

2013~2015年湖北地区虾中硝基呋喃代谢物 残留的监测分析

闻胜¹, 熊碧¹, 黄常刚², 梁高道², 何振宇², 刘潇¹, 张瑞¹,
陈明¹, 宋毅^{1*}

(1. 应用毒理湖北省重点实验室, 湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079;
2. 武汉市疾病预防控制中心, 武汉 430015)

摘要: **目的** 分析 2013~2015 年湖北地区虾产品中硝基呋喃类药物的残留情况, 以期对硝基呋喃代谢物的来源和危害分析提供科学依据。 **方法** 采用超高效液相色谱串联质谱法检测湖北虾产品中呋喃它酮(furaltadone)、呋喃西林(nitrofurazone)、呋喃妥因(nitrofurantoin)和呋喃唑酮(furazolidone)4 种硝基呋喃类代谢物的残留量, 并用 Excel 和 SPSS 16.0 对实验数据进行统计学分析。 **结果** 硝基呋喃类药物的代谢产物总体检出率为 27.09%, 检出的代谢物均为氨基脒(semi carbazide, SEM), 河虾的检出率最高, 为 61.54%; 其次是基围虾为 6.78%; 最低是小龙虾为 1.38%; 对于整体匀浆的带壳河虾样品, 检出率高达 91.67%; 而去壳的河虾虾肉样品没有检出 SEM。 **结论** 湖北地区的虾产品中存在不同程度的硝基呋喃污染情况, 同时发现河虾中有内源性 SEM 的存在。结合湖北地区居民的膳食消费情况分析, 虾中 SEM 暴露对人类健康危害较小。

关键词: 虾; 硝基呋喃; 代谢物; 残留监测

Monitoring and analysis of nitrofurans metabolites residues in shrimp of Hubei area in 2013~2015

WEN Sheng¹, XIONG Bi¹, HUANG Chang-Gang², LIANG Gao-Dao², HE Zhen-Yu², LIU Xiao¹,
ZHANG Rui¹, CHEN Ming¹, SONG Yi^{1*}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory for Applied Toxicology, Hubei Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, China; 2. Wuhan Centre for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the nitrofurans metabolites residues in shrimp of Hubei area in 2013~2015, so as to provide scientific basis for the source and hazard analysis. **Methods** The residues of 4 kinds of nitrofurans metabolites including furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin and furazolidone in shrimp of Hubei area were detected by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and the obtained data were statistically analyzed by Excel and SPSS16.0. **Results** The detection rate of nitrofurans metabolites was 27.09%, and all of them were semi carbazide (SEM), while river prawn had the highest detection rate of 61.54%, followed by shrimps of 6.78% and crawfish of 1.38%. For overall homogenate river shrimp, the detection rate was up to 91.67%, while SEM was not detected in the shelled shrimp samples. **Conclusion** Different levels of SEM are

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会疾控专项(WJ2016J-023)

Fund: Supported by the Health and Family Planning Commission of Hubei Provincial Project (WJ2016J-023)

*通讯作者: 宋毅, 副主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: 16062518@qq.com

*Corresponding author: SONG Yi, Associate Chief Technician, Hubei Provincial Key Laboratory for Applied Toxicology, Hubei Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, China. E-mail: 16062518@qq.com

detected in shrimp of Hubei area, meanwhile endogenous SEM is founded in river prawn. According to the food consumption data of residents in Hubei area, the SEM exposure in shrimp is less harmful to human health.

KEY WORDS: shrimp; nitrofurans; metabolite; residue monitoring

1 前 言

硝基呋喃类药物是人工合成的具有 5-硝基基本结构的广谱抗菌药物, 主要作用于微生物酶系统, 抑制乙酰辅酶 A, 干扰微生物糖类的代谢, 从而起到抑菌、杀菌的作用^[1,2]。常用的硝基呋喃类药物有 4 种, 分别是呋喃它酮(furaltadone)、呋喃西林(nitrofurazone)、呋喃妥因(nitrofurantoin)和呋喃唑酮(furazolidone)。由于其致畸、致癌和致突变等作用^[3], 美国、日本、欧盟等大部分国家和地区都禁止将其用于食用动物养殖中^[4-7]。美国、日本等国规定硝基呋喃类残留物在动物源性食品中不得检出^[5-7]; 2015 年, 欧洲食品安全署食物链污染物委员会发布了《硝基呋喃类及其代谢物的科学意见》, 设定动物源性食品中单个硝基呋喃类代谢物残留限量为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。2002 年, 我国把呋喃唑酮和呋喃它酮列入《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》(农业部 193 号公告)^[9]; 2005 年把呋喃西林和呋喃妥因列入首批《兽药地方标准废止目录》(农业部 560 号公告), 规定硝基呋喃类残留物在动物源性食品中不得检出^[10]。我国发布《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第四批)》的通知(整顿办函〔2010〕50 号), 明确将硝基呋喃类药物呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因及呋喃西林列入可能违法添加的非食用物质名单^[11]。

