

南极磷虾煮虾和虾粉的急性毒性研究

赵守涣,杨靖亚*,汪之和,宋书杰,孙立春

(上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:目的:通过急性毒性实验,初步了解南极磷虾煮熟的整虾和虾粉的安全性。方法:24h内喂食由南极磷虾和虾粉制成的受试物样品,对照组喂食SPF鼠粮。连续观察7d以及相关记录。结果:煮虾和虾粉制作的样品水分含量分别为14.14%和15.47%,灰分含量分别为12.54%和10.93%,样品脂肪含量为15.95%和2.56%,干重氟含量分别为1399.84mg/kg和186.77mg/kg;7d观察,小鼠无死亡均属正常情况,实验组小鼠体重和对照组无明显差异;鼠粮、煮虾和虾粉的小鼠原样最大给样量分别是290.89、599.04、62.71g/kg,折算成70kg成人剂量分别为32.73、64.22、7.18g/kg;煮虾组的肝脏系数与对照组有极显著差异($p<0.01$),其他均无显著差异。结论:小鼠对南极磷虾煮虾和虾粉的最大耐受量分别大于599.04g/kg和62.71g/kg,而南极磷虾煮虾可能对肝脏有损伤,其安全性需亚慢性实验进一步研究。

关键词:南极磷虾,急性毒性实验,最大给样量,最大耐受量

Study on acute toxicity of boiled Antarctic Krill and shrimp powder

ZHAO Shou-huan, YANG Jing-ya*, WANG Zhi-he, SONG Shu-jie, SUN Li-chun

(Food Science and Technology College of Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Objective: An acute toxicity test was used to obtain a preliminary understanding of the safety of boiled Antarctic Krill and shrimp powder. Methods: Lab mice were classified into three categories. Two tested ones were fed with samples made by boiled Antarctic Krill and shrimp powder respectively and the controlled ones were fed by SPF mice food. Seven consecutive days of observation and relevant record were needed. Results: Moisture content of samples, made by boiled Antarctic Krill and shrimp powder, were 14.14% and 15.47%, respectively, ash content were 12.54% and 10.93%, respectively. Furthermore, crude fat content of dry samples were 15.95% and 2.56%, respectively. And fluoride level were 1399.84mg/kg and 186.77mg/kg, respectively. After seven consecutive days of observation, there were no death cases. In fact, all the mice were normal. To conclude, there was no significant difference between the tested and controlled mice. The original maximum given dose of SPF mice food, boiled Antarctic Krill and shrimp powder were 290.89, 599.04g/kg and 62.71g/kg, respectively. The converted adult doses were 32.73, 64.22g/kg and 7.18g/kg, respectively. There was highly significant difference ($p<0.01$) between liver coefficient of tested and controlled mice, and there was no significant difference between others. Conclusion: The maximum tolerance dose of boiled Antarctic Krill and shrimp powder were above 599.04g/kg and 62.71g/kg, respectively. The safety of boiled Antarctic Krill needs further subchronic research as it may be harmful to liver.

Key words: Antarctic Krill; acute toxicity test; maximum given dose; maximum tolerance dose

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)08-0352-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.072

南极磷虾(*Euphausia superba*),又名南极大磷虾或者大磷虾,节肢动物门、甲壳纲、磷虾目^[1]。南极磷虾以浮游植物为食物,一般体长可达6cm,质量约2g,可存活6年。南极磷虾资源蕴藏量约8亿吨,是人们可以利用的蕴藏量最为丰富的物种之一^[2]。另外南极磷虾的营养丰富,富含蛋白质,还富含各种必需氨基酸、亚油酸、亚麻酸等多不饱和脂肪酸和一些矿物质

元素^[3]。但是,南极磷虾具有富集氟的特性。有资料显示,南极磷虾整虾的总氟含量为2400mg/kg,头胸部总氟含量为4260mg/kg,甲壳总氟含量为3300mg/kg,肌肉总氟含量为570mg/kg^[4],对机体产生一定程度的危害,因此南极磷虾未得到大规模的开发利用。本文进行了南极磷虾受试物的急性毒性实验,观察短期毒性,做出受试物的毒理学安全性评价,为进一步研究南极磷虾的安全性和大规模开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

