

# 鱼粉中肌胃糜烂素及其检测方法研究进展

陶志华, 韩凌霜, 许晓静, 谭兆平, 林敏, 岑志鹏

(广东工业大学食品与生物工程系, 广东广州 510006)

**摘要:** 配合鱼粉饲料中的肌胃糜烂素 (gizzerosine, GZ) 是导致鸡、鸭、鱼等养殖动物发生肌胃糜烂、食欲不振、产卵率下降、吐黑、死亡的原因物质, 是褐色鱼粉直火干燥制造过程中产生的生物胺, 其引起病变的浓度范围是 1 mg/kg 左右, 生理毒性是鱼粉中组胺毒性水平的 1000 倍。引起致病的主要原因是能促进动物的胃酸大量分泌而致使胃粘膜发生病变。养殖禽类是农业的主要经济来源, 也是关系人类健康的重要食物来源。从养殖业的安全性出发, 建立适合饲料安全控制检测体系, 及时有效的控制影响禽类安全性的指标是非常必要的。本文针对肌胃糜烂素的理化性质、毒性水平及其检测方法进行综述, 为今后对肌胃糜烂素的研究方法及控制方法提供参考, 并对肌胃糜烂素的相关研究提供展望。

**关键词:** 肌胃糜烂素; 生理毒性; 检测方法; 研究进展

**文章编号:** 1673-9078(2014)8-288-291

## Detection and Characterization of Gizzerosine in Fish Meal

TAO Zhi-hua, HAN Ling-shuang, XU Xiao-jing, TAN Zhao-ping, LIN Min, CEN Zhi-peng

(Department of Food and Biology Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Gizzerosine (GZ) in fish meal feed is the causative agent of gizzard erosion and ulceration, inappetence, decreased spawning rate, Black Vomit, and death in chickens, ducks, fish, and other poultry. Gizzerosine is a biogenic amine formed during the flame-drying treatment of brown fish meal. The level of gizzerosine that can cause pathological changes is about 1 mg/kg and its physiological toxicity is 1000 times that of histamine in fish meal. The main pathogenic mechanism is that gizzerosine promotes secretion of large amounts of gastric acid, resulting in gastric mucosal lesions. Poultry farming is the main source of income in agriculture field, and is an important contributor to food-related human health. From the safety point of view in animal husbandry, it is essential to establish an inspection system that is suitable to monitor feed safety affording timely and effective control of factors affecting poultry safety. In this study, the physicochemical properties, toxicity levels, and gizzerosine detection methods were reviewed in the paper, thereby providing a reference for future research on gizzerosine and methods to control the diseases it causes. Thus, it offers a new perspective for gizzerosine-related research.

**Key words:** gizzerosine; physiological toxicity; detection methods; research progress

鱼粉是平衡蛋白质和氨基酸的优良动物性蛋白饲料, 也是平衡矿物质特别是微量元素的好饲料。但配合鱼粉饲料中的肌胃糜烂素 (gizzerosine, GZ) 是导致鸡、鸭、鱼等养殖动物发生肌胃糜烂、食欲不振、产卵率下降、吐黑、死亡等现象的主要原因, 且其造成养殖动物发病率和死亡率均偏高<sup>[1-9]</sup>。肌胃糜烂素是褐色鱼粉直火干燥制造加工过程中产生的一种生物胺, 这与红肉鱼肉中存在大量的组氨酸以及组氨酸在微生物的作用下生成大量的组胺有关。当加工温度达到 100 °C, 2 h 后, 肌胃糜烂素就开始生成。持续加热

