

不同来源氨基脲在刺参体内的富集和消除规律研究

田秀慧¹, 郑伟云^{1,2}, 徐英江¹, 宫向红^{1*}

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

摘要: **目的** 分析刺参中低浓度氨基脲的残留分布特征, 明确不同来源引起的低浓度氨基脲的变化趋势。**方法** 采用超高效液相色谱-串联质谱法对不同来源氨基脲在刺参(*Apostichopus japonicus*)体内的富集和消除规律进行研究。**结果** 非呋喃西林源氨基脲, 1 d后氨基脲在刺参体壁的含量为0.57 μg/kg, 之后含量逐渐上升, 到3 d时含量达到最大值1.00 μg/kg。富集实验共持续3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为0.57、0.24、0.19 μg/(kg·d), 第140 d时体壁未检出, 平均消除速率为0.0073 μg/(kg·d); 呋喃西林源氨基脲, 1 d后体壁的含量为0.52 μg/kg, 之后含量逐渐上升, 到3 d时, 含量达到最大1.00 μg/kg。富集实验共持续3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为0.52、0.26、0.22 μg/(kg·d), 第160 d时体壁未检出, 平均消除速率为0.0064 μg/(kg·d)。跟踪监测至180 d时, 非呋喃西林源氨基脲和呋喃西林源氨基脲在刺参体壁内均未检出, 半衰期分别为1045.7 h和1224.2 h, 呋喃西林源大于非呋喃西林源。内脏的富集和消除速率相对较快, 但内脏中氨基脲残留量大于体壁, 所以降至未检出所需时间更长。**结论** 在投喂过呋喃西林或暴露于一定浓度氨基脲的刺参, 需经较长时间净化后才能降至未检出。

关键词: 氨基脲; 呋喃西林; 刺参; 液相色谱-串联质谱法

Rules of accumulation and elimination of semicarbazide residue from different sources in *Apostichopus japonicus*

TIAN Xiu-Hui¹, ZHENG Wei-Yun^{1,2}, XU Ying-Jiang¹, GONG Xiang-Hong^{1*}

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

ABSTRACT: Objective To analyze the distribution characteristics of low residues of semicarbazide in *Apostichopus japonicus*, and clarify the variation trend of low concentration urea from different sources. **Methods** Rules of accumulation and elimination of semicarbazide residue from different sources in *Apostichopus japonicus* was studied by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method (HPLC-MS/MS). **Results** Non-nitrofurazone source semicarbazide, the content in the body wall was 0.57 μg/kg

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(Z135050009017)、山东省现代农业产业技术体系藻类创新团队加工与质量控制岗项目(SDAIT-26-05)、山东省农业重大应用技术创新项目(SF1805301301)

Fund: Supported by Central Government Guides Local Science and Technology Development Projects (Z135050009017), Shandong Provincial Modern Agricultural Industry Technology System Algae Industry Innovation Team (SDAIT-26-05) and Major Applied Agricultural Technology Innovation Projects in Shandong Province (SF1805301301)

*通讯作者: 宫向红, 硕士, 研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。E-mail: ggxxhh123@163.com

*Corresponding author: GONG Xiang-Hong, Master, Professor, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, No 216, Changjiang Road, Yantai 264006, China. E-mail: ggxxhh123@163.com

after 1 d, and then increased gradually, reaching the maximum value of 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at 3 d, and the average enrichment rate was 0.57, 0.24 and 0.19 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, respectively. At the 140 th day, it was not detected in body wall, and the average removal rate was 0.0073 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$. Nitrofurazone source semicarbazide, the content was 0.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 1 d, and then increased gradually, reaching 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at 3 d, and the average enrichment rate was 0.52, 0.26, 0.22 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, respectively. At the 160 th day, it was not detected in body wall, and the average removal rate was 0.0064 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$. At 180 d, 2 source semicarbazide were not detected in the body wall of *Apostichopus japonicus*, with half-lives of 1045.7 h and 1224.2 h, respectively. The semicarbazide caused by nitrofurazone longer than direct exposure. The enrichment and elimination rate of semicarbazide in viscera was relatively fast, but the residue of semicarbazide in viscera was larger than the body wall, so it took longer time to decrease to undetected.

Conclusion *Apostichopus japonicus* fed with nitrofurazone or grown in the seawater at a certain content of semicarbazide can be decreased to undetected only after purified for a long time.

KEY WORDS: semicarbazide; nitrofurazone; *Apostichopus japonicus*; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

1 引言

氨基脒(semicarbazide), 又名氨基甲酰肼, CAS 号为 57-56-7, 分子式为 $\text{CH}_3\text{N}_3\text{O}$, 分子量为 75.1, 极易溶于水, 水中溶解度为 100.0 g/L (20 $^{\circ}\text{C}$), 不溶于乙醚及乙醇, 用于制备热敏记录纸上的光色染料, 也是重要的医药、农药等有机合成的中间体, 用于生产呋喃西林、呋喃妥因、肾上腺色脞、氢化泼尼松、氢化可的松等药物, 还可用于测定醛和酮等化合物^[1]。氨基脒在水中形成 $[\text{NH}_2\text{CONHNH}_3]^+$, 其与水溶液中 OH^- 离子不仅能够通过正负电荷间的静电引力结合, 同时还可以通过分子内氢键及分子间氢键结合, 延伸为网状结构, 因此化学结构非常稳定, 如图 1 所示^[2]。