南极磷虾 2012年捕于南极海域48.2区,在-20℃冷冻保藏;南极磷虾虾粉 购于山东科芮尔生物制品有限公司;实验动物 昆明种小鼠,雄雌各半,由

收稿日期:2013-08-05 * 通讯联系人

作者简介:赵守涣(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:海洋生物制药。

基金项目:国家高新技术研究发展(863)计划海洋技术领域主题项目(2011AA090801)。

上海复旦大学提供;SPF级鼠粮 购于江苏省协同医药生物工程有限责任公司;硫酸、盐酸、乙醚等试剂 均为分析纯。

JA1003B光电分析天平 上海越平科学仪器有限公司;DHG-9140A烘箱 上海慧泰仪器制造有限公司;KGL-1200-5马弗炉 上海司阳精密设备有限公司;I10实验室超细匀浆机 上海依肯机械设备有限公司;PHS.3C精密pH计、氟离子选择电极 上海精密科学仪器;TD5002A电子天平 潍坊三水检验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凝固剂琼脂粉溶液的配制 称取100g琼脂粉置于250mL的三角瓶中,加入100mL的去离子水并95℃下加热30min,不停的搅拌加速溶解,60℃水浴保存,用于下一步样品的成型。

1.2.2 南极磷虾煮虾受试物样品制备 称取一定质量的南极磷虾,常温(用流动自来水)解冻2h,匀浆机145W功率下加工10min,加入占总质量1%的上述琼脂粉溶液烧杯内搅拌,电磁炉沸水煮制0.5h后放置于一次性培养皿塑料模型中,40℃烘箱中干燥,样品凝固成型时取出称重,0℃冷藏,待喂小鼠。

1.2.3 南极磷虾虾粉受试物样品制备 称取一定质量的虾粉,常温(用流动自来水)解冻2h,加入1%质量的上述琼脂粉溶液烧杯内搅拌,电磁炉沸水煮制0.5h后放置于40℃烘箱干燥,样品凝固成型时取出称重,0℃冷藏,待喂小鼠。

1.2.4 检测方法

1.2.4.1 水分含量 采用国标(GB/T5009.3-2010)直接干燥法测定。

1.2.4.2 脂肪含量 采用国标(GB/T5009.6-2003)索氏抽提法测定。

1.2.4.3 灰分含量 采用国标(GB/T5009.4-2003)马福炉550℃灼烧法测定。

1.2.4.4 氟含量 采用国标(GB/T5009.18-2003)氟离子选择电极法测定。

1.2.5 急性毒性实验 参照经典的急性毒性实验方法,进行南极磷虾煮虾受试物和虾粉受试物的急性毒性实验^[5-8],24h内多次喂食小鼠受试物加工成的样品,记录小鼠的一般情况,并做相关计算,做出毒理学安全性评价。

在进行正式实验之前,首先进行预实验以便为正式实验提供依据。预实验中,选取昆明种小鼠12只,体重18~25g,随机分为3组(煮虾组、虾粉组、对照组),每组4只,雄雌各半,在禁食不禁水12h后,喂食制成按1.2.2和1.2.3中方法制作成的受试物样品,对照组喂食SPF鼠粮,24h内小鼠自由摄食,观察小鼠的体重、活动、饮食、毛发、大小便以及死亡情况。如死亡率≥30%,则测定半数致死量(LD₅₀);如不足以引起死亡,则采用最大耐受量法,即先求出最大给样量,以推测最大耐受量范围。

1.2.5.1 小鼠一般反应情况的确定 昆明种小鼠60只,随机分成三组:煮虾组、虾粉组、对照组,每组20只,雌雄各半。24h内喂食由样品制成的饲料,连续观

察7d,详细记录小鼠的活动、饮食、毛发、大小便以及死亡情况。

1.2.5.2 小鼠体重变化 小鼠实验前,TD5002A电子天平称量小鼠体重,精确到0.01g,实验后,连续观察7d,详细记录小鼠的体重。

1.2.5.3 最大给样量的确定 根据24h内小鼠摄食的总样品量,以及样品制作前后的质量比,计算出最大给样量。最大给样量计算公式如下所示,当南极磷虾煮虾和虾粉均为100.00g时,制作出的煮虾和虾粉样品成品的质量分别为19.57g和109.89g,代入下列公式计算最大给样量。

煮虾/虾粉最大给样量(g/kg)=[24h内小鼠进食的煮虾/虾粉样品总量(g/kg)×小鼠体重(g)×a]/[小鼠体重(g)×b]

其中,a为原样南极磷虾煮虾或虾粉质量(g),b为制作成煮虾和虾粉饲料样品成品的质量(g)。

1.2.5.4 成人转化剂量 小鼠对南极磷虾煮虾和虾粉的最大进食量,按照系数折算法折算成70kg成人的剂量,小鼠的原样剂量(g/kg)=X(g/kg)×70(kg)×0.0026/Y(g),则X(g/kg)=小鼠的原样剂量(g/kg)×Y(g)/182,其中X(g/kg)为70kg成人的剂量,Y(g)为小鼠体重;70kg成人剂量中含量(mg)=[70kg成人剂量(g/kg)×70kg×原样中氟含量(mg/kg)]/1000。