到 150 °C 以后, 肌胃糜烂素就开始微量分解, 但生成量大于分解量, 持续加热, 温度达到 190 °C, 肌胃糜烂素的生成量达到最大 25.0 mg/kg, 温度达到 200 °C 时, 肌胃糜烂素的含量降为 23.6 mg/kg, 而且在 80 °C 条件下, 鱼粉持续受热一周, 肌胃糜烂素会在第 1~5 天内生成, 因此鱼粉在运输或贮存条件不当时, 尤其是在炎热的夏天运输途中, 温度升高, 肌胃糜烂素也会生成。致病的主要原因是肌胃糜烂素能促进 cAMP 大量生成, 进而导致胃酸的大量分泌, 过量胃酸是致病的主要原因<sup>[10-11]</sup>。但并非鱼粉饲料中存在的肌胃糜烂素均致病, 用含有 0.4 mg/kg 和 0.5 mg/kg 的低浓度肌胃糜烂素的饲料喂食, 能促进小鸡摄食量和体重增加<sup>[12]</sup>。在 VD<sub>3</sub> 存在的情况下, 微量肌胃糜烂素能促进小鸡大腿 Ca 和灰分的含量, 促进小鸡对 Ca 的吸收, 并且微量肌胃糜烂素也能增加产蛋鸡蛋壳的钙质, 减少鸡蛋的破损<sup>[13]</sup>。目前, 国内外大多数关于肌胃糜烂

收稿日期: 2014-02-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31101743); 国家自然科学基金 (31300804)

作者简介: 陶志华 (1973-), 女, 博士, 副教授, 海洋生物资源的有效利用及其有害成分的控制技术研究

通讯作者: 陶志华 (1973-), 女, 博士, 副教授, 海洋生物资源的有效利用及其有害成分的控制技术研究

素的研究都是针对肌胃糜烂素对禽类产生的生理性影响和一些治疗措施等方面的报道,对其理化性质和检测方法的研究则极少见报道。本文就肌胃糜烂素的理化性质、生理毒性及其检测方法研究进展进行综述。

## 1 肌胃糜烂素

### 1.1 理化性质

1983年,日本东京大学 Okazaki 等利用质谱分析和核磁共振( $400^1\text{H-NMR}$ )实验揭示了肌胃糜烂素的分子量为240,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4$ ,化学组成为2-氨基-9-(4-咪唑基)-7-氮诺氨酸,难挥发。肌胃糜烂素在两性电解质中,显示氨基酸的特性,等电点极高。在 $400^1\text{H-NMR}$ 实验中发现了肌胃糜烂素分子中有来自于咪唑核的芳香杂环化合物质子。通过质子偏共振自旋去耦实验,发现肌胃糜烂素分子还含有别的 $-\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-\text{N}-$ 和 $=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ 基团,暗示肌胃糜烂素含有组胺残基和赖氨酸残基(见图1)<sup>[1]</sup>。从分子结构看,肌胃糜烂素的形成跟组胺,组氨酸和赖氨酸有着直接的关系。

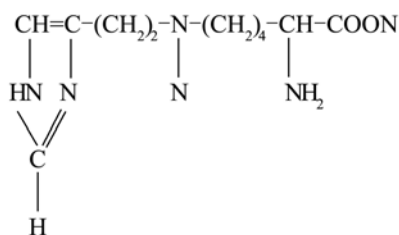


图1 肌胃糜烂素的分子结构

Fig.1 The molecular structure of GE

### 1.2 生理毒性

动物在一般正常情况下,胃粘膜释放少量组胺,通过局部弥散到壁细胞,与壁细胞上的组胺受体( $\text{H}_2$ 受体)结合,从而刺激壁细胞分泌大量的胃酸。肌胃糜烂素有类似组胺的作用,其刺激胃酸分泌的能力是组胺的10倍。据研究报道其致病的主要原因是促进胃酸过量分泌,引起肌胃pH下降,3日龄的小鸡喂饲含有6.25 mg/kg肌胃糜烂素的日粮一周后,肌胃和十二指肠内的pH下降,pH值分别能达到4.4~3.6和6.4~5.6。小鸡达到11或16日龄时,静脉注射肌胃糜烂素盐液30 min,肌胃内pH值由3.7降为2.9,十二指肠内pH值由3.6降为2.6,小鸡全部死亡<sup>[1]</sup>。过量的胃酸会损害禽类动物的肌胃粘膜,导致肌胃内角质膜发生糜烂和溃疡。Noguchi的研究文献报道<sup>[4]</sup>,肌胃糜烂素标准品经小鸡腹腔注入后,肌胃糜烂素在小鼠血液中的半衰期为2.7 h,同时注入小鼠腹腔的肌胃糜