氨基脒属于致癌化学物联氨中的一种, 国际癌症研究机构在 1987 年将氨基脒归类为“Unclassifiable as to carcinogenicity to humans”(第三组)中^[3,4]。氨基脒残留会通过食物链传递到人体内, 若长期食用会导致贫血、神经炎、肝坏死等疾病, 也会对眼部甚至 DNA 造成一定损伤^[5,6]。研究表明, 除使用呋喃西林外, 食品加工及处理程序也会给食品中引入氨基脒^[7]。欧盟研究发现, 在婴儿食品和果酱等罐装食品甚至面粉中检出氨基脒, 上述食品均未使用呋喃西林^[8]。由于氨基脒的生物毒性和食物链的传递效应, 氨基脒已成为一种重要的环境和食品的污染物^[9]。

海参是我国重要的经济养殖海珍品, 是水产品中单一经济总量最大的养殖品种, 山东省是我国海参养殖量最大的省份^[10,11]。刺参(*Apostichopus japonicus*)是海参的一种, 是 20 多种食用海参中质量最好的, 主要产于山东半岛和辽东半岛。在所检测的水产品中, 刺参中氨基脒的检出率是最高的, 刺参养殖产业曾因氨基脒残留问题遭受了巨大经济损失^[12,13]。因此本研究以刺参为研究生物, 采用超高效液相色谱-串联质谱法, 进行了 2 种不同来源氨基脒-呋

喃西林源氨基脒和非呋喃西林源氨基脒在刺参中的低浓度残留研究, 以期指导海参养殖业户安全生产, 促进我国海参养殖产业的健康可持续发展。

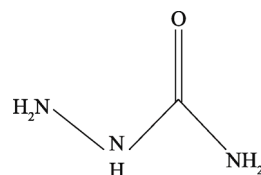


图 1 氨基脒结构式

Fig.1 Structure of semicarbazide

2 材料与方法

2.1 药品与试剂配制

乙腈、甲醇、乙酸乙酯、甲酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 2-硝基苯甲醛(分析纯, 美国 Acros 公司); 盐酸(优级纯, 国药集团); 磷酸氢二钾、乙酸铵(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 所用水为超纯水; 氨基脒标准品(纯度 >98%)、内标 $\text{SEM-}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ (纯度 >95%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

氨基脒标准储备液: 取适量的氨基脒标准品, 用甲醇溶解, 配制成 1.00 mg/L 的储备液, 备用。氨基脒内标工作液: 取适量的氨基脒内标, 用甲醇溶解, 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 感量 0.01 g 分析天平(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

2.3.1 预实验设计

2015 年底进行了预实验, 刺参由山东省黄河三角洲海洋渔业科研推广中心提供。选择平均体质量为 20.0 g 左右的刺参, 水温变化范围为 20.2~23.6°C; 溶解氧保持在 6.0~8.5 mg/L 之间, 24 h 持续充气; pH 值在 7.8~8.2 之间, 盐度在 30~32 之间, 每天定时测定上述参数。每 2 天换水 1 次, 清理刺参的残料和粪便。于水槽中暂养 10 d 后随机分组用于实验。实验前检测刺参及所用海水均无氨基脒残留, 观察生长及健康情况。

实验设置氨基脒染毒组和呋喃西林染毒组各 5 组, 每组设置 3 个平行, 并设置一个空白对照组。2 种情况下的染毒浓度设置 5 个浓度梯度, 分别均为 0.050、0.10、0.25、0.50 μg/L、1.00 μg/L。每个养殖箱放入个头相近、健康状况良好的刺参, 染毒方式为直接泼洒到水体中, 分别于染毒后连续取样。随机抽取 3 只刺参, 用蒸馏水冲洗体表海水及附着物, 解剖分离体壁及内脏组织, 然后充分匀浆、备用。通过对不同浓度下的实验数据分析汇总, 并对相应浓度产生的最大浓度值进行拟合推导, 最终得出刺参体壁氨基脒最大残留量为 1.00 μg/kg 时, 水体中氨基脒及呋喃西林的最低染毒浓度分别为 0.15 μg/L 和 0.20 μg/L。

2.3.2 正式实验设计

选择平均体质量为 25.0 g±2.35 g 左右的刺参, 随机分组。池塘中放入个头相近、健康状况良好的刺参用于本实验, 池塘水深 1.0 m, 体积 1000 m³, 水温变化范围为 21.6~28.2°C(夏眠时温度在 29.2~33.2°C 之间), 溶解氧保持在 6.0~8.5 mg/L 之间, pH 值在 7.8~8.2 之间, 盐度在 30~32 之间。染毒方式为将氨基脒水溶液和呋喃西林悬浊液直接泼洒到池塘中; 泼洒时尽量从池塘的多个点洒入, 同时亦可在池塘的海水入口处洒入, 使水体中氨基脒及呋喃西林的终浓度分别为 0.15 μg/L 和 0.20 μg/L。

分别于染毒后连续取样, 染毒 3 d 后, 按比例定期更换洁净海水。鉴于刺参实际养殖情况, 若将池塘中全部海水一次性排空后再将其加满, 所用时间长, 按照池塘体积和加水流量计算, 大约需要 12 h, 且一次性更换大量海水不利于刺参的生长, 因此每次更换一半海水。同时对海水及沉积物中氨基脒和呋喃西林的浓度进行测定, 直至其在海水和沉积物中均未检出。消除实验的取样时间点按照具体实验情况及前期分析数据设定并适时调整。本实验于染毒后的 4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h(3 d)、96 h(4 d)、144 h(6 d)、192 h(8 d)、240 h(10 d)、288 h(12 d)、

