

金刚烷胺在菊花江蓠体内的富集和消除规律研究

郑伟云^{1,2}, 孙利芹¹, 田秀慧², 徐英江^{2*}

(1. 烟台大学生命科学学院, 烟台 264005; 2. 山东省海洋资源与环境研究院, 烟台 264006)

摘要: **目的** 研究金刚烷胺在菊花江蓠体内的生物富集和消除规律。**方法** 采用半静态水质接触染毒法使金刚烷胺在菊花江蓠体内的富集和消除, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定菊花江蓠体内的金刚烷胺。**结果** 在 5.00、25.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 3 个曝污质量浓度下, 金刚烷胺在菊花江蓠体内的富集速率较快, 随着曝污浓度的增加, 富集量也相应增加, 成正相关关系; 并在富集实验的第 5 d、4 d 和 4 d 达到最大值, 分别为 2056.87、5619.40、22852.96 $\mu\text{g/kg}$ 。然后开始消除实验, 至第 54 d, 菊花江蓠体内金刚烷胺残留量分别为 169.47、428.17、568.29 $\mu\text{g/kg}$, 仅为最大残留量的 8.14%、7.62%、2.49%。**结论** 在 3 个曝污质量浓度下, 最大富集系数分别为 411.37、227.48 和 228.53; 至实验结束, 金刚烷胺在实验结束时均未完全消除, 在菊花江蓠体内仍有残留。

关键词: 金刚烷胺; 菊花江蓠; 富集; 消除; 超高效液相色谱-串联质谱法

Rules of accumulation and elimination of amantadine residue in *Gracilaria lichenoides*

ZHENG Wei-Yun^{1,2}, SUN Li-Qin¹, TIAN Xiu-Hui², XU Ying-Jiang^{2*}

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the regularity of accumulation and elimination of amantadine in *Gracilaria lichenoides*. **Methods** The semi-static water contact method was used to enrich and eliminate amantadine in *Gracilaria lichenoides*. The content of amantadine in *Gracilaria lichenoides* was determined by ultra performance liquid chromatogram tandem mass spectrometry. **Results** At 3 pollution mass concentration (5.00, 25.00, 100.00 $\mu\text{g/L}$), the amantadine accumulated rapidly in *Gracilaria lichenoides*. With the increase of the pollution concentration, the accumulation also increased, and they had positive correlation. The highest content (C_{max}) enriched was 2056.87, 5619.40, 22852.96 $\mu\text{g/kg}$ of the 3 concentrations when placed for 5, 4, 4 d. In the removal experiments, on the 54th day, the amantadine residues in *Gracilaria lichenoides* were 169.47, 428.17, 568.29 $\mu\text{g/kg}$, respectively, Only 8.14%, 7.62% and 2.49% of the maximum residues were left. **Conclusion** At the 3 aeration mass concentrations, the biggest bioconcentration factors (BCFs) were 411.37, 227.48, 228.53, respectively. At the end of

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系藻类创新团队加工与质量安全控制岗(SDAIT-26-05)、山东省农业重大应用技术创新项目(SF805301301)、中央引导地方科技发展专项--海参中新型环境污染残留物残留机制及控制技术(Z135050009017)

Fund: Supported by Modern Agro-industry Technology Research System in Shandong Province (grant No. SDAIT-26-05), Agricultural Major Applied Technology Innovation Project in Shandong Province (SF805301301), and Technology Development Project of Central Government Guiding Local Science (Z135050009017)

***通讯作者:** 徐英江, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。E-mail: xuyingjiang@yeah.net

***Corresponding author:** XU Ying-Jiang, Msater, Associate Professor, College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China. E-mail: xuyingjiang@yeah.net

the experiment, amantadine was not completely eliminate, and some amantadine still remain in the *Gracilaria lichenoides*.

KEY WORDS: amantadine; *Gracilaria lichenoides*; accumulation; elimination; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

1 引言

金刚烷胺(amantadine, AMD), 又名 1-氨基金刚烷, 属于三环胺类, 分子式为 $C_{10}H_{17}N$, 结构式如图 1 所示。金刚烷胺于 1960 年合成^[1], 是一类抗病毒药物, 1964 年被 Davis 发现具有抗病毒作用^[2], 1966 年在美国上市并被 FDA 批准为抗流感病毒药物^[3], 国内于 1971 年开始生产^[4]。另外, 金刚烷胺也用于治疗帕金森病引起的神经障碍, 治疗带状疱疹和带状疱疹后的神经痛^[5]。但长时间超剂量服用金刚烷胺, 会产生幻觉、多梦、精神错乱、失眠、晕眩、食欲不振、抑郁等神经毒副作用^[6,7]。也会使病毒产生不同程度的耐药性, 诱导新型耐药病毒的产生, 许多动物实验表明其对胚胎有致畸作用^[8]。因此, 2005 年 10 月农业部发布第 560 号公告, 在《兽药地方标准废止目录》中明确指出停止经营和使用金刚烷胺^[9], 2015 年 12 月发布《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》, 禁止金刚烷胺等抗病毒药物的生产和使用。美国 FDA 于 2006 年明令禁止金刚烷胺等抗病毒药物用于动物畜禽类^[10]。

