

论著

体内碱性彗星试验法检测纳米氧化锌遗传毒性

王宁¹, 张文众², 孙拿拿², 孙宇立¹, 邵乃敏¹, 刘君丽¹, 丁瑜¹, 董竞武¹, 于洲², 洪新宇¹

(1.上海市疾病预防控制中心, 上海 201611; 2.国家食品安全风险评估中心, 北京 100022)

摘要:目的 利用体内碱性彗星试验方法,检测长期给予纳米氧化锌颗粒(ZnO NPs)对大鼠的遗传毒性作用。方法 结合扩展一代生殖毒性试验,使用13周龄的亲代SD大鼠,经口每天灌胃给予ZnO NPs 0、7、50、350 mg/kg(纳米尺度分散状态最大浓度),记录体质量变化并观察。70 d后每个剂量组取亲代大鼠雌雄各10只处死后取乙二胺四乙酸抗凝全血,采用彗星试验试剂盒进行制片,用定量分析专业软件(Casp)进行彗星结果分析。结果 与溶剂对照组比较,雄性大鼠高剂量组外周血DNA损伤细胞率和尾部DNA含量百分比明显上升,分别为28.60%和(36.38±5.84)%,差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠高剂量组外周血DNA损伤细胞率和尾部DNA含量百分比明显上升,分别为27.31%和(18.80±2.96)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在350 mg/kg剂量下ZnO NPs体内碱性彗星试验结果阳性。

关键词: 纳米氧化锌; 体内碱性彗星试验; DNA损伤; 遗传毒性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)04-0320-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.04.004

Detection of genotoxicity of nano zinc oxide by alkaline comet assay *in vivo*WANG Ning¹, ZHANG Wenzhong², SUN Nana², SUN Yuli¹, SHAO Naimin¹,
LIU Junli¹, DING Yu¹, DONG Jingwu¹, YU Zhou², HONG Xinyu¹(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201611, China;
2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To detect the genotoxic effects of long-term administration of nano zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) particles on rats by using the alkaline comet assay *in vivo*. **Methods** In combination with the extended generation reproductive toxicity test, 13-week-old parental SD rats were administered orally with ZnO NPs at 0, 7, 50, and 350 mg/kg (maximum concentration of the nanoscale dispersion), and body weight changes were recorded and observed. After 70 days, 10 male rats and 10 female rats were taken from each dose group and sacrificed. Ethylene diamine tetraacetic acid anticoagulated whole blood was taken from each rat. The comet assay kit was used for tableting, and the result of comet analysis were analyzed by quantitative analysis software (Casp). **Results** Compared with the vehicle control group, peripheral blood DNA damage cell rate and tail DNA of the high-dose group of male rats increased significantly, which were 28.60% and (36.38±5.84)%, respectively ($P<0.05$). Peripheral blood DNA damage cell rate and tail DNA of the high-dose group of female rats increased significantly, which were 27.31% and (18.80±2.96)%, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** The result of alkaline comet assay in ZnO NPs were positive at 350 mg/kg group.

Key words: Zinc oxide nanoparticles; *in vivo* alkaline comet assay; DNA damage; genotoxicity

纳米氧化锌颗粒(zinc oxide nanoparticles, ZnO NPs)是一种应用前景广泛的多功能无机纳米材料,其具有粒径微小、比表面活性高、化学性质稳定等

特点,在橡胶制品、油漆涂料、化纤纺织、医学诊断和治疗等领域具有广泛的应用前景。随着人们与ZnO NPs接触的日益增多,有研究报告^[1-3]提出ZnO NPs可通过皮肤接触、呼吸吸入以及消化道摄入等多种途径进入人体,并能通过体循环分布到各种组织中,其对人类健康的潜在毒性影响需要引起高度关注。

体内彗星试验由于操作简便,灵敏度高,需要的样品量少,能与包括长期试验在内的不同试验相结合,耗时、耗费低,因而引起研究者的关注。2007

收稿日期: 2019-06-25

基金项目: 上海市卫生健康委员会高端海外研修团队项目-卫生毒理学(GWTD2015S03)