336 h(14 d)、384 h(16 d)、480 h(20 d)、576 h(24 d)、672 h(28 d)、768 h(32 d)、864 h(36 d)、960 h(40 d)、1152 h(48 d)、1344 h(56 d)、1536 h(64 d)、1728 h(72 d)、1920 h(80 d)、2160 h(90 d)、2400 h(100 d)、2640 h(110 d)、2880 h(120 d)、3360 h(140 d)、3840 h(160 d)、4320 h(180 d)时间点取样。随机抽取 10~16 头刺参, 冲洗体表海水及附着物, 解剖分离体壁及内脏组织, 充分匀浆、备用。

2.4 样品前处理及测定

2.4.1 样品前处理

取海参体壁(2.00±0.01)g 或内脏(0.50±0.01)g 于 50 mL 离心管中, 加入 100 μL 内标工作液, 再加入 150 μL 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液, 加入 5.0 mL 盐酸溶液, 涡旋 2 min, 超声 30 min, 然后置于恒温水浴振荡器上 37°C 避光振荡约 16 h。取出离心管放置至室温后, 用磷酸氢二钾溶液调节 pH 7.0~7.5 之间, 加入 5 mL 乙酸乙酯, 旋涡 2 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液至 15 mL 离心管中, 用 5 mL 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 洗脱液在 40 °C 水浴下蒸至近干, 准确加入 1.0 mL 甲醇:含有 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (V:V=5:95) 的混合液旋涡后再加入 3 mL 正己烷, 涡旋 1 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 弃上层液, 下层液过 0.22 μm 滤膜至进样瓶中, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

2.4.2 样品测定

(1) 色谱条件

色谱柱: Thermo C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液; 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	5	95	
0.50	5	95	6
6.00	95	5	6
7.00	95	5	6
7.20	5	95	6
9.00	5	95	1

(2) 质谱条件:

扫描方式: 选择反应监测, 母离子、子离子和碰撞能量见表 2; 喷雾电压: 3.5 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。

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
氨基脲	209	166	12
		192*	10
氨基脲内标	212	168*	10

注: *为定量离子。

2.5 标准曲线和检出限

分别准确移取氨基脲标准工作液 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mL 于离心管中, 除不加样品外, 按照样品处理方法操作和测定, 溶液浓度依次为 0.50、1.00、5.00、10.0、20.0 ng/mL。按照本研究的仪器条件, 得到氨基脲浓度 X 与 Y (氨基脲和内标物的峰面积之比)之间的线性关系。

2.6 回收率和精密度

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。

2.7 数据处理方法

每个时间点的浓度值取测量值的平均值, 采用 DAS 2.0 药物代谢动力学参数计算程序, 在计算机上处理呋喃西林和氨基脲药浴后海参体内的氨基脲含量-时间数据, 计算出不同药浴条件下氨基脲的药物代谢动力学参数。对实验数据汇总分析后, 揭示低浓度呋喃西林和氨基脲在海参体内的组织分布及消除规律。

3 结果与分析

3.1 色谱质谱特征

在优化条件下, 色谱峰的峰形尖锐, 且分离效果良好, 氨基脲标准溶液(10.0 ng/mL)特征离子质谱图如图 2 所示。

3.2 分析方法验证

方法线性范围为: 0.50~20.0 ng/mL, 典型的回归方程为: $Y=0.0225603X+0.00468025$, 相关系数 r 为 0.9996。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, 得出氨基脲的检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。氨基脲在刺参中添加浓度为 0.50~5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 回收率在 72.0%~113%之间, 相对标准偏差在 4.05%~8.72%之间。

3.3 低浓度氨基脲在刺参中的残留分布规律研究

3.3.1 非呋喃西林源氨基脲在刺参体壁和内脏中的残留分布规律研究

(1) 非呋喃西林源氨基脲在刺参体壁和内脏中的残留分布规律

以 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$ 氨基脲对刺参进行染毒, 染毒时间为 3 d,

测定刺参体壁及内脏中氨基脲的残留量, 直至刺参体壁中氨基脲达到最大残留量值(1.00 \pm 0.040) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后, 然后进行消除实验。在富集过程中, 水体中的浓度基本保持恒定, 浓度值为(0.15 \pm 0.010) $\mu\text{g}/\text{L}$ ($n=3$)。富集实验结束后, 定期更换一半洁净海水, 同时对海水及沉积物中含量进行监测, 分别在实验的第 9 d 和第 2 d 未检出。

氨基脲染毒下体壁含量变化见图 3, 1 d 后氨基脲在刺参体壁的含量为 0.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 之后含量逐渐上升, 到 3 d 时含量达到最大值 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。富集实验共持续 3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为 0.57、0.24、0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, 前期平均富集速率快于后期。染毒开始后, 随体内含量的增多, 蓄积速率减慢, 推测可能与摄食习性及相关反应有关。消除实验开始后, 体壁氨基脲含量逐渐降低, 前期下降趋势相对较快, 到达一定程度后逐渐降低, 在低浓度水平维持较长时间。第 40 d 后含量降为 0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 140 d 时, 氨基脲在刺参体壁内未检出。整个消除过程中, 平均消除速率为 0.0073 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$; 跟踪监测至 180 d 时仍未检出。氨基脲的消除情况是: 平均消除速率呈下降趋势, 后期趋于稳定。暴露于一定浓度氨基脲的刺参, 经较长时间净化才能降至未检出。

