

三聚氰胺对花鲈的急性毒性实验研究

刘海燕^{1,2} 张伟^{1,3} 薛敏¹ 吴秀峰¹ 郑银桦¹ 郭利亚¹ 盛洪建¹

(1. 中国农业科学院饲料研究所, 国家水产饲料安全评价基地, 北京 100081; 2. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 3. 大连水产学院, 大连 116023)

摘要:本文以花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 为实验对象, 采用接触、腹腔注射及口服三种致毒方式, 进行了非蛋白氮物质三聚氰胺对花鲈的急性毒性实验研究。口服急性毒性实验中, 通过在饲料中添加不同浓度的三聚氰胺 (0、500、2000、5000 及 10000 mg/kg), 进行了 21d 的花鲈养殖实验。实验结果表明: 三聚氰胺溶解度较低, 其水溶液没有表现出急性毒性, $LC_{50} > 3500$ mg/L; 而在腹腔注射致毒方式下, 三聚氰胺对花鲈的半致死剂量 $LD_{50} = 890.07$ mg/kg · w; LD_{50} 95% 可信限为: 778.63—1017.45 mg/kg · w; 在口服急性毒性实验中, 10000 mg/kg 组三聚氰胺降低了花鲈的摄食与生长 ($p < 0.05$), 饲料系数显著升高 ($p < 0.05$); 三聚氰胺对花鲈的存活率、肥满度、肝体比及脏体比均无显著影响 ($p > 0.05$)。饲料中添加三聚氰胺没有显著影响花鲈血清的丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、总蛋白、葡萄糖、胆固醇、甘油三酯及尿素氮 ($p > 0.05$), 但显著影响了花鲈血清的碱性磷酸酶活性, 10000 mg/kg 组的碱性磷酸酶活性显著高于其他各处理组 ($p < 0.05$), 其他各组间无显著差异 ($p > 0.05$)。三聚氰胺对花鲈 21d 的最大未观察到有害作用剂量 (NOAEL, no-observed-adverse-effect-level) 为 131.99 mg/kg · w · d。

关键词:三聚氰胺; 花鲈; 急性毒性实验

中图分类号: X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207 (2009) 02-0157-07

饲料安全问题目前已成为世界各国动物源食品生产发展中的一大障碍, 2007 年 4 月美国发生的宠物“毒粮”事件引起国内外食品界和饲料界的广泛关注, 2008 年 9 月的“三鹿毒奶粉”事件再次为食品安全与饲料安全问题敲响警钟, 使三聚氰胺成为饲料安全问题中备受关注的焦点, 其对动物影响的研究也因此而相继展开^[1]。三聚氰胺 (Melamine) 是一种有机含氮杂环化合物, 作为一种化工原料主要用于塑料和板材贴面生产, 分子式为 $C_3H_6N_6$, 但由于其含氮量很高 (66%), 成为目前饲料市场上蛋白原料掺假的主要的非蛋白氮物质^[1,2]。有关三聚氰胺在哺乳动物中的毒性作用已有初步研究^[2,3-7], 然而其是否会对经济鱼类产生负面影响还未见报道。由于水产动物对蛋白营养的需求特点, 蛋白原料在水产饲料中所占的比例要远远大于其他动物饲料, 因此, 三聚氰胺对水产动物的影响更是不容忽视。

花鲈 (*Lateolabrax japonicus*), 鲈形目, 鲈科, 花鲈属, 海水肉食性鱼类, 为我国南北方传统名贵养殖

鱼类, 具有肉味鲜美、适应性强、个体大、生长快和食性广等优点, 已成为我国海水养殖第一大产量品种, 有关花鲈生物学及饲料营养学的研究已见诸报道^[8-10]。本文以花鲈为实验动物, 进行三聚氰胺的急性毒性实验研究, 旨在为三聚氰胺在水产饲料中的安全性评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验用三聚氰胺 本实验所用三聚氰胺产自河南, 白色粉末状物质, 纯度为 99.8%。

1.2 实验鱼 实验所用花鲈是购自山东潍坊的同批野生苗种, 在国家水产饲料安全评价基地 (北京, 南口) 进行淡化驯养。正式实验之前, 转入与实验用水质、温度和光照相同的循环水养殖系统中适应 15d, 以使鱼类适应实验室的生活环境, 如水温、水质和光线等, 且便于对实验鱼进行健康选择。每天投喂 2 次。