由于硝基呋喃类药物在动物机体内具有快速降解的特性, 无法在动物源性食品中进行其原药的检测。但其代谢产物能与动物组织中的大分子如蛋白质和 DNA 迅速结合而存在于动物体内, 因此一般采用检测其代谢产物的方法检测硝基呋喃类药物在食品中的残留。常用的硝基呋喃类药物有各自相对应的标志性代谢产物: 呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮的标志性代谢产物分别是 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮(5-morpholine-methyl-3-amino-2-oxazolidinone, AMOZ)、氨基脒(semi carbazide, SEM)、1-氨基乙内酰脲(1-aminohydantoin, AHD)和 3-氨基-2-恶唑烷酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)。

2015 年, 湖北省水产品产量达 455 万吨, 增产 5.2%, 水产品产量连续 20 年居全国第一^[12]。尤其是湖北地区小龙虾(学名:克氏原螯虾, *Procambarus clarkii*)的产量占全国第一, 出口量更是占全国的 70%^[13]。湖北地区居民也有河虾(青虾, 学名: 日本沼虾, *Macrobrachium nipponense*)和基围虾(学名:刀额新对虾, *Metapwnaeus ensis*)的食用习惯。由于虾类养殖过程中极易产生水霉病、寄生虫病和细菌性疾

病等, 可能会使用硝基呋喃类药物防治。因此, 本研究拟开展湖北地区虾产品中硝基呋喃类药物的残留情况分析, 为该类药物的来源和危害分析提供科学依据。

2 材料和方法

2.1 材 料

2.1.1 仪 器

UPLC-TQD 超高效液相色谱串联质谱仪(美国 Waters 公司); PRO200 匀浆机(美国 PRO 公司); Z383K 离心机(德国 Hermle 公司); SHZ-88 恒温水浴振荡器(控温 37 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, 常州固得仪器公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司); N-EVAPTM112 氮气吹干仪(美国 Organomation Associates 公司)。

2.1.2 试 剂

固体粉末标准品 AOZ(50 mg, 99.7%)、AMOZ(10 mg, 100%)、SEM(50 mg, 99.5%)、AHD(50 mg, 99.3%)、D4-AOZ(10 mg, 100%)、D5-AMOZ(10 mg, 100%)、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -SEM(10 mg, 100%)、 ^{13}C -AHD(10 mg, 100%), 均购自德国 WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH 公司; 乙腈、乙酸乙酯(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 邻硝基苯甲醛(上海 TCI 公司); Oasis HLB 固相萃取小柱(美国 Waters 公司); 氢氧化钠(分析纯, 北京化学试剂公司); 试验用水符合一级水标准。

2.2 实验方法

2.2.1 样品采集

按照分层随机抽样法设置采样点, 对湖北地区的虾类产品进行抽样。2013~2015 年夏季, 在湖北地区 9 个市州(武汉、宜昌、襄阳、黄石、荆州、十堰、荆门、鄂州和孝感市)采集 347 份虾类样品: 包括 145 份小龙虾、143 份河虾和 59 份基围虾, 采样点为养殖环节、超市和农贸市场。

2.2.2 样品制备

先将采集的虾样品去皮, 沿脊背取肌肉, 然后再将肌肉放入匀浆机中充分搅匀, 均质。另外, 2013 和 2014 年采集的河虾样品则直接将整虾放入匀浆机充分搅匀, 均质。再取出 500 g 左右作为试样, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存。

2.2.3 样品分析

样品分析使用超高效液相色谱-串联质谱仪测定^[14]。

称取已匀浆的样品 1 g(精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 100 μL 100.0 ng/mL 的混合内标溶液、200 μL 0.1 mol/L 邻硝基苯甲醛和 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液, 涡旋混合均匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温水解 16 h。然后取出离心管

