

一起食物中毒事件中毒理学试验方法的应用

冯瑄, 何薇, 刘辉, 刘红梅, 赵显锋, 田丽, 郭美丽
陕西省疾病预防控制中心毒理检验与评价所, 陕西 西安 710054

摘要: **目的** 为食物中毒事件致病因子的快速筛查提供毒理学依据。 **方法** 将 2018 年 3 月 26 日陕西省延长县某村一家 6 人进食中毒现场采集的 6 份可疑样品对小鼠以最大耐受量一次灌胃给予后, 观察动物毒性表现初步判断致毒物; 针对致毒物进行小鼠急性经口毒性试验的预实验, 初步判断其毒性分级; 根据预试验结果同时开展理化定性定量分析和急性经口毒性霍恩氏法正式试验的检测, 最终确定致病因子和致毒物的 LD₅₀。 **结果** 小鼠最大耐受量给予 5 号样品后短时间内死亡, 其余样品均未有死亡的表现, 锁定 5 号样品为致毒物; 急性经口毒性预试验初步判断致毒物 LD₅₀ < 62.5 mg/(kg·BW), 毒性分级为高毒级; 经理化定性定量分析, 5 号样品中含有浓度高达 2.23×10⁴ mg/kg 的呋喃丹, 霍恩氏法测定其 LD₅₀ 为 43.0 mg/(kg·BW) (雌) 和 50.1 mg/(kg·BW) (雄)。 **结论** 本次食物中毒事件的致病因子为呋喃丹。食物中毒事件中通过对可疑样品进行毒理学动物试验, 可以快速锁定致病因子并提供毒性分级线索, 为类似食物中毒事件的处置提供方法参考。

关键词: 食物中毒; 毒理学试验; 致病因子
中图分类号: R595.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)08-1007-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.08.032

2018 年 3 月 26 日, 陕西省延长县某村一家 6 人在进食早餐后 10~30 min 内发生头晕、抽搐、呕吐等症状, 紧急送医后有患者出现大小便失禁、意识不清、瞳孔缩小等症状。对现场进行了危害因素初步排查及患者临床表现分析后, 随即采集可疑物进行实验室定性定量分析。在实验室检测中, 通过食物中毒小鼠模型复制及小鼠急性经口毒理学试验, 较短时间内缩小了毒源范围, 结合现场流行病学调查及理化分析最终认为本次中毒是食用了混有呋喃丹(克百威)的食物所引起的。现将试验部分报告如下。

1 材料与方法

1.1 食物中毒样品及处理 中毒采集样品包括呕吐物(1 号)、洗胃液(2 号)、猪肠(3 号)、馒头(4 号)、不明原因粉末 1(5 号)和不明原因粉末 2(6 号)。预试验样品处理方法见表 1。急性经口毒性预试验中对引起实验动物死亡的样品处理方法为: 称取可疑样品 500 mg 加入超纯水至 10 ml 混匀作为染毒剂量 1 000 mg/(kg·BW) 备用(浓度为 5%), 依次用超纯水 2 倍稀释为 500、250、125、62.5 mg/(kg·BW) 和 31.3 mg/(kg·BW) 染毒剂量的混悬液备用(浓度依次为 2.5%、1.25%、0.625%、0.313% 和 0.156%)。急

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF283); 陕西省科技资源开放共享平台项目(2016FWPT-12)
作者简介: 冯瑄(1980-), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 食品毒理学。

性经口毒性正式试验依设计剂量将可疑样品配制所需浓度。

表 1 送检样品毒物初筛处理方法

序号	样品名称	采集地点	处理方法
1	呕吐物	家中	使用匀浆器将样品混匀备用。
2	洗胃液	县医院	原液备用, 不做处理。
3	猪肠	家中厨房	加入适量超纯水使用匀浆器混匀制成糊状备用。
4	馒头	家中厨房	加入适量超纯水使用匀浆器混匀制成糊状备用。
5	不明原因粉末 1	家中厨房	称取样品 2 500 mg 加超纯水至 10 ml 备用。染毒剂量为 5 000 mg/(kg·BW)。
6	不明原因粉末 2	家中厨房	称取 2 500 mg 加入 3% 淀粉糊至 10 ml 制成混悬液备用。染毒剂量为 5 000 mg/(kg·BW)。

