

超高效液相色谱-串联质谱法定量检测 日本沼虾不同组织中氨基脒含量

徐磊^{1,2,3}, 孙博怿^{1,2,3}, 王俊^{1,2,3}, 吴琦芳^{1,2,3}, 高晟^{1,2,3}, 周冬仁^{1,2,3*}

(1. 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 湖州 313001; 2. 湖州市渔业环境与水产品质量安全重点实验室, 湖州 313001; 3. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)不同组织部位中不同形态氨基脒(semicarbazide, SEM)的检测方法。**方法** 样品用66.7%甲醇溶液洗脱后,经盐酸酸化水解,2-硝基苯甲醛过夜衍生,调pH至7.3~7.4后,用乙酸乙酯提取,分析物采用UPLC-MS/MS定性检测,稳定同位素内标法进行定量测定。**结果** SEM在0.25~20.00 µg/kg范围内线性关系良好,相关系数大于0.999,肌肉、头壳、背壳、头足胸、眼柄和鳃6个组织的方法检出限为0.25 µg/kg ($S/N \geq 3$),定量限为0.50 µg/kg ($S/N \geq 10$),肝胰腺的方法检出限为0.5 µg/kg,定量限为1.0 µg/kg,相对标准偏差不大于5.20%。虾壳中SEM含量最高,肌肉中含量最低,肌肉中SEM主要以游离态形式存在,虾壳中SEM主要以结合态形式存在。**结论** 本方法灵敏度高、重现性好,可用于日本沼虾不同组织中不同形态SEM的定量测定。日本沼虾不同组织中SEM的存在形态与含量均存在巨大差异。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 日本沼虾; 氨基脒

Quantitative determination of semicarbazide content in different tissues of *Macrobrachium nipponense* based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Lei^{1,2,3}, SUN Bo-Yi^{1,2,3}, WANG Jun^{1,2,3}, WU Qi-Fang^{1,2,3}, GAO Sheng^{1,2,3}, ZHOU Dong-Ren^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huzhou 313001, China;
2. Huzhou Key Laboratory of Fishery Environment and Aquatic Product Quality and Safety, Huzhou 313001, China;
3. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the determination of different forms of semicarbazide (SEM) in different tissue parts of *Macrobrachium nipponense*. **Methods** After washing with 66.7% methanol solution, the samples underwent hydrochloric acid acidification and hydrolysis, followed by overnight derivatization of 2-nitrobenzaldehyde. After adjusting the pH value to 7.3–7.4, it was extracted with ethyl acetate. The analyte was qualitatively detected using UPLC-MS/MS and quantitatively determined using stable isotope internal standard method. **Results** The SEM

基金项目: 湖州市科技计划项目(2020GZ18)、浙江省科技厅重点研发项目(2022C02028)

Fund: Supported by the Huzhou Science and Technology Plan Project (2020GZ18), and the Key Research and Development Project of Zhejiang Provincial Department of Science and Technology (2022C02028)

*通信作者: 周冬仁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为鱼类病害防治。E-mail: 872559718@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Dong-Ren, Master, Associate Professor, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, No.999, Hangchangqiao South Road, Wuxing, Huzhou 313001, China. E-mail: 872559718@qq.com

exhibited a good linear relationship within the range of 0.25–20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with a correlation coefficient exceeding 0.999. For 6 tissues (muscle, head shell, back shell, head foot chest, eye handle, and gills), the limit of detection was 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 3$) and the limit of quantitation was 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 10$). The limit of detection and limit of quantitation for liver and pancreas was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, with relative standard deviations not more than 5.20%. The shrimp shell possessed the highest SEM content, while the muscle exhibited the lowest content. SEM in muscle primarily existed in the free form, whereas SEM in the shrimp shell predominantly existed in the bound form. **Conclusion** This method has high sensitivity and good reproducibility, and can be used for quantitative determination of SEM in different tissues of *Macrobrachium nipponense*. There are significant differences in the morphology and content of SEM in different tissues of *Macrobrachium nipponense*.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Macrobrachium nipponense*; semicarbazide

0 引言

呋喃西林作为广谱抗菌药物,因其疗效好、耐药效果好、价格便宜,曾在水产养殖上广泛用于预防和治疗由大肠杆菌、沙门氏菌等引起的细菌性疾病^[1-2]。因发现硝基呋喃类药物及其代谢产物对人体具有毒性作用和潜在的致癌性,世界主要国家均要求在食用动物养殖中禁止使用该类药物^[3-4]。氨基脲(semicarbazide, SEM)是一种联胺类小分子化合物,作为呋喃西林在生物体内稳定的侧链代谢物,一直以来都被认为是呋喃西林的特征代谢产物^[5]。欧盟于 1995 年就规定该类物质禁止在食物中使用,2003 年公布水产品中硝基呋喃类药物及其代谢物的检测限^[6],我国农业部也于 2002 年公布的《食品动物禁用兽药及其他化合物清单》中规定呋喃西林抗生素在所有食品动物中禁止使用^[7]。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)又称青虾或河虾^[8],隶属十足目(Decapoda)长臂虾科(Palaemonidae)沼虾属(*Macrobrachium*),是我国淡水中的主要经济虾类之一^[9]。据《中国渔业统计年鉴》公布,2022 年我国青虾养殖产量为 22.6 万 t^[10],然而,在我国水产品质量安全监督抽查中发现,日本沼虾的 SEM 超标现象非常突出^[11]。在一些研究中,检出率甚至高达 100%^[12],这给日本沼虾的安全性带来了质疑,给养殖企业造成巨大的经济损失。近年来,越来越多的研究表明,SEM 来源广泛,除了使用呋喃西林药物外,还有受体自身来源、外界迁移和生产加工过程中产生等^[13-19]。关于甲壳类水产品在未接触呋喃西林药物的情况下仍检出 SEM 的报道也时有发生。ZHANG 等^[20]在浙江沿海野生的三疣梭子蟹中,MC CRACKEN 等^[21]和 POUCKE 等^[22]在罗氏沼虾中,闻胜等^[23]在克氏原螯虾、河虾和基围虾中,于慧娟等^[24]在多种青虾、青蟹等中都检测出 SEM,并且外壳中的 SEM 含量要远高于肌肉中^[24-25],可见甲壳类水产品中 SEM 的存在具有普遍性。此外,HOOGENBOOM 等^[26]还发现甲壳类水产品中的 SEM 具有游离态和结合态两种存在形态。游离态 SEM 存在于组织

表面,容易洗脱,而结合态 SEM 与蛋白深度结合,可长期存在^[27]。由于甲壳动物中各组织间 SEM 含量差异巨大且存在两种形态,导致在国际贸易中,如果双方采用不同的检测方法,可能会得到完全不同的检测结果^[22]。

