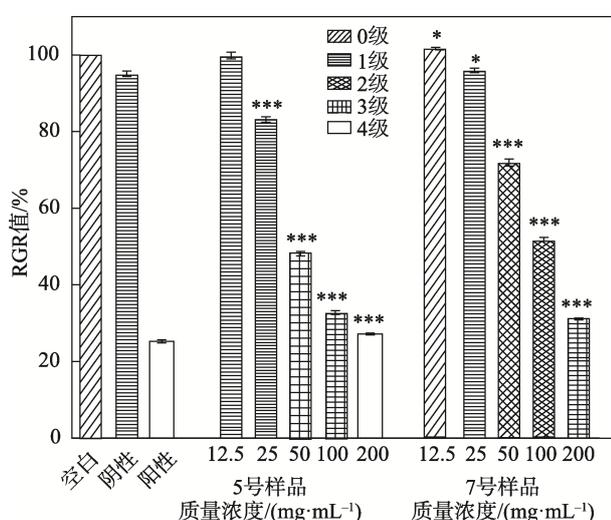


图2 5号和7号样品(迁移液)在不同质量浓度下对细胞毒性的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of samples 5 and 7 (migration) on cytotoxicity

注: *表示与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$); **表示与空白对照组相比差异极显著($P < 0.01$); ***表示与空白对照组相比差异极其显著($P < 0.001$)。

图3展示了19种样品在4种测试体系下的 IC_{50} 值。由图3可以看出,19种样品迁移液在4种测试体系下的细胞毒性结果差异较大。图4展示了19种样品在最高上样浓度(200 mg/mL)下,在4种测试体系得到的RGR值。

在HeLa-NRU测试体系下,19种样品的 IC_{50} 值为0.064(5号)~0.91 g/mL(15号),提示5号样品(模具)的细胞毒性最大,19号样品(伸缩杯)的细胞毒性最小。在200 mg/mL下,58%的样品(1、2、8、12~19号)的RGR值在57%~75%时,为细胞毒性2级;42%的样品(3~9、10、11号)的RGR值在27%~49%时,为细胞毒性3~4级。在HeLa-CCK-8测试体系下,10号样品(蒸盘)的细胞毒性最强, IC_{50} 值为0.095 g/mL。26%的样品(1、2、8、12、13号)的RGR值在55%~73%时,为细胞毒性2级;21%的样品(3、9~11号)的RGR值在30%~48%时,

为细胞毒性3级。

在HepG2-NRU测试体系下,19种样品的 IC_{50} 值为0.056(5号)~0.34 g/mL(16号),5号样品(模具)细胞毒性最大,与HeLa-NRU测试体系结果相同。37%的样品(3、8、12、16~19号)为细胞毒性2级,63%的样品(1、2、4~7、9~11、13~15号)为细胞毒性3级。在HepG2-CCK-8测试体系下,19种样品的细胞毒性最不敏感, IC_{50} 值为0.23 g/mL~8.21 g/mL,仅有3号样品(5%)的RGR值为75%,为细胞毒性2级,其余均为1级。总的来说,19种FCSPs中有1种样品(5号,模具)呈现重度毒性,12种样品(63%)在至少一种测试体系下呈中度毒性。