类似体壁, 氨基脲在内脏呈现一定的蓄积, 如图 4 所示。在相同条件下, 内脏中氨基脲的浓度要高于体壁。相比较体壁最大残留量值 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 内脏中为 1.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 表明内脏蓄积能力更强; 由图可以看出, 1 d 后内脏的含量为 1.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 之后含量逐渐上升, 2 d 后内脏的含量为 1.65 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 到 3 d 时, 含量达到最大值 1.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。富集实验共持续 3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为 1.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ 、0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ 和 0.26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, 前期平均富集速率大于后期, 并且大于相应天数下体壁的富集速率。在染毒开始后, 随着体内含量的增多, 富集速率逐渐减慢。在实验的第 90 d 降为 0.46 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 160 d 降至未检出。整个消除过程中, 平均消除速率为 0.012 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$; 内脏的富集和消除速率相对较快, 但由最大浓度值降至未检出时所需时间更长, 说明刺参内脏蓄积能力较强, 而体壁相对较弱。

(2) 非呋喃西林源氨基脲在刺参体壁和内脏中的动力学参数推导

氨基脲染毒后, 刺参体内的代谢过程经动力学软件 DAS 2.0 分析。首先取刺参体壁氨基脲浓度-时间数据, 用对数图进行初步判断, $\lg C$ 与 t 呈双指数函数特征, 初步判断不是一室模型, 可能为二室模型或三室模型; 相比较三室模型, 二室模型与所测数据有更好的拟合度, 因此采用二室模型, 主要参数见表 3。

3.3.2 呋喃西林源氨基脲在刺参体壁和内脏中的残留分布规律研究

(1) 呋喃西林源氨基脲在刺参中的残留分布规律

以 0.20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 呋喃西林对刺参进行染毒, 染毒时间为

3 d, 测定刺参体壁及内脏中氨基脒的残留量, 直至刺参体壁中氨基脒达到最大残留量(1.00±0.030) $\mu\text{g}/\text{kg}(n=3)$ 表示, 进行消除实验。富集实验结束后, 定期更换一半洁净海水,

同时对海水及沉积物中呋喃西林浓度进行监测, 结果显示海水及沉积物分别在消除实验开始后的第 6 d 和第 3 d 未检出呋喃西林。

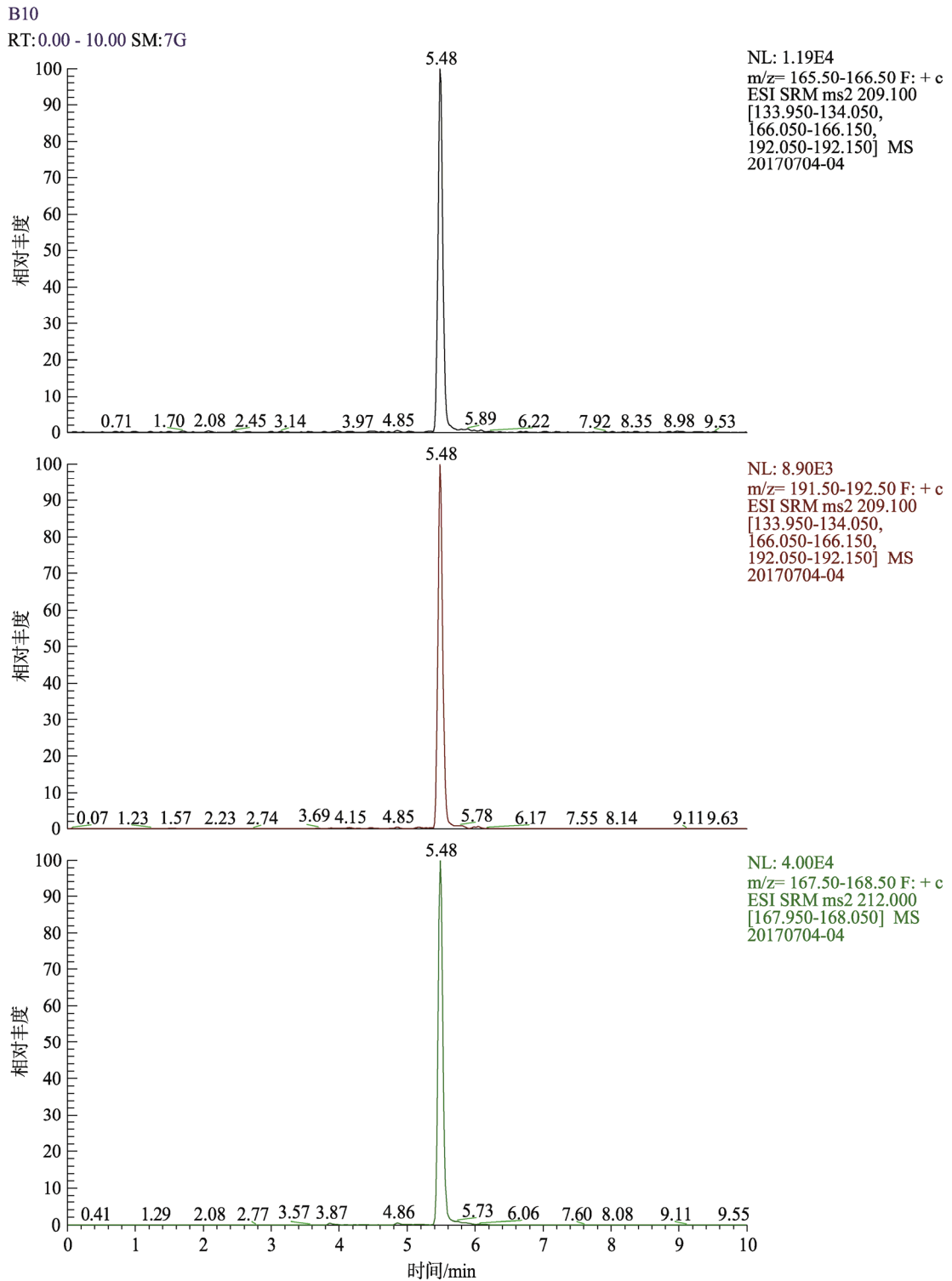


图 2 氨基脒标准溶液(10.0 ng/mL)特征离子质谱图
Fig.2 Chromatograms of semicarbazide at a concentration of 10.0 ng/mL