1.2 实验动物 昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(陕)2017-003 号, 质量合格证号为 61001700002618, 实验动物使用许可证号为 SYXK(陕)2013-005 号。动物房室温 22℃±2℃, 相对湿度 50%±5%, 在光照-黑暗交替条件下(光照期 7:00-19:00, 黑暗期 19:00-7:00), 自由饮水进食。饲料、垫料均由北京科澳协力饲料有限公司提供。
1.3 仪器 TE2101-L/0.1 g 电子天平和 BS110S/0.1 mg 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司), Direct Q3UV+Bi 超纯水机(美国密理博有限公司)和 Tissue-Tearor 手持式高速组织匀浆器(美国 Biospec 公司)。
1.4 毒物初筛试验方法 取禁食 4 h 雌性小鼠, 每种处理样本经口给予 2 只动物, 灌胃容量均为

0.2 ml/(10 g. BW), 观察 0.5 h 内实验动物毒性反应。

1.5 小鼠急性经口毒性预试验方法^[1] 毒物初筛试验中导致动物出现死亡现象的样本, 按照 1 000、500、250、125、62.5 mg/(kg · BW) 和 31.3 mg/(kg · BW) 的剂量, 从高到低依次进行试验。首先一次性灌胃给予 2 只动物最高剂量, 灌胃容量为 0.2 ml/(10 g. BW), 观察动物死亡情况; 出现死亡即给予较低剂量受试物, 依次进行各剂量的动物染毒。连续观察 24 h, 记录中毒表现及死亡情况。

1.6 理化试验方法 参照《国家食品污染物手册》^[2] 中相应方法进行。

1.7 小鼠急性经口毒性正式试验方法^[1] 根据预实验结果按照霍恩氏法 LD₅₀ 值计算表选定 5 个剂量, 每个剂量 10 只动物, 雌雄各半, 取禁食 4 h 小鼠, 灌胃给予相应剂量, 灌胃容量均为 0.2 ml/(10 g. BW) 观察 7 d。记录动物死亡数, 根据每组死亡动物和所采用的剂量系列求得 LD₅₀。

表 2 5 号样品小鼠急性经口毒性实验结果

剂量 mg/(kg·BW)	动物数 (只)	体重 (g)	毒作用表现	死亡数 (只)
1000	2	18.0~ 22.0	经口染毒 3 min 后动物出现不动, 流涎, 震颤等症状, 8 min 后动物死亡。大体解剖见小鼠胃肠胀气。	2
500	2	18.5~ 21.6	经口染毒 2 min 后动物出现不动, 呆卧, 震颤, 4 min 后一只动物死亡, 5 min 后另一只动物死亡。大体解剖均可见小鼠胃肠胀气。	2
250	2	18.6~ 21.5	经口染毒 3 min 后动物出现扭体, 闭眼, 呆卧, 后肢无力等症状, 4 min 后出现震颤, 眼部有分泌物, 两只动物死亡。大体解剖均可见胃胀气。	2
125	2	19.0~ 21.0	经口染毒 1 min 后动物出现震颤, 4 min 后出现不动、少动症状, 5 min 后一只动物死亡, 6 min 后另一只动物死亡。大体解剖均可见胃肠胀气。	2
62.5	2	19.2~ 21.0	经口染毒 4 min 后动物出现步态不稳, 震颤, 不安, 多动, 后肢无力, 眼球突出等症状, 8 min 后一只动物死亡, 10 min 后另一只动物死亡。大体解剖均可见胃粘膜出血。	2
31.3	2	20.0~ 20.1	经口染毒 5 min 后动物出现呆卧, 不动症状, 8 min 后两只动物鼻腔出现分泌物增多现象。24 h 后动物恢复正常。	0

见表 2。62.5 mg/(kg · BW) 剂量组两只实验动物短时间内均出现死亡现象(现有试验条件下死亡率 100%) 以及 31.3 mg/(kg · BW) 剂量组两只实验动物短时间内均出现明显毒作用表现并于 24 h 后恢复正常, 可初步判断 5 号样品的对雌性小鼠的急性经口毒性 LD₅₀ 的范围可能为 31.3 ~ 62.5 mg/(kg · BW)。根据 GB 15193.3-2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》^[3] 中急性毒性(LD₅₀) 剂量分级表, 5 号样品作为食品毒性分级有可能为剧毒级或中等毒级; 鉴于本次食物中毒事件的病患为农业从业者, 并且中毒事件发生时, 正处于春季农作物除虫季, 病患接触农药的可能性较大, 根据“农药登记资料规定”^[4] 中 3.3.2.8 农药产品毒性分级及标识表中“经口半数致死量在 20 ~ 200 mg/(kg · BW) 为高毒级”, 初步推断 5 号样品在农药产品毒性分级属高毒级。