1.3 实验步骤

1.3.1 接触急性毒性实验 由于三聚氰胺的水溶

收稿日期: 2008-09-08; 修订日期: 2009-01-15

基金项目: 农业部专项项目; 十一五国家科技支撑计划 (2006BAD12B06) (2006BAD12B08) 资助

作者简介: 刘海燕 (1971—), 女, 汉族, 河北石家庄人; 博士; 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: hy_liu99@163.com

通讯作者: 薛敏, E-mail: xuemin@caas.net.cn

性很差, 23 时, 三聚氰胺在水中的溶解度为 3240mg/L^[11]。本实验条件下 (26—27)三聚氰胺在水中的溶解度达到 3500mg/L。根据《水生生物毒物试验方法》^[12], 在正式实验开始前先进行预实验, 根据预实验结果, 试验所用的三聚氰胺的梯度分为 0mg/L 和 3500mg/L, 每个处理组设 3 个重复, 每个重复 10 尾鱼。

实验开始前 24h 花鲈停止投喂。实验开始时随机选择大小均匀, 体质健壮的花鲈放入对应浓度的实验桶中。实验花鲈的平均体重为 50g 左右。所有实验用鱼在 30min 内全部转入到实验桶中。实验在容积为 0.25m³ 的圆锥形玻璃钢养殖桶中进行, 每个养殖桶装入水或待试溶液 200L, 静水养殖。每一养殖桶备有一个充气头, 各养殖桶的溶氧保持在 6mg/L 以上, pH = 8.20, 水温 26.5—27.5 。实验期间不投饵。试验开始后 15、30、60min 和 2、4、8、14 ±2、24、33 ±3、48h, 详细观察并记录各容器试验鱼的反映情况, 发现死鱼及时捞出, 以后每天观察记录一次, 直到 96h 结束。实验期间每天 14:00 测定一次水质。根据花鲈的死亡情况计算半致死浓度 (Median lethal concentration) LC₅₀。

1.3.2 腹腔注射急性毒性实验 首先选择几个较大范围的浓度梯度进行预试验, 将花鲈放入其中观察其活动及存活情况。根据预实验的结果, 依寇氏法, 三聚氰胺的浓度梯度分为 5 个, 另外加 1 个对照组, 即: 0、200、360、648、1166.4、2099.52mg/kg · w。注射液均

用 7% 的生理盐水进行配制, 将三聚氰胺配成一定浓度的混悬液, 现用现配, 注射量为 1mL /100g 体重。每个浓度梯度设 3 个重复。每个重复 10 尾鱼。

实验开始前 24h 花鲈停止投喂, 实验开始时随机选择大小均匀, 体质健壮的花鲈, 平均体重为 75g 左右, 称重, 以体重计算注射量, 用注射器吸取相应容积的三聚氰胺混悬液从花鲈的腹鳍后部注射入腹腔, 然后将鱼放入实验桶中。实验在循环水养殖系统中进行, 花鲈养殖在容积为 0.25m³ 的圆锥形玻璃钢养殖桶中。每一养殖桶备有一个充气头, 各养殖桶的溶氧保持在 6mg/L 以上, pH = 8.20, 水温 24.5—26.5 。

实验期间的饲养管理与驯养期间的相同, 每天投喂两次。试验开始后详细观察并记录各容器试验鱼的反映情况, 发现死鱼及时捞出, 试验鱼的死亡以身体完全不动, 用清水冲洗, 再放入清水中, 5min 后仍不动为准。实验期间每天 14:00 测定一次水质, 实验期持续 14d。

1.3.3 口服急性毒性实验

实验饲料 本实验共 5 个处理组, 每个处理 3 个重复。三聚氰胺在 5 种实验饲料的添加水平依次为: 0mg/kg (Diet1)、500mg/kg (Diet2)、2000mg/kg (Diet3)、5000mg/kg (Diet4)、10000mg/kg (Diet5), 5 种实验饲料的配方组成及化学组成 (表 1)。实验饲料用双螺杆挤压机 (TSE 65) 制成 φ2.0mm 的挤压饲料, 自然晾干后备用。

