

环境中氨基脒消解规律及对斑点叉尾鮰残留评估

索纹纹^{1,2}, 刘永涛², 艾晓辉^{2*}, 杨秋红², 吕思阳^{1,2}, 沈丹怡³

(1.华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2.中国水产科学研究院长江水产研究所 农业部淡水鱼类种质监督检验测试中心, 武汉 430223; 3.浙江慈溪市水产技术推广中心, 浙江 慈溪 315300)

摘要:为研究环境中呋喃西林代谢物氨基脒(Semicarbazide, SEM)在池塘和鱼体中的蓄积消解规律,采用全池泼洒呋喃西林的给药方式,采集环境(水样和底泥)和斑点叉尾鮰组织(皮肤和肌肉)样品,采样工作持续1年,并采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-ESI/MS/MS)法对样品中SEM含量进行了分析。结果表明:水体中SEM初始阶段具有较高的消除速率,随后消除速率趋于平缓,并维持较长时间,底泥中SEM浓度随时间呈非线性下降;实验前5d,鱼皮中SEM出现了短暂蓄积后随时间呈线性下降,肌肉中SEM消除规律与水体中相似;水体、肌肉和鱼皮的消除半衰期 $T_{1/2}$ 分别为1.7、2.09、2.42 d,水环境与斑点叉尾鮰组织中SEM浓度值存在显著相关性($P<0.01$);至实验结束时,水体中和鱼体内氨基脒最终降至低于检出限($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),底泥中氨基脒仍高于检出限;斑点叉尾鮰体内氨基脒含量与水环境密切相关,但鱼体中SEM并未出现明显富集。

关键词:养殖环境;斑点叉尾鮰;呋喃西林代谢物;氨基脒;消除;蓄积

中图分类号:X592 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)04-0681-08 doi:10.11654/jaes.2013.04.004

Elimination Rules of the Semicarbazide in Environment and Assessment of Semicarbazide in the Channel Catfish (*Ictalurus Punetaus*) Tissue

SUO Wen-wen^{1,2}, LIU Yong-tao², AI Xiao-hui^{2*}, YANG Qiu-hong², LÜ Si-yang^{1,2}, SHEN Dan-yi³

(1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Freshwater Fish Germplasm Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture, Wuhan 430223, China; 3.Spreading Center of Technology in Aquatic Science of Cixi City in Zhejiang Province, Cixi 315300, China)

Abstract: Accumulation and elimination of semicarbazide (SEM) in channel catfish (*Ictalurus Punetaus*) tissue and pond under practical farming laboratory conditions were studied. We took the method of splashing nitrofurazone in whole pond, and the same sizes of channel catfish (124.13 ± 25.2)g were exposed to freshwater containing semicarbazide for one year at natural conditions. The concentrations of SEM in environmental (water, mud) and tissue (muscle, skin) samples was determined by liquid chromatography tandem mass spectrometric (HPLC-ESI/MS/MS). The results showed that semicarbazide concentration in water and tissue decreased quickly in the beginning, then the elimination trends started to level off and maintained a certain concentration fraction in certain period, but the semicarbazide concentration in mud presents downtrend in the overall period without a linear progression. The SEM in skin was enriched in the first five days, then the content of SEM represents decreased linearly over time. The elimination half-life of SEM in water, muscle and skin were 1.7 d, 2.09 d and 2.42 d, respectively. Semicarbazide concentrations in channel catfish and water were below $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ at the end of the experiment except mud. The concentration in the channel catfish and the environment present significant correlation ($P<0.01$), but the SEM was not enriched obviously in the tissues of channel catfish.