我国关于动物源性食品中硝基呋喃代谢物残留的检测方法有很多,主流方法是液相色谱与质谱联用技术,其中专门针对水产品的检测标准包括农业部 783 号公告-1-2006《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》和 GB 31656.13—2021《水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法》。两种方法均针对于肌肉组织中硝基呋喃类代谢物残留的检测,测定的均为 SEM 总量,并不考虑 SEM 的存在形态。此外,关于水产品中硝基呋喃代谢物残留的检测方法研究大多致力于前处理过程的优化^[27-28],关于检测过程中是否需要避光和环境温度对前处理过程的影响等问题却少有报道。本研究在农业部 783 号公告-1-2006 和 GB 31656.13—2021 的基础上对仪器条件及样品前处理方面进行优化,初步探索光照和环境温度对前处理的影响,使其更适用于日本沼虾不同组织部位中不同形态 SEM 的检测。为后续进一步了解日本沼虾中 SEM 的本底特征、存在形态及分布特征奠定检测技术基础,为日本沼虾中呋喃西林假阳性问题的解决提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SEM 标准品(纯度 99.70%)、SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂(纯度 98.9%)(德国 Dr.Ehrestorfer 公司); 2-硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde, 2-NBA)(分析纯,美国 Sigma 公司); 正己烷(色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙酸铵(色谱纯,美国 ROE 公司); 甲酸(色谱纯,德国 CNW 公司); 磷酸氢二钾(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司); 浓盐酸(优级纯,永华化学科技公司); 甲醇、乙酸乙酯(色谱纯,

美国 MERCK 公司); 二甲基亚砜(色谱纯, 北京索莱宝科技有限公司); 15 mL 聚乙烯离心管(美国 Corning 公司)。

1.2 仪器与设备

ACQUITY H-CLASS 超高效液相色谱仪串联 Waters Xevo TQ 质谱仪(美国 Waters 公司); VM-800 多管旋涡混合器(群安实验仪器公司); ZHWY-110X50 型恒温振荡箱(上海智城分析仪器制造有限公司); T18 高速均质机(德国 IKA 公司); SIGMA 3-18K 高速离心机(德国 Sigma 公司); N-EVAP111 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 仪器分析条件

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40°C; 流速: 0.40 mL/min; 进样量: 5.0 μL; 流动相水相 A: 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1%甲酸); 流动相有机相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序为 0 min (80% A)→2.5 min (20% A)→3.0 min (20% A)→3.2 min (80% A)→4.0 min (80% A)。

质谱条件: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)正离子模式; 毛细管电压: 0.8 kV; 离子源温度: 150°C; 脱溶剂气流量: 氮气 1000 L/h; 脱溶剂气温度: 500°C; 锥孔气流量: 氮气 50 L/h; 碰撞气流量: 氩气 0.15 mL/min。其他质谱参数见表 1。

表 1 SEM 的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of SEM

| 化合物 | 定性离子对 (<i>m/z</i>) | 定量离子对 (<i>m/z</i>) | 锥孔电压 /V | 碰撞能量 /eV |
|---|-------------------------|-------------------------|------------|-------------|
| SEM | 209>166 | 209>166 | 24 | 11 |
| | 209>192 | | 24 | 13 |
| SEM·HCl- ¹³ C ₁₅ N ₂ | 211.8>168 | 211.8>168 | 25 | 11 |

1.3.2 样品采集及制备

日本沼虾采集于浙江德清养殖场, 低温条件下运回实验室, 再将样品分为肌肉、头壳、背壳、头足胸、肝胰腺、眼柄及鳃共计 7 个组织, 手动或匀浆机混匀后分装, -20°C 冷冻保存。

1.3.3 样品处理

根据不同组织部位, 称取适量样品(0.5~2.0 g)于 50 mL 离心管中, 加入 50 μL SEM 内标工作溶液(100 ng/mL), 涡旋 50 s, 再加入 5 mL 盐酸溶液(0.2 mol/L)和 150 μL 2-NBA 溶液(50 mmol/L), 涡旋 50 s 后, 置于恒温水浴振荡器中 37°C 避光振荡 16 h。

将离心管取出并冷却至室温, 加入适量 K₂HPO₄ 溶液(1.0 mol/L), 调节 pH 至 7.0~7.5, 加入 8 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 100 s, 8000 r/min 离心 5 min 后取上清液转移至 10 mL

离心管中, 将上清液于 40°C 下氮气吹干。加入 2.0 mL 5% 甲醇溶液, 2 mL 正己烷涡旋振荡溶解残留物, 8000 r/min 离心 5 min, 下层清液过 0.22 μm 滤膜, 待测。

1.3.4 标准工作曲线制作

分别移取 SEM 标准工作溶液 1 (10 ng/mL) 25、50、100、200 μL 和 SEM 标准工作溶液 2 (100 ng/mL) 50、100、200 μL 于 7 个 50 mL 离心管中, 除不加样品外按 1.3.3 步骤操作, 检测方法参照 1.3.1。标准曲线溶液的质量浓度依次是 0.25、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00 ng/mL, 内标溶液质量浓度为 5.0 ng/mL。

1.4 数据处理

实验数据分析采用 Waters 的 Masslynx 软件, 所有检测实验均采用 3 平行同步进行, 检测结果以平均值表示。检测分析采用内标法, 相对回收率(%)按照公式(1)计算, 以 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

相对回收率=(加标基质中回收得到目标物质的峰面积/加标基质中回收得到内标物质的峰面积)/(加标样品同等浓度的纯试剂溶液目标物质的峰面积/加标样品同等浓度的纯试剂溶液内标物质的峰面积)×100% (1)

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

取 1 mL 的 SEM 标准工作液(200 μg/L)和 1 mL 的 SEM 内标工作液(200 μg/L), 按照 1.3.3 的方法处理后定容于 2 mL 样品瓶中。吸取 250 μL 样品于毛细管注射器中, 以流动注射的方式, 首先在 MS 模式下选定 SEM 衍生物和 SEM 内标衍生物的母离子, 进行离子源参数优化, 然后在 MS/MS 模式下进行其子离子及碰撞能优化。图 1 为在锥孔电压为 24 V 条件下, 碰撞能为 11 eV 时, SEM 衍生物母离子和其子离子的相对丰度。