表 1 实验饲料配方及营养成分
Tab. 1 Experimental diet fomulation and nutrition composition

原料 Ingredient	含量 Content (%)				
	Diet1	Diet2	Diet3	Diet4	Diet5
进口鱼粉 Fish meal	38.00	38.00	38.00	38.00	38.00
面粉 Wheat flour	23.00	22.95	22.80	22.50	22.00
大豆粕 Soybean meal	21.50	21.50	21.50	21.50	21.50
鱼油 Fish oil	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
乌贼粉 Sepia meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
预混料 Vitamins ¹ /minerals ² premix	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
啤酒酵母 Beer yeast	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
大豆油 Soybean oil	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
磷酸二氢钙 Calcium phosphate	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
胆碱 Choline	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
三聚氰胺 Melamine	0.00	0.05	0.20	0.50	1.00
化学组成 Chemical compositions (%)					
水分 Moisture	7.26	6.87	7.11	7.10	6.95
粗蛋白 Crude protein	43.28	43.12	43.51	45.23	47.11
粗脂肪 Crude lipid	11.6	11.9	11.23	12.6	12.27

续表

原料 Ingredient	含量 Content(%)				
	Diet1	Diet2	Diet3	Diet4	Diet5
粗灰分 Crude ash	10.76	10.72	10.68	10.77	10.61
能量 Gross energy (MJ/kg)	18.72	18.57	18.38	18.4	18.58

¹ 维生素预混料 (mg/kg diet): VB₁ 15; VB₂ 15; 烟酰胺 Niacin 100; VB₆ 20; VB₁₂ (1%) 4; 泛酸钙 D-pantothenic acid 50; 生物素 Biotin 1; 肌醇 Inositol 200; 叶酸 Folic acid 5; VC 240; VA 20; VD₃ 8; VE 300; VK₃ 10; BHT 400; 纤维素 α -cellulose 162

² 矿物盐预混料 (mg/kg diet): 硫酸镁 MgSO₄ 3000; 碳酸氢钠 NaHCO₃ 2000; 硫酸亚铁 FeSO₄ 600; 硫酸锌 ZnSO₄ 350; 硫酸锰 MnSO₄ 180; 碘化钾 KI 10; 亚硒酸钠 Na₂Se₂O₃ 10; 氯化钴 CoCl₂ 50; 硫酸铜 CuSO₄ 10

实验鱼及实验条件 正式实验前花鲈停止投喂 24h, 实验开始时, 随机挑选体质健康、个体大小均一的花鲈 (30.58 ±0.05g), 称重后随机分配到容积为 0.15m³ 的圆锥形玻璃钢养殖桶中, 每桶 14 尾鱼。养殖系统为半流水式养殖系统, 水源为曝气井水, 每个养殖桶内备有一个充气头进行充氧, 采用自然光照。每天用一定量的实验饲料表观饱食投喂两次 (9:00; 16:00), 投喂期间停止循环水系统, 投喂 0.5h 后以流水运行模式收集残饵, 烘干称重。及时清理粪便、定期检测水质, 使水质条件保持在: 溶氧 DO > 6mg/L; 总氨氮 TAN < 0.4mg/L; pH 7.5—8.5; 水温 24—27 ; 水体三聚氰胺含量 < 0.5mg/kg。

样品采集与分析 实验周期为 21d, 实验结束前一天停止投喂, 实验结束时称重、测体长, 同时每桶取 3 尾花鲈解剖取内脏及肝脏, 称重, 另取 3 尾花鲈的血清用于检测谷草转氨酶 (ALT)、谷丙转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP)、葡萄糖 (GLU)、总胆固醇 (Chol)、甘油三酯 (TG)、尿素氮 (Urea)。

血清的各项生理生化指标均采用全自动生化分析仪用试剂盒进行分析, 总蛋白、葡萄糖、总胆固醇、尿素氮采用四川迈克科技优先公司试剂盒, 甘油三酯采用北京莱帮生物技术有限公司试剂盒, 碱性磷酸酶采用北京九强公司试剂盒; 谷丙转氨酶、谷草转氨酶采用英国 RANDOX 公司试剂盒。