2012 年在我国出口日本的鸡肉中检出金刚烷胺, 为了安全起见, 日本厚生劳动省医药食品局食品安全部 2013 年 2 月 15 日发布通知, 在进口食品监控计划中加入对中国产鸡肉中金刚烷胺的检查。本研究小组追溯金刚烷胺的来源, 在排除使用了违禁药金刚烷胺后, 发现其来源于作为辅料的藻类。我们对烟台大钦岛养殖区的藻类进行了跟踪检测, 发现藻类中金刚烷胺的含量为 1.72~20.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 海水中金刚烷胺的含量为 1.72~2.35 ng/L 。Ghosh 等^[11]调查显示, 污水处理厂进水中金刚烷胺含量高达 184~538 ng/L 。含有金刚烷胺的废水具有高化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、难生物降解等特点, 若直接排放, 将会对水体造成极大的危害。

大型藻类作为水生生态系统中的初级生产者, 在不到海洋总面积 1% 的沿岸带构成海洋总初级生产力的 10%^[12]。其对维持生态系统的平衡起重要作用, 而且与大多数污染物比鱼类和贝类更为敏感。藻类对许多化合物具有较强的生物富集能力, 是一类高效、简便、选择性好的生物富集体。藻类细胞壁上含有大量多糖、脂质、蛋白质、矿物质等成分, 其含有的 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 等活性基团, 易于污染物发生络合、氢键等作用力, 从而去除环境中的污染物^[13-15]。许多品种的大型海藻作为海洋经济藻种, 其数量与质量的变化, 关系到海洋生态环境平衡与人

们的食品安全^[16]。菊花江蓼较其他江蓼属的种类生长快、适应性好、耐高温, 且能在近海水域和海水池塘小水体中生长^[17,18]。故本实验采用菊花江蓼作为实验藻种。

目前, 有关金刚烷胺在菊花江蓼体内富集和消除效应的研究国内外几乎未见报道。本文采用超高效液相色谱-串联质谱法, 首次建立菊花江蓼中金刚烷胺的测定方法, 并在山东省黄河三角洲海洋渔业科研推广中养殖池塘进行了染毒实验, 采用半静态水质接触染毒法研究了金刚烷胺在菊花江蓼体内的富集和消除规律, 以期为金刚烷胺对藻类产生的危害程度和作用机制提供基础性资料。

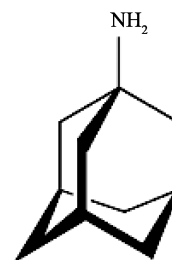


图 1 金刚烷胺结构式
Fig.1 Structure of amantadine

2 材料与方法

2.1 药品与试剂配制

金刚烷胺(AMD)标准品和内标物金刚烷胺-D6(纯度 $\geq 98\%$, 美国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈、乙酸、甲酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 使用前 650 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 4 h, 冷却后置于干燥器中密闭保存); C_{18} (硅胶键合十八烷基)(40~50 μm , 美国安捷伦科技有限公司); PSA(硅胶键合乙二胺-N-丙基)(40~60 μm , 美国安捷伦科技有限公司); 所用水为超纯水。

金刚烷胺标准储备液: 取适量的金刚烷胺标准品, 用乙腈溶解, 配制成 1.00 mg/L 的储备液, 备用。金刚烷胺内标工作液: 取适量的金刚烷胺-D6, 用乙腈溶解, 配成 1.00 mg/L , 备用。

2.2 仪器与设备

TSQ Vantage 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo 公司); Milli-Q Gradient 超纯水仪(法国 Millipore 公司); TGL-10C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A

旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); GB 303 分析天平(感量 0.01 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-600E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); N-EVAP™112 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); 0.22 μm 微孔滤膜(法国 Millipore 公司)。

2.3 实验设计

实验藻种菊花江蕨(*Gracilaria chouae*)购自福建省, 此品种为我国特有的温暖带藻类, 适应性强, 耐高温。实验用江蕨和海水经检测均不含金刚烷胺。养殖池塘水深 1.5 m, 体积 1500 m³。每天定时测定水温、溶解氧、pH 和盐度等环境参数, 水温变化范围为 21.6~33.2 °C, 溶解氧保持在 6.0~8.5 mg/L, pH 为 7.8~8.2, 盐度为 30~32; 每天观察记录江蕨的生长情况。菊花江蕨养殖方法参照王红勇等在 2004 年建立的菊花江蕨池塘养殖方法^[19]。