2.2 样品处理方法的优化

2.2.1 游离 SEM 洗脱方法的优化

由于 SEM 在日本沼虾体内存在游离态和结合态两种形态, 为研究 SEM 在日本沼虾体内的分布特点, 需要检测两种形态 SEM 的含量。由于游离态 SEM 易于洗脱, 可在沼虾样品前处理过程中增加预洗过程。为选择最佳预洗过程, 在预洗溶剂方面, 本研究首先比较了甲醇和乙醇的洗脱效果, 结果显示, 当肌肉样品经甲醇单次预洗后, 可洗脱约 15.3% 的 SEM, 经乙醇单次预洗后, SEM 浓度反而增加约 32.6%, 可见乙醇具有将肌肉中氨基酸转化为 SEM 的能力^[4], 因此选择甲醇作为洗脱溶剂。其次, 本研究比较了涡旋 5 min 和超声 5 min 两种预洗方式, 经 66.7% 甲醇单次预洗后, 两种预洗方式洗脱效果接近, 均可洗脱约 53.7% 的 SEM, 本研究选择涡旋 5 min 的预洗方式。最后,

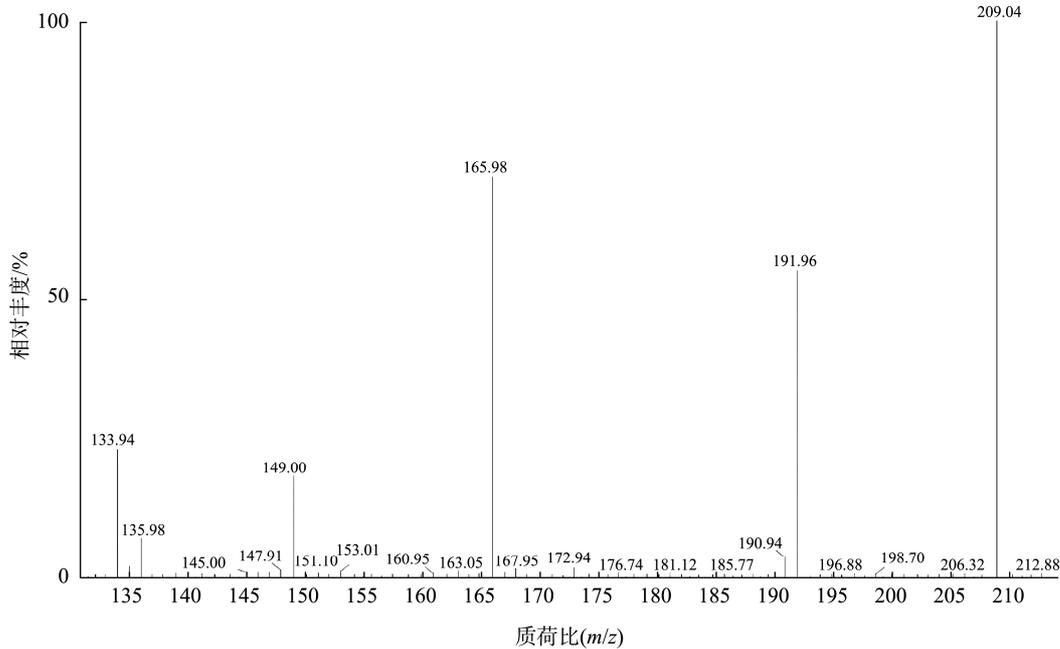


图 1 SEM 标准工作液(200 µg/L)质谱图

Fig.1 Mass spectrum of SEM standard solution (200 µg/L)

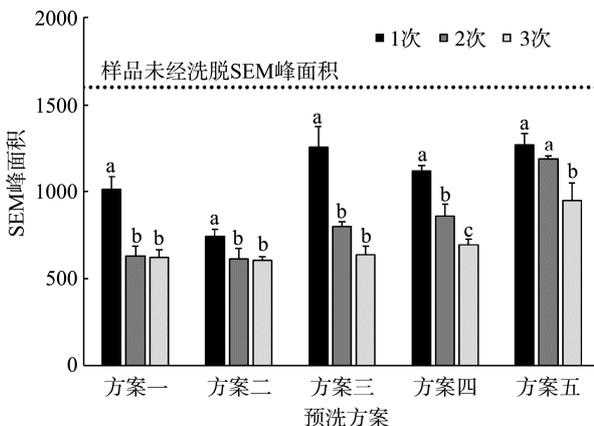
本研究选取 50%甲醇水溶液(方案一)、66.7%甲醇水溶液(方案二)、75%甲醇水溶液(方案三)、90%甲醇水溶液(方案四)及 100%甲醇溶液(方案五)作为预洗溶剂,每次预洗溶剂用量均为 5 mL,预洗方式为 2000 r/min 涡旋 5 min,预洗次数分为 1 次、2 次和 3 次。具体预洗结果见图 2。肌肉样品经单次预洗后,5 种预洗溶剂均能起到洗脱游离 SEM 的效果,其中方案二的预洗能力最好,可洗脱约 53.7%的 SEM。通过第 2 次预洗,方案一和方案二洗脱效果最好,结果接近,能够洗脱约 61.9%的 SEM。通过第 3 次预洗,方案一、方

案二和方案三洗脱效果最好,大约能洗脱 62.3%的 SEM。综合考虑时间与成本,本研究认为方案二(66.7%甲醇水溶液)涡旋 2 次是较佳方案,能够快速、经济、彻底的将游离 SEM 洗脱。

2.2.2 pH 对水解和萃取的影响

pH 对于 SEM 检测的影响很大,在 SEM 的检测过程中,有两个步骤涉及 pH 调节,一是水解过程,酸性条件下有利于 SEM 蛋白结合物水解,二是萃取过程,pH 为 7.0~7.5 时有利于乙酸乙酯的萃取。当测定肌肉组织中 SEM 残留量时,一般添加 5 mL 盐酸(0.2~0.5 mol/L)。由于虾壳中含有几丁聚糖和 CaCO_3 ,可能会对盐酸产生额外的消耗,从而影响水解过程。为了解虾壳中 SEM 检测过程的最佳盐酸添加量,以日本沼虾的虾壳为基质制备 8 组 SEM 阳性样品,通过依次添加 0、1、2、3、4、5、6、7 mL 盐酸(0.5 mol/L),观察不同盐酸添加量对检测结果的影响,结果见图 3。从图 3 中可以看出,当盐酸(0.5 mol/L)添加量为 4 mL 时,即可满足虾壳中 SEM 检测的需要。

以日本沼虾肌肉为基质制备 8 组 SEM 阳性样品,样品完成水解衍生后,通过添加不同体积的 K_2HPO_4 (1.0 mol/L)来改变水解产物的 pH,进而观察 SEM 检测过程中最佳萃取 pH。在农业部 783 号公告-1-2006 和 GB 31656.13—2021 中,最佳 pH 为 7.0~7.5,在 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》中,最佳 pH 为 7.4。从图 4 中可以看出,当 pH 在 7.28~7.38 之间,此时萃取效果最好。