烂素,在小鼠血液中的半衰期为16 min,而组胺在小鼠血液中的半衰期仅为3分钟左右,肌胃糜烂素对哺乳动物可能没毒性作用。通过 $\text{In Vitro}$ 实验证实,组胺和肌胃糜烂素直接作用于分离出的肌胃层细胞,组胺与肌胃糜烂素的活性差别不大,而通过 $\text{In Vivo}$ 实验,肌胃糜烂素能促进胃酸分泌能力比组胺大1000倍。肌胃糜烂素的强大作用源于它在小鸡血液里存在时间很长,而且肌胃糜烂素在促进cAMP形成方面强于组胺1000倍,并且肌胃糜烂素对小鸡的消化细胞表的亲和力比组胺强,所以肌胃糜烂素对小鸡的致病及致死率远远高于组胺。Sugahara报道,喂食含0.93 mg/kg肌胃糜烂素的鱼粉配合饲料,4周间能引起小鸡死亡率达到25%;喂食含3.48 mg/kg肌胃糜烂素的鱼粉饲料,4周间引起小鸡的死亡率达到83%<sup>[15]</sup>。将含30.8 mg/kg肌胃糜烂素的鱼粉按20%配合到饲料中,曾引起小鸡的肌胃层糜烂,产卵率下降,绿色痢疾便等病症<sup>[4]</sup>。

因此,肌胃糜烂素的简单准确快速的分析方法,具有重要意义。目前鱼粉中肌胃糜烂素的检测方法,主要有以下几种。

## 2 检测方法研究进展

### 2.1 荧光检测法

Ito开发了肌胃糜烂素的OPA(邻苯二甲醛)诱导后的荧光检测技术<sup>[16]</sup>。鱼肉样品在110℃用6 mol/L的盐酸水解24 h,加少量活性炭过滤。滤液脱水除去盐酸,经IR-CG50固相柱萃取净化,再经RP-8固相柱进一步净化,洗出液冻干后溶解在1 mL的水中,通过ODS柱,用醋酸盐缓冲液洗脱(流速1.5 mL/min)得到含有肌胃糜烂素的洗出液。洗出液冻干后溶解在适量水中,加入硼酸缓冲液、乙硫醇、OPA三者混合物荧光衍生,KOH调节pH至10后即可用于荧光定量检测。

样品经定量检测所得图谱与合成的标准肌胃糜烂素图谱进行比较,样品中肌胃糜烂素的出峰时间与标准品基本一致。用此方法定量检测了浓度为0.2~5 ug/g的肌胃糜烂素,所得线性关系较好,且回收率也达到了95~102%。这些结果表明,该方法可以检测到鱼粉中引起动物肌胃层糜烂的肌胃糜烂素的浓度,对防止养殖家禽发生吐黑等疾病有很大帮助。

### 2.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography/HPLC)<sup>[17]</sup>是目前应用广泛的分离、

分析的有效方法之一。在已知的有机化合物中,约有80%能用高效液相色谱法分离、分析,而且由于此法条件温和,不破坏样品,因此特别适合高沸点、难气挥发、热稳定性差的有机化合物和生命物质。