作者简介: 王宁 女 副主任医师 研究方向为卫生毒理学

E-mail: wangning@scdc.sh.cn

通信作者: 洪新宇 女 副主任医师 研究方向为卫生毒理学

E-mail: hongxinyu@scdc.sh.cn

年日本替代方法验证中心联合日本、美国和欧洲的十四家实验室,应用40种受试物对体内彗星试验进行联合验证,2014年9月经济合作与发展组织通过了关于哺乳动物碱性彗星试验的指导原则(TG489)^[4],这大大推动了彗星试验在遗传毒性领域的应用。目前,已有研究指出ZnO NPs对哺乳动物细胞可能存在遗传毒性,但也有研究结果显示ZnO NPs的毒性效应并不明显^[5-6],因此,本次研究结合扩展一代繁殖毒性试验,利用体内碱性彗星试验方法开展经口长期摄入ZnO NPs对大鼠遗传毒性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

BS224S型电子天平,CR21GII型高速离心机, JY92-IIN超声波细胞粉碎机(宁波新芝公司), JEM-2100透射电子显微镜(TEM,日本JEOL), Nano 90ZS纳米粒度仪(英国马尔文),彗星试验电泳系统(彗星实验专用电泳槽和配套设备,由国家食品安全风险评估中心提供),电泳仪(Biotek EPS-300-IIV,25 V 300 mA),4℃冰箱,水浴锅,荧光显微镜,100和10 μl可调加样器。

ZnO NPs(20 nm,干燥粉末状,纯度>99%,美国 Nanostructured & Amorphous Materials),胎牛血清(FBS,美国Gibco),彗星试验试剂盒(北京博乐通生物科技有限公司),葡萄糖、无水乙醇均为分析纯。

1.1.2 实验动物

无特定病原体(SPF级)健康成年SD大鼠,100只,雌雄各半,体质量180~220 g。由上海杰思捷实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2013-0006。实验动物饲养室温度20~25℃,相对湿度40%~70%。实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2013-0008。动物饲料由上海福贝宠物用品有限公司提供,登记证号:沪饲证(2014)04002。

1.2 方法

1.2.1 纳米颗粒的粒径和形貌表征

取少量待测样品的粉末置于Eppendorf管中,加入适量乙醇,使用超声仪超声30 min,取少量滴在300孔包覆碳膜的铜网上,室温下过夜干燥。样品在TEM下观察,照相,用Image J软件统计粒径大小及分布。

1.2.2 纳米颗粒在溶液中的粒径测量及稳定性分析

供试液制备:将5%葡萄糖溶液用蒸馏水10倍稀释,配制0.5%的葡萄糖溶液;量取38.8 ml的

0.5%葡萄糖溶液至50 ml离心管;称取1.400 g ZnO NPs于离心管中,摇匀;在冰浴条件下超声,400 W,2 min,3 s开3 s停;向离心管内加入自然解冻的胎牛血清(不可以放水浴加热加速解冻)1.2 ml;继续在冰浴条件下超声,400 W,1 min,3 s开3 s停。

动态光散射(DLS)测定各供试液配制后第1天和第7天的粒径及Zeta电势。在每次检测前超声30 s,工作温度为25℃,测量3次取平均值。

1.2.3 体内碱性彗星试验剂量设计和分组

经文献查询结果表明经口灌胃200~2 000 mg/kg BW ZnO NPs会发生大鼠体质量减轻和腹泻等症状^[4],且为了保持供试液表面离子的阴性状态,使得纳米粒子在供试液中不处于团聚状态,经多次样品配制试验且参考国家食品安全风险评估中心28 d毒性试验评价结果,本次大鼠扩展一代繁殖毒性试验的最高剂量设为350 mg/kg BW(在供试系统中能维持ZnO NPs非团聚状态的最高浓度)。按5倍梯度稀释,共设高、中、低三个剂量组,分别为350、50和7 mg/kg BW,另设一个溶剂组。用溶剂对照组的抗凝全血在紫外灯下照射10 min。

根据供试液DLS检测结果,每次只配制少于7 d的样品。配制完成的混悬液(35 mg/ml)可以放4℃冰箱保存一周,用前混匀;中剂量和低剂量可由高剂量稀释,稀释液为含3%胎牛血清的0.5%葡萄糖溶液。试验中的溶剂组即使用该稀释液。