注:不同字母表示组间具有显著性差异, $P<0.05$,下同;虚线表示日本沼虾肌肉样品在未经过预洗,直接常规处理后检测到的 SEM 峰面积(1601±59)。

图 2 不同预洗方案后肌肉样品中结合 SEM 的含量($n=3$)
Fig.2 Concentration of bound SEM in muscles after different prewash programs ($n=3$)

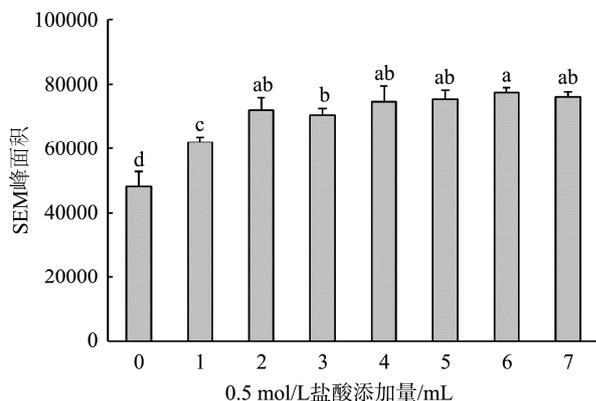


图 3 盐酸对水解过程的影响(n=3)
Fig.3 Effects of hydrochloric acid on the hydrolysis process (n=3)

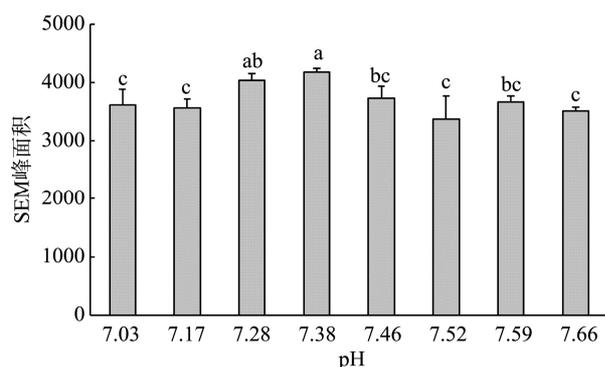


图 4 pH 对萃取过程的影响(n=3)
Fig.4 Effects of pH on the extraction process (n=3)

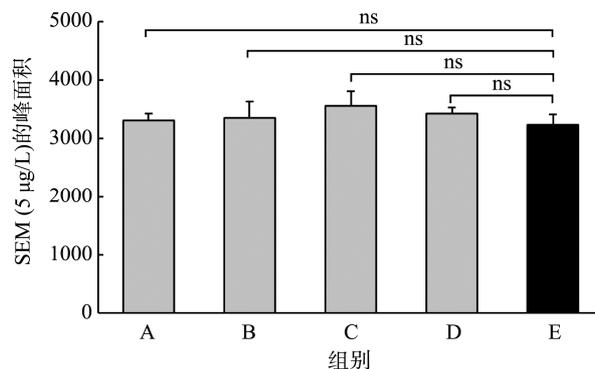
2.2.3 避光效果对前处理的影响

农业部 2349 号公告-6-2015 和一些研究中^[28-29]显示, 硝基咪唑类药物对光照敏感, 在实验过程中需要做到避光。为了研究避光对 SEM 检测的影响, 本研究将检测过程分为 5 个阶段, 分别是加标、衍生化、提取、氮吹、定容, 其中衍生化过程全程避光, 其余 4 个阶段选择性避光, 避光方法主要是采用锡纸包裹实验器皿的方法, 避光过程设置如表 2 所示, 其中 A 组全程不避光, E 组作为对照组全程避光。空白基质加标实验结果见图 5, 实验过程的 4 个主要阶段, 避光与否对于实验的最终检测结果影响不大。

表 2 避光过程
Table 2 Light avoidance process

| 组别 | 加标 | 提取 | 氮吹 | 定容 |
|--------|----|----|----|----|
| A | Y | Y | Y | Y |
| B | N | Y | Y | Y |
| C | N | N | Y | Y |
| D | N | N | N | Y |
| E(对照组) | N | N | N | N |

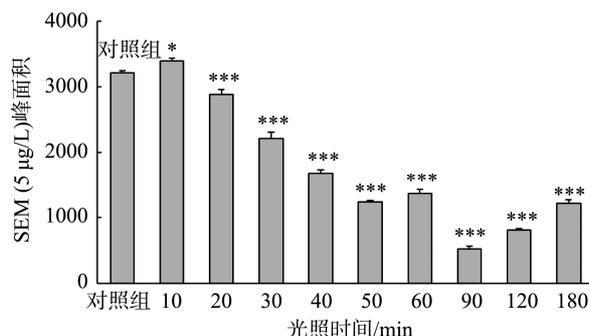
注: Y 表示不避光, N 表示避光。



注: ns 表示组间不具有显著性差异, P>0.05。

图 5 避光对 SEM 测定的影响(n=3)
Fig.5 Effects of avoiding light on SEM measurement (n=3)

为进一步考虑光照对实验的影响, 本研究将 SEM 标准品直接暴露于光照中。考虑到如果将 SEM 标准品添加到基质当中, 当样品混匀时, SEM 在基质的遮蔽下近似于处在一种避光环境中, 因此本研究选择在一批 15 mL 离心管中, 直接加入 100 μL SEM (100 μg/L) 标准溶液, 将其置于阳光下, 在不同的光照时长分别检测 SEM。结果如图 6 所示, 当 SEM 暴露于光照下一段时间后, 其峰面积呈现先下降后上升的趋势, 光照 90 min 时, 峰面积达到最低, 约为最大峰面积的 15%。说明 SEM 在阳光照射下会呈现衰减现象。在光照 90 min 以后, SEM 的浓度有随光照时间增加而增加的情况, 可能是塑料中的一些物质在长时间光照下产生了 SEM。有研究表明, 一些塑料垫圈在高温处理过程中, 垫圈中的发泡剂会受热分解产生 SEM, 并进入到食品中^[16]。可见在正常的检测过程中, 虽然不用特意去避光, 但是仍应该避免光的直接照射。



注: 与对照组相比, *表示组间具有显著性差异, *** P<0.001, 下同。

图 6 光照时长对 SEM 标准品的影响(n=3)

Fig.6 Effects of light duration on SEM standards (n=3)