Keywords: aquaculture environment; channel catfish (*Ictalurus Punetaus*); nitrofurazone residues; semicarbazide SEM; eliminate; accumulation

收稿日期:2012-09-26

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203085);中国水产科学研究院基本科研业务费专项课题(2012A1102)

作者简介:索纹纹(1988—),女,硕士研究生,研究方向为水产品质量安全与渔业标准化。E-mail:suowenwen@126.com

*通信作者:艾晓辉 E-mail:aixh@yfi.ac.cn

呋喃西林(Nitrofurazone, NFZ)是一种化学合成的硝基呋喃类广谱抗菌药,在生物体内的半衰期短,进入动物体内数小时即代谢为氨基脒(Semicarbazide, SEM)^[1]。大量研究表明,SEM能够与组织蛋白质紧密结合,长时间残留于体内,在酸性条件下可从蛋白质中释放而被机体吸收^[2],并具有致癌、致突变和生殖毒性^[3-5]。由于硝基呋喃类药物残留事件严重威胁消费者的身体健康,因此在欧盟^[6]、日本^[7]和我国^[8]呋喃西林原形药在食用畜禽及水产动物中均为禁用,我国也已制定相应法律法规来管制此类事件的发生,但目前未使用呋喃类药物而实际检测中呋喃西林代谢物含量超标的现象时有发生,其原因尚无定论。有人指出,在水产品未经过加工包装上市之前呋喃西林代谢物的检出可能是由于环境中用药残留引起的蓄积所致,但目前国内外均尚未对此可能性进行相关的研究。本研究以斑点叉尾鲟为受试对象,通过对养殖水体进行直接泼洒呋喃西林的方式,首次对环境中呋喃西林代谢物SEM在水体、底泥、鱼肉和鱼皮中的蓄积和消解规律进行初步研究,评估环境中使用呋喃西林对斑点叉尾鲟可食组织残留的风险,为确定斑点叉尾鲟中氨基脒残留的渊源提供参考,并为进一步规范药物使用管理以及加强水产品中硝基呋喃类药物的监控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:健康斑点叉尾鲟由湖北省仙桃市水产局提供,平均质量为 (124.13 ± 25.2) g。试验前在池塘的网箱(1 m×2 m×1.5 m)内暂养1周。试验期间每日上午8点和下午6点投喂斑点叉尾鲟饲料,并记录水温。

药品及试剂:呋喃西林代谢物(SEM)标准品(纯度>93.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH);SEM-¹³C-¹⁵N₂标准品(纯度>99%, 德国 Wegita);呋喃西林原粉(纯度>90.1%, 济南金达药化有限公司);甲醇(色谱纯, 美国 J.T. Baker);LC-MS water(美国 CNW);乙酸铵(分析纯, 美国 J.T. Baker);二硝基苯甲醛(分析纯, 北京恒业中远化工有限公司)。

仪器:高效液相色谱-串联质谱(Surveyor ms pump plus, surveyor autosampler plus, Thermo tsq quantum access max)及 Thermo LCquan 2.6 数据采集处理软件;自动高速冷冻离心机(日本 Hitachi 20PR-520 型);Mettler-toledo AE-240 型精密电子天平(梅特勒-托利多公司);FS-1 高速匀浆机(华普达教学仪器有限

公司);调速混匀器(上海康华生化仪器制造厂);氮吹仪(Aosheng, 杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计与采样

实验设计:试验池为长 35.8 m, 宽 20 m, 平均水深 0.9 m, 水体积为 644.0 m³ 的土池。两个同样大小网箱(1 m×2 m×1.5 m)与养鱼池垂直放置, 平行排列于池中, 离池长边的距离均为 4 m, 距池宽边的距离为 17 m(图 1)。称取 644 g 呋喃西林原粉, 于 10 L 水中进行一定的溶解后, 将呋喃西林溶液进行全池泼洒, 使池中呋喃西林溶液理论浓度为 1 mg·L⁻¹。试验期间(2011 年 07 月 11 日至 2012 年 06 月 05 日)每日上午 8 点和下午 6 点投喂斑点叉尾鲟饲料, 并记录水温。于给药后 1、3、5、10、15、30、45、60、90 d……采集肌肉、皮肤, 同时分别随机采集池边及池中水样(水面下约 20 cm 处)及底泥(约 5 cm 深度)样品, 置-20℃冰箱避光保存, 待测定。