1.2.5.5 小鼠脏器观察和脏器系数计算 7d后解剖,对小鼠器官进行大体检查,并将重要器官和组织用冰生理盐水清洗干净,滤纸吸去多余水分,称重并进行固定保存。计算小鼠的脏器系数,脏器系数(%)=脏器重量(g)/小鼠体重(g)×100。

1.3 实验数据统计方法

所有的数据用 $\bar{x} \pm$ 标准差表示,数据采用Independent Samples t Test,统计软件用SPSS 17.0, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $p < 0.01$ 表示差别有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 南极磷虾煮虾和虾粉受试物样品的成分含量结果

南极磷虾煮虾和虾粉受试物样品的成分含量如表1所示。

表1 南极磷虾煮虾和虾粉受试物样品的成分含量

Table 1 The component content of the boiled Antarctic krill and shrimp powder

样品	含水量 (%)	灰分 (%)	干样粗脂肪 (%)	湿重氟含量 (mg/kg)
煮虾样品	14.14±0.28	12.54±0.83	15.95±1.05	289.09±2.01
虾粉样品	15.47±1.63	10.93±0.32	2.56±1.12	173.88±1.14

2.2 急性毒性实验结果

预实验结果显示所有受试小鼠毛色发亮,饮食、活动和大小便正常,鼻眼口耳无异常分泌物,而且无死亡情况,故无法测定半数致死量(LD₅₀)。

2.2.1 7d观察小鼠一般反应情况结果 7d内记录小鼠的一般情况如表2所示。

由表2结果可以看出,小鼠按最大给样量给予小鼠最大限度的样品之后,连续观察7d内,所有受试小鼠毛色发亮,饮食、活动和大小便正常,鼻眼口耳无异常分泌物,未出现不良情况和死亡情况,未出现急性毒性反应。

表2 南极磷虾样品最大给样量实验对小鼠一般反应情况影响

Table 2 General reaction of mice under the maximum does of the Antarctic krill samples

组别	活动	毛发	饮食	粪便	尿液	死亡
对照组	-	-	-	-	-	无
煮虾组	-	-	-	-	-	无
虾粉组	-	-	-	-	-	无

注:“-”表示正常。

2.2.2 体重变化 南极磷虾煮虾和虾粉受试物样品的最大给样量喂食小鼠,7d内小鼠的体重变化情况如表3所示。

表3 南极磷虾样品最大给样量实验对小鼠体重改变的影响

Table 3 The change of mice body weight under the maximum does of the Antarctic krill samples

组别	给样前体重(g)	7d观察后体重(g)	体重前后变化(g)
对照组	20.48±1.07	24.54±1.37	4.06±1.10
煮虾组	19.51±1.39	22.62±1.29	3.11±1.22
虾粉组	20.84±1.25	23.82±1.20	2.98±1.24

由表3可以看出,所有受试小鼠的体重在7d后均增加,但实验组与对照组比较,无显著性差异。

2.2.3 最大给样量的确定 计算出小鼠的喂食饲料样品的最大进食量,结果如表4所示。

表4 南极磷虾样品最大给样量

Table 4 The maximum dose of the Antarctic krill samples

组别	小鼠的饲喂样品的总剂量(g/kg)	折算成小鼠的原样剂量(g/kg)
对照组	290.89±1.13	290.89±1.13
煮虾组	117.23±0.57	599.04±1.06
虾粉组	68.91±0.29	62.71±0.42

由表4可以看出,南极磷虾煮虾和虾粉的最大给样量分别为599.04、62.71g/kg,则小鼠对南极磷虾煮虾和虾粉的最大耐受量分别大于599.04、62.71g/kg。

2.2.4 成人转化剂量 按照1.2.5.4的方法得出的成

人转化剂量,如表5所示。

世界上大多数国家均制定了人体每日氟摄入量标准。美国和德国提出的推荐标准是成人每日摄入量为1.5~4.0mg;日本标准为2.1~2.3mg;世界卫生组织(WHO)规定,人均每天适宜的氟摄入量为2.5~4.0mg;我国卫生部1986年颁布的“初级卫生保健计划”规定每人每日总氟摄入量不能超过4mg。南极磷虾煮虾和虾粉受试物折算成70kg成人剂量分别是64.22、7.18g/kg,70kg成人剂量中的氟含量分别是1299.49、87.40mg,分别是我国规定每人每日总氟最大摄入量4mg的324.87倍和21.85倍。拟定成人南极磷虾煮虾和虾粉受试物的摄入量均为100g,折算的70kg成人剂量分别是拟定摄入量的45倍和5倍。