称取一定量的金刚烷胺盐酸化物用水溶解配制成浓度分别为 5.00、25.00、100.00 μg/L 的悬浊液(配制时按照质量分数进行转化)。将金刚烷胺悬浊液直接泼洒到 3 个池塘中, 泼洒时尽量均匀地撒入池塘, 也可在池塘的入水口洒入, 减少金刚烷胺在池塘中达到平衡的时间。实验的取样时间点按照实际情况及前期数据分析结果设定并进行适当调整。分别于曝污后的 8 h、24 h、48 h、96 h(4 d)、120 h(5 d)、144 h(6 d)、192 h(8 d)、240 h(10 d)、288 h(12 d)、360 h(15 d)、432 h(18 d)、504 h(21 d)、600 h(25 d)、696 h(29 d)、792 h(33 d)、864 h(36 d)、888 h(37 h)、984 h(41 d)、1080 h(45 d)、1200 h(50 d)、1296 h(54 d), 从池塘中抽取 1000~2000 g 菊花江蕨, 将其体表的附着物用海水冲洗干净, 充分匀浆, 待用。因夏季水温较高, 实验后期菊花江蕨出现腐烂现象, 故消除实验仅进行到 54 d。

分别以 5.00、25.00、100.00 μg/L 3 个暴露质量浓度对菊花江蕨进行药浴, 药浴时间为 5 d, 测定菊花江蕨体内的金刚烷胺残留量, 直至菊花江蕨体内的金刚烷胺含量达到最大残留量值。富集实验结束, 定期更换一半的洁净海水, 同时对海水及沉积物中金刚烷胺浓度进行监测。

2.4 样品前处理及测定

2.4.1 样品前处理

称取约 3.00 g 菊花江蕨匀浆于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 30 μL 1.00 mg/L 金刚烷胺内标工作液, 再加入 15 mL 乙腈, 充分旋涡混匀, 超声提取 20 min, 9000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入另一 50 mL 离心管中, 加入 10 g 无水硫酸钠、500 mg PSA 和 500 mg C₁₈, 旋涡混匀后 9000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清液于 15 mL 离心管中, 氮吹至近干。用 1.00 mL 乙腈-含有 0.10% 甲酸的水溶液(5:95=V:V)复溶, 上机待测。

2.4.2 样品测定

(1) 色谱条件

色谱柱: Hypersil GOLD C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);

流动相: A 为乙腈, B 为 0.10% 甲酸水溶液; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 35 °C; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	A/%	B/%	梯度曲线
0	0.25	5	
0.50	0.25	5	6
1.00	0.25	95	6
5.00	0.25	95	6
6.50	0.25	5	6
7.00	0.25	5	1

(2) 质谱条件:

扫描方式: 选择反应监测(selective reaction monitoring, SRM), 喷雾压: 3.50 kV; 鞘气: 40 Arb; 辅助气: 15 Arb; 碰撞气压力: 1.5 mTorr; 离子传输管温度: 350 °C; Q1 半峰宽: 0.7 Da; Q3 半峰宽: 0.7 Da; 母离子、子离子和碰撞能量见表 2。

表 2 SRM 模式下质谱测定的特征离子
Table 2 Characteristic ions determined by mass spectrometry in SRM mode

目标化合物	母离子	子离子	碰撞能量/eV
金刚烷胺	152.1	93.1	30
		135.1*	17
金刚烷胺内标	158	141.0*	17

注: *为定量离子。

2.5 方法学考察

(1) 线性关系考察 分别准确移取 1.00 mg/L 金刚烷胺标准工作液 0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 mL 于离心管中, 金刚烷胺浓度依次为 1.00、5.00、10.00、50.0、100.00 ng/mL, 除不加样品外, 按照样品处理方法操作和测定。

(2) 回收率和精密度实验 在空白样品中添加 3 个不同浓度的金刚烷胺标准溶液, 按照 2.4 进行回收率测定, 同时每个浓度的实验重复 6 次, 计算回收率和精密度。

2.6 数据处理方法

富集系数即生物体内污染物的质量浓度与其生存环境中该污染物质量浓度的比值, 用公式表示:

$$BCF = \frac{C_t}{C_0}$$

式中, BCF 为富集系数, C_t 表示菊花江蕨体内金刚烷胺含量(μg/kg), C_0 表示实验水体中金刚烷胺的曝污浓度(μg/L)。

消除速率是污染物在单位时间内从生物体内的消除量, 用公式表示为:

$$v = \frac{\Delta C}{\Delta t}$$

式中, v 为消除速率 [$\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$], Δt 表示消除实验所用的时间 (d), Δc 表示消除实验所用时间内菊花江蓠体内金刚烷胺的消除量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

每个时间点的测定值取重复组的平均值, 采用 DAS 2.0 药物代谢动力学参数计算程序, 在计算机上处理曝污后菊花江蓠体内的金刚烷胺含量 - 时间数据, 计算出有关药物动力学参数, 并使用 Excel-2013 软件进行作图分析。

3 结果与分析

3.1 方法的线性范围、检出限、回收率及精密度

3.1.1 标准曲线和检出限

以金刚烷胺浓度为横坐标, 金刚烷胺与内标物的色谱峰面积之比为纵坐标, 绘制标准曲线, 典型回归方程为 $Y=0.687988X+0.0342122$ (Y 为金刚烷胺与内标的峰面积之比, X 为金刚烷胺浓度), 相关系数 r 为 0.9999, 如图 1 所示。根据 3 倍信噪比计算方法检出限, 10 倍信噪比计算方法定量限, 得出海水和藻类中金刚烷胺的检出限分别为 5.00 ng/L 和 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限分别为 10.0 ng/L 和 2.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