并冷却至室温,用氢氧化钠调节 pH 值至 7~8, 再在 4 °C 下以 10000 r/min 离心 10 min, 取出上清液待净化。

转移样品提取液至活化好的 Oasis HLB 固相萃取小柱上, 以 5 mL 超纯水淋洗柱子后抽干, 然后使用 5 mL 乙酸乙酯洗脱固相萃取柱, 收集洗脱液后氮吹至干, 加入 1.0 mL 甲醇水溶液(50:90, V:V)定容, 经 0.45 μm 滤膜过滤后待上机。

2.2.4 数据分析

数据由 Excel 2007 录入, 用 Excel 和 SPSS 16.0 软件进行数据分析。

3 结果与讨论

3.1 虾产品中硝基呋喃类代谢物监测总体状况

2013~2015 年, 湖北地区共监测了 9 个市州的 347 份虾类样品, 其中硝基呋喃类药物代谢产物的总体检出率为 27.09%, 表明湖北地区的虾类产品中存在不同程度硝基呋喃代谢物检出的情况。河虾的检出率最高, 为 61.54%; 其次是基围虾, 检出率为 6.78%; 最低是小龙虾, 检出率为 1.38%。但是对于整体匀浆的河虾样品(带壳), 检出率高达 91.67%(见表 1)。

由表 1 可知, 2013~2015 年采集的虾类样品, 检出的代谢物均为 SEM, 占 100%。浓度范围为 2.3~246 μg/kg; 其余 3 种硝基呋喃类药物的代谢物(AOZ、AOZ 和 AHD)均未检出。对于河虾样品, 检出的最高浓度为 246 μg/kg, 最低浓度为 2.8 μg/kg。对于小龙虾样品, 仅检出 2 份, 浓度分别为 78.1 和 2.3 μg/kg。从上述结果可以初步得出结论, 湖北地区的虾中可能存在较为普遍的呋喃西林滥用情况, 但是没有发现其他硝基呋喃类药物的非法使用。

3.2 不同年份虾产品中硝基呋喃类代谢物监测状况分析

2013 年的小龙虾虾肉样品中 SEM 的检出率为 1.47%, 2014 年和 2015 年没有检出。对于 SEM 检出率最高的整体匀浆河虾样品, 总体检出率高达 91.67%, 2013 年的检出率

为 86.67%, 2014 年的检出率为 93.94%(见图 1)。将 2013 年河虾中的 SEM 检出情况与 2014 年进行比较发现, 2 年之间没有显著差异($\chi^2 = 1.428, P = 0.232$)。2015 年河虾的虾肉样品没有检出 SEM。尤其是去壳后的河虾虾肉样品中没有检测到 SEM 和其他的硝基呋喃代谢物。因此, 本研究认为非法使用呋喃西林导致 SEM 在虾中残留的结论存在一定的问题, 虾中的 SEM 可能存在其他来源。

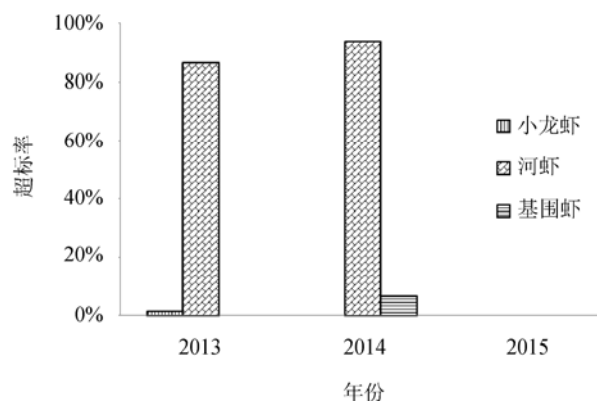


图 1 2013~2015 年湖北地区虾产品中硝基呋喃类代谢物的检出情况

Fig. 1 Detection situation of nitrofurans metabolites in shrimp from Hubei area in 2013~2015

3.3 SEM 来源分析

为进一步分析虾中 SEM 的来源, 对虾中不同部位进行了检测, 发现河虾中的 SEM 主要存在于壳, 其次是头部, 而肌肉组织中的 SEM 则未检出。结果说明, 河虾中的 SEM 并非由硝基呋喃药物滥用而来。关于河虾中 SEM 的来源, 现有研究认为有以下几种可能: 一是 SEM 在环境中广泛存在, 而河虾对 SEM 有生物富集作用; 二是 SEM 是河虾的内源性物质, 由甲壳素分解产生, 有研究表明, 即使在深海捕捞的天然虾蟹种类也有 SEM 的检出, 表明存在内源性 SEM^[15]; 三是次氯酸钠消毒剂与含氮物质的反应, 可