Wada 开发了检测肌胃糜烂素的 HPLC 分析方法<sup>[18]</sup>。之后, Ohta 用此方法成功地检测了鱼粉样品中的肌胃糜烂素<sup>[19]</sup>。鱼粉样品检测前的处理方法与 Ito 的处理方法相同。柱前衍生后,使用 2619-F 分析柱进行 HPLC 检测,所用流动相为硼酸钠溶液 (pH 9.2 和 pH 10.7)、0.8% 氢氧化钠溶液 (含 3% 乙醇),变换浓度梯度洗脱,流速为 1 mL/min,激发波长和发射波长分别为 350 nm 和 450 nm。实验结果表明,添加到鱼粉中的肌胃糜烂素的回收率超过 90%,最小检出限达到了  $1 \times 10^{-3}$  g/kg。

### 2.3 放射性标记免疫检测法

放射免疫检测法 (Radioimmunoassay, RIA) 是利用同位素标记的与未标记的抗原同抗体发生竞争性抑制反应的放射性同位素体外微量分析方法,又称竞争性饱和分析法。此法是 1960 年由美国化学家 R S 耶洛和 S A 贝尔森提出。

用放射性标记免疫检测法测定肌胃糜烂素含量的方法是由 Marcela 开发的<sup>[20]</sup>。Marcela 用的是  $^{125}\text{I}$  标记的 Bolton-Hunter 蛋白碘化试剂和 Iodogen 氧化剂。 $^{125}\text{I}$ -GZ 半抗原和 GZ 多克隆抗体结合,用组胺-琼脂糖凝胶柱吸收。该方法得到的曲线是具有线性关系,能检测的肌胃糜烂素的浓度范围为 0.0001~0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。添加已知量的肌胃糜烂素到鱼饲料样品中,所得到的剂量效应和标准品的曲线相似,而且样品中的其它化合物也不影响  $^{125}\text{I}$ -GZ 与抗体的结合。RIA 方法可以用于检测鱼粉中的肌胃糜烂素。

### 2.4 单克隆抗体 ELISA 法

酶联免疫吸附法,又称 ELISA 法,其中心是让抗原或抗体与酶复合物结合,然后通过显色来检测。Manosalva 开发了应用单克隆抗体 ELISA 检测鱼粉中肌胃糜烂素的方法<sup>[21]</sup>。他们使 BALB-c 小白鼠对抗-GZ 3H4 抗体免疫,这种抗体是和来自免疫分析的血蓝蛋白结合在一起的。然后让来自免疫鼠的 NSO/2 细胞和脾细胞扩散融合,得到了 34 种潜在的抗-特异型抗体,这些抗体可以通过它们被杂交瘤细胞上清液与特异型粒子的结合程度来区分。用竞争性 RIA 方法来分析抗-特异型抗体,以确定它们分离  $^{125}\text{I}$ -GZ 和抗-GZ 3H4-特异型抗体之间相互作用的能力。得到了三种抗-特异型抗体,分别是 2D11、2H6、3A12,这三种抗体再通

过竞争性 ELISA 方法分析(GZ 和示踪物-HRP 特异基因型竞争)。结果显示 GZ 的灵敏度在 0.1~10  $\mu\text{g/mL}$  范围内,3A12 抗抗-特异型抗体的结果最好。此外,赖氨酸、组氨酸等物质在低浓度范围内不会干扰 GZ 的检测。用含有合成 GZ 的鱼粉所做的实验结果也比较理想,鱼粉中的其它物质也不会影响到 ELISA 系统。所以,结合到固相的特异型和抗-特异型 3A12-HRP 作为示踪物的 ELISA 方法可以作为检测鱼粉中肌胃糜烂素的一种理想方法。

### 2.5 纸电泳分析法

纸电泳分析法的原理是根据电泳现象在渗透了缓冲液的滤纸上加上电场,从而使物质移动,也就是把样品加在作为支持体的滤纸内来检测其移动和分离的方法。常用于分离性质相似的物质,如各种氨基酸的分离和稀土元素的分离等。