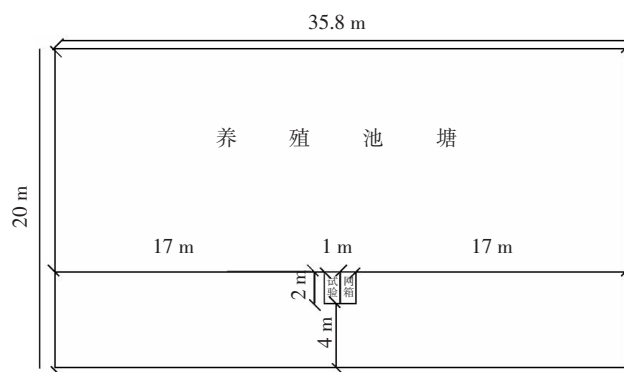


图1 试验网箱在养殖池塘中的位置

Figure 1 The position of net cages in pond

样品采集:每一时间点各取 5 尾鱼和 5 份环境样品, 作为 5 个平行样品分别处理测定。

1.2.2 样品检测

按照中华人民共和国农业部 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》进行测定, 略有改动。

水解和衍生化:将冷冻保存的肌肉、皮肤、水样和底泥样品室温下自然解冻, 肌肉称取 2.0 g(精确到 0.01 g)、皮肤根据样品量称取并记录称取量和底泥称取 10.0 g(精确到 0.01 g)均装于 50 mL 离心管中, 水样取 50 mL 于 120 mL 塑料管中, 分别加入 0.05 mL 100 ng·mL⁻¹ 内标工作液(SEM-¹³C-¹⁵N₂)涡旋 50 s, 再加入 100 μL 浓盐酸和 0.15 mL 0.05 mol·L⁻¹ 2-硝基苯

甲醛溶液,涡旋 50 s 后,37 ℃避光振荡 16 h。

提取净化:取塑料管和离心管冷却至室温,各加入 1.0 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液,调节 pH 至 7.0~7.5,水样、底泥、肌肉和皮肤各加入 30、20、10、10 mL 乙酸乙酯剧烈振荡混匀 5 min,静置 30 min,取上层清液于鸡心瓶中;再重复上述操作,合并上清于鸡心瓶中,于 40 ℃旋转蒸发至近干;肌肉和鱼皮样品采用 1 mL 初始流动复溶,过 0.2 μm 滤膜,待测;水样和底泥样品采用 2 mL 乙酸乙酯反萃,重复 3 次,萃取液于 10 mL 离心管中,于 40 ℃氮吹至近干,1 mL 初始流动复溶,过 0.2 μm 滤膜,待测。

(1) 色谱条件

Hypersil Gold C18(100 mm×2.1 mm×3 μm)反相色谱柱;柱温 30 ℃;流速 0.2 mL·min⁻¹;进样量 20.0 μL。梯度洗脱条件(表 1):A 相为甲醇,B 相为 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 The mobile phase gradient elution program

时间/min	A/%	B/%	流速/mL·min ⁻¹
0	20	80	0.2
3.00	40	60	0.2
8.00	40	60	0.2
8.01	20	80	0.2
11.00	20	80	0.2

(2) 质谱分析条件

加热大气压电喷雾离子源(HESI),正离子模式;采用选择反应监测(SRM)模式;喷雾电压 3000 V;源内解离电压 0 V;鞘气压力 40 arb;辅助气压力 20 arb;碰撞气(氦气)压力,1.5 m Torr;离子传输毛细管温度 350 ℃;Q1 PW 0.7,Q3 PW 0.7。母离子、定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 呋喃西林代谢物及其同位素内标质谱条件

Table 2 Spectrometric parameters of SEM and SEM-¹³C-¹⁵N₂

分析物 Analyst	母离子 Parention	子离子 Pruduction	碰撞能量 Collision energy/V
SEM	209	166*	7
		192	11
SEM- ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212	168	9