表 1 湖北地区虾产品中硝基呋喃类药物检出情况
Table 1 Determination of nitrofurans metabolites residues in shrimp from Hubei area

名称	数量	检出数量	总检出率(%)	检出的代谢物数量				SEM 浓度(μg/kg)				
				AOZ	SEM	AMOZ	AHD	范围	平均值	标准差	中位数	
小龙虾(虾肉)	145	2	1.38	0	2	0	0	2.3~78.1	/	/	/	
	143	88	61.54	0	88	0	0	2.8~246	85.0	45.0	77.2	
河虾	全虾	96	88	91.67	0	88	0	0	2.8~246	85.0	45.0	77.2
	虾肉	47	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/
基围虾(虾肉)	59	4	6.78	0	4	0	0	9.9~95.6	35.1	40.8	17.4	
合计	347	94	27.09	0	94	0	0					

能在洗虾的过程中由于自来水中含有残留的次氯酸钠消毒剂, 与虾本身发生反应, 从而导致了 SEM 的生成^[16]; 四是偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADC)的高温热解反应, 偶氮甲酰胺具有漂白和氧化双重作用, 是一种在工业中常用的发泡剂, 可用于瑜伽垫、橡胶鞋底等生产, 以增加产品的弹性^[15,17]。国外研究也发现, 未接触过呋喃西林药物的龙虾^[18]、对虾^[19]和淡水河虾^[20,21]中存在内源性污染, 均检测出 SEM。因此, 虾中 SEM 的来源暂时无法排除非呋喃西林源的干扰。因此, 在开展虾中 SEM 检测时, 建议采取以下措施: (1)只检测肌肉部分, 因为外壳中存在大量的内源性 SEM; (2)样品在水解和衍生之前, 最好用有机溶剂洗涤样品以除去游离态的内源性 SEM^[8]。

3.4 虾中 SEM 的风险评估

根据 2012 年湖北省居民消费量调查结果, 湖北地区居民关于水产品的摄入量标准是 46.63 g/d^[22], 按照本研究的结果, 河虾(全虾)中 SEM 残留量的中位数为 77.2 μg/kg。通过评估可知, 体重 60 kg 的湖北地区居民通过虾摄入的 SEM 暴露量将是 0.059 μg/(kg bw·d)。参考文献保守假设硝基呋喃及其代谢物的基准剂量下限(benchmark dose limit, BMDL)为 20 mg/(kg bw·d)^[23], 采用食品添加剂联合专家委员会(Joint Expert Committee on Food Additive, JECFA)对遗传性致癌物风险评估所建议使用的暴露限值法(margin exposure, MOE)对其进行评估, MOE=BMDL/膳食暴露量, 则得到中等体重的成年人每天暴露硝基呋喃及其代谢物的 MOE 值为 370 000 (JECFA 制定的健康风险边界值 MOE 为 10 000), 对人类健康危害较小。

4 结 论

2013~2015 年, 347 份虾类样品中硝基呋喃类药物总体检出率为 27.09%, 表明湖北地区的虾类产品中存在不同程度硝基呋喃代谢物检出情况。尤其是河虾整虾匀浆样品 SEM 的检出率高达 91.67%, 但是去壳后的虾肉样品中没有检出 SEM, 研究认为虾中存在内源性 SEM。因此, 本研究认为如果在虾中检出了 AMOZ、AHD 和 AOZ, 说明非法使用了硝基呋喃药物; 但是, 如果检测出 SEM, 不能排除内源性的问题, 需要进行进一步的确认。为去除内源性 SEM 的干扰, 在检测虾中 SEM 时一定要去除虾壳, 同时采用有机溶剂对虾肉进行淋洗。结合湖北地区居民的膳食消费结果, 进行虾中 SEM 的风险评估, 发现虾中 SEM 暴露对人类健康危害较小。