2.2.4 基质效应

基质效应会使化合物的信号被增强或被抑制, 其产生原因是质谱离子源中样品离子化过程中, 由内源性或外源性基质物质与目标化合物竞争电荷和中和离子化过程引起的。本研究采用 MATUSZEWSKI 等^[30]的方法考察基质效应, 即测定提取后的空白基质加入待测物的响应与纯流

动相中待测物的响应,将两个响应峰面积比值(MF)作为参考。MF>1 时,表明离子增强,MF<1 时,表明离子抑制,通常 MF 在 0.8~1.2 范围时,认为基质作用较弱,可以忽略。本研究以空白的秀丽白虾为基质进行了 SEM 的基质效应评估,经计算 MF 值在 0.88±0.09 (n=5)之间,说明 SEM 在基质中基质作用较弱。此外,SEM 在以秀丽白虾为基质的加标实验中,绝对回收率为 67.2%±7.7% (n=5),因此,在 SEM 的检测中,普遍采用内标法^[15-20]。

2.2.5 环境温度对萃取效果的影响

在农业部 783 号公告-1-2006 和 GB 31656.13—2021 中,当 SEM 完成水解衍生化后,需要先从 37°C 冷却至室温,然后再调节溶液 pH 并进行乙酸乙酯萃取,可见温度偏高会影响萃取效果。为了确定最佳的萃取温度,本研究设计了不同温度环境下的萃取实验,分别设置了 6 组温度,依次是 0、7、14、21、28、37°C,确保样品完成衍生化后,再调节 pH,加乙酸乙酯萃取,样品的涡旋以及离心等步骤均在相对应的 6 组环境温度下进行,所涉及的溶液均事先调节到对应的温度。结果如图 7 所示,温度偏高或者偏低均不利于 SEM 的萃取,最佳萃取温度范围大约在 20~30°C 之间,与室温接近,故本研究涉及的实验均在环境温度 25°C 下进行。

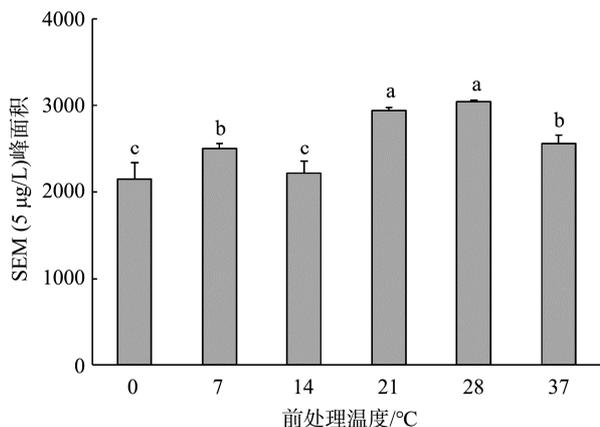


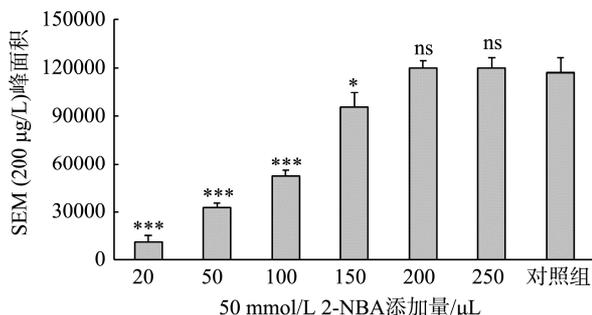
图 7 环境温度对 SEM 检测的影响(n=3)

Fig.7 Effects of environmental temperature on SEM detection (n=3)

2.2.6 衍生剂添加量的优化

在 SEM 的衍生化过程中,衍生剂 2-NBA (50 mmol/L) 的添加量通常为 150 µL,由于日本沼虾不同组织中 SEM 的含量差别巨大,部分组织中 SEM 的浓度可以达到数百 µg/kg,因此需要考虑 150 µL 衍生剂(50 mmol/L)的添加量是否足够。以空白的秀丽白虾为基质,通过添加 SEM 标准品,配制 500 µg/kg 的阳性样品,依次添加 2-NBA (50 mmol/L) 25、50、100、150、200、250、300 µL,样品上机前均稀释成 200 µg/L,其峰面积如图 8 所示。若以 300 µL 衍生剂添加量作为对照,当衍生剂添加量为 150 µL 时,SEM 的响应效果并非最佳,当达到 200 µL 后,SEM 的响应接近最高值,继续添加衍生

剂响应效果无明显性差异。由于衍生剂是由二甲亚砜配制而成,考虑到二甲亚砜本身带有大蒜异臭的气味,对实验人员的健康有影响,建议将 2-NBA 配制成 100 mmol/L,添加量为 100 µL,有效降低有机溶剂二甲亚砜的加入量。



注:与对照组(300 µL 衍生剂添加量)相比,*表示组间具有显著性差异,*P<0.05; ns 表示不具有显著性差异,P>0.05。

图 8 2-NBA 添加量对 SEM 检测的影响(n=3)

Fig.8 Effects of 2-NBA addition on SEM detection (n=3)

2.3 方法的适用性评价

将日本沼虾分为肌肉、头壳、背壳、头足胸、肝胰腺、眼柄和鳃 7 个组织,分别进行总 SEM 和游离 SEM 的测定,每个组织设置 3 个平行,结果表明:在日本沼虾样品的各个组织中均能检出 SEM,各组织样品批内相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在 0.15%~5.20% 之间,批间 RSDs 在 0.57%~7.25% 之间。根据日本沼虾各组织中的 SEM 本底含量,以加标回收的方式,进行质量控制,添加浓度水平为 1.00~150.00 µg/kg,SEM 的回收率在 83.4%~112.5% 之间,精密度大不于 5.20%,具体结果见表 3 和表 4。以上研究结果表明,本方法的准确度、精密度和重现性均良好,符合日本沼虾不同组织中总 SEM 和游离 SEM 分析要求。

表 3 日本沼虾不同组织中总 SEM 加标回收率及 RSDs (n=3)
Table 3 Recoveries and RSDs of the total SEM content in different tissues of *Macrobrachium nipponense* (n=3)

| 组织 | 取样量/g | 加标量/(µg/kg) | 平均回收率/% | RSDs/% |
|-----|-------|-------------|---------|--------|
| 肌肉 | 2.00 | 2.00 | 95.7 | 3.12 |
| | | 5.00 | 96.9 | 2.17 |
| | | 10.00 | 102.4 | 0.45 |
| | | 50.00 | 91.2 | 3.20 |
| 头壳 | 2.00 | 100.00 | 92.8 | 2.19 |
| | | 150.00 | 96.6 | 2.30 |
| | | 50.00 | 104.0 | 1.18 |
| 背壳 | 2.00 | 100.00 | 92.9 | 0.66 |
| | | 150.00 | 93.2 | 1.04 |
| | | 20.00 | 100.5 | 4.30 |
| 头足胸 | 2.00 | 50.00 | 102.1 | 1.91 |
| | | 100.00 | 107.3 | 2.00 |