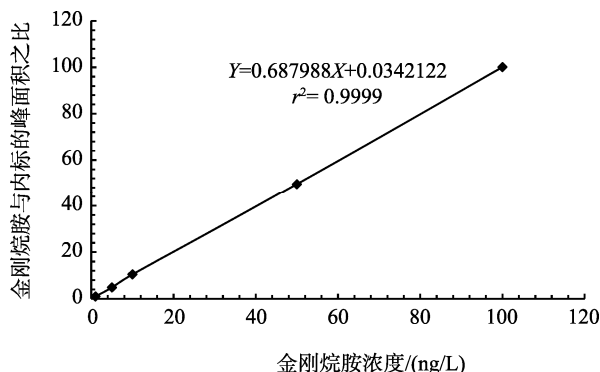


图 1 金刚烷胺标准物质线性方程

Fig.1 Linear equation of amantadine standards

3.1.2 色谱质谱特征

在优化条件下, 金刚烷胺和内标物的保留时间约为 3.54 min, 色谱峰的峰形尖锐, 且分离效果良好, 金刚烷胺标准溶液 (10.0 ng/mL) 特征离子质谱图如图 2 所示。

3.1.3 分析方法验证

金刚烷胺在菊花江蓠中添加浓度为 1.00~10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 回收率在 75.4%~99.2% 之间, 相对标准偏差在 3.87%~4.85% 之间, 详见表 3。

3.2 菊花江蓠对不同金刚烷胺质量浓度的富集消除规律

富集实验结束后, 海水与沉积物中的金刚烷胺在第 8 d 未被检测到。

金刚烷胺在菊花江蓠体内的含量变化见图 3。由图 3 可以看出, 在 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污组, 8 h 菊花江蓠体内的残留量为 552.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 d 后的残留量为 962.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 之后残留量逐渐上升, 2 d 后为 1300.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。到 5 d 时, 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污组残留量最大为 2056.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 为曝污浓度的 411.37 倍。富集实验共持续 5 d, 按天计算平均富集速率, 第 8 h、1 d、2 d 和 5 d 分别为 1657.2、962.0、650.1、411.38 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 前期富集速率明显快于后期。在 25.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污组, 8 h 时菊花江蓠体内的残留量为 2146.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 d 后的残留量为 2628.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 之后残留量逐渐上升, 2 d 后为 2655.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 到 4 d 时, 残留量达到最大值 5619.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 为曝污质量浓度的 227.48 倍。按天计算平均富集速率, 第 8 h、1 d、2 d 和 4 d 分别为 6440.31、2628.11、1327.61、1123.88 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。在 100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污组, 8 h 菊花江蓠体内的残留量为 4978.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 d 后的残留量为 13377.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 之后残留量逐渐上升, 2 d 后为 15798.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 到 4 d 时, 残留量达到最大值 22852.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 为曝污浓度的 228.53 倍。按天计算平均富集速率, 第 8 h、1 d、2 d 和 4 d 分别为 14394.66、13377.27、7899.44、5713.24 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。

表 3 菊花江蓠中金刚烷胺的回收率及精密度

Table 3 Results for recoveries and precision of amantadine in *Gracilaria lichenoides*

添加量	回收率/%					平均回收率(%, n=18)	相对标准偏差(%, n=18)
2.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$	84.5	87.2	84.6	89.4	80.9	91.4	
	82.8	91.8	93.6	76.1	82.4	83.6	85.5
	81.2	85.6	85.6	85.8	78.9	93.9	
5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$	89.5	88.2	84.6	81.4	86.0	75.4	
	85.8	90.8	94.6	96.8	92.4	87.6	87.6
	83.2	85.6	85.6	91.8	88.2	90.0	
10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	96.9	91.8	97.5	88.7	84.5	87.6	
	88.2	87.5	94.7	89.5	94.8	91.1	91.64
	88.4	94.3	91.5	93.1	90.3	99.2	