参考文献

- [1] 生威, 李季, 许艇. 动物性产品中硝基呋喃类抗生素残留检测方法研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(s1): 429-434.
Sheng W, Li J, Xu T. Advances of detection for residues of nitrofurans and analogues in foods derived from animals [J]. J Agro-Environ Sci, 2006, 25(s1): 429-434.
- [2] Leitner A, Zillner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2008, 939(1-2): 49-58.
- [3] Finzi JK, Donato JL, Sucupira M, et al. Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2005, 824(1-2): 30-35.
- [4] (EC) No.1442/95-1995 欧盟委员会关于修改确定动物源性食品中兽药最大残留限量制定共同程序的第 2377/90 号理事会条例(EEC)之附录 I,II 和 III 的条例[S].
(EC) No.1442/95-1995 No. 2377/90 Council Regulation(EEC) Appendix I,II and III of the ordinance on modifying and determining the amount of maximum residue limits of veterinary medicinal products in animal-origin food and developing community programs of European Commission [S].
- [5] 日本厚生劳动省. 食安输发第 0530001 号[Z].
MHLW. Shianshufa 0530001 [Z].
- [6] 日本厚生劳动省. 食安输发第 0531003 号 [Z].
MHLW. Shianshufa 0531003 [Z].
- [7] Topical Nitrofurans. Extralabel animal drug use; order of prohibition [J]. Federal Register, 2002, 67: 5470-5471.
- [8] Petersen, Publication A, EFSA. EFSA panel on contaminants in the food chain [J]. EFSA J, 2009, 7(10): 1351.
- [9] 中华人民共和国农业部公告第 193 号 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[Z].
Ministry of Agriculture, bulletin No. 193. Disabled veterinary drugs and other compounds list of food animal [Z].
- [10] 中华人民共和国农业部公告第 560 号 [Z].
Ministry of Agriculture, bulletin No. 560 [Z].
- [11] 总局全面部署打击保健食品“四非”专项行动 [EB/OL].
http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html.(2013-05-20)
The special action of "four not" against health food was comprehensively deployed by Administration[EB/OL]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html.(2013-05-20)
- [12] 湖北农业信息网. 湖北省淡水产品总量连续 20 年位居全国第一[J]. 农村百事通, 2016, (9): 10.
Hubei agricultural information network. Total freshwater products for 20 years in hubei province ranking first in the country [J]. Rural Blackstone, 2016, (9): 10.
- [13] 亦佳. 盛夏带“火”龙虾经济[J]. 科技创业月刊: 创富指南, 2013, (6): 14-15.
Yi J. Midsummer fire lobster economic [J]. Sci Technol Entrep Monthly: Capital Invest guide, 2013, (6): 14-15.
- [14] GB/T 20752-2006 猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20752-2006 Determination of nitrofurans metabolite residues in pork, beef, chicken, liver and aquatic products liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [15] 张晓燕, 张睿, 陈雷, 等. 甲壳类水产品中氨基脒的来源分析[J]. 食品研究与开发, 2013, (13): 125-127.
Zhang XY, Zhang R, Chen L, et al. Analysis to the occurrence of semicarbazide in shellfish [J]. Food Res Dev, 2013, (13): 125-127.
- [16] 谢冬冬, 万志刚, 沈金灿, 等. 不同鸡组织经次氯酸钠处理后氨基脒生

- 成量差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3394–3399.
- Xie DD, Wan ZG, Shen JC, *et al.* Study on semicarbazide content difference from different organizations chicken generated by sodium hypochlorite [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(11): 3394–3399.
- [17] 李金强, 郭海霞, 曹鹏, 等. 偶氮甲酰胺分解产生呋喃西林代谢物的相关性研究[J]. 化学分析计量, 2009, 18(6): 34–36.
- Li JQ, Guo HX, Cao P, *et al.* Studies on decomposition of azodicarbonamide nitrofurazone metabolites [J]. *Chem Anal Meter*, 2009, 18(6): 34–36.
- [18] Saari L, Peltonen K. Novel source of semicarbazide: levels of semicarbazide in cooked crayfish samples determined by LC/MS/MS [J]. *Food Addit Contam*, 2004, 21(9): 825–832.
- [19] Van PC, Detavernier C, Wille M, *et al.* Investigation into the possible natural occurrence of semicarbazide in *Macrobrachium rosenbergii* prawns [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(5): 2107–12.
- [20] Bock C, Gowik P, Stachela C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 856(1–2): 178–189.
- [21] Mccracken R, Hanna B, Ennis D, *et al.* The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3–4): 1562–1567.
- [22] 吴永宁, 李筱薇. 第四次中国总膳食研究[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- Wu YN, Li XW. China's total dietary study for the fourth time [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [23] 王群, 马兵, 吕海燕, 等. 食品中硝基呋喃类及其代谢物对人体健康的安全性评价[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(2): 4–10.
- Wang Q, Ma B, Lv HY, *et al.* Safety evaluation of nitrofurans and its metabolites in food on human health [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2013, 3(2): 4–10.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



闻 胜, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品安全和持久性有机污染物。
E-mail: 30723280@qq.com



宋 毅, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全。
E-mail: 16062518@qq.com