陶志华等人开发了纸电泳分析法来分析鱼粉中肌胃糜烂素的含量<sup>[22]</sup>,鱼粉样品用 80% 乙醇提取,经离心后取上清液,以醋酸、吡啶、水按照一定比例 (4:1:289) 混合作电泳缓冲液,定性滤纸作纸桥,进行纸电泳实验。实验条件是:额定电压 1000 V,额定电流 10 mA,电泳时间 10 min,肌胃糜烂素与组胺及组氨酸进行有效分离后,利用面积分析软件对样品中的肌胃糜烂素定量分析。纸电泳法快速,简便,稳定,灵敏度较高,后来推广到用于鱼粉中的肌胃糜烂素的分析与测量,也取得了较好的结果。

### 2.6 LC-MS-MS 方法

Uhlig 把亲水性作用色谱连接到离子化的电喷雾和串联四级杆质谱上,开发了液-质-质联用的肌胃糜烂素的检测方法<sup>[23]</sup>。样品通过酸水解及脱盐,水解产物通过阳离子交换树脂吸附,然后经流动相 A (10 mM 的醋酸缓冲液) 和流动相 (乙腈溶液) 从 1/1 A:B 到 A:B 4/1 梯度洗脱 18 min,洗脱液中的肌胃糜烂素通过 HPLC 正向接入的 TSQ 量子化的串联四级杆质谱上电喷雾 (喷雾电压 4.5 V,温度 180  $^{\circ}\text{C}$ ) 操作,质子化的分子离子通过多反应监控装置进行定量分析。此方法的回收率在 68%~82%,检出限度能达到 0.25 mg/kg。

该方法也可以检测到鱼粉中引起动物肌胃层糜烂的肌胃糜烂素的浓度,能用在肌胃糜烂素的相关研究及对鱼粉中肌胃糜烂素的监控,对防止养殖家禽发生吐黑等疾病有帮助。

## 3 前景与展望

以上对肌胃糜烂素的检测方法的研究进行了综



述, 高效液相色谱法要进行色谱柱的净化, 还要对样品分 3 步纯化, 准备工作比较繁琐, 但检测灵敏度高, 准确性好; 放射性标记免疫检测法操作比较简单方便, 但涉及到放射性物质对样品的标记, 检测硬件条件和操作技术要求比较高, 在实践工作中的推广难度较大。单克隆抗体 ELISA 方法, 需要有结合到固相的特异型和抗-特异型 3A12-HRP 抗体, 提高检测肌胃糜烂素的灵敏度和效率; 纸电泳分析法是利用重氮偶联和电泳结合的方法, 此方法快速、简单, 但灵敏度比不上其它的一些检测方法。LC-MS-MS 方法测定限度能达到 0.25 mg/kg, 但是回收率偏低, 操作烦杂。综合来说, 现在应用比较多的检测方法是高效液相色谱法。如果能利用肌胃糜烂素的重氮偶联, 不需要复杂的前处理, 结合高效液相检测技术, 研究出有效分离条件, 对将来肌胃糜烂素的检测方面, 能得到有效的监控应用。