表5 成人转化剂量

Table 5 The converted adult dose

组别	喂食前小鼠平均体重(g)	折算成70kg成人剂量(g/kg)	70kg成人剂量中氟含量(mg)
煮虾组	19.51±1.39	64.22±1.95	1299.49±2.32
虾粉组	20.84±1.25	7.18±0.24	87.40±1.48

2.2.5 小鼠脏器观察和脏器系数计算 对各组小鼠进行大体解剖,观察肝、脾、肾、胃、小肠等主要脏器,均未见组织有异常改变。脏器系数如表6所示。

脏器系数^[9]是不同年龄期脏器质量与体重质量的比值。表6显示,实验组小鼠的肾脏、脾脏、小肠、胃和心脏系数与对照组均没有显著性差异,表明实验组小鼠的肾脏、脾脏、小肠、胃和心脏未发生异常变化;南极磷虾虾粉组的肝脏系数与对照组也没有显著性差异,表明虾粉组的肝脏未发生异常变化,但是南极磷虾煮虾组的肝脏系数与对照组有极显著性差异,并且数值降低,则表明煮虾组的肝脏可能发生萎缩等情况,但是具体判断需要进一步实验。

3 讨论

上述结果显示南极磷虾煮虾和虾粉的最大给样量分别是599.04、62.71g/kg,则小鼠对南极磷虾煮虾和虾粉的最大耐受量分别大于599.04、62.71g/kg。折算成成人剂量时分别是我国规定的每人每天最大氟摄入量的324.87倍和21.85倍。有研究显示^[10]大鼠连续一周大量食用南极磷虾会产生氟蓄积,测定机体主要部位的氟含量,表明蓄积的氟对机体特别是骨有一定的影响。南极磷虾的氟富集反应^[11]是来自海水,可以通过残壳对氟再吸收。如此高的氟摄入量,作为食品时进行安全性评价,根据我国食品安全

表6 南极磷虾样品最大给样量实验后小鼠的脏器系数(%)

Table 6 The organ coefficient of mice under the maximum does of the Antarctic krill samples(%)

组别	肝脏系数	肾脏系数	脾脏系数	小肠系数	胃系数	心脏系数
对照组	5.52±0.52	1.32±0.17	0.45±0.10	4.44±1.41	0.92±0.14	0.50±0.05
煮虾组	4.53±0.45*	1.31±0.21	0.34±0.06	5.40±0.95	0.93±0.10	0.47±0.04
虾粉组	5.58±0.96	1.28±0.16	0.67±0.26	4.40±0.72	0.92±0.16	0.49±0.05

注:*表示实验组与对照组比较有极显著性差异($p<0.01$)。

(下转第358页)

果与张瑞等^[1]报道的五味子残渣对白羽肉鸭免疫功能无影响不一致,表明五味子药渣经蛹虫草菌发酵后其营养和药效价值远大于原五味子药渣。其原因,一方面由于五味子药渣中还残留部分成分,除粗蛋白、粗脂肪、矿物质、氨基酸、油脂、糖类、维生素、微量元素、有机酸类等营养物质外,还有生物碱、多糖、萜类和挥发油、香豆素类、木脂素、醌类、黄酮类、甾体及苷类和鞣质等。这些残留成分仍具有部分生物活性,陈荣华等^[2]在五味子残渣中提取到8.46%的粗多糖,并发现其能增强巨噬细胞吞噬功能,提高血清溶血素水平。另一方面,微生物发酵具有独特的生物转化机制^[3],蛹虫草菌利用五味子药渣中的糖类、蛋白等进行生长,破坏细胞壁使五味子残留有效成分溶出和富集;在生长中产生初生或次生代谢产物,这些代谢物有可能与五味子药渣中的成分发生反应或直接转化形成新的化合物等。本实验前期研究发现五味子药渣经蛹虫草菌发酵后菌质中总多糖、五味子酯素和虫草素含量均高于原五味子药渣。此外,蛹虫草菌丝含有氨基酸、脂肪酸、核苷类物质、甾醇、甘露醇、多糖、SOD酶等,具有广泛的免疫活性^[13-14]。五味子药渣发酵后不仅富含了蛹虫草菌丝体和五味子残留原有成分的生物活性,还可能增添了大量未知的免疫活性物质。这些免疫活性成分进入机体后促进T淋巴细胞增殖分化,诱导内源性细胞因子的产生,激发机体细胞及体液免疫应答,从而提高机体的免疫功能。

综上,五味子药渣发酵菌质可作为一种良好的免疫增强剂,提高断奶应激仔猪免疫抵抗力,在医药和保健品等方面有一定的开发和应用前景,并有助于解决药渣浪费和环境问题。

参考文献

[1] 张李阳,周业飞,虞蔚岩,等. 药用真菌发酵产物调控肉鸡

内分泌及免疫力的研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2005,26(4):16-38.