1.2.4 体内碱性彗星试验

结合扩展一代生殖毒性试验,使用13周龄的亲代SD大鼠,经口每天灌胃给予ZnO NPs 0、7、50、350 mg/kg(纳米尺度分散状态最大浓度),记录体质量变化并观察。70 d后每个剂量组取亲代大鼠雌雄各10只处死后取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血,进行体内碱性彗星试验。

1.2.5 单细胞悬液制备

大鼠腹主动脉抗凝全血,采样后立即进行制片处理,减少间隔时间,并保证每个样品从取样到制片间隔时间一致。

1.2.6 样品的处理顺序

样品做平行处理,即不同剂量组动物随机选择或每组各一只依次采样,每张载玻片上各组样品依次或随机排放。

1.2.7 制片、裂解、解旋及电泳

取抗凝全血10 μl加入70 μl上样胶(1%低熔点琼脂糖)滴加在已经铺有第一层琼脂糖的彗星试验专用载玻片上,立即盖上盖玻片,置4℃10 min固化,移去盖玻片;再滴加70 μl上样胶作为第三层。每个标本制2~3张玻片,放置备用。裂解液用

前加热使其完全溶解,并提前放入4℃冰箱至少30 min。将玻片浸入预冷的细胞裂解液中,裂解液应没过玻片,放置于4℃冰箱避光裂解至少2 h(或过夜)。裂解完成后,从裂解液中取出载玻片,用纯水漂洗3次,去除过多的盐,每次5 min。将玻片置于水平电泳槽中,缓缓加入新鲜配制的电泳缓冲液($\text{pH} \geq 13$),使液面高于载玻片2 mm,把电泳槽置于4℃冰箱中,避光解旋30 min。取出电泳槽,调节电压为25 V,电流300 mA,电泳30 min。电泳完毕,取出载玻片,用中和缓冲液漂洗3次,每次5 min。 -20°C 预冷的无水乙醇脱水10 min,空气中自然干燥。在室温下储存,直到进行评估。

1.2.8 染色、拍照和分析

滴加 Gelred 荧光染料避光染色,约2 min。在荧光显微镜下,用适当放大倍数(100、200倍)阅片。选择玻片同一密度的几个区域,以确保没有重叠的尾,避免在玻片的边缘进行评估。可以观察到DNA碎片从细胞的“头”移到“尾”,彗头为圆形、边缘光滑整齐,彗尾紧随彗头之后,呈散点状拖尾。彗星拖尾的长度与DNA的损伤程度相关。对所有玻片进行独立编码和盲号阅片。用Casp专业软件定量分析。每个动物随机分析50个细胞,计出拖尾细胞数,同时将尾部DNA取均值,再做组间比较。

1.3 统计学分析

数据统计分析采用SPSS 19.0分析软件,先对数据进行正态性和方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析进行总体比较,发现差异再用Dunnnett法进行多个剂量组与一个对照组均数间的两两比较。若方差不齐,则采用不要求方差齐性的Dunnnett T3检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。所有数据均以均值 \pm 标准差表示。

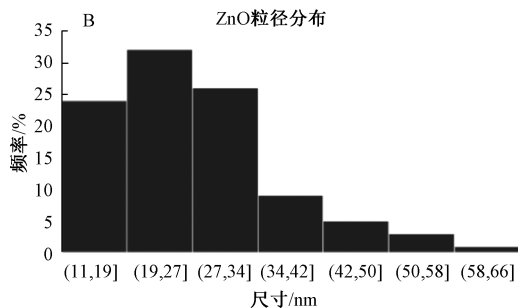
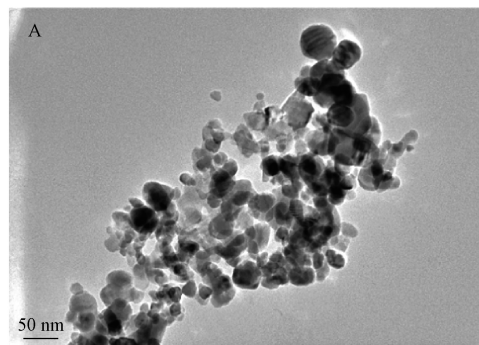
2 结果