### 参考文献

- [1] Okazaki T, Noguchi T, Igarashi K, et al. Gizzerosine, a new toxic substance in fish meal, causes severe gizzard erosion in chicks [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1983, 47: 2949-2952
- [2] Sugahara M, Hattori T, Nakajima T. Lethal toxicity of gizzerosine for Broiler chicks [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51: 3423-3424
- [3] Hino T, Noguchi T, Naito H. Effect of gizzerosine on acid secretion by isolated mucosal cells of chicken proventriculus [J]. *Poult. Sci.*, 1987, 66: 548-551
- [4] Matsui M. Erosion of the stomach muscle stratum corneum by gizzerosine [R]. *Animal Health Workshop*, 2001, 11. In Japanese
- [5] 杨启雪, 金中林, 甄红华, 等. 麻鸡对肌胃糜烂素更敏感[R]. 中国畜牧兽医学会禽病分会第十三次学术研讨会, 2006
- [6] Tisljar M, Grabarević Z, Artuković B, et al. Gizzerosine-induced histopathological lesions in broiler chicks [J]. *Br. Poult. Sci.*, 2002, 43(1): 86-93
- [7] Branka A, Željko G, Marina T, et al. Gizzerosine induced histopathological changes in laying hens [J]. *Vet. Arhiv.*, 2005, 75(1): 1-13
- [8] Nouri M, Azarabad H, Moini M. First report of coccidiosis and gizzard erosion in a zebra finch (*taeniopygia guttata*) of Iran. *Archives of Razi Institute*, 2012, 67(1): 75-78
- [9] Rodgers A N J, Iji A PA, Vanselow B B A. Suspect biogenic amine toxicity in an experimental broiler flock [J]. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 2010, 28: 102-102
- [10] 增村忠宏, 金玉璞. 鱼粉引起的肉鸡肌胃糜烂和溃疡[J]. 国外畜牧学(猪和禽), 1983, 4: 34-35
- [11] Sugahara M, 史照译, 李川校. 黑色呕吐病肌胃糜烂症和肌胃糜烂素[J]. 国外畜牧科技. 1996, 23(6): 48-52
- [12] Sugahara M, Hattori T, Nakajima T. Effect of low concentrations of gizzerosine in Broiler chicks diets [J]. *Jpn. Poult. Sci.*, 1993, 30: 389-395
- [13] Horikawa H, Masumura H, Susumu H, Emiko W. Effects of dietary gizzerosine on calcium content in the Femur of Chicks [J]. *Jpn. Poult. Sci.*, 1992, 29: 221-227
- [14] Noguchi D. Research state of gizzerosine which causing the muscle stomach ulcer of chick [J]. *Proc. Jpn. Soc. Ani. Nutr. and Metab.*, 1989, 33(2): 97-100. In Japanese
- [15] Sugahara M, Hattori T, Nakajima T. Effect on the growth performance of broiler and death due to long-term administration of feed containing gizzerosine [J]. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 1988: 62(3): 328-328. In Japanese
- [16] Ito Y, Noguchi T, Naito H. Fluorometric determination of gizzerosine, a Histamine H2-receptor agonist discovered in foodstuffs, employing high-performance liquid chromatography [J]. *Anal. Biochem.*, 1985, 151: 28-31
- [17] Li W, Lin X, Chen G. Analysis of 2% Potassium (o-nitrophenol+p-nitrophenol+2, 4-dinitrophenol) aqueous solution by HPLC [J]. *Guangdong Chemistry*, 2008, 35(8): 126-129
- [18] Wada T, Hishiyama T, Ueno J. Simple quantitative method of analysis for small amount of gizzerosine [J]. *Scientific Feeds*, 1987, 32: 342-348
- [19] Ohta Y, Ohashi H, Enomoto S, et al. Simple measurement of Gizzerosine in Fish meal by high-performance Lgraphy [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 52(11): 2817-2821
- [20] Marcela T, Headd M, Isabel C, et al. Procedure for radiolabeling gizzerosine and basis for a radioimmunoassay [J]. *Agric. Food Chem.*, 1999, 47: 4231-4236
- [21] Manosalva H, De Ioannes A E, Becker M I. Development of monoclonal antibodies bearing the internal image of the gizzerosine epitope and application in a competitive ELISA for fish meal [J]. *Hybridoma and Hybridomics*, 2004, 23(1): 45-48
- [22] Tao Z, Sato M, et al. A simple, rapid method for gizzerosine analysis in fish meal by paper electrophoresis [J]. *Fisheries Science*, 2012, 78: 923-926
- [23] Uhlig S, Kaldhusdal M, Gjevre A. LC-MS-MS determination of gizzerosine in poultry feed [J]. *Chromatographia*, 2011, 74: 133-138