1.4 数据处理与统计分析

1.4.1 腹腔注射实验 试验结果取重复组的平均值, 用改良的 Karber 法求出三聚氰胺对花鲈的半致死剂量 (Median lethal dose LD₅₀)、标准误及 95% 可信限。计算公式及具体计算步骤如下:

$$LgLD_{50} = X_m - d(\sum p - 0.5)$$

$$lgLD_{50} \text{ 的标准误: } SbgLD_{50} = d \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

$$LD_{50} \text{ 95\% 可信限} = \log^{-1} (lgLD_{50} \pm 1.96SbgLD_{50})$$

式中 X_m 为最大剂量的对数; d 为最大剂量与相

邻剂量比值的对数; p 为各组的死亡率 (死亡率以小数表示); $\sum p$ 为各组死亡率的总和; q 为各组的存活率 (存活率以小数表示); n 为各组鱼数。

1.4.2 口服实验

摄食率 (Feeding intake, %/d) $FR = 100 \times R_1 / ((W_0 + W_t) / 2) / \text{days}$

三聚氰胺日摄入量 (MFI, mg/kg · w · d) $= FR \times C$
饲料系数 (Feed conversion ratio) $FCR = R_1 / (W_t + W_d - W_0)$;

特定生长率 (Specific growth rate, %/d) $SGR = 100\% \times [\ln(W_t) - \ln(W_0)] / t$

存活率 (Survival rate, %) $= 100 \times \text{存活鱼尾数} / \text{初始鱼尾数}$

肥满度 (Condition factor) $CF = 100 \times (\text{体重, g}) / (\text{体长, cm})$

肝体比 (Hepatic somatic index, %) $HIS = 100 \times (\text{肝重} / \text{全鱼重})$

脏体比 (Visceral somatic index, %) $VSI = 100 \times (\text{内脏重} / \text{全鱼重})$

其中, R_1 为摄食量; W_0 为初均重, W_t 为末均重, W_d 为死亡鱼重, t 为实验天数, C 为三聚氰胺在饲料中的含量。

口服实验中所有实验数据均采用 Statistica 6.0 软件进行一元方差分析 (One-way ANOVA), 差异显著后进行 Duncan's 多重比较, 差异显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果

2.1 接触急性毒性实验

实验开始后, 花鲈没有发现有任何异常反应, 其鱼体侧翻、游泳能力及呼吸功能和色素沉积等均未出现异常变化。96h 内对照组及 3500mg/L 三聚氰胺浓度组没有一尾花鲈出现死亡。因此, 水温在 27 左右时, 三聚氰胺对花鲈的半致死浓度 $LC_{50} > 3500\text{mg/L}$, 其水溶液毒性极低, 不易达到急性毒性

试验要求动物死亡的浓度,无法测定出 LC_{50} 。

2.2 腹腔注射急性毒性实验

实验开始 36h 后 2099.52mg/kg · w 组花鲈出现焦躁不安、狂游、顶网、身体侧翻、游动不协调,然后静止在水底,过 0.5h 左右再出现上述症状,体色变浅,黏液增多,最后直至死亡。48h 后 2099.52mg/kg · w 组出现大量死亡,1166.4mg/kg ·

w 组也开始出现死亡。解剖鱼体发现,肝脏发白,胆道发黄,内脏充血。对于未死亡的花鲈,0、200、360、648mg/kg · w 组花鲈的摄食要明显好于 1166.4、2099.52mg/kg · w 组。表 2 所示为 14d 实验期内花鲈的死亡统计及 LD_{50} ,结果表明腹腔注射三聚氰胺对花鲈的半致死剂量 LD_{50} = 890.07mg/kg · w; LD_{50} 95%可信限为:778.63—1017.45mg/kg · w。

表 2 花鲈腹腔注射三聚氰胺的死亡率及半致死剂量 (LD_{50})

Tab. 2 The mortality and LD_{50} of Japanese sea bass in injection test					
剂量 Concentration (mg/kg · w)	试验鱼数 Fish number(尾)	平均死亡率 Mortality(%)	半致死浓度 LD_{50} (mg/kg · w)	$S_{bg,LD_{50}}$	LD_{50} 95% 可信限 (mg/kg · w)
2099.52	30	100			
1166.4	30	73	890.07	0.0296	778.63—1017.45
648	30	13			
360	30	7			
200	30	3			

2.3 口服急性毒性实验

2.3.1 对生长、存活及饲料转化的影响

表 3 结果表明:5 个处理组的三聚氰胺日摄入量 (MFI) 分别为:0、12.63、51.35、131.99 及 255.74mg/kg · w · d。单因素方差分析显示饲料中添加三聚氰胺显著影响了花鲈 21d 的摄食与生长 ($p < 0.05$)。最高三聚氰胺组 (10000mg/kg 或