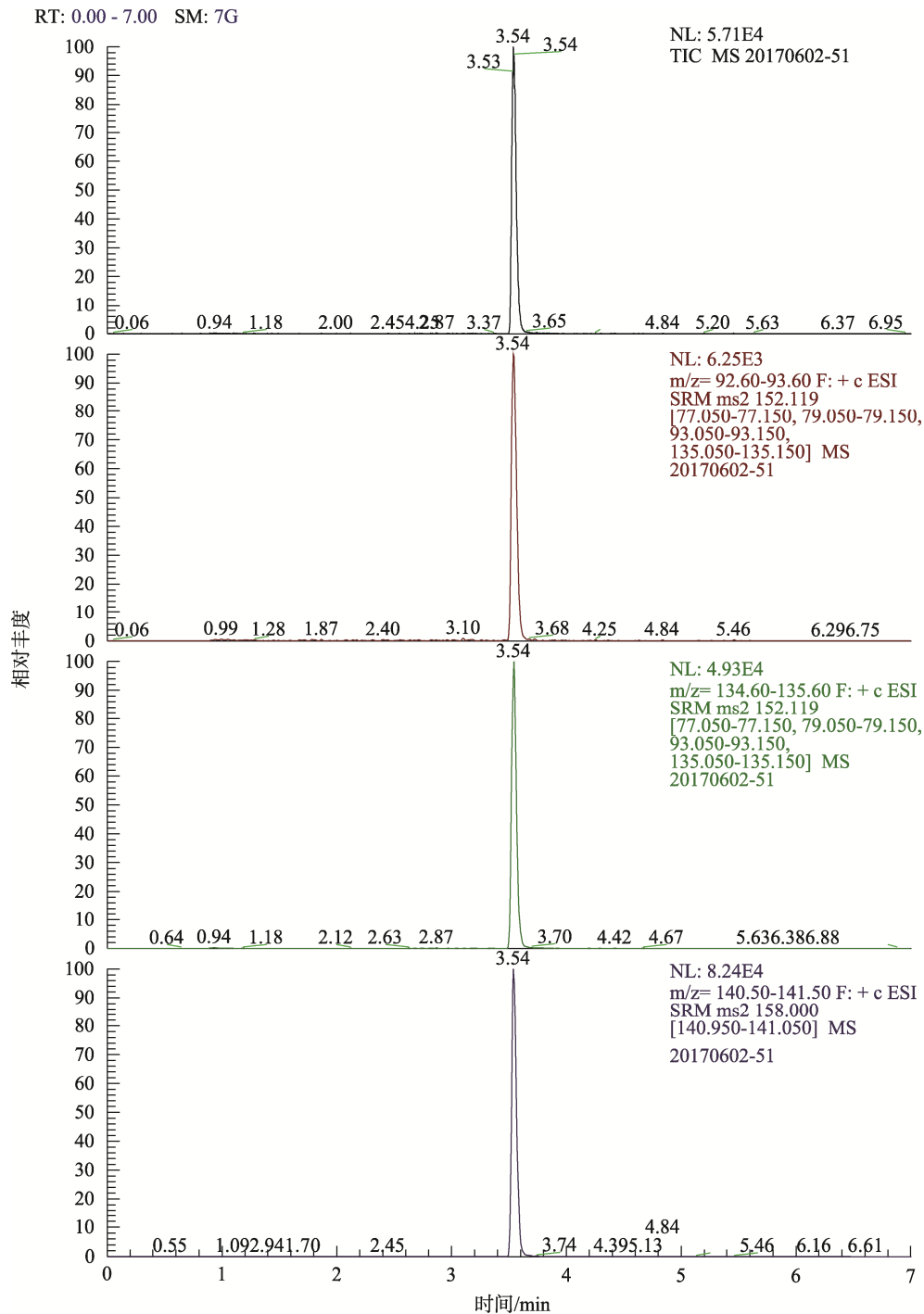


图2 金刚烷胺标准溶液(10.0 ng/mL)特征离子质谱图

Fig.2 Chromatograms of amantadine at a concentration of 10.0 ng/mL

消除实验开始后,菊花江蓼体内金刚烷胺的含量逐渐降低,在消除实验的前期阶段,金刚烷胺残留量下降趋势相对较快,到达一定程度后缓慢降低,并在低浓度水平维持较长时间。在5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝污组,实验第12 d 残留量降为940.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于最大残留量2056.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的一半;第54 d, 金刚烷胺残留量为169.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 为最大残留量的

8.14%。在25.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝污组,实验第12 d 残留量降为2401.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于最大残留量5619.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的一半;第54 d, 金刚烷胺残留量为428.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在100.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝污组,实验第10 d 残留量为10841.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于最大残留量22852.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的一半;第54 d, 金刚烷胺残留量为568.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在3组曝污剂剂量下,金刚烷胺的消除情况是:

平均消除速率呈下降趋势,且在后期趋于稳定。结果表明,菊花江蓼对金刚烷胺的消除速率很高,脱离暴露环境可以迅速降低菊花江蓼体内金刚烷胺的含量。

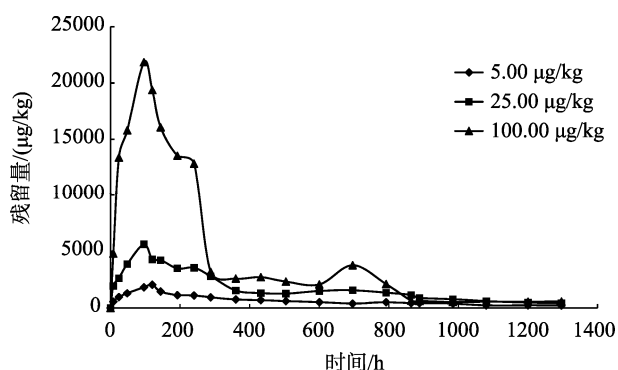


图 3 金刚烷胺在菊花江蓼体内的含量-时间曲线

Fig. 3 Amantadine concentration-time curve in *Gracilaria chouae*

3.3 相关富集和消除参数推导

金刚烷胺染毒进入菊花江蓼体内后,部分富集-消除参数可经 DAS 2.0 分析,参数存在一定的局限性,但仍可为金刚烷胺在菊花江蓼体内的富集和消除提供参考。结果见表 4。