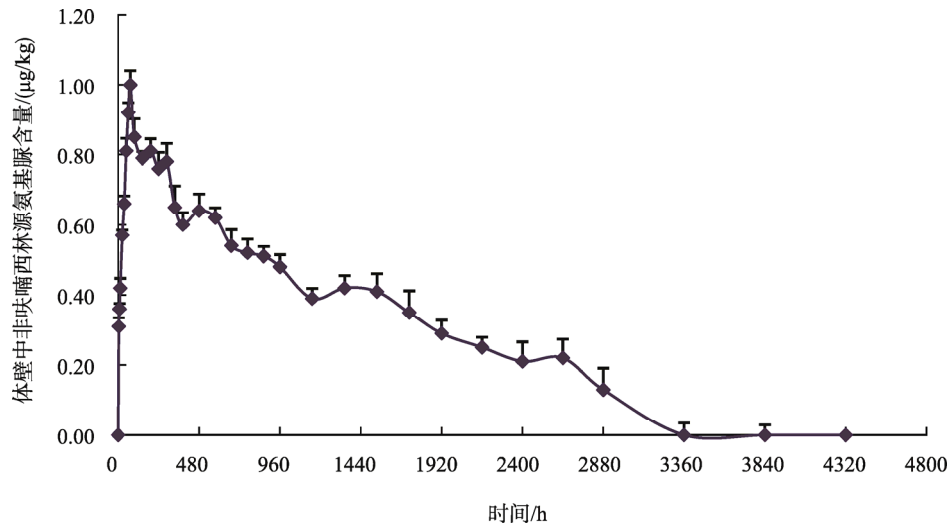


图 3 非呋喃西林源氨基脒在刺参体壁中的含量-时间曲线(氨基脒染毒浓度为 0.15 $\mu\text{g/L}$) ($n=3$)

Fig.3 The non-nitrofurazone source semicarbazide concentration-time curve in body wall of *Apostichopus japonicus* (0.15 $\mu\text{g/L}$ of semicarbazide) ($n=3$)

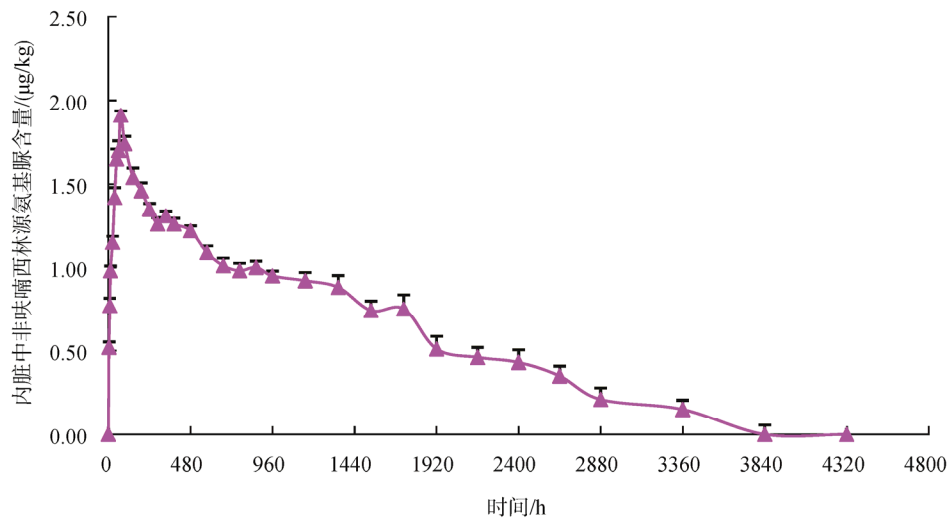


图 4 非呋喃西林源氨基脒在刺参内脏中的含量-时间曲线(氨基脒染毒浓度为 0.15 $\mu\text{g/L}$) ($n=3$)

Fig.4 The non-nitrofurazone source semicarbazide concentration-time curve in viscus of *Apostichopus japonicus* (0.15 $\mu\text{g/L}$ of semicarbazide) ($n=3$)

表 3 非呋喃西林源氨基脒的主要动力学参数(氨基脒染毒浓度为 0.15 $\mu\text{g/L}$)

Table 3 The kinetic parameters of non-nitrofurazone source semicarbazide in *Apostichopus japonicus* (0.15 $\mu\text{g/L}$ of semicarbazide)

动力学参数	英文缩写	体壁	内脏	单位
药时曲线下总面积(0-t)	AUC(0-t)	1181.8	2297.4	$\mu\text{g/L/h}$
药时曲线下总面积(0- ∞)	AUC(0- ∞)	1364.9	2463.3	$\mu\text{g/L/h}$
分布半衰期	$t_{1/2\alpha}$	41.3	36.9	h
消除半衰期	$t_{1/2\beta}$	1045.7	1235.7	h
表观分布容积	V_1/F	0.174	0.088	L/kg
一级吸收速度常数	K_a	0.040	0.052	1/h
吸收半衰期	$t_{1/2K_a}$	17.3	13.4	1/h
速率常数(中央室消除)	K_{10}	0.001	0.001	1/h
速率常数(中央室至周边室)	K_{12}	0	0	1/h
速率常数(周边室至中央室)	K_{21}	0	0.001	h
时滞	Tlag	0	0	h

