

应用体外仿生模型分析南极磷虾中氟的生物可给性及其对人体的健康风险

尚德荣^{1,2}, 赵宪勇¹, 宁劲松^{1,2}, 赵艳芳^{1,2*}, 翟毓秀^{1,2}, 盛晓风^{1,2}, 丁海燕^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所;
2. 国家水产品质量监督检验中心: 山东 青岛 266071)

摘要:运用体外全仿生消化模型研究了南极磷虾中氟的生物可给性及其对人体的健康风险。采用氟离子选择电极法进行分析,结果表明,南极磷虾中氟的溶解态含量及其生物可给性差异很大,模拟胃液中氟的溶解态含量为 81.68 ~ 1 987.4 mg/kg,生物可给性为 61.24% ~ 87.50%;模拟小肠液中氟的溶解态含量为 23.48 ~ 550.64 mg/kg,生物可给性为 16.97% ~ 27.31%。胃液中氟的溶解态含量与南极磷虾是否带壳有关。如以胃消化阶段判断,摄入南极磷虾中氟对儿童的日允许摄入量(TDI)贡献率均低于 1.0%,其中虾肉的最低为 0.035%。如以小肠消化阶段判断,摄入南极磷虾中氟对儿童的 TDI 贡献率均低于 0.30%。研究还发现,经过不同加工处理的南极磷虾摄入的氟对人体均没有太大的风险,若食用去壳后的南极磷虾且日摄入量控制在 8 000 mg 以内,其安全性更高。本研究为科学评价南极磷虾中氟的食用安全性和有效提高南极磷虾的加工利用提供参考。[中国渔业质量与标准,2014,4(4):21-26]

关键词:体外仿生;南极磷虾;氟;生物可给性;健康风险

中图分类号:S9; TS201.6 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-1833(2014)04-0021-06

南极磷虾(*Euphausia superba*)隶属节肢动物门,磷虾属,是海洋中生物储量最大的单种生物之一,其资源储量可达数亿吨^[1]。南极磷虾营养丰富,是人类赖以生存的后备蛋白库^[2-5],并富含人体所必需的氨基酸、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素及矿物质等^[6]。如何有效地开发利用南极磷虾资源已成为当今科研的重点和热点^[7]。由于南极磷虾具有富集氟的特性,对人体健康具有潜在的安全隐患,已成为制约南极磷虾综合加工利用的重要瓶颈^[8-9]。因此,南极磷虾体内氟的富集机理及富集部位等一直是国内外学者重点探讨的问题^[10-14]。但是,南极磷虾中氟的生物利用率及其安全性评价研究甚少。因现有风险评估能力是基于人群流行病学结果,全球每年能够完成一个化合物就十分不易。每年能够完成整体实验动物的毒理学评估的数量约 100 个,但真正能够符合条件的不足 10 个,而待评估的化学品成千上万,评估能力明显与新开发化合物的需求不适应,对原有化合物也没有得到很好评估^[15]。另外,伴随着动物福利问题的提出,减少、优化和替代动物试验(3R)成为当前的急迫需求。因此,本研究采用体外仿生(*in*

vitro)消化技术对南极磷虾进行预处理,应用“全仿生消化”(in vitro whole - bionic digestion)(含消化酶)方法,探讨胃和肠模拟南极磷虾中氟的生物可给性(bioaccessibility),以期为南极磷虾中氟的食用安全性评估提供重要参考依据。与动物模型相比,体外全仿生消化技术评价南极磷虾中氟的生物可给性操作简单,费用低,结果较为准确^[16]。同时还可利用生物可给性结果评估南极磷虾中氟对人体氟摄入总量的贡献率。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Milli-Q element A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司);SHY-2A 型水浴恒温振荡器(江苏金城国胜实验仪器公司);S40-K 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器公司);高速冷冻离心机 CR22G II(日本日立公司);BP221S 电子分析天平(德国 Sartorius AG 公司);pF-1 型雷磁离子氟离子选择电极(上海精密

收稿日期:2014-04-23;接收日期:2014-06-24

资助项目:国家科技支撑项目(2013BAD13B03);农业部南极海洋生物资源开发利用项目(213013551)

作者简介:尚德荣(1960-),女,高级工程师,研究方向为分析技术与水产品质量安全,shangdr@ysfri.ac.cn

通信作者:赵艳芳,副研究员,研究方向为水产品质量安全,zhaoyf@ysfri.ac.cn

科学仪器有限公司);85-1型磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂有限公司);ZRD-A7080电热恒温干燥箱(上海普城分析仪器厂)。