表 4 菊花江蓼对金刚烷胺的药物代谢动力学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of prometryn in *Gracilaria chouae*

药动学参数	曝污质量浓度/(μg/L)		
	5	25	100
AUC(0-t)	8.19×10^5	1.99×10^6	6.18×10^6
AUC(0-∞)	9.47×10^5	2.24×10^6	1.11×10^7
$t_{1/2\alpha}$	59.48	59.68	3.47
$t_{1/2\beta}$	545.04	511.17	266.81
V_i/F	0.002	0.003	0.006
CL/F	0	0	0
Ka	0.015	0.013	3.75
$t_{1/2}Ka$	45.72	53.44	0.19
Tlag	0	0	0

注: AUC(0-t)为 0-t 时的药时曲线下总面积, $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$; AUC(0-∞)为 0-∞时的药时曲线下总面积, $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$; $t_{1/2\alpha}$ 为药物的分布半衰期, h; $t_{1/2\beta}$ 为药物的消除半衰期, h; V_i/F 为表观分布容积, L/kg; CL/F 为药物自体内消除的速率常数, $\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$; Ka 为一级吸收速率常数, h^{-1} ; $t_{1/2}Ka$ 为吸收半衰期, h; Tlag 为时滞, h。

3.4 药时曲线下面积

药时曲线下总面积(AUC)反映药物进入生物体循环的相对量,是衡量药物被生物体吸收利用的程度。在 5.00、25.00 和 100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污质量浓度下,如图 4,菊花江蓼的 AUC(0-t)依次为 $8.19 \times 10^5 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ (5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$) $<1.99 \times 10^6 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ (25.00 $\mu\text{g}/\text{L}$) $<6.18 \times 10^6 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ (100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$)。说明不同的曝污质量浓度下,菊花江蓼对金刚烷胺的富集能力有较大差别。

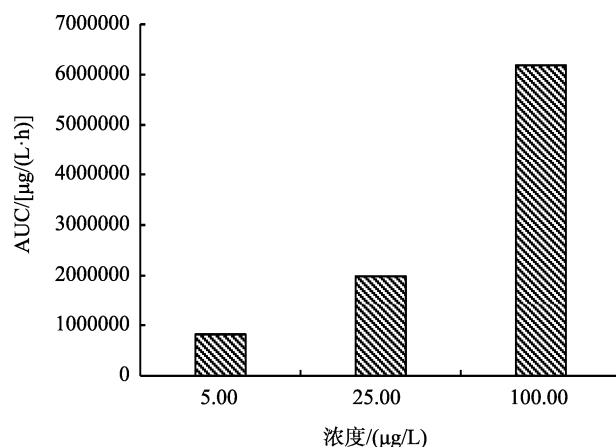


图 4 金刚烷胺在菊花江蓼体内的含量-药时曲线下总面积

Fig. 4 The amantadine concentration-time histogram in *Gracilaria chouae*

3.5 药物消除半衰期

药物消除半衰期($t_{1/2\beta}$)是指药物质量浓度下降到一半所需要的时间,是药动学的一个重要参数,是描述所研究生物体对药物的消除快慢、决定药物消除速率与程度的重要指标。消除半衰期是衡量药物在体内消除速率的尺度。在 5.00、25.00 和 100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污质量浓度下,菊花江蓼的 $t_{1/2\beta}$ 依次为 545.043 h(5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) >511.171 h(25.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) >266.809 h(100.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。说明菊花江蓼体内金刚烷胺含量越高,消除速率越快。

4 讨论

4.1 金刚烷胺在菊花江蓼总最高浓度值的比较

在 5.00、25.00、100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 曝污质量浓度下,金刚烷胺在菊花江蓼体内的最高浓度值分别为 2056.87、5619.40、22852.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$,最高浓度值分别为曝污质量浓度的 411.37、227.48、228.53 倍。美国国家环保局规定^[20]:对持久性有机污染物而言,生物富集因子可以在实验室内获得,如果其大于 5000,认为该物质具有较强的生物富集效应;若在 2000~5000 之间,认为该物质具有潜在的生物富集效应。本实验数据表明,相较于持久性有机污染物,菊花江蓼对金刚烷胺的富集能力较弱。然而,在低浓度下,