2.3 理化试验结果 根据毒物初筛试验和经口毒性预试验的结果, 以 5 号样品为重点分析对象, 检测其中是

2 结 果

2.1 污染食物毒性初筛结果 1 号、2 号、3 号和 6 号样品在灌胃染毒后的 0.5 h 内, 实验动物均未出现明显中毒表现及死亡现象。4 号(馒头) 和 5 号(不明原因粉末 1) 样品在灌胃染毒后, 所有染毒实验动物均出现不动、流涎、震颤等中毒症状; 其中 5 号样品染毒实验动物分别于染毒 3 min 后和 4 min 后死亡, 大体解剖可见动物胃肠胀气。根据实验动物染毒后 0.5 h 内的毒作用表现, 初步确定 5 号样品具有最大致毒可能性, 并提示 4 号样品中可能混有 5 号毒物。

2.2 可疑样品的急性经口毒性试验结果 5 号样品在 62.5 ~ 1 000 mg/(kg · BW) 剂量范围内全部小鼠出现死亡现象(死亡时间均在给受试物后 10 min 以内); 31.3 mg/(kg · BW) 剂量组小鼠在给受试物后 10 min 内即有明显中毒症状, 至 24 h 恢复饮食活动正常。毒作用表现见表 2。

否含有高度级及剧毒级农药。5 号样品中未检出杀鼠剂(杀鼠灵、敌鼠钠盐和氟乙酰胺); 有机磷类农药检出也均在国家允许范围内; 氨基甲酸酯类农药呋喃丹检出量较高: 2.23×10⁴ mg/kg。呋喃丹在可能混有 5 号样品的病患呕吐物(1 号) 及馒头(4 号) 中也均有检出。

2.4 可疑样品的急性经口毒性正式试验结果 根据预试验估计 5 号样品的对雌性小鼠的急性经口毒性 LD₅₀ 的范围可能为 31.3 ~ 62.5 mg/(kg · BW), 选定 215、100、46.4、21.5 mg/(kg · BW) 和 10.0 mg/(kg · BW) 5 个剂量组进行霍恩氏法试验。染毒后 10 min 内实验动物即出现震颤、少动中毒症状, 多数有毒反应症状的实验动物在 1 h 内死亡。死亡动物大体解剖可见胃肠胀气及出血。5 号样品对小鼠急性经口毒性试验结果见表 3。查表^[5] 可得 5 号样品对雌性小鼠的 LD₅₀ 为 43.0 mg/(kg · BW) (可信限为 29.5 ~ 62.6 mg/(kg · BW)) 对雄性小鼠的 LD₅₀ 为 50.1 mg/(kg · BW) (可信限为 34.4 ~ 73.0 mg/(kg · BW))。

表 3 5 号样品小鼠急性经口毒性正式试验结果

性别	剂量 [mg/(kg·BW)]	动物数 (只)	死亡动物数 (只)	存活动物数 (只)
雌性	215	5	5	0
	100	5	5	0
	46.4	5	3	2
	21.5	5	0	5
	10.0	5	0	5
雄性	215	5	5	0
	100	5	5	0
	46.4	5	2	3
	21.5	5	0	5
	10.0	5	0	5

3 讨 论

在本次食物中毒事件实验室分析的过程中,针对食品中毒事件中病人呕吐物、洗胃液以及病人摄入的可疑样品进行了食物中毒的生物体(小鼠)模型复制。经口给予小鼠可疑样品 0.5 h 内即快速锁定了 5 号样品(不明原因粉末 1)为最大可能致病因子;在进一步的急性经口毒性预试验中给予小鼠 5 号可疑样品 10 min 后即初步给出致毒样品的 LD₅₀ 的范围可能为 31.3 ~ 62.5 mg/(kg·BW),毒性分级为高毒级。根据此预试验结果,理化实验室定性定量分析主要针对 5 号样品开展,并根据可疑致病因子依据农药产品的毒性分级可能为高毒级这一线索,结合食物中毒现场流行病学调查情况,有针对性的以农业从业者可能接触的农药为分析方向,最终定性定量了引起本次食物中毒的物质为呋喃丹。5 号样品的小鼠急性经口试验结果显示 LD₅₀ 分别为 43.0 mg/(kg·BW)(雌)和 50.1 mg/(kg·BW)(雄),验证了预试验预估的结果。