磷酸二氢钠、无水乙酸钠、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸二钠和硝酸钾为优级纯(美国Sigma公司);浓HNO₃和浓HCl(优级纯);淀粉酶、尿酸、粘液素、牛血清蛋白、胃蛋白酶、胰液素、脂肪酶、胆汁和卵磷脂(美国Sigma公司)。氟标准溶液购于国家标准物质研究中心。

1.2 材料与方法

1.2.1 南极磷虾

2013年捕捞于南极海域,于-20℃冷冻保存。在碎冰条件下迅速将半解冻的南极磷虾头胸部分解并剥离虾壳,收集不同部位。一部分直接绞碎混匀;一部分煮熟后绞碎混匀备用。整虾解冻后,快速沥水,样品匀浆后备用。另取部分煮熟后快速沥水,匀浆后备用。详细的样品制备方法参见徐正等^[17]报道的方法。

1.2.2 胃和肠全仿生消化液制备

根据参考文献^[18-20]制备胃和肠全仿生消化液,分别加入胃和肠中所含的有机物、无机物和消化酶,调pH至各消化液要求的数值,制备胃和肠全仿生消化液。详见表1。

表1 全仿生唾液、胃液、十二指肠液和胆汁组成成分
Tab.1 Main components of saliva, gastric juice, duodenal juice and bile

项目 Item	唾液 Saliva	胃液 Gastric juice	十二指肠液 Duodenal	胆汁 Bile
无机物	10 mL 189.6 g·L ⁻¹ KCl; 10 mL 20 g·L ⁻¹ KSCN; 10 mL 88.8 g·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ; 10 mL 57 g·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ; 1.7 mL Na ₃ PO ₄ ; 175.3 g·L ⁻¹ NaCl; 1.8 mL 40 g·L ⁻¹ NaOH	15.7 mL 175.3 g·L ⁻¹ NaCl; 3.0 mL 88.8 g·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ; 9.2 mL 89.6 g·L ⁻¹ KCl; 18 mL 22.2 g·L ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O; 10 mL 30.6 g·L ⁻¹ NH ₄ Cl; 8.3 mL 37% HCl (V:V)	40 mL 175.3 g·L ⁻¹ NaCl; 40 mL 84.7 g·L ⁻¹ NaHCO ₃ ; 10 mL 8 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ ; 6.3 mL 89.6 g·L ⁻¹ KCl; 10 mL 5 g·L ⁻¹ MgCl ₂ ; 0.18 mL 37% HCl (V:V); 9 mL 22.2 g·L ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mL 175.3 g·L ⁻¹ NaCl; 68.3 mL 4.7 g·L ⁻¹ NaHCO ₃ ; 4.2 mL 89.6 g·L ⁻¹ KCl; 10 mL 5 g·L ⁻¹ MgCl ₂ ; 0.2 mL 37% HCl (V:V); 10 mL 22.2 g·L ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O
有机物	8 mL 25 g·L ⁻¹ 尿素	10 mL 65 g·L ⁻¹ 葡萄糖; 10 mL 2 g·L ⁻¹ 葡萄糖醛酸; 3.4 mL 25 g·L ⁻¹ 尿素; 10 mL 33 g·L ⁻¹ 氨基葡萄糖盐酸盐	4 mL 25 g·L ⁻¹ 尿素	
消化酶	145 mg α-淀粉酶; 15 mg 尿酸; 50 mg 黏液素	1 g 牛血清蛋白; 1 g 胃蛋白酶; 3 g 黏液素	1 g 牛血清蛋白; 3 g 胰液素; 0.5 g 脂肪酶	1.8 g 牛血清蛋白; 6 g 胆汁素
pH	6.5 ± 0.2	1.07 ± 0.07	7.8 ± 0.2	8.0 ± 0.2

注:用HCl或NaHCO₃溶液调pH,用一级水定容至500 mL,在4℃下保存。

1.2.3 南极磷虾全仿生提取液制备

称取南极磷虾粉约0.5 g,鲜样约2.0 g,分别加全仿生唾液10 mL,在37℃下恒温振荡5 min后,加胃液150 mL,在37℃下恒温振荡2 h,从胃仿生消化食糜中取其消化液,以8 000 r/min于4℃离心10 min,取上清用0.45 μm滤膜抽滤,得胃全仿生提取液;往余下的胃仿生消化食糜中加十二指肠液