[2] 庄毅,洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志,2006,31(22):1918-1919.

[3] 庄毅,池玉梅,陈慎宝,等. 药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质的研制[J]. 中国药理学杂志,2004,39(3):175-178.

[4] 史琳,王志成,冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2011,34(3):208-212.

[5] 汪艳群. 五味子多糖的分离,结构鉴定及免疫活性研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.

[6] 刘丽华,刘登湘,马鸣,等. 五味子提取物对辐射所致小鼠淋巴细胞减少的预防效果及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2010,17(3):313-317.

[7] 朱科学,聂少平,李文娟,等. 黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导细胞因子的影响[J]. 食品科学,2010,19:78.

[8] 马得莹,单安山,刘玉芹,等. 中草药对正常和高温下蛋鸡生产性能和免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(3):235-239.

[9] 刘永琦,谢小冬. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010.

[10] 万集今,葛振华,王若愚. 天花粉和五味子对小鼠脾脏抗体形成细胞的影[J]. 福建中医药,1988,2(5):79.

[11] 张瑞,赵景辉,王英平,等. 人参,黄芪(残渣),五味子(残渣)等对白羽野鸭生产性能和免疫性能的影响[J]. 中兽医医药杂志,2011(3):18.

[12] 陈荣华,吴向阳,仰榴青,等. 五味子醇提残渣中粗多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1512-1513.

[13] 樊慧婷,林洪生. 蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(15):2549-2552.

[14] Koh J H, Suh H J, Ahn T S. Hot-water extract from mycelia of Cordyceps sinensis as a substitute for antibiotic growth promoters[J]. Biotechnology Letters,2003,25(7):585-590.

(上接第354页)

性毒理学评价程序和方法的相关规定的急性毒性剂量分级标准^[2],大鼠一次口服或者24h内多次口服的LD₅₀>15000mg/kg时,大致相当于体重70kg人的致死剂量>1050g,无急性毒性,本实验中,无实验小鼠死亡,则可以判断南极磷虾煮虾和虾粉受试物无急性毒性。

另一方面,急性毒性实验仅能判断短时间内受试物的急性毒性,而且一般用于研究新研发药物的毒性评价,在药物实验时,大多数引起死亡。本文中受试物南极磷虾是一种可能的食品,则南极磷虾的急性毒性实验和药物的急性毒性实验是有较大区别的。一个全方面的食品安全性评价需要结合其他指标,且需进一步的慢性实验进行评价。本急性毒性实验显示南极磷虾煮虾可能对小鼠肝脏有损伤,但具体的判断还需要进一步的实验。

参考文献

[1] 孙松. 南极磷虾[J]. 世界科技研究与发展,2002,24(4):57-60.

[2] Tou J C, Jaczynski J, Chen Y C. Krill for human consumption:

Nutritional value and potential health benefits[J]. Nutrition Reviews,2007,65(2):63-77.

[3] Yoshitomi B. Utilization of antarctic krill for food and feed[J]. Food Chemistry,2004,43(2):45-49.

[4] 孙雷,周德庆,盛晓风. 南极磷虾营养评价与安全性研究[J]. 海洋水产研究,2008,29(6):57-64.

[5] GB/T 15193.1-2003,食品安全性毒理学评价程序[S].

[6] GB/T 21757-2008,化学品急性经口毒性实验急性毒性分类法[S].

[7] 张铤,刘毓谷. 毒理学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:233-234.

[8] GB/T 15193.3-2003急性毒性实验[S].

[9] 陈守良. 动物生理学[M]. 北京大学出版社,2005.

[10] 葛鲁娜,刘肖帅,武晓云,等. 食品与药品[J]. 2012,14(5):172-174.

[11] 潘建明,张海生,刘小涯. 南大洋磷虾富氟机制I. 氟的化学赋存形态研究[J]. 海洋学报,2000,22(2):58-64.

[12] GB/T 15193.1-21-2003,食品安全性毒理学评价程序和方法[S].