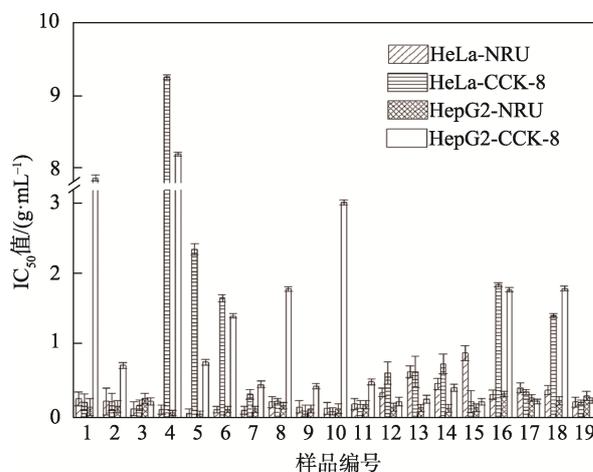


图3 19种FCSPs在不同测试体系下的 IC_{50} 值

Fig.3 IC_{50} of 19 FCSPs under different test systems

在本研究中,使用同一细胞(HeLa或HepG2细胞)进行NRU和CCK-8测试,同一样品在2种测试方法中结果不同,这与李雪等^[26]的研究结果一致。造成该结果的原因是这2种细胞毒性实验检测的毒性指标的差异。MTT经还原所产生的甲瓖产物不溶于水,需加入有机溶剂被溶解后才能检测,增加了工作量,而且溶解甲瓖的有机溶剂会损害人体健康。而CCK-8法克服了MTT法检测的不足之处,CCK-8试剂被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲瓖物,可直接进行测定,生成的甲瓖物的数量与活细胞的数量成正比^[27]。NRU实验是基于细胞对中性红的摄入能力来检测细胞增殖或细胞毒性的方法,主要对导致溶酶体破坏的细胞毒性反应灵敏^[28-29]。Weyermann等^[30]对这2种方法进行了比较,结果发现MTT比色法主要对影响线粒体酶活性的毒性反应敏感,NRU法主要对导致溶酶体破坏的细胞毒性反应灵敏。本研究结果表明,19种FCSPs无论是对HeLa细胞还是对HepG2细胞,NRU测试方法都比CCK-8测试方法更敏感。此外,在本研究中使用相同测试方法在HeLa和HepG2细胞中结果也不同,这可能是由