2.1 ZnO NPs的粒径及形貌特征

ZnO NPs的粒径表征TEM结果见图1。使用Image J软件对5张TEM图片中随机选取的100个纳米颗粒的粒径计算结果显示,ZnO NPs的形状为颗粒性,理论尺寸为20 nm,平均粒径为 (26.60 ± 10.36) nm,最大值为60.90 nm,最小值为11.05 nm,主要集中在11~34 nm。

2.2 ZnO NPs在溶剂中的粒径尺寸及稳定性

ZnO NPs的DLS测定结果见表1和图2。结果显示,ZnO NPs在供试液有一定程度的团聚,但仍能维持在较小的粒径范围内,且7 d内稳定性均较好。



注:A为ZnO NPs的TEM照片;B为粒径分布情况

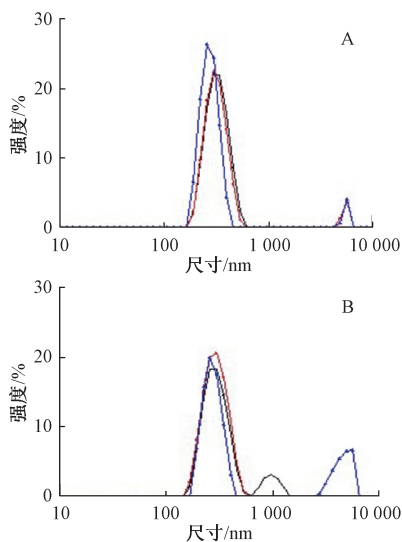
图1 ZnO NPs的形貌及分布

Figure 1 Morphology and distribution of ZnO NPs

表1 ZnO NPs在溶剂中的粒径尺寸及稳定性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Particle size and stability of ZnO NPs solvents

物质	粒径/nm		Zeta电势	
	第1天	第7天	第1天	第7天
ZnO NPs	402.5 ± 5.8	404.0 ± 29.7	-9.3 ± 2.9	-13.2 ± 0.4



注:A为ZnO NPs供试液第1天结果;B为ZnO NPs供试液第7天结果

图2 ZnO NPs DLS测定结果

Figure 2 ZnO NPs DLS measurement results

2.3 大鼠体质量变化及毒性体征观察

灌胃染毒期间,溶剂对照组及ZnO NPs各染毒组大鼠无明显毒性体征,体质量均增加,增长趋势见图3。随着染毒时间的增长,高剂量组ZnO NPs

造成大鼠体质量增长减慢,但与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

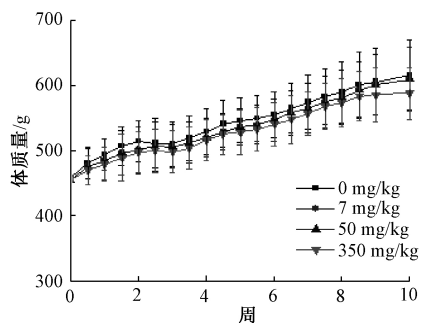


图3 ZnO NPs 经口染毒 70 d 大鼠体质量变化

Figure 3 Changes of body weight of ZnO NPs in oral administration for 70 days

表2 ZnO NPs 染毒对大鼠血细胞 DNA 损伤的影响

Table 2 Effects of ZnO NPs on DNA damage in rat blood cells

剂量 /(mg/kg)	观察细胞数		DNA 损伤细胞数		DNA 损伤率/%		尾部 DNA 含量百分比/%	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0	504	507	67	65	13.29	12.82	10.72±2.11	6.84±1.53
7	506	503	98	72	19.37	14.31	17.32±2.77	13.25±2.68
50	504	504	114	103	22.62	20.43	17.49±2.84	14.04±1.92
350	500	509	143	139	28.60*	27.31*	36.38±5.84*	18.80±2.96*

注: * 为与溶剂对照组(0 mg/kg)比较, $P<0.05$

3 讨论

ZnO NPs 是一种使用广泛的纳米材料,由于其具有多种生物效应,在各个领域的使用不断增加。无论在体外还是在体内,小尺寸决定大的比表面积,赋予 ZnO NPs 极高的反应活性,能影响与生物大分子的相互作用、细胞的摄取方式以及在体内的分布情况,从而也可能导致常规锌不具有的毒副作用。纳米材料毒性与粒径大小和形状有着重要关联,FERNÁNDEZ 等^[7]发现 ZnO NPs 比粗颗粒状的氧化锌毒性更大,但由于纳米材料具有独特的理化性质,其毒性可能与超细颗粒或细微颗粒毒性迥异,在何种程度上可以进行外推,两者间是否存在规律仍是个有争议的问题。正是由于纳米材料的粒度分布、尺寸大小与小尺寸效应密切相关的缘故,纳米材料的粒度尺寸分布就成为了表征纳米材料特性最重要的指标之一^[8]。