表 3(续)

| 组织 | 取样量/g | 加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 平均回收率/% | RSDs/% |
|-----|-------|---------------------------------|---------|--------|
| 眼柄 | 0.50 | 20.00 | 109.5 | 3.87 |
| | | 50.00 | 104.4 | 1.43 |
| | | 100.00 | 96.5 | 1.08 |
| 鳃 | 0.50 | 10.00 | 105.3 | 1.35 |
| | | 20.00 | 103.9 | 0.42 |
| | | 50.00 | 98.0 | 0.15 |
| 肝胰腺 | 0.50 | 5.00 | 86.0 | 1.35 |
| | | 10.00 | 89.9 | 0.49 |
| | | 20.00 | 89.7 | 0.86 |

按 1.3.4 中的方法配制标准曲线, 结果表明, SEM 浓度在 0.25~20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内与其峰面积比值呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=0.445397X+0.055834$, r^2 大于 0.9991, 提取离子流图见图 9。肌肉、头壳、背壳、头足胸、眼柄和鳃 6 个组织的方法检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 3$), 定量限为 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 10$), 肝胰腺的方法检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 3$), 定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 10$)。

表 4 日本沼虾不同组织中游离 SEM 加标回收率及精密度($n=3$)

Table 4 Recoveries and RSDs of the free SEM content in different tissues of *Macrobrachium nipponense* ($n=3$)

| 组织 | 取样量/g | 加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 平均回收率/% | RSDs/% |
|-----|-------|---------------------------------|---------|--------|
| 肌肉 | 2.00 | 1.00 | 89.4 | 2.21 |
| | | 2.00 | 92.7 | 1.87 |
| | | 5.00 | 93.8 | 1.65 |
| 头壳 | 2.00 | 5.00 | 102.4 | 4.23 |
| | | 10.00 | 110.4 | 2.17 |
| | | 20.00 | 105.0 | 0.39 |
| 背壳 | 2.00 | 5.00 | 111.0 | 1.72 |
| | | 10.00 | 98.5 | 0.23 |
| | | 20.00 | 94.3 | 0.48 |
| 头足胸 | 2.00 | 5.00 | 92.6 | 2.30 |
| | | 10.00 | 90.7 | 2.11 |
| | | 20.00 | 102.3 | 1.52 |
| 眼柄 | 0.50 | 5.00 | 112.5 | 5.20 |
| | | 10.00 | 102.2 | 2.05 |
| | | 20.00 | 99.1 | 1.22 |
| 鳃 | 0.50 | 5.00 | 93.8 | 2.39 |
| | | 10.00 | 107.6 | 0.83 |
| | | 20.00 | 102.4 | 0.79 |
| 肝胰腺 | 0.50 | 5.00 | 83.4 | 1.47 |
| | | 10.00 | 92.3 | 1.45 |
| | | 20.00 | 87.5 | 2.93 |

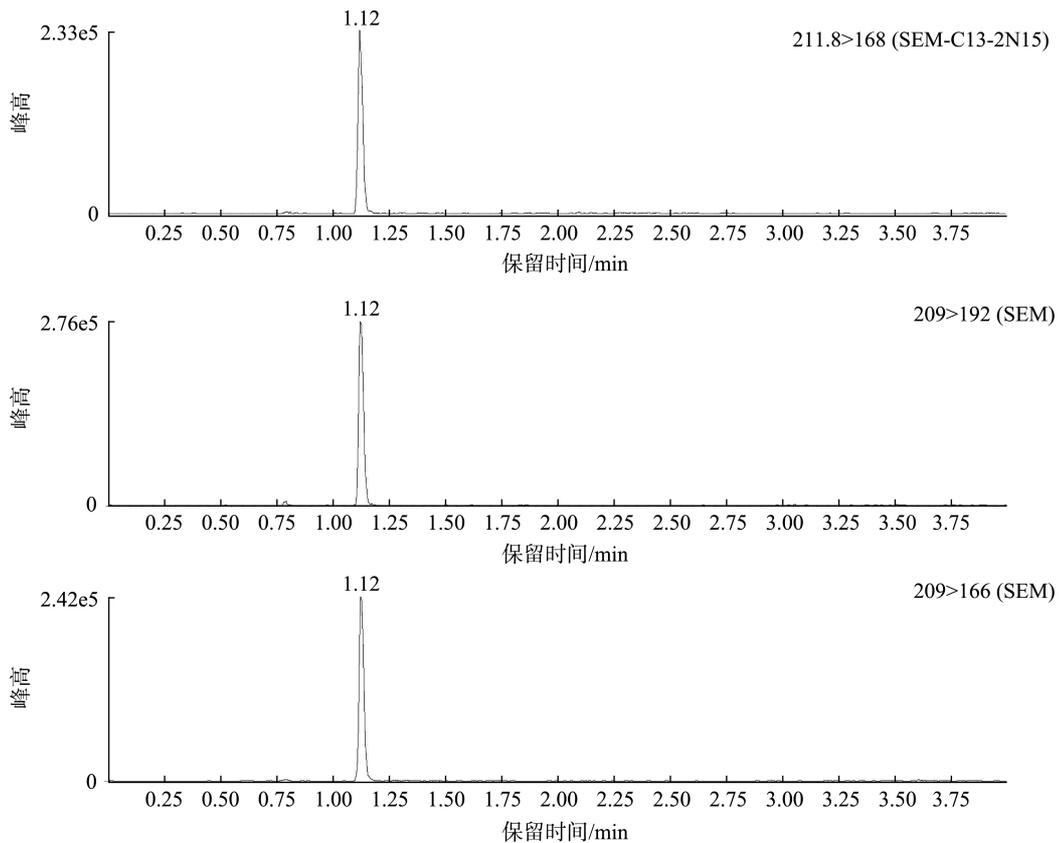


图 9 SEM 标准工作液(5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$)的提取离子流图

Fig.9 Extracted ion chromatograms of SEM standard working solution (5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$)