200 mL和胆汁80 mL,在37℃下恒温振荡7 h,取肠仿生消化食糜液,以8 000 r/min于4℃离心10 min,取上清用0.45 μm滤膜抽滤,得肠全仿生提取液。胃和肠的全仿生提取液于4℃下保存待测。

1.2.4 生物可给性的计算

胃消化阶段或小肠消化阶段的生物可给性可由式(1)计算:

$$BA(\%) = (C_{IV} \times V_{IV}) / (T_s \times M_s) \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

式(1)中,BA为特定的生物可给性(%); C_{IV} 是体外模拟实验的胃阶段或者小肠阶段反应液中氟的可溶态总量(mg/kg); V_{IV} 为胃、肠液体积(L); T_s 是南极磷虾中氟的总量(mg/kg); M_s 为试样质量(kg)。

1.2.5 南极磷虾中氟对人体总氟的贡献率

鉴于氟对人体有利也有弊,因此大部分国家对食品中氟的摄入量有所规定。如世界卫生组织(WHO)推荐人体日允许摄入量(tolerable daily intake, TDI)为2~4 mg、儿童1~2 mg为宜^[21];中国有关部门曾建议每人每天摄取氟的安全限量为3.5 mg。按照中国居民家庭水产品消费水平预测,到2015年,城镇居民和农村居民家庭人均年消费量分别达到19.34 kg和7.61 kg^[22],对鱼的消费量占主导地位。目前对南极磷虾的加工利用尚在初期,食用消费人群和消费量处于相对较低的水平,儿童和成人每天摄入南极磷虾量按100 mg计算(目前远没达到这个摄入量);儿童体重按中国卫生部《全国第四次儿童体格发育调查报告》中2~6岁儿童平均体重15.4 kg,成人(男

子)按56 kg计^[23]。则南极磷虾摄入对人体氟的TDI贡献率可按式(2)计算。

$$\text{南极磷虾摄入对人体氟的TDI贡献率}(\%) = (\text{模拟胃或小肠中氟溶解态含量} \times \text{摄入南极磷虾量}) / (\text{体重} \times \text{TDI值}) \times 100\% \quad \text{式(2)}$$

1.2.6 南极磷虾中及其胃肠液中氟的分析

南极磷虾中氟含量分析参照GB/T 5009.18—2003《食品中氟的测定》^[24]的改进方法^[25],将氟离子选择电极法的线性范围延伸至0.2~10.0 μg/mL测定。

2 结果与分析

2.1 南极磷虾中氟的含量

通过分析发现,南极磷虾各部位中氟含量的分布差异性很大,虾壳(包括甲壳和尾足)含量最高,其次是头胸部,虾肉中的氟含量较少。南极磷虾各部位的重量分布与其氟含量的分布特征正好相反。虾壳中氟的含量达623.30 mg/kg(湿重),占南极磷虾中氟的含量的67.87%,详见表2。

表2 南极磷虾的氟含量
Tab.2 Fluorine contents of *Euphausia superba*

$n=3$

检测对象 Detection object	重量百分比/% Weight percentage	氟含量/(mg·kg ⁻¹) Contents	氟含量百分比/% Contents percentage
生虾 fresh krill	—	272.82	—
生虾肉 fresh krill meat	43.17	102.68	5.41
虾壳 krill shell	20.89	623.30	67.87
头胸部 krill head	35.94	425.74	26.92
熟虾 boiled krill	—	373.10	—
熟虾肉 boiled krill meat	—	138.40	—
熟虾壳 boiled krill shell	—	405.48	—
熟头胸部 boiled krill head	—	364.31	—
虾粉 grilled krill	—	2569.62	—

注:—表示无。

2.2 南极磷虾中氟的溶解态及其生物可给性

南极磷虾中氟的溶解态含量及其生物可给性差异很大,模拟胃液中氟的溶解态含量为81.68~1987.4 mg/kg,模拟胃液中氟的生物可给性为61.24%~87.50%;模拟小肠液中氟的溶解态含量为23.48~550.64 mg/kg,模拟小肠液中氟的生物可给性为16.97%~27.31%。从表3的分析结果可以看

出,南极磷虾中的氟主要在模拟胃液中溶解,虾粉中氟的溶解态含量最高,这与其水分含量低和带壳有关。模拟胃液中氟的生物可给性在61.24%以上。相比之下熟虾肉中氟在模拟胃液和小肠液中溶解态氟的含量较低,其生物可给性也最低,这与其去壳有关(表3)。