江蓠中的金刚烷胺依旧会通过食物链的传递与放大作用被人体吸收, 继而对人体产生毒性作用。

4.2 金刚烷胺对菊花江蓠的富集和消除规律比较

在本实验中, 随着曝污质量浓度的增加, 金刚烷胺的富集系数逐渐减小, 这种富集系数随曝污质量浓度增加而减小的现象与冠盘^[21]藻对双酚 A 的富集、梁永莉等^[22]对双酚 A 的富集和毕研芳^[23]对异丙隆的富集行为的研究结论相似。藻类可以作为有机相吸收富集有机物, 使其进入自身体内, 从而降低环境中有机污染物的浓度。且藻类细胞壁含有多糖、蛋白质、脂类等物质, 带有一定的负电荷, 其中羧基、羟基等阴离子官能团易于金刚烷胺结合, 此外, 藻类的细胞膜是一种具有高度选择性的半透膜, 这可能是决定藻类对金刚烷胺具有较高富集效率的重要因素。金刚烷胺易溶于有机溶剂, 微溶于水, 在脂溶相分配平衡过程中, 曝污质量浓度较高组在菊花江蓠体内金刚烷胺质量浓度相对增加较快, 细胞壁上脂类、阴离子基团等与金刚烷胺结合更易达到饱和, 导致随着金刚烷胺曝污质量浓度的增加, 菊花江蓠对金刚烷胺的富集系数逐渐减小。

在 5.00、25.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 曝污质量浓度下, 菊花江蓠分别在曝污后的 5 d、4 d 和 4 d 达到最大富集量, 分别为 2056.87、5619.40、22852.96 $\mu\text{g/kg}$, 最大富集系数分别为 411.37、227.48、228.53。从菊花江蓠对金刚烷胺富集的时间效应来看, 各曝污质量浓度下, 随着曝污时间的增加, 菊花江蓠体内的金刚烷胺含量升至最大之后出现下降, 而后富集速率和消除速率维持在一个动态平衡中, 金刚烷胺含量保持微小波动。在曝污质量浓度为 5.00、25.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 的情况下, 金刚烷胺的富集含量在的 5 d、4 d 和 4 d 达到最大值。Li^[21]等发现初始溶液中双酚 A 的浓度越高, 冠盘藻体内富集的也越多, 在第 8 d 藻类体内的双酚 A 含量达到最大值。

总之, 随着曝污实验进行, 菊花江蓠体内金刚烷胺残留量逐渐增多, 蓄积速率减慢, 主要是因为金刚烷胺的富集导致藻类的细胞膜遭到破坏, 通透性增加, 金刚烷胺直接进入细胞与某些生命物质发生反应, 加大了对藻类的毒害^[24,25], 从而导致菊花江蓠对藻类的蓄积速率减缓。即便如此, 菊花江蓠体内的富集作用仍会大于抑制作用, 最终使得菊花江蓠体内金刚烷胺含量仍会增加。消除实验开始后, 菊花江蓠体内的金刚烷胺含量逐渐降低, 在消除实验的前期, 下降趋势较快, 随后逐渐减缓, 并在低浓度残留水平维持较长时间。因此在养殖过程中, 若被金刚烷胺污染过的菊花江蓠, 需在洁净海水中较长时间净化后, 才能保证安全食用或投喂鲍鱼等水产动物。

5 结 论

实验结果表明, 在 5.00、25.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 曝污浓度

下, 菊花江蓠分别在曝污后的 5 d、4 d 和 4 d 达到最大富集量, 分别为 2056.87、5619.40、22852.96 $\mu\text{g/kg}$, 最大富集系数分别为 411.37、227.48、228.53。金刚烷胺的富集量均随曝污时间延长呈现先增加后降低的趋势。菊花江蓠对金刚烷胺的富集能力因曝污质量浓度的不同而有所差异, 表现为曝污质量浓度低时富集系数较大, 曝污质量浓度高时富集系数较小。本研究发现金刚烷胺在菊花江蓠体内的富集系数均较大, 表明其易在藻类中累积。当转移至洁净的海水中时, 前期平均消除速率较快, 后期趋于稳定, 平均消除速率呈下降趋势, 至第 54 d, 金刚烷胺仍有残留, 分别为 169.47、428.17、568.29 $\mu\text{g/kg}$, 为最大残留量的 8.14%、7.62%和 2.49%, 表明金刚烷胺未完全消除。因此被金刚烷胺污染过的菊花江蓠, 需经较长时间净化后, 才能保证安全食用或投喂鲍鱼等水产动物。