131.99mg/kg · w · d) 的末均重和摄食率显著低于对照组 ($p < 0.05$),10000mg/kg 三聚氰胺组的特定生长率显著低于对照组和 2000mg/kg 组,10000mg/kg 三聚氰胺组的饲料系数显著高于对照组和 2000mg/kg 组 ($p < 0.05$);其他各组之间无显著差异,三聚氰胺对花鲈的存活率、肥满度、肝体比及脏体比均无显著影响 ($p > 0.05$)。

表 3 饲料中三聚氰胺对花鲈生长性能及饲料转化效率的影响 (平均值 ± 标准误)

指标 Parameters	饲料组 Treatments				
	Diet1	Diet2	Diet3	Diet4	Diet5
初均重 BW (g)	30.74 ± 0.21	30.26 ± 0.14	30.38 ± 0.95	30.71 ± 0.37	30.81 ± 0.21
末均重 FBW (g)	43.19 ± 0.62 ^b	41.62 ± 0.62 ^{ab}	42.38 ± 0.74 ^{ab}	42.45 ± 0.06 ^{ab}	40.10 ± 1.36 ^a
摄食率 FI (%/d)	2.63 ± 0.16 ^b	2.53 ± 0.03 ^{ab}	2.57 ± 0.02 ^{ab}	2.64 ± 0.04 ^{ab}	2.56 ± 0.04 ^a
三聚氰胺日摄入量 MFI (mg/kg · w · d)	0	12.63 ± 0.17	51.35 ± 0.46	131.99 ± 1.82	255.74 ± 4.48
特定生长率 SGR (%/d)	1.21 ± 0.04 ^b	1.14 ± 0.06 ^{ab}	1.19 ± 0.07 ^b	1.16 ± 0.04 ^{ab}	0.94 ± 0.11 ^a
饲料系数 FCR	1.65 ± 0.11 ^a	1.72 ± 0.03 ^{ab}	1.65 ± 0.11 ^a	1.73 ± 0.08 ^{ab}	2.11 ± 0.22 ^b
存活率 Survival rate (%)	100.00 ± 0.00	97.62 ± 2.38	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
肥满度 CF	1.13 ± 0.02	1.18 ± 0.04	1.20 ± 0.06	1.85 ± 0.03	1.17 ± 0.01
肝体比 HSI (%)	1.10 ± 0.08	1.17 ± 0.07	1.21 ± 0.06	1.20 ± 0.05	1.01 ± 0.04
脏体比 VSI (%)	9.99 ± 1.10	11.18 ± 0.35	10.83 ± 0.29	11.13 ± 0.25	10.79 ± 0.36

注:同一行中上标字母无重复者表示有显著差异 ($p < 0.05$)

Note: within the same row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

2.3.2 对血液指标的影响

表 4 结果表明:饲料中添加三聚氰胺没有显著影响花鲈血清的丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、总蛋白、葡萄糖、胆固醇、甘油三酯及尿素氮

($p > 0.05$),但显著影响了花鲈血清的碱性磷酸酶活性,10000mg/kg 组的碱性磷酸酶活性显著高于其他各处理组 ($p < 0.05$),其他各组间无显著差异 ($p > 0.05$)。

表 4 饲料中三聚氰胺对花鲈血清生化指标的影响 (平均值 ±标准误)
Tab. 4 Effects of dietary melamine on the serum parameters in Japanese sea bass (means ±S. E.)

	饲料组 (Treatments)				
	Diet1	Diet2	Diet3	Diet4	Diet5
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L)	19.67 ±3.84	15.67 ±3.48	15.67 ±4.70	18.33 ±2.33	20.67 ±4.48
天冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	146.00 ±29.02	122.33 ±28.49	125.00 ±30.07	145.67 ±34.35	147.67 ±52.98
碱性磷酸酶 ALP (U/L)	38.67 ±4.48 ^a	41.00 ±1.73 ^a	45.33 ±3.67 ^a	47.67 ±0.67 ^a	58.00 ±2.08 ^b
总蛋白 TP (g/L)	43.67 ±1.45	40.67 ±0.33	42.67 ±1.33	43.33 ±0.67	45.00 ±1.00
葡萄糖 GLU (mmol/L)	6.21 ±0.05	6.33 ±0.95	5.90 ±0.33	5.82 ±0.53	5.65 ±0.75
胆固醇 Chol (mmol/L)	7.00 ±0.18	6.27 ±0.12	6.76 ±0.50	7.14 ±0.18	7.49 ±0.11
甘油三酯 TG (mmol/L)	4.65 ±0.33	3.94 ±0.16	4.28 ±0.07	4.48 ±0.07	4.66 ±0.24
尿素氮 Urea (mmol/L)	0.91 ±0.09	1.00 ±0.01	0.82 ±0.06	0.61 ±0.07	0.82 ±0.14