呋喃西林源氨基胍在刺参体壁的含量变化见图 5, 由图可以看出, 1 d 后体壁的含量为 $0.52 \mu\text{g}/\text{kg}$, 之后含量逐渐上升, 到 3 d 时, 含量达到最大 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。富集实验共持续 3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为 0.52 、 0.26 、 $0.22 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, 前期平均富集速率快于后期。变化趋势与非呋喃西林源氨基胍一致, 同样可能与刺参摄食习性及应用反应有关。消除实验开始后, 刺参体壁氨基胍含量逐渐降低, 在消除前期, 氨基胍下降趋势较快, 到达一定程度后逐渐减缓, 并在低浓度残留水平维持较长时间。第 56 d 含量降为 $0.46 \mu\text{g}/\text{kg}$, 低于 $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$; 第 160 d 时未检出。整个消除过程中, 平均消除速率为 $0.0064 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$; 跟踪监测至 180 d 时, 氨基胍在刺参体壁内仍未检出。停药后氨基胍的消除情况是: 平均消除速率呈下降趋势, 且在后期趋于稳定。所以在实际养殖过程中, 投喂过呋喃西林的刺参, 停药后需经较长时间净化才能降至未检出。

类似体壁, 氨基胍在内脏呈现一定的蓄积, 如图 6 所示, 鉴于内脏是主要蓄积组织, 在相同条件下, 内脏中氨基胍的浓度要高于体壁。体壁最大残留量为 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 内脏中为 $1.85 \mu\text{g}/\text{kg}$, 表明内脏富集能力更强, 这与文献报道结果一致^[13]; 由图可以看出, 1 d 后内脏的含量为 $1.22 \mu\text{g}/\text{kg}$, 之后含量逐渐上升, 2 d 后内脏的含量为 $1.61 \mu\text{g}/\text{kg}$, 到 3 d 时, 含量达到最大 $1.85 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。富集实验共持续 3 d, 按天计算平均富集速率, 分别为 $1.22 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ 、 $0.39 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 和 $0.24 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 前期平均富集速率大于后期, 并且大于相应天数下体壁的富集速率。在染毒开始后, 随着体内含量的增多, 蓄积速率也是逐渐减慢。第 110 d 后含量降为 $0.45 \mu\text{g}/\text{kg}$, 低于 $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$; 在 180 d 降至未

检出。整个消除过程中, 平均消除速率为 $0.010 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$; 即使内脏的富集和消除速率相对较快, 相比较体壁, 其由最大残留量值降至未检出时所需时间更长。

(2) 呋喃西林源氨基胍在刺参体壁和内脏中的动力学参数推导

呋喃西林染毒进入刺参体内后, 经 DAS 2.0 分析, 同样先取刺参体壁氨基胍浓度-时间数据, 用对数图进行初步判断, 初步判断不是一室模型, 可能为二室模型或三室模型; 相比较三室模型, 在该染毒方式下, 二室模型与所测数据有更好的拟合度, 因此本研究采用二室模型, 主要参数见表 4。

3.3.3 影响因素讨论

(1) 药时曲线下面积(AUC)

药时曲线下面积(AUC)反应氨基胍进入刺参体内量的多少, 是表示不同组织吸收氨基胍的一个重要指标。吸收后的母体呋喃西林在刺参体内数小时代谢为氨基胍, 氨基胍以蛋白结合物的形式在刺参体内可残留较长时间。本实验条件下, 分别染毒氨基胍和呋喃西林时, 刺参体壁的 AUC(0-∞)分别为 $1364.9 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$ 和 $1576.7 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$, 说明氨基胍无论来自于环境污染还是呋喃西林代谢, 都有一定量进入刺参体壁, 推测此数值的大小与染毒方式、染毒浓度和研究对象有关系。体壁和内脏 AUC(0-∞)比较, 非呋喃西林源氨基胍体壁($1364.9 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$) < 内脏($2463.3 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$), 呋喃西林源氨基胍体壁($1576.7 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$) < 内脏($2843.5 \mu\text{g}/\text{L}/\text{h}$); 体壁和内脏 AUC 存在一定差距, 体壁均小于内脏, 说明组织不同, 氨基胍的蓄积能力有所差别, 内脏中蓄积能力相对较强。

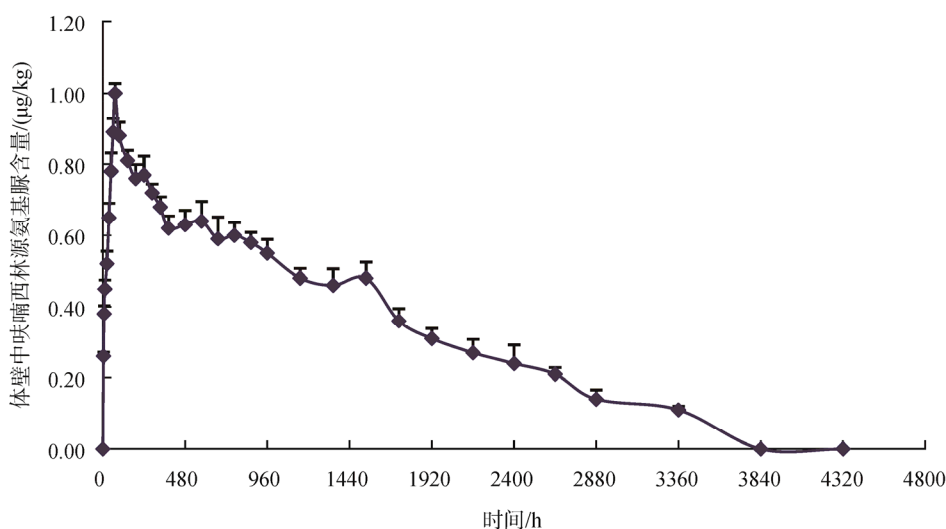


图 5 呋喃西林源氨基胍在刺参体壁中的含量-时间曲线(呋喃西林染毒浓度为 $0.20 \mu\text{g}/\text{L}$) ($n=3$)