参考文献

- 李家泰. 临床药理学-第 3 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
Li JT. Clinical pharmacology (Version 3) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- 奥野良信, 万献尧, 毕丽岩. 金刚烷胺[J]. 日本医学介绍, 2004, 25(7): 307-309.
AoYe LX, Wan XY, Bi LY. Amantadine [J]. Prog Japanese Med, 2004, 25(7): 307-309.
- Arndt T, Guessregen BA, Reis J. Determination of serum amantadine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chim Acta, 2005, 359(1): 125-131.
- 丁方华. 金刚烷胺的合成[D]. 南京: 南京理工大学, 2007.
Ding FH. Synthesis of amantadine [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2007.
- 刘丹, 范子宸, 张瑛, 等. 金刚烷胺及其结构类似物的研究进展[J]. 中国药师, 2009, 12(11): 1640-1644.
Liu D, Fan ZC, Zhang Y, et al. Antiparkinson research development of amantadine and its analogs [J]. Chin Pharm, 2009, 12(11): 1640-1644.
- 张立华. 金刚烷胺溶液及鸡肉粉基体标准物质研制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
Zhang LH. Development of the reference material for the content of amantadine in methanol solution and chicken meat powder [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- 刘丹, 孙卓, 王洪媛. 金刚烷胺及其类似物抗帕金森病的研究进展[J]. 北方药学, 2014, (12): 99-100.
Liu D, Sun Z, Wang HY. Antiparkinson research development of amantadine and its analogs [J]. Northern Pharm, 2014, (12): 99-100.
- 陈祈磊, 赵文杰. 禽流感及抗禽流感病毒药物[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10): 581-586.
Chen QL, Zhao WJ. Avian influenza and anti-avian influenza virus drugs [J]. Chin J Anti, 2006, 31(10): 581-586.
- 中华人民共和国农业部. 农业部 560 号公告[Z].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC560 [Z].
- FDA prohibits use of antiviral drugs in poultry to help keep drugs effective for humans [EB/OL]. [2009-06-18]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/>

- Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucml08620.htm
- [11] Ghosh GC, Nakada N, Yamashita N, *et al.* Occurrence and fate of oseltamivir carboxylate (Tamiflu) and amantadine in sewage treatment plants [J]. *Chemosphere*, 2010, 81(1): 13–17.
- [12] Smith SV. Marine macrophytes as a global carbon sink [J]. *Science*, 1981, 211(4484): 838–840.
- [13] Tien CJ. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics [J]. *Process Biochem*, 2002, 38(4): 605–613.
- [14] Dönmez G, Aksu Z. Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *dunaliella*, species [J]. *Process Biochem*, 2002, 38(5): 751–762.
- [15] Volesky B, Holan ZR. Biosorption of heavy metals [J]. *Biotechnology Progress*, 1995, 11(3): 235.
- [16] 姜涛. 氯代阻燃剂得克隆(Dechlorane Plus)对海藻的生物毒性及生物富集[D]. 大连: 大连海事大学, 2011.
- Jiang T. The Biototoxicity and bioaccumulation of chlorinated flame retardants Dechlorane Plus on marine algae [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2011.
- [17] Xu Y, Fang J, Wei W. Application of *Gracilaria lichenoides*, (Rhodophyta) for alleviating excess nutrients in aquaculture [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20(2): 199–203.
- [18] 黄鹤忠, 梁建生, 张群英. 菊花江蓠(对 N、P 吸收效应及其细胞超微结构变化[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 95–102.
- Huang HZ, Liang JS, Zhang QY. Uptake effect of nitrogen and phosphorus and cell ultrastructure changes of *Gracilaria lichenoides* [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 2013, 44(1): 95–102
- [19] 王红勇, 李红, 吴洪流. 菊花江蓠栽培技术[J]. *中国水产*, 2004, (9): 62–63.
- Wang HY, Li H, Wu HL. Cultivation techniques of *Gracilaria lichenoides* [J]. *China Fish*, 2004, (9):62–63.
- [20] Gissi A, Lombardo A, Roncaglioni A, *et al.* Evaluation and comparison of benchmark QSAR models to predict a relevant REACH endpoint: The bioconcentration factor (BCF) [J]. *Environ Res*, 2015, 137: 398–409.
- [21] Li R, Chen GZ, Tam NFY, *et al.* Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72(2): 321–328.
- [22] 梁永莉, 季宏兵, 朱毅. 莱茵衣藻的双酚 A 毒性效应及生物富集和降解作用研究[J]. *环境科学与技术*, 2014, (6): 31–37.
- Liang YL, Ji HB, Zhu Y. Toxic effect for bisphenol A to *chlamydomonas reinhardtii* and its bioaccumulation and biodegradation [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, (6): 31–37.
- [23] 毕研芳. 异丙隆对莱茵衣藻的生理毒性和生物富集的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Bi YF. Toxicity and bioaccumulation of isoprotruron to *chlamydomonas reinhardtii* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [24] 严国安, 沈国兴, 严雪, 等. 农药对藻类的生态毒理学研究 I: 毒性效应[J]. *环境工程学报*, 1999, (5): 96–106.
- Yan GA, Shen GX, Yan X *et al.* Study on ecotoxicology for pesticides to algae I: Toxic effect [J]. *Chin J Environ Eng*, 1999, (5): 96–106.
- [25] Supaog IB, Murra T. A field experiment of the physical and chemical effects of two oils on mangroves [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1999, 42(2): 211–229.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

郑伟云, 硕士研究生, 主要研究方向为农产品加工及贮藏工程。
E-mail: 18363804656@163.com

徐英江, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。
E-mail: xuyingjiang@yeah.net