注:同一行中上标字母无重复者表示有显著差异 ($p < 0.05$)
Note: within the same row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

3 讨 论

急性毒性试验处在毒理学研究的早期阶段,对阐明受试物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义,是饲料安全评价的重要指标。由于水产动物生存在水体中这一特殊性,接触急性毒性试验是其急性毒性试验研究的形式之一。三聚氰胺作为一种化工原料,其水溶性很差。本文的结果表明在三聚氰胺最大溶解度时花鲈并没有受到影响,因此,其水溶液没有表现出毒性。而在急性毒性试验研究的另一种形式 腹腔注射急性毒性试验下,三聚氰胺对花鲈的半致死剂量 LD₅₀为 890.07mg/kg·w,解剖发现在花鲈肝脏及其他内脏器官中均有一定的病理变化,对花鲈表现出了一定的毒性。有关三聚氰胺急性毒性的研究很少,而且多集中在哺乳动物中,UCL D报道三聚氰胺对大鼠及小鼠的口服半致死剂量分别为 3161mg/kg和 3296mg/kg,按照化学物质的急性毒性分级标准三聚氰胺属低毒物质^[12]。

在口服急性毒性实验中,10000mg/kg (255.74mg/kg·w·d)三聚氰胺处理组的花鲈摄食率及生长均显著降低,饲料系数显著升高,这与在其他动物中所进行的三聚氰胺的研究结果相一致^[2,5]。在本实验,5000mg/kg (131.99mg/kg·w·d)及其以下浓度三聚氰胺组对花鲈的摄食与生长没有产生显著影响。血清生理生化指标是鱼类疾病诊断及健康状况的指示指标。林祥梅报道,摄食含三聚氰胺饲料的猫,其血清尿素氮水平显著升高,提示三聚氰胺可能导致肾衰竭^[7]。但在本实验中,只10000mg/kg (255.74mg/kg·w·d)三聚氰胺处理组的花鲈血清碱性磷酸酶显著升高,而其他血清生理生化指标均无显著变化。从本实验中花鲈的摄食生

长及血清生理生化指标的变化,可以得出:对于花鲈,21d的三聚氰胺最大未观察到有害作用剂量 (NOAEL, no-observed-adverse-effect-level)为 131.99mg/kg·w·d。目前,有关评价日粮中添加三聚氰胺对哺乳动物影响的研究较多,给大鼠饲喂添加三聚氰胺的日粮,13周不出现副作用的剂量 (NOAEL)为 63mg/kg·w·d,28d的 NOAEL为 240mg/kg·w·d,14d的 NOAEL为 417mg/kg·w·d。对小鼠来说 13周时的 NOAEL为 1600mg/kg·w·d^[13,14]。相对于啮齿类动物,花鲈对三聚氰胺毒性反应更为敏感。

关于三聚氰胺中毒机理的研究,已有相关学者在哺乳动物中展开了一系列研究,根据现有数据认为,三聚氰胺是惰性代谢物质,基本不经过肝脏清除,主要通过肾脏排出体外^[15]。2007年美国发生的宠物中毒事件是由于宠物在摄食含三聚氰胺的饲料后发生的急性肾衰^[1,3-6],2008年的三鹿毒奶粉事件也是由于婴儿食用受三聚氰胺污染的奶粉后发生肾结石。Okumura和 Ogasawara等的研究报道认为三聚氰胺诱发膀胱癌和泌尿道增生性疾病是由于结石的形成^[16,17]; Puschner和 Dobson等的研究结果也表明,三聚氰胺和三聚氰酸的混合物使猫的肾脏中出现双折射晶体,导致肾脏出现病理变化,而单独饲喂三聚氰胺或三聚氰酸均未观察到肾功能的变化,三聚氰胺和三聚氰酸的混合物是猫急性肾衰的发病原因^[3,6]; Smith在猫的实验中拍摄到了结晶的电子显微镜照片^[18], Cianciolo和林祥梅在猫的实验中也观察到了肾小管中晶体的出现^[5,7]。