2.4 实验样品结果

实验组采集了 3 批次日本沼虾样品(养殖过程中均未接触过呋喃西林药物), 采用本研究优化后的检测方法分别对日本沼虾的肌肉、头壳、背壳、头足胸、肝胰腺、眼柄和鳃 7 个组织进行了预洗和不预洗实验, 对其中的总 SEM 及游离 SEM 含量进行了测定, 结果取均值, 测定结果见图 10。由图 10 可见, 日本沼虾的 7 个组织中均能检测到 SEM, 且浓度均高于标准限值(1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 这也说明在日本沼虾组织中存在内源产生 SEM 的情况^[18,31]。就总 SEM 而言, 背壳中含量最高, 头足胸其次, 肌肉组织中含量最低。该结果与宋蓓等^[27]对日本沼虾 6 个组织中 SEM 含量检测的结果相近, 与倪永付等^[32]对青虾中各部分 SEM 含量检测的结果及分布特征相一致。日本沼虾中各个组织中的 SEM 均以结合态和游离态存在, 其中游离态 SEM 占总 SEM 比例在肝胰腺、肌肉、鳃、眼柄、背壳、头足胸和头壳中分别是 84.3%、66.8%、27.7%、12.9%、12.4%、11.4%、9.5%。肝胰腺和肌肉中 SEM 主要以游离态形式存在, 比例大于 50%; 背壳、头足胸、鳃和眼柄中 SEM 主要以结合态形式存在, 结合态 SEM 比例大于 50%。这与舒秀君等^[33]测得日本沼虾肌肉和肝胰腺中游离态 SEM 占比为 67.35% 和 72.40%, 背壳、眼柄、附肢、头胸部和鳃中结合态 SEM 占比为 89.50%、87.16%、85.68%、80.48% 和 73.30% 的分析结果接近。与上述报道相比, 本研究将日本沼虾的头壳和背壳分开处理, 结果发现, 两者虽然同属于虾的外骨骼, SEM 的存在形态也相似, 但背壳中 SEM 含量要远远高于头壳。

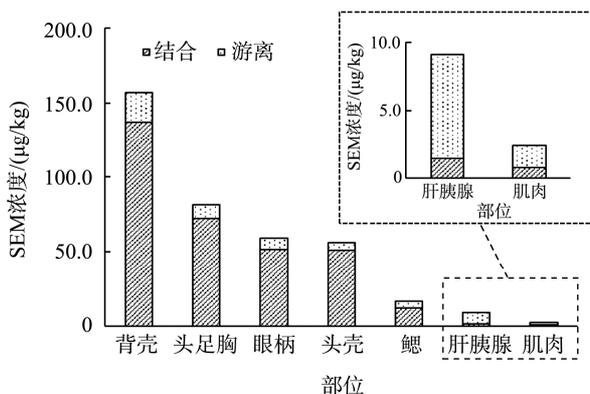


图 10 日本沼虾不同组织中不同形态 SEM 的含量($n=3$)
Fig.10 Content of different forms of SEM in different tissues of *Macrobrachium nipponens* ($n=3$)

3 结论

本研究以日本沼虾为研究对象, 在农业部 783 号公告-1-2006 和 GB 31656.13—2021 方法基础上, 针对日本沼

虾不同组织中 SEM 浓度差异大且存在不同形态的特征, 对该方法的质谱条件、游离 SEM 洗脱条件、水解过程盐酸的用量、衍生化过程衍生剂的用量、最佳萃取 pH、最佳前处理温度以及前处理过程中光照的影响等方面进行了探索和优化。该方法在日本沼虾 7 个组织中 SEM 的检测精密批内 RSDs 在 0.15%~5.20%之间, 批间 RSDs 在 0.57%~7.25%之间, SEM 的回收率在 83.4%~112.5%之间。同时, 对日本沼虾 7 个组织中 SEM 的存在形态进行了研究, 发现日本沼虾的 7 个组织中均能检测到不同浓度的 SEM, 且总 SEM 的含量从高到低依次是背壳>头足胸>眼柄>头壳>鳃>肝胰腺>肌肉, 其中虾的背壳、头足胸、鳃和眼柄组织中 SEM 主要以结合态形式存在, 肝胰腺和肌肉中则主要以游离态形式存在。该方法通过对游离态 SEM 的洗脱, 适用于日本沼虾不同组织中总 SEM 和结合态 SEM 的检测, 为后续进一步研究日本沼虾中 SEM 本底特征、存在形态及分布特征奠定了一定的科学基础, 也为日本沼虾中呋喃西林假阳性问题的解决提供技术支撑。

参考文献

- [1] 徐伟, 耿士伟, 刘路, 等. 硝基呋喃类药物及其代谢物检测方法的研究进展[J]. 天津农业科学, 2018, 24(8): 16–20.
XU W, GENG SW, LIU L, *et al.* Research progress on the detection methods f nitrofurans antibiotics and their metabolites [J]. Tianjin Agric Sci, 2018, 24(8): 16–20.
- [2] 封腾望, 王新新, 穆树荷, 等. 滤过型净化-超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法测定草鱼肌肉冻干粉中 4 种硝基呋喃类代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4181–4187.
FENG TW, WANG XX, MU SH, *et al.* Determination of 4 kinds of nitrofurans metabolites in grass carp muscle lyophilized powder by pass-through cleanup-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole/compound linear ion trap mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(13): 4181–4187.
- [3] 王民燕. 硝基呋喃类四种药物残留快速检测方法的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
WANG MY. Research on rapid detection methods for residues of four nitrofurans [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [4] 王玉堂. 禁用渔药—硝基呋喃类药物的毒性及危害[J]. 中国水产, 2017, 4: 85–86.
WANG YT. Toxicity and harm of prohibited fishing drugs—nitrofurans [J]. China Fish, 2017, 4: 85–86.
- [5] WILLIAMS MS. Investigating the suitability of semicarbazide as an indicator of preharvest nitrofurazone use in raw chicken [J]. J Food Protect, 2020, 83(8): 1368–1373.
- [6] European Commision, Commission Decision 2003/181/EC. Off. J. Eur.