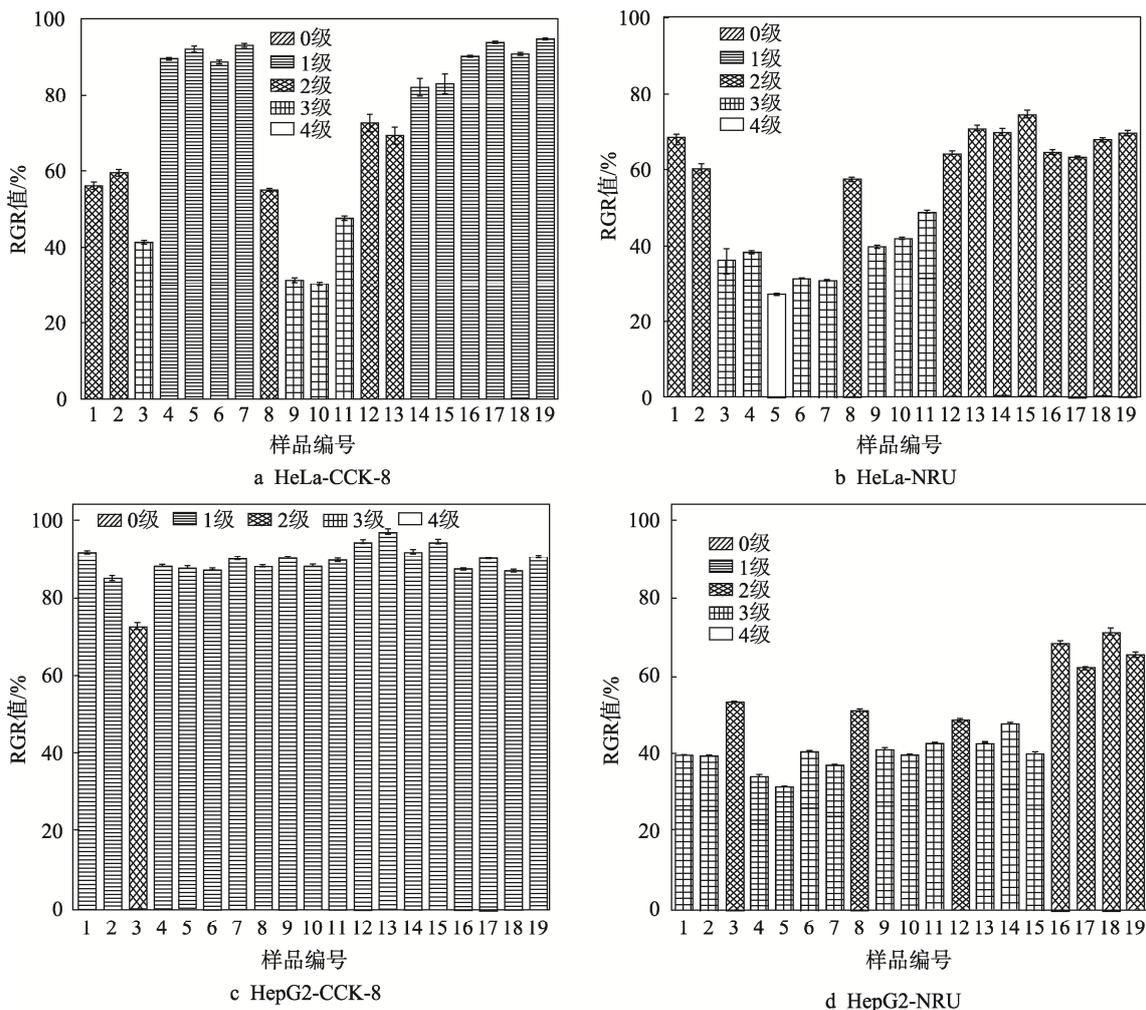


图 4 19 种 FCSPs 的细胞毒性 (200 mg/mL)
Fig.4 Cytotoxicity of 19 FCSPs (200 mg/mL)

于不同细胞对同一物质的耐受程度不同。已有报道指出不同的细胞毒性实验可能得出不同的结果,这取决于选择的受试系统和细胞毒性实验,因此多种测试方法或体系联用可以更全面地评价 FCMs 的细胞毒性^[30]。评价毒性作用机理尚不明确待检化合物时,应合理地选择样品浓度、细胞类型和检测生物学终点的评价指标或评价方法,综合评价 FCMs 迁移液混合物的毒性,以增加结果的可信度。

4 结语

作为化学分析的补充,体外生物检测可以确定混合迁移物危害和质量评估的综合信息。本文研究了不同测试体系下 FCSPs 细胞毒性的评价方法,为 FCSPs 以及其他 FCMs 的体外生物测定提供了研究思路和科学依据,为 FCMs 的安全评价体系提供重要的科学理论基础。样品在脂类食品模拟物(体积分数为 95% 的乙醇)中进行加速模拟迁移(70 °C 保持 2 h)后,利用 HeLa-NRU、HeLa-CCK-8、HepG2-NRU、HepG2-CCK-8 共 4 种测试体系对中国市售的 19 种

FCSPs 进行了细胞毒性评价。结果表明,不同的测试方法和不同的细胞导致不同的细胞毒性结果。19 种 FCSPs 中有 13 种(68%)在至少一种测试体系下呈中毒或重度毒性。推测 FCSPs 原料及添加剂中的重金属、硅氧烷、增塑剂和润滑剂等多种物质联合作用共同导致细胞毒性,因此,相关的体外生物安全性评价还需深入研究。总之,本研究为食品接触硅胶制品以及其他 FCMs 的生物安全性评价提供了研究思路和科学依据。

参考文献:

[1] GALBIATI E, TIETZ T, ZELLMER S, et al. Risk Assessment of Food Contact Materials II[J]. EFSA Journal, 2022, 20: 11.