鱼类的排泄器官包括肾脏和鳃,淡水硬骨鱼类的尿中包含许多肌酸和氮代谢物,包括氨、氨基酸和少量尿素,尿中排出氮占总排出量的 7%—25%,大部分的含氮废物通过鳃排泄^[19]。鱼类和陆生动物

在排泄系统的这一差别可能会导致三聚氰胺在鱼类机体中的代谢途径与陆生动物有非常大的区别。目前,对于水生动物三聚氰胺中毒机理的研究还未见相关报道,摄食三聚氰胺后,水生动物是否也会发生如其他哺乳动物一样的中毒症状,其代谢及残留情况如何等还有待进一步进行亚急性和慢性毒性实验研究。

4 结 论

三聚氰胺溶解度较低,在接触实验中其水溶液没有表现出毒性, $LC_{50} > 3500 \text{ mg/L}$ 。腹腔注射致毒方式下,三聚氰胺对花鲈的半致死剂量 $LD_{50} = 890.07 \text{ mg/kg} \cdot w$ 。 LD_{50} 95%可信限为: 778.63—1017.45 $\text{mg/kg} \cdot w$ 。口服急性毒性实验中,三聚氰胺显著降低了花鲈的摄食与生长, 21d的 NOAEL 为 131.99 $\text{mg/kg} \cdot w \cdot d$ 。

参考文献:

- [1] US-FDA (U. S Food and Drug Administration), 2007. 10. 26. Interim melamine and analogues safety/risk assessment Available at URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html>
- [2] Shao J J, Wen J Q, Xu S W. Research progress on melamine toxicology [J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, **12**: 52—54 [邵静君, 温家琪, 徐世文. 三聚氰胺毒理学研究进展. 现代畜牧兽医. 2007, **12**: 52—54]
- [3] Puschner B, Poppenga R H, Lowenstine L J, et al Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, **19**(6): 616—624
- [4] Brown C A, Jeong K S, Poppenga R H, et al Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007 [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, **19**(5): 525—531
- [5] Cianciolo R E, Bischoff K, Ebel J G, et al Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2008, **233**(5): 729—737
- [6] Dobson R L, Motlagh S, Quijano M, et al Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs [J]. *Toxicological Sciences*, 2008, **106**(1): 251—262
- [7] Lin X M, Wang J F, Jia G L, et al Toxicology study of melamine [J]. *Journal of Toxicology*, 2008, **22**(3): 216—218 [林祥梅, 王建峰, 贾广乐, 等. 三聚氰胺的毒性研究. 毒理学杂志, 2008, **22**(3): 216—218]
- [8] Xue M, Luo L, Wu X F, et al Effects of six alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, **260**: 206—214
- [9] Chang Q, Liang M Q, Wang J L, et al Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 172—176 [常青, 梁萌青, 王家林, 等. 花鲈对不同饲料原料的表观消化率. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 172—176]
- [10] Luo L, Wu X F, Xue M, et al Effect of replacement calcium phosphate monobasic with neutral phytase on growth and phosphorus metabolism of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, **19**(1): 33—39 [罗琳, 吴秀峰, 薛敏, 等. 中性植酸酶在豆粕型饲料中替代磷酸二氢钙对花鲈生长及磷代谢的影响. 动物营养学报, 2007, **19**(1): 33—39]
- [11] Li C. Fundamental studies on resource utilization of solid waste from melamine manufacturing [D]. Thesis for Master of Science. Zhengzhou University, Zhengzhou 2000 [李晨. 三聚氰胺生产过程中固体废弃物的资源化基础研究. 硕士学位论文, 郑州大学, 郑州. 2000]
- [12] Zhou Y X, Zhang Z S. Toxicological trial methods of aquatic biology [M]. Beijing: Agriculture Press 1989 [周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法. 北京: 农业出版社. 1989]
- [13] UCL D (The International Uniform Chemical Information Database) Chemical Data Sheet: Substance D 108 - 78 - 1, 2000, February 18, 30—98
- [14] OECD (Organization for economic co-operation and development). 2002. 06. SDS Analysis UNEP Publications: Melamine. Available at URL: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf>
- [15] US-FDA, Interim melamine and analogues safety/risk assessment 2007. US Food and Drug Administration, Washington, DC
- [16] Okumura M, Hasegawa R, Shirai T, et al Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine [J]. *Carcinogenesis*, 1992, **13**(6): 1043—1045
- [17] Ogasawara H, Imaida K, Ishiwata H, et al Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation [J]. *Carcinogenesis*, 1995, **16**(11): 2773—2777
- [18] Cornell University (2007, April 10). Cornell Details Effect of Pet Food Contaminant, Melamine. Science Daily. Retrieved May 23, 2008, from <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/04/070409185542.htm>
- [19] Lin H R. Fish Physiology (Second Edition) [M]. Guangzhou: Guangzhou Higher Education Press 2007 [林浩然. 鱼类生理学 (第二版). 广州: 广东高等教育出版社. 2007]