- communities [Z].
- [7] 中华人民共和国农业部公告第235号[Z].
Bulletin of Ministry of agriculture of the People's Republic of China 235 [Z].
- [8] 王克行. 虾蟹类增殖学(水产养殖专业用)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
WANG KX. Shrimp and crab aquaculture (for aquaculture) [M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1997.
- [9] 董俊. 东平湖日本沼虾的生物学研究[J]. 渔业信息与战略, 2010, 25(4): 7-9.
DONG J. Biological research on *Macrobrachium nipponense* in Dongping Lake [J]. Fish Inf Strategy, 2010, 25 (4): 7-9.
- [10] 农业农村部渔业渔政管理局编制. 中国渔业统计年鉴. 2023[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
Compiled by the Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fisheries Statistical Yearbook. 2023 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023.
- [11] 沈玮, 厉晨皓, 钱梦逸, 等. 平湖市 2020 年食品安全监督抽检结果分析[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(5): 114-118.
SHEN W, LI CH, QIAN MY, *et al.* Analysis of food safety supervision and sampling results in Pinghu City in 2020 [J]. Food Ferment Sci Technol, 2021, 57(5): 114-118.
- [12] 王鼎南, 周凡, 李诗言, 等. 甲壳类水产品中呋喃西林代谢物氨基脒的本底调查及来源分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(6): 6-11.
WANG DN, ZHOU F, LI SY, *et al.* Background value survey and source analysis of semicarbazide in shellfish [J]. Chin Fish Qual Stand, 2016, 6(6): 6-11.
- [13] 范清涛, 陈胜军, 邓建朝, 等. 甲壳类水产品中氨基脒产生及控制方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1439-1445.
FAN QT, CHEN SJ, DENG JC, *et al.* Research progress on the production and control method of semicarbazide in crustacean aquatic products [J] J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1140-1145.
- [14] 白亚敏, 梁静. 次氯酸钠消毒对水发食品中产生氨基脒的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(18): 165-169.
BAI YM, LIANG J. Influence of semicarbazide in waterish logged food products generated by sodium hypochlorite disinfectant [J] Food Ferment Sci Technol, 2023, 49(18): 165-169.
- [15] 郭思言, 王俊芬, 郝存显, 等. 动物源性面制品中氨基脒来源分析[J]. 食品安全导刊, 2022, (28): 65-69.
GUO SY, WANG JS, XI CX, *et al.* Analysis of semicarbazide source in animal derived flour products [J]. China Food Saf, 2022, (28): 65-69.
- [16] 赵天祚, 马占峰, 张莹. 蜂蜜中氨基脒本底来源研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3402-3404.
ZHAO TY, MA ZF, ZAHNG Y. Study on the source of semicarbazide in honey [J] J Food Saf Qual, 2019, 10(11): 3402-3404.
- [17] 张祚, 余海霞, 陈霞霞, 等. 甲壳类氨基脒的来源及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6302-6309.
ZHANG Y, YU HX, CHEN XX, *et al.* Research progress on the source and detection method of crustacean semicarbazide [J] J Food Saf Qual, 2021, 12(16): 6302-6309.
- [18] 程波, 舒秀君, 宋蓓, 等. 甲壳类水产品氨基脒残留来源研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(5): 96-101.
CHENG B, SHU XJ, SONG B, *et al.* Research progress on the sources of residual aminourea in crustacean aquatic products [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2018, 38(5): 96-101.
- [19] 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, 34(13): 125-127.
ZHANG XY, ZHANG R, CHEN L, *et al.* Source analysis of aminourea in crustacean aquatic products [J]. Food Res Dev, 2013, 34(13): 125-127.
- [20] ZHANG S, GUO Y, YAN Z, *et al.* A selective biomarker for confirming nitrofurazone residues in crab and shrimp using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407: 8971-8977.
- [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] POUCKE C, 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): 2107-2112.
- [23] 闻胜, 熊碧, 黄常刚, 等. 2013—2015 年湖北地区虾中硝基呋喃代谢物残留的监测分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 336-340.
WEN S, XIONG B, HUANG CG, *et al.* Monitoring and analysis of nitrofurans metabolites residues in shrimp of Hubei area in 2013—2015 [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(1): 336-340.
- [24] 于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法定测定甲壳类水产品中氨基脒的含量[J]. 分析化学, 2012, 40(10): 1530-1535.
YU HJ, LI B, CAI YQ, *et al.* Determination of semicarbazide content in crustaceans by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(10): 1530-1535.
- [25] 莫梦松, 蔡楠, 李来好, 等. 罗氏沼虾成虾中氨基脒的分布特征[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 104-109.
MO MS, CAI N, LI LH, *et al.* Distribution characteristics of semicarbazone in adult *Macrobrachium rosenbergii* [J] Prog Fish Sci, 2022, 43(3): 104-109.
- [26] HOOGENBOOM LAP, VAN BRUCHEM GD, SONNE K, *et al.* Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2002, 11(3-4): 273-287.

- [27] 宋蓓, 程波, 宋铎, 等. 日本沼虾中氨基脒含量检测方法的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(8): 1782-1788.
SONG B, CHENG B, SONG Y, *et al.* Optimization of determination method of semicarbazide (SEM) content in *Macrobrachium nipponensis* [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(8): 1782-1788.
- [28] 郭添荣, 韩世鹤, 吴文林, 等. UPLC-MS/MS 法快速检测人工养殖淡水鱼中硝基呋喃类代谢物[J]. 环境化学, 2022, 41(11): 3534-3543.
GUO TR, HAN SH, WU WL, *et al.* Rapid detection of nitrofurans metabolites in cultured freshwater fish by UPLC-MS/MS [J]. Environ Chem, 2022, 41(11): 3534-3543.
- [29] 坛墨质检科技股份有限公司. 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量测定的前处理方法: 高效液相色谱-串联质谱法[S/OL]. [2020-07-21]. https://www.hbzhan.com/st569012/article_675781.html
Tan-Mo Technology Co., Ltd. A pre-treatment method for the determination of residual nitrofurans metabolites in animal derived foods: high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S/OL] [2020-07-21]. https://www.hbzhan.com/st569012/article_675781.html
- [30] MATUSZEWSKI BK, CONSTANZER ML, CHAVEZ-ENG CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.
- [31] 赵芸, 翁丽萍, 张乐. 河虾中氨基脒的来源初探[J]. 杭州农业与科技, 2019, (4): 43-44.
ZHAO Y, WENG LP, ZHANG L. Preliminary study on the source of semicarbazide in river shrimp [J]. Hangzhou Agric Technol, 2019 (4): 43-44.
- [32] 倪永付, 朱莉萍, 王勇, 等. 微山湖小青虾各部分呋喃西林代谢物含量测定[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 86-88.
NI YF, ZHU LP, WANG Y, *et al.* Determination of nitrofurazone metabolic in every part of Weishan lake shrimp [J]. Food Ferment Technol, 2012, 48(1): 86-88.
- [33] 舒秀君, 程波, 徐娟娟, 等. 日本沼虾养殖过程中氨基脒存在特征研究[J]. 淡水渔业, 2020, 50(3): 11-16.
SHU XJ, CHEN B, XU JJ, *et al.* Study on the characteristics of semicarbazide (SEM) in *Macrobrachium nipponense* during the culture period [J]. Freshw Fisher, 2020, 50(3): 11-16.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介

徐磊, 硕士, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: Lei_1130@126.com

周冬仁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为鱼类病害防治。

E-mail: 872559718@qq.com