Fig.5 The nitrofurazone source semicarbazide concentration-time curve in body wall of *Apostichopus japonicas* ($0.20 \mu\text{g}/\text{L}$ of nitrofurazone) ($n=3$)

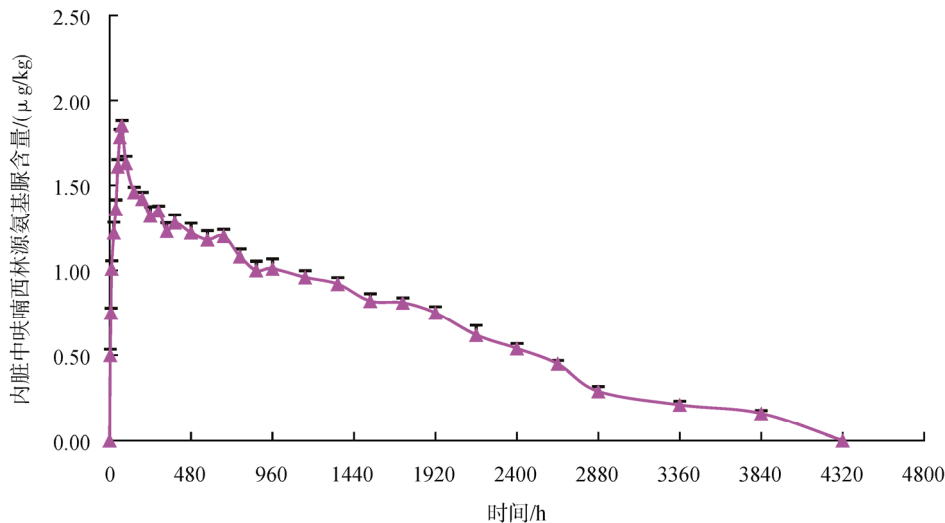


图 6 呋喃西林源氨基脒在刺参内脏中的含量-时间曲线(呋喃西林染毒浓度为 $0.20 \mu\text{g/L}$) ($n=3$)

Fig.6 The nitrofurazone source semicarbazide concentration-time curve in viscus of *Apostichopus japonicus* ($0.20 \mu\text{g/L}$ of nitrofurazone) ($n=3$)

表 4 呋喃西林源氨基脒的主要动力学参数(呋喃西林染毒浓度为 $0.20 \mu\text{g/L}$)

Table 4 The kinetic parameters of nitrofurazone source semicarbazide in *Apostichopus japonicus* ($0.20 \mu\text{g/L}$ of nitrofurazone)

动力学参数	英文缩写	体壁	内脏	单位
药时曲线下总面积(0-t)	AUC(0-t)	1364.9	2620.1	$\mu\text{g/L/h}$
药时曲线下总面积(0- ∞)	AUC(0- ∞)	1576.7	2843.5	$\mu\text{g/L/h}$
分布半衰期	$t_{1/2\alpha}$	44.1	38.7	h
消除半衰期	$t_{1/2\beta}$	1224.2	1439.9	h
表观分布容积	V_1/F	0.148	0.119	L/kg
一级吸收速度常数	K_a	0.021	0.058	1/h
吸收半衰期	$t_{1/2K_a}$	32.5	12.1	1/h
速率常数(中央室消除)	K_{10}	0.001	0.001	1/h
速率常数(中央室至周边室)	K_{12}	0.006	0	1/h
速率常数(周边室至中央室)	K_{21}	0.009	0.001	h
时滞	Tlag	0	0	h

(2) 消除半衰期($t_{1/2\beta}$)

消除半衰期($t_{1/2\beta}$)是衡量污染物在生物体内消除速率的尺度。本实验条件下,2种来源氨基脒在刺参体壁的半衰期分别为 1045.7 h 和 1224.2 h,内脏的半衰期分别为 1235.7 h 和 1439.9 h,体壁小于内脏,非呋喃西林源小于呋喃西林源。邢丽红等^[14]研究表明:氨基脒在刺参苗种体内的消除半衰期为 682.4 h(此实验条件下是将刺参整体匀浆后分析测定),明显小于本论文得出的消除半衰期。推测上述数据差异可能与刺参生长期及环境条件有关,本实验部分时间段处于刺参夏眠期内,因此半衰期相对较长。

(3) 消除期

消除期要根据污染物的残留量及消除速度来确定。本

实验为刺参成参,跟踪测定 6 个月后未检出氨基脒,推荐消除期为 180 d。总体说来,上述数据表明氨基脒在刺参体内的消除速度缓慢,一旦进入刺参体内,便较难消除。推测可能与氨基脒分解和排出的酶活性、环境温度和生活习性(如夏眠)等有关。

(4) 表观分布容积(V_1/F)

表观分布容积(V_1/F)值越小,表明氨基脒与该组织的结合程度越高。非呋喃西林源氨基脒,体壁和内脏的 V_1/F 分别为 0.174 和 0.088;呋喃西林源氨基脒,体壁和内脏的 V_1/F 分别为 0.148 和 0.119。2种方式下,内脏中 V_1/F 值均小于体壁,说明无论何种方式产生的氨基脒残留,其与内脏组织的结合程度均大于体壁。