[2] HELLING R, MIETH A, ALTMANN S, et al. Determination of the Overall Migration from Silicone Baking Moulds into Simulants and Food Using 1H-NMR Techniques[J]. Food Additives & Contaminants Part A,

- Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2009, 26(3): 395-407.
- [3] LIU Yi-qi, WRONA M, SU Qi-zhi, et al. Influence of Cooking Conditions on the Migration of Silicone Oligomers from Silicone Rubber Baking Molds to Food Simulants[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 128964.
- [4] 张喜荣, 王文娟, 戚冬雷, 等. P&T-GC-MS 法对食品接触硅胶奶嘴中 VMSs 的模拟迁移研究[J]. 包装工程, 2018, 39(15): 21-27.
- ZHANG Xi-rong, WANG Wen-juan, QI Dong-lei, et al. Simulated Migration of VMSS in Food-Contact Silicone Teats by Method of P & T-GC-MS[J]. Packaging Engineering, 2018, 39(15): 21-27.
- [5] 刘宜奇, 胡长鹰, 商贵芹, 等. 食品接触用硅橡胶中危害物迁移的研究进展[J]. 包装工程, 2020, 41(13): 48-55.
- LIU Yi-qi, HU Chang-ying, SHANG Gui-qin, et al. Advances on Migration of Hazardous Substances in Food Contact Silicone Rubber[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(13): 48-55.
- [6] 孙衍, 万峰, 禄春强, 等. 食品接触用硅橡胶中 8 种金属元素的迁移分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(24): 6420-6424.
- SUN Kan, WAN Feng, LU Chun-qiang, et al. Analysis of 8 Migratory Metal Elements in Food Contact Silicone Rubber[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(24): 6420-6424.
- [7] 王文娟, 蔡小芳, 袁航, 等. 食品接触硅橡胶制品中 9 种芳香烃的检测及安全风险评估[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 208-217.
- WANG Wen-juan, CAI Xiao-fang, YUAN Hang, et al. Detection and Safety Evaluation of 9 Aromatics in Food Contact Silicone Rubber Products[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 208-217.
- [8] 戚冬雷, 张喜荣, 王文娟, 等. 食品接触硅橡胶制品中 5 种高关注物质的分析[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 294-301.
- QI Dong-lei, ZHANG Xi-rong, WANG Wen-juan, et al. Analysis of 5 Substances of very High Concern (SVHC) in Food Contact Silicone Rubber Products[J]. Food Science, 2018, 39(20): 294-301.
- [9] GROH K, MUNCKE J. In Vitro Toxicity Testing of Food Contact Materials: State-of-the-Art and Future Challenges: In Vitro Toxicity Testing of FCMS[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(5): 1123-1150.
- [10] SEVERIN I, SOUTON E, DAHBI L, et al. Use of Bioassays to Assess Hazard of Food Contact Material Extracts: State of the Art[J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 105: 429-447.
- [11] 王文娟, 蔡小芳, 唐洁, 等. 体外生物测定法在食品接触材料安全性评价中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 277-284.
- WANG Wen-juan, CAI Xiao-fang, TANG Jie, et al. Application of in Vitro Bioassays in Safety Evaluation of Food Contact Materials: A Review[J]. Food Science, 2019, 40(15): 277-284.
- [12] GOGLIETTINO M, BALESTRIERI M, AMBROSIO R L, et al. Extending the Shelf-Life of Meat and Dairy Products via PET-Modified Packaging Activated with the Antimicrobial Peptide MTP1[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2963.
- [13] BRADLEY E L, HONKALAMPI-HÄMÄLÄINEN U, WEBER A, et al. The BIOSAFEPAPER Project for in Vitro Toxicity Assessments: Preparation, Detailed Chemical Characterisation and Testing of Extracts from Paper and Board Samples[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2498-2509.
- [14] MITTAG N, FÖRSTER S, HOPPE S, et al. Bioassay Guided Analysis of Migrants from Can Coatings[J]. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2006, 1(4): 345-353.
- [15] ALLAFCHIAN A, BALALI F, VAHABI M R, et al. Antibacterial and Cytotoxic Effects of Silver Nanoparticles Fabricated by Eryngium Billarderi Delar Extract[J]. Chemical Physics Letters, 2022, 791: 8.
- [16] BOUYON YENDA T, JIGUET-JIGLAIRE C, KHICHANE I, et al. Controlled Synthesis of Small Water-Soluble Hybrid Gold Nanoparticles: An Optimized Strategy for Stable Nano-Dispersion and Towards Cellular Uptake[J]. Frontiers in Mechanical Engineering, 2022, 8: 8.
- [17] FENG Di, LI Xue-yan, FAN Xiao-jie, et al. Cytotoxicity, Endocrine Disrupting Activity, and Chemical Analysis of 42 Food Contact Silicone Rubber Products[J]. The Science of the Total Environment, 2023, 872: 162298.
- [18] GB/T 16175—2008, 医用有机硅材料生物学评价试验方法[S].
- GB/T 16175—2008, Test Method For Biological Evaluation of Medical Silicone Materials[S].
- [19] EU No.10/2011, Plastic Materials and Articles Intended to Come into Contact with Food[S].
- [20] BINDERUP M L, PEDERSEN G A, VINGGAARD A