目前,纳米材料粒度分析的方法和仪器种类有很多,TEM 是分析纳米颗粒粒径和形态最高效的手段之一^[9]。ZnO NPs 的 TEM 显微照片显示这些颗粒彼此分离,形态均一且具有轮廓清晰的球状外貌,其粒径平均值为 26.6 nm,80% 的颗粒粒径分布在 11~34 nm,由此表明本次试验所使用的 ZnO NPs 粒径分布在一个比较狭窄的范围内,且大小均匀,适合用于后续的试验开展。除了粒径尺寸表征分析外,材料的结构表征也很重要^[10]。

2.4 体内碱性彗星试验结果

ZnO NPs 350 mg/kg 组体内碱性彗星试验,与溶剂对照组比较,雄性大鼠高剂量组外周血 DNA 损伤细胞率和尾部 DNA 含量百分比上升,分别为 28.60% 和 (36.38±5.84)%,差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠高剂量组外周血 DNA 损伤细胞率和尾部 DNA 含量百分比上升,分别为 27.31% 和 (18.80±2.96)%,差异有统计学意义($P<0.05$);其余 ZnO NPs 剂量组指标差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。阳性对照组雄性和雌性大鼠外周血 DNA 损伤细胞率均为 49.50%,尾部 DNA 含量百分比分别均为 (98.86±3.18)%,高于溶剂对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

考虑到在日常使用过程中,纳米粒子均不会以单独的分散形态存在,而是会被加入到其他溶剂或材料中,以相对聚集的形态存在。一旦纳米材料发生聚集,其理化特性将发生改变,因此,纳米材料的聚集状态对于它可能存在的潜在毒性也起着重要的作用。本次试验分析了 ZnO NPs 配制在溶剂中的颗粒大小及 Zeta 电势。结果显示,ZnO NPs 均能稳定的维持在一个较小的尺寸范围内,且 Zeta 电势为负数。结合本试验结果并参考受试 ZnO NPs 的各项数据,认为该 ZnO NPs 适合进行后续的各项毒理学试验研究。

ZnO NPs 可引起淋巴细胞、骨髓细胞、肝细胞等多种细胞的 DNA 损伤,具有一定的遗传毒性^[11-13],但是,体内试验环境与体外试验有很大的不同,结果的外推受到一定的限制。体外研究结果显示,人表皮细胞(A431)^[14]加入 30 nm 氧化锌(0.001、0.008、0.08、0.8、5 μg/ml)染毒 6 h,发现 0.8 μg/ml 浓度组 ZnO NPs 可引起 A431 细胞 DNA 损伤,表现为 Olive 尾距 [(2.13±0.12) nm] 相比对照组 [(1.37±0.12) nm] 增加($P<0.05$);另一项使用原代人鼻黏膜细胞的体外彗星试验^[15],用 ZnO NPs 处理细胞(0.01~50 μg/ml) 24 h,10 和 50 μg/ml 组 ZnO NPs 可引起细胞 DNA 损伤($P<0.05$),而微米级的氧化锌(<5 μm)未引起原代人鼻黏膜细胞毒性和 DNA 损伤。在体内研究方面,SHARMA 等^[16]通过小鼠单细胞彗星试验发现 300 mg/kg 的 ZnO NPs

对肝细胞造成了DNA损伤,而对肾细胞没有损伤;PATI等^[17]则通过小鼠骨髓及红细胞微核试验证实200和500 mg/kg的ZnO NPs均造成DNA损伤,该损伤可能是由氧化应激引起的。本次研究直接采集了长期试验中各剂量组大鼠的全血进行血细胞的彗星试验,研究结果表明,与溶剂对照组比较,ZnO NPs 350 mg/kg组体内碱性彗星试验雄性和雌性大鼠外周血DNA损伤细胞数均有增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);雄性和雌性大鼠高剂量组细胞尾部DNA含量百分比也均有明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);因此,在350 mg/kg剂量下ZnO NPs引起大鼠外周血细胞和多种体细胞DNA损伤,提示可能具有潜在的遗传毒性作用,本研究为以后进一步开展ZnO NPs安全性评估的更长期研究及致癌研究提供基础数据。