我国食物中毒事件发生场所近年来常见于家庭,其中化学类致毒因子导致相关人员的中毒症状均较为严重^[6]。在食物中毒现场,中毒物质的多样性,使得不能快速锁定致毒物质的种类及调查方向,这一直以来是食物中毒事件处置中的难点。本次事件中,对现场采集的可疑样品先进行了毒理学动物试验,快速缩小了检样范围,锁定了致毒样本,为事件的处置及病患的救治节约了大量的时间成本,也为日后处置类似事件提供了具体操作的参考。现场来源样本均尽可能最大染毒剂量地给予实验动物,可以快速确定致毒样本;进一步毒理学试验,可倍比稀释致病因子为不同染毒剂量给予实验动物,根据动物死亡情况,为致病因子的毒性分级提供线索。需要说明的是,毒理学试验的操作均参照 GB 15193.3-2014^[1],但由于中毒事件处置的时效要求,实验动物数及观察时间均发生了偏离。

呋喃丹又名克百威,是氨基甲酸酯类农药,常用于

土壤中防治害虫,具有高效、广谱、高毒性的特性。虽然我国农业部第 199 号公告^[7]把呋喃丹列为限制使用农药,不允许在蔬菜、果树、茶叶和中草药材上使用,但我国当前在其它作物上的使用仍然较为广泛。目前市场上常见的剂型为呋喃丹 75% 粉剂和 30% 颗粒剂。呋喃丹的毒性高,是乙酰胆碱酯酶抑制剂^[8],急性中毒的临床表现与有机磷类农药中毒较为相似,救治时易引起误诊。由于呋喃丹水溶性大、内吸性强,因此在农药生产加工及农业从业者工作生活中必须谨慎操作。呋喃丹引起的中毒事件近年来时有发生:2016 年有文献报道广东省某小型农药生产厂发生过职业中毒事件^[9],2009 年 1 月十堰市某工厂加工农药种子时发生中毒事件^[10];2017 年宁夏某村 4 人进食烩菜导致了呋喃丹中毒^[11],2015 年安康市某县农户误食了呋喃丹污染的馒头引发食物中毒^[12],2014 年延安市发生吃饭(面)后出现呋喃丹中毒症状^[13],2013 年 4 月内蒙古某餐厅发生呋喃丹导致的群体性食物中毒^[14]。本次食物中毒为呋喃丹被当做食物添加剂误食导致。上述近年来发生的呋喃丹中毒事件提示相关部门应继续加强农药的使用管理,有针对性的对农业从业者开展农药知识宣传,避免出现类似情况。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.3-2014 食品安全国家标准 急性经口毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2015:1-3.

[2] 杨大进, 李宁. 2013 年国家食品污染和有害因素风险工作手册[M]. 中国标准出版社, 2012:141-150.

[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.3-2014 食品安全国家标准 急性经口毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2015:21.

[4] 中华人民共和国农业部. 农药登记资料规定(中华人民共和国农业部第 010 号令)[Z]. 2007-12-08.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.3-2014 食品安全国家标准 急性经口毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2015:9-11.

[6] 王萍,宋晓冰. 2006-2015 年中国大陆地区食物中毒特征分析[J]. 实用预防医学,2018,25(3):257-260.

[7] 中华人民共和国农业部. 关于中药材上禁止和限制使用的农药种类(中华人民共和国农业部公告第 199 号)[Z]. 2002-06-05.

[8] Chapalamadugu S, Chaudhry GR. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. [J]. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12(5-6):357-389.

[9] 英若娴,林英钊,陈日暖. 一起呋喃丹中毒事故分析[J]. 工业卫生与职业病,2016,42(3):239.

[10] 王容侠,陈四平. 一起急性呋喃丹农药中毒事件的调查[J]. 工业卫生与职业病,2010,36(6):382.

[11] 徐飞,刘峰,张亚军,等. 液相色谱-串联质谱法检测一起由化学物质引起的食物中毒[J]. 中国食品卫生杂志 2017,29(6):750-752.

[12] 王娟,张骅,施周文,姜伟,等. 化学性食物中毒样品克百威定性分析[J]. 环境卫生学杂志,2016,6(2):162-163,168.

[13] 陈涛,霍起森,刘永宏. 呋喃丹中毒检验 1 例[J]. 延安大学学报(医学科学版),2015,13(3):60-61.

[14] 金化瑞,徐晓枫,单美娜,等. 一起由克百威引起的群体性食物中毒检测报告[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(6):885-886.