表3 南极磷虾中氟的溶解态含量及其生物可给性

Tab.3 Dissolved content and bioaccessibility of fluorine in the krill

n = 3

项目 Items	胃提取液 Gastric extracts		肠提取液 Intestinal extracts	
	溶解态含量/(mg · kg ⁻¹) Content of dissolved fluorine	生物可给性/% Bioaccessibility	溶解态含量/(mg · kg ⁻¹) Content of dissolved fluorine	生物可给性/% Bioaccessibility
生虾 fresh krill	238.72 ± 8.22	87.50	51.48 ± 1.62	18.87
虾肉 krill meat	81.68 ± 2.81	79.55	28.04 ± 0.96	27.31
熟虾 boiled krill	230.0 ± 7.10	61.66	73.54 ± 2.84	19.71
熟虾肉 boiled krill	84.75 ± 2.84	61.24	23.48 ± 0.68	16.97
虾粉 grilled krill	1 987.4 ± 16.21	77.34	550.64 ± 9.62	21.43

2.3 风险预测

利用南极磷虾中氟的溶解态浓度、人体可能摄入的南极磷虾量、人体的体重及 WHO 建议氟的每天允许摄入量的中位值进行计算分析,得出人体从南极磷虾中摄入的氟对人体氟 TDI 的贡献率(表4)。从表4中可见,如以胃阶段判断,摄入南极磷虾中氟对儿

童的 TDI 贡献率均低于 1.0%,其中虾肉的最低为 0.035%。摄入南极磷虾中氟对成人的 TDI 贡献率均低于 0.15%,其中虾肉的最低为 0.004 9%。如以小肠阶段判断,摄入南极磷虾中氟对儿童的 TDI 贡献率均低于 0.30%,对于成人均低于 0.05%,最低贡献率均为虾肉。

表4 儿童和成人在胃肠阶段可能摄入的氟对氟每天允许摄入量的贡献率

Tab.4 Fluorine contribution of gastrointestinal uptake from krill to TDI for children and adults

%

项目 Items	胃 Gastric				肠 Intestinal			
	成人 Adults		儿童 Children		成人 Adults		儿童 Children	
生虾 fresh krill	0.014		0.10		0.0031		0.022	
虾肉 krill meat	0.0049		0.035		0.0017		0.012	
熟虾 boiled krill	0.014		0.10		0.0044		0.032	
熟虾肉 boiled krill	0.0050		0.037		0.0014		0.010	
虾粉 grilled krill	0.12		0.86		0.033		0.24	

3 小结

研究表明,南极磷虾中不同部位氟的溶解态含量及其生物可给性差异很大,模拟胃液中氟的溶解态含量在 81.68 ~ 1 987.4 mg/kg,其生物可给性在 61.24% ~ 87.50%;这说明胃消化酶通过影响消化过程,从而对南极磷虾中氟的溶解和生物可给性产生明显影响;模拟胃液中氟的溶解态含量与是否带虾壳有关。

通过对比发现,带壳的虾粉对儿童和成人氟的 TDI 贡献率相对较高,分别为 0.86% 和 0.12%,而去

壳后的虾肉对儿童和成人氟的 TDI 贡献率在胃和小肠阶段都低于 0.01%。可见,去壳后的南极磷虾肉对人体健康的风险大大降低。以氟的 TDI 为 3.5 mg 计算,由式(2)可得,如果食用去壳后的南极磷虾且日摄入量控制在 8 000 mg 以内,对 TDI 的贡献率低于 3%,其安全性会更高^[16]。

研究结果对于进一步科学评价南极磷虾中氟的食用安全性和有效提高南极磷虾的加工利用提供参考。

参考文献:

[1] 李显森,左涛,赵宪勇,等. 南极磷虾商业捕捞动态

- [J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(1): 8-11.
- [2] Soevik T, Braekkan O R. Fluoride in Antarctic krill (*Euphausia superba*) and Atlantic krill (*Meganyctiphanes norvegica*) [J]. J Fish Res Board Can, 1979, 36(11): 1414-1416.
- [3] 相建海. 南极磷虾和氟[J]. 海洋科学, 1985, 9(3): 57-59.
- [4] Tou J C, Jaczynski J, Chen Y C. Krill for human consumption: Nutritional value and potential health benefits [J]. Nat Rev, 2007, 65(2): 63-77.
- [5] 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.
- [6] Yoshitomi B. Utilization of Antarctic krill for food and feed [J]. Food Chem, 2004, 43(2): 45-49.
- [7] 陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 451-458.
- [8] Bunji Y, Ichiro N. Effect of dietary fluoride derived from Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal on growth of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) [J]. Chemosphere, 2012, 86(9): 891-897.
- [9] 朱兰兰, 赵晓军, 周德庆, 等. 南极磷虾中氟的研究进展 [J]. 农产品加工: 学刊, 2012, 22(3): 24-25.
- [10] Sands M, Nicol S, McMinn A. Fluoride in Antarctic marine crustaceans [J]. Mar Biol, 1998, 132(4): 591-598.
- [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] Commission for the conservation of Antarctic marine living resources. Report of the eleventh meeting of the commission [R]. Australia: CCAMR, 2004.
- [13] 朱元元, 尹雪斌, 周守标. 南极磷虾硒及矿物质营养的初步研究 [J]. 极地研究, 2010, 22(2): 135-140.
- [14] 朱兰兰, 赵彦玲, 赵晓君, 等. 南极磷虾中氟含量的调查分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 55-57.
- [15] 吴永宁. 食品中化学危害暴露组与毒理学测试新技术中国技术路线图 [J]. 科学通报, 2013, 58(26): 2651-2656.
- [16] 崔岩山, 陈晓晨. 土壤中镉的生物可给性及其对人体的健康风险评估 [J]. 环境科学, 2010, 31(2): 403-408.
- [17] 徐正, 赵宪勇, 尚德荣, 等. 不同加工方式对南极磷虾各组分的影响 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5): 1537-1541.
- [18] Omen A G, Rompelberg C J M, Bruil M A, et al. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants [J]. Arch Environ Contain Toxicol, 2003, 44: 281-287.
- [19] 林路秀, 李顺兴, 郑凤英. 应用体外仿生模型分析海藻水煎液中微量金属的形态和生物可给性 [J]. 分析化学, 2010, 38(6): 823-827.
- [20] 赵艳芳, 尚德荣, 宁劲松, 等. 运用体外全仿生消化法分析海藻中砷形态 [J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(2): 45-51.
- [21] WHO. Fluorides and Human Health [M]. Geneva: WHO, 1984.
- [22] 张欢, 孙琛. 我国居民水产品消费水平与消费特征分析 [J]. 农业现代化研究, 2009, 30(4): 430-433.
- [23] Wang X, Sato T, Xing B, et al. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish [J]. Sci total environ, 2005, 350(1/2/3): 28-37.
- [24] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.18—2003《食品中氟的测定》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [25] 盛晓风, 郭莹莹, 尚德荣, 等. 离子选择电极法测定高氟样品中氟的方法改进 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 285-289.

Bioaccessibility analysis and health risk assessment of fluorine in *Euphausia superba* using *in vitro* whole - bionic model

SHANG Derong^{1,2}, ZHAO Xianyong¹, NING Jinsong^{1,2}, ZHAO Yanfang^{1,2*},
ZHAI Yuxiu^{1,2}, SHENG Xiaofeng^{1,2}, DING Haiyan^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences;

2. National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products, Qingdao 266071, China)

Abstract: *In vitro* whole - bionic digestion model was used to study the bioaccessibility of fluorine and its health risk assessment in *Euphausia superba*. Fluorine content was determined by ion selection election. The results showed that

a great difference existed in different extracts for the dissolved fluorine content and its bioavailability. The dissolved fluorine content in the gastric extracts was between 81.68 and 1 987.4 mg/kg, and its bioaccessibility was between 61.24% and 87.50%. The dissolved fluorine content in the intestinal extracts was between 23.48 and 550.64 mg/kg, and its bioaccessibility was between 16.97% and 27.31%. The fluorine content in the gastric extracts was related to the shrimp shell. Considering the fluorine content and bioavailability in the gastric extracts, the contribution rate of fluorine in *E. superba* to the children tolerable daily intake (TDI) was below 0.035%, and if considering the fluorine content and bioavailability in the intestinal extracts, the contribution rate of fluorine in *E. superba* to the children TDI was below 0.30%. So, the human health risk of fluorine in *E. superba* with different processing method as in the present experiment was low. If the daily intake content of the shrimp without shell doesn't exceed 8 000 mg, it is safe for an average person. The present result provides important information for the safety evaluation of fluoride in *E. superba*, and the deep processing and the utilization of *E. superba*. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2014, 4(4):21-26]

Key words: *in vitro* bionic digestion; *Euphausia superba*; fluorine; bioaccessibility; health risk

Corresponding author: ZHAO Yanfang, zhaoyf@ysfri.ac.cn