参考文献

- [1] MIRZAEI H, DARROUDI M. Zinc oxide nanoparticles: biological synthesis and biomedical applications[J]. *Ceram Int*, 2017, 43(1): 907-914.
- [2] WANG J P, MENG F R, FAN L X, et al. Synthesis of hydrogel polymer coated ZnO nanoparticles and their decontaminating effect against soman *in vitro* [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2018, 32(2): 119-124.
- [3] HE X P, YANG P F, KUANG H J, et al. Application and security of nano zinc oxide in food field[J]. *J Food Safety Qual*, 2016, 7(11): 4525-4530.
- [4] OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In vivo* mammalian alkaline comet assay[S/OL]. 2016 [2019-05-29]. <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
- [5] 王盼雪,王雪杰,田露. 纳米金属氧化物在食品领域的应用及安全性进展[J]. *食品科技*, 2019, 44(2): 295-301.
- [6] 陈丽,李喜宏,胡云峰,等. 富士苹果PVC/TiO₂纳米保鲜膜研究[J]. *食品科学*, 2001, 22(7): 74-76.
- [7] FERNÁNDEZ D, GARCÍA-GÓMEZ C, BABÍN M. *In vitro*

- evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells[J]. *Sci Total Environ*, 2013, 452-453(2): 262-274.
- [8] CARRÉ-RANGEL L, ALONSO-NUÑEZ G, ESPINOZA-GÓMEZ H, et al. Green synthesis of silver nanoparticles: effect of dextran molecular weight used as stabilizing-reducing agent[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(12): 9849-9855.
- [9] AN Y J, LOHSE S E, MURPHY C J. Tuning cellular response to nanoparticles via surface chemistry and aggregation[J]. *Small*, 2014, 10(8): 1642-1651.
- [10] TRIPATHY N, HONG T K, HA K T, et al. Effect of ZnO nanoparticles aggregation on the toxicity in RAW 264.7 murine macrophage[J]. *J Hazard Mater*, 2014, 270(1): 110-117.
- [11] DEMIR E, CREUS A, MARCOS R. Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2014, 77(21): 1292-1303.
- [12] ROY R, KUMAR D, SHARMA A, et al. ZnO nanoparticles induced adjuvant effect via toll-like receptors and Src signaling in Balb/c mice[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(3): 421-433.
- [13] 关荣发,陈潇婷,芮昶,等. 纳米氧化锌对人正常肝细胞DNA及染色体的损伤作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2): 237-241.
- [14] SHARMA V, SHUKLA R K, SAXENA N, et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells[J]. *Toxicology Letters*, 2009, 185(3): 211-218.
- [15] HACKENBERG S, SCHERZED A, TECHNAN A. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells *in vitro* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(3): 657-663.
- [16] SHARMA V, SINGH P, PANDEY A, et al. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles [J]. *Mutat Res*, 2012, 745(1/2): 84-91.
- [17] PATI R, DAS I, MEHTA R K, et al. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150(2): 454-472.

· 资讯 ·

欧盟评估枯草芽胞杆菌 DSM 28343 作为牛犊饲料添加剂的有效性

2019年7月23日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,欧盟动物饲料添加剂和产品就枯草芽胞杆菌DSM 28343作为牛犊饲料添加剂的有效性发表意见。

据了解,枯草芽胞杆菌DSM 28343是枯草芽胞杆菌单一菌株的活孢子制剂。2018年,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就枯草芽胞杆菌DSM 28343作为犊牛饲料添加剂的安全性和有效性发表了科学意见,但由于缺乏数据,FEEDAP小组无法在申请人提议的使用条件下得出该添加剂的有效性。目前经过评估,FEEDAP小组得出结论,在拟议的使用限量下,枯草芽胞杆菌DSM 28343作为肠道菌群稳定剂可能对牛犊饲养有效。

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2019/07/527702.html>)