(5) 药代动力学参数影响因素

影响水生生物代谢动力学参数的因素众多, 最显著的是温度。早在 1990 年 Björklund and Bylund(1990)发现, 水温在升高 1 °C 的条件下, 水生生物体内药物的代谢速率和消除速率一般提高 10%^[15,16]。但是这一点对刺参并非完全成立。因为在温度较高的夏季, 刺参一般处于夏眠期, 休眠期间代谢率低。诸如其他条件, 如染毒方式(口服、药浴或者注射)、环境因子(水的盐度及 pH)、取样方式及取样组织等都会对结果产生一定影响。

4 结 论

通过分析低浓度氨基脒在刺参中的残留分布特征, 分析了刺参中残留变化趋势。非呋喃西林源氨基脒, 第 140 d 时刺参体壁内未检出, 平均消除速率为 0.0073 μg/(kg·d); 呋喃西林源氨基脒, 第 160 d 时刺参体壁未检出, 平均消除速率为 0.0064 μg/(kg·d); 上述 2 种途径下跟踪监测至 180 d 时, 氨基脒在刺参体壁内仍未检出。两种来源氨基脒在刺参体壁的半衰期分别为 1045.7 h 和 1224.2 h, 呋喃西林源大于非呋喃西林源。内脏的富集和消除速率相对较快, 但内脏中氨基脒残留量大于体壁, 所以降至未检出所需时间更长。数据表明: 投喂过呋喃西林或暴露在一定氨基脒浓度水平下的刺参, 需经较长时间净化后才能降至未检出。

参考文献

- [1] Srinivasan MR, Bhat HL, Narayanan PS. Electrical, thermal and infrared studies on semicarbazide hydrochloride and semicarbazide hydrobromide [J]. Appl Phys A, 1992, 54(3): 258–260.
- [2] Tian X, Xu Y, Song X, et al. Temporal and spatial distribution of semicarbazide in western Laizhou bay [J]. Marine Pollut Bull, 2016, 112(1-2): 393–398.
- [3] Tian X, Xu Y, Gong X, et al. Environmental status and early warning value of the pollutant semicarbazide in Jincheng and Sishili bays, Shandong Peninsula, China [J]. Sci Total Environ, 2017, (576): 868–878.
- [4] 徐英江, 孙玉增, 宋秀凯, 等. 潮河口邻近海域氨基脒污染现状调查研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 538–542.
Xu YJ, Sun YZ, Song XK, et al. Survey of semicarbazide contamination in coastal waters adjacent to the chaohe river estuary [J]. Oceanol Limnol Sin, 2010, 41(4): 538–542.
- [5] Toth B. A review of the natural occurrence, synthetic production and use of carcinogenic hydrazines and related chemicals [J]. In vivo (Athens, Greece), 2000, 14(2): 299–319.
- [6] Toth B. Synthetic and naturally occurring hydrazines as possible cancer causative agents [J]. Cancer Res, 1975, 35(12): 3693–3697.
- [7] Beatriz MC, Anklam E. Semicarbazide: Occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(4): 968–977.
- [8] Szilagyi S, Calle MBDL. Semicarbazide in baby food: A European survey [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 224(1): 141–146.
- [9] Gao S, Wang W, Tian H, et al. An emerging water contaminant,

semicarbazide, exerts an anti-estrogenic effect in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Bull Environ Contamin Toxicol, 2014, 93(3): 280–288.

- [10] 彭道民, 慕永通. 中国沿海省份海参养殖业经济区域类型初探及产量预测分析[J]. 中国渔业经济, 2017, 35(4): 67–72.
Peng DM, Mu YT. Preliminary discussion on regional types of Chinese sea cucumber aquaculture industry economy in coastal provinces and predictive analysis of yield [J]. Chin Fish Econom, 2017, 35(4): 67–72.
- [11] 孙圆圆, 袁志星, 薛晓蕾. 中国海参产业发展问题与对策研究[J]. 世界农业, 2018, (3): 186–191.
Sun YY, Yuan ZX, Xue XL. Study on the development problems and countermeasures of Chinese sea cucumber industry [J]. World Agric, 2018, (3): 186–191.
- [12] 付树林, 邢丽红, 孙伟红, 等. 呋喃西林和呋喃唑酮在海参组织中的代谢消除规律[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(1): 36–44.
Fu SL, Xing LH, Sun WJ, et al. The elimination rules of the metabolites of nitrofurazone and furazolidone in *Apostichopus japonicus* [J]. China Fish Qual Stand, 2016, 6(1): 36–44.
- [13] 孙稚菁, 王婵, 李崇, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速检测海参中硝基呋喃代谢物前处理方案的探讨[J]. 分析测试学报, 2016, 35(9): 1127–1131.
Sun ZJ, Wang C, Li C, et al. Pretreatment programs discussion of detecting nitrofurazone metabolites rapidly in holothurians by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2016, 35(9): 1127–1131.
- [14] 邢丽红, 李兆新, 王英姿. 呋喃西林在海参体内的代谢消除规律研究[J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(4): 44–49.
Xing LH, Li ZX, Wang YZ. Metabolism and elimination rules of the metabolite of furazolidone in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. China Fish Qual Stand, 2012, 2(4): 44–49.
- [15] Jia Y, Wang L, Qu Z, et al. Distribution, contamination and accumulation of heavy metals in water, sediments, and freshwater shellfish from Liuyang River, Southern China [J]. Environ Sci Pollut Res, 2018, 25(7): 7012–7020.
- [16] Souza IDC, Mariana M, Bonomo MM, et al. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, (161): 260–269.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



田秀慧, 博士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。

E-mail: tianxiuhui127@163.com



宫向红, 研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。

E-mail: ggxxhh123@163.com