ACUTE TOXICITY STUDY OF MELAMINE ON JAPANESE SEA BASS (*Lateolabrax japonicus*)

LIU Hai-Yan^{1,2}, ZHANG Wei^{1,3}, XUE Min¹, WU Xiu-Feng¹, ZHENG Yin-Hua¹, GUO Li-Ya¹ and SHENG Hong-Jian¹

(1. Feed Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

2. The College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016; 3. Dalian Fisheries University, Dalian 116023)

Abstract: Melamine had become the focus of feed safety assessment because of the tainted pet food and milk powder scandal happened in 2007 and 2008. Melamine is a high nitrogen content industrial chemical material, but it was falsely added to protein sources to enhance the apparent protein content for the bigger profit. In this study, the acute toxic experiments (including touching test, injection test and oral test) were conducted on Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) to assess the safety of melamine in fish. In touching test, Japanese sea bass (50g $\pm$ 0.1g) were exposed to 0 and 3500mg/L melamine solution at 27 $^{\circ}$ C for 96h, no feed was provided to the experimental fish during trial, the mortality of the Japanese sea bass were calculated after 96h; In injection test, the melamine was injected into Japanese sea bass (75g $\pm$ 1.1g) at 0, 200, 360, 648, 1166.4 and 2099.52 mg/kg $\cdot$ w levels from the abdomen, respectively, lasted for 14d in a recirculation rearing system, and the fish were fed once daily, the mortality of Japanese sea bass were calculated after 14d, LD₅₀ and the confidence limitation of LD₅₀95% were calculated using Korbom method; In oral test, the effects of melamine in feeds on the feed intake, growth performance, serum parameters of Japanese sea bass were investigated. The concentrations of melamine in experimental diets were 0, 500, 2000, 5000 and 10000 mg/kg respectively, each diet was fed to triplicate groups of the experimental fish, the initial body weight of Japanese sea bass was 30.58 $\pm$ 0.05g, fish were reared in a rearing system for 21d.

The results showed that the solubility of melamine was low and the LC₅₀ was beyond 3500 mg/L at 27 $^{\circ}$ C in touching test. The LD₅₀ of Japanese sea bass in injection test was 890.07mg/kg $\cdot$ w, and the confidence limitation of LD₅₀95% was 778.63—1017.45 mg/kg $\cdot$ w. In oral test, the feeding intake and growth performance were significantly decreased and the feed conversion ratio was significantly increased in 10000mg/kg melamine treatment ($p < 0.05$), there was no significant difference in survival rate, condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI) and viscerasomatic index (VSI) among all treatments. The serum alkaline phosphatase (ALP) in 10000mg/kg melamine treatment was significantly higher than other treatments ($p < 0.05$), the serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), glucose (GLU), Cholesterol (Chol), Triglyceride (TG) and Urea nitrogen were not significantly affected by melamine during 21d ($p > 0.05$). The 21d NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) for melamine in Japanese sea bass was 131.99 mg/kg $\cdot$ w $\cdot$ d. In conclusion, no acute toxicity was observed for melamine solution in Japanese sea bass; the LD₅₀ in injection test was 890.07 mg/kg $\cdot$ w and the confidence limitation of LD₅₀95% was 778.63—1017.45 mg/kg $\cdot$ w; The melamine in feed had significantly decreased the feeding rate and growth performance in Japanese sea bass, the 21d NOAEL for melamine in Japanese sea bass was 131.99mg/kg $\cdot$ w $\cdot$ d.

Key words: Melamine; Acute toxicity; Japanese sea bass