- M, et al. Toxicity Testing and Chemical Analyses of Recycled Fibre-Based Paper for Food Contact[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2002, 19: 13-28.
- [21] SÉVERIN I, LIONTI K, DAHBI L, et al. In Vitro Toxicity Assessment of Extracts Derived from Sol-Gel Coatings on Polycarbonate Intended to be Used in Food Contact Applications[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 93: 51-57.
- [22] MAISANABA S, LLANA RUIZ-CABELLO M, PICHARDO S, et al. Toxicological Assessment of Two Silane-Modified Clay Minerals with Potential Use as Food Contact Materials in Human Hepatoma Cells and Salmonella Typhimurium Strains[J]. *Applied Clay Science*, 2017, 150: 98-105.
- [23] VLAD-BUBULAC T, HAMCIUC C, RIMBU C M, et al. Fabrication of Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan Composite Films Strengthened with Titanium Dioxide and Polyphosphonate Additives for Packaging Applications[J]. *Gels*, 2022, 8(8): 16.
- [24] EZATI P, RHIM J W, MOLAEI R, et al. Carbon Quantum Dots-Based Antifungal Coating Film for Active Packaging Application Of Avocado[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2022, 33: 100878.
- [25] GB/T 16886.5—2017, 体外细胞毒性试验[S]. GB/T 16886.5—2017, Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity[S].
- [26] 李雪, 牛勇, 贾强, 等. 四种细胞毒性试验测定柴油机尾气颗粒物提取物急性毒性的比较[J]. *卫生研究*, 2013, 42(2): 221-227.
- LI Xue, NIU Yong, JIA Qiang, et al. Comparison of Four Cytotoxicity Tests to Determine the Acute Toxicity of the Extracts of Diesel Exhaust Particle[J]. *Health Research*, 2013, 42(2): 221-227.
- [27] 蔡文涛. MTT法和CCK-8法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(3): 305-310.
- CAI Wen-tao. The Comparison of MTT and CCK-8 by Detecting Cytotoxicity of Antiviral Active Components in Traditional Chinese Medicine[J]. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 2017, 39(3): 305-310.
- [28] CONTE F M, CESTONARO L V, PITON Y V, et al. Toxicity of Pesticides Widely Applied on Soybean Cultivation: Synergistic Effects of Fipronil, Glyphosate and Imidacloprid in HepG2 Cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2022, 84: 11.
- [29] TÜRKEZ H, ARSLAN M E, SÖNMEZ E, et al. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Boron Nitride Nanoparticles: Emphasis on Toxicogenomics[J]. *Cyotechnology*, 2019, 71(1): 351-361.
- [30] WEYERMANN J, LOCHMANN D, ZIMMER A. A Practical Note on the Use of Cytotoxicity Assays[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288(2): 369-376.

责任编辑: 曾钰婵