注:离子对为定量离子对。

(3) 标准曲线的制备及回收率与精密度测定

标准曲线的制备:配制含 SEM 浓度为 1、2、5、10、20、50 ng·mL⁻¹,含 5 ng·mL⁻¹ 内标的低浓度标准溶液系列及含 SEM 浓度为 50、100、200、500、1000 ng·

mL⁻¹,含 5 ng·mL⁻¹ 内标的高浓度标准溶液系列,作 HPLC/MS/MS 分析,以测得的 SEM 与 SEM-¹³C-¹⁵N₂ 面积的比值 X 为横坐标,SEM 浓度 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,求出回归方程和相关系数。用空白组织、空白水样和空白底泥制成低质量浓度药物的含药组织、含药水样和含药底泥,经预处理后测定,将引起 3 倍基线噪音的药物质量浓度定义为仪器最低检测限。

回收率与精密度测定:回收率= $C_r/C_0 \times 100\%$ (其中 C_r 为空白水体、空白底泥、空白肌肉和空白皮肤中各加入一定量的 SEM 已知标准溶液,再按样品预处理方法进样后,测定 SEM 的质量浓度; C_0 为加入一定量的 SEM 已知标准溶液)。在空白肌肉、空白皮肤、空白水样和空白底泥中分别添加 5 个浓度水平的标准溶液,使组织和底泥中质量浓度分别为 1.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μg·kg⁻¹,水中为 1.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μg·L⁻¹。每个浓度的样品,日内做 5 个重复,1 周内重复做 5 次,计算日内及日间精密度。

(4) 样品中 SEM 含量计算

经过前处理所得样品按照上述仪器方法检测,将得到的样品中 SEM 所对应的峰面积值代入标准曲线,即得到 SEM 的浓度值。样品中呋喃西林代谢物残留量按式(1)计算(计算结果需扣除空白值)。

$$X = \frac{C_i \times V}{m} \quad (1)$$

式中: X 为样品中呋喃西林代谢物的含量,μg·kg⁻¹ 或 ng·mL⁻¹; C_i 为样品制备液中 SEM 的浓度,ng·mL⁻¹; V 为最终定容体积,mL; m 为样品质量,g。

1.2.3 数据处理

标准曲线、药物经时曲线图、消除方程及休药期计算和回归图,采用 Microsoft Excel 2007 进行计算和绘制。消除方程采用 $C=C_0 e^{-kt}$,其中 C 表示药物浓度, C_0 为残留消除对数曲线的截距(μg·kg⁻¹ 或 ng·mL⁻¹), k 表示消除速率常数。

2 结果

2.1 标准曲线方程与相关系数

在 1~50.0 ng·mL⁻¹ 和 50.0~1 000.0 ng·mL⁻¹ 范围内 SEM 线性关系良好,低浓度线性方程为 $Y=0.023\ 405\ 4+0.130\ 627x$,高浓度线性方程为 $Y=0.080\ 163\ 1+1.325\ 241\ 7x$,其相关性指数 r^2 均大于 0.998 8。

2.2 方法检测限、回收率与精密度

本试验条件下水样 SEM 方法检测限为 0.02 ng·mL⁻¹,肌肉、皮肤组织和底泥中 SEM 方法检测限均为

0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。肌肉、鱼皮、水样和底泥中 5 个质量浓度中加标水平的 SEM 平均回收率为 96.32%~108.65%，测得的日内精密密度与日间精密密度均小于 10%。

2.3 SEM 在斑点叉尾鲴肌肉和鱼皮以及环境中的消除规律

将测得的 SEM 的峰面积分别与其氘代同位素内标峰面积的比值,代入标准曲线方程,可以求出 SEM 在斑点叉尾鲴肌肉、鱼皮以及养殖环境中的浓度值(表 3)。如图 2、图 3 和图 4 所示:肌肉、水体中 SEM,在实验前 30 d 呈现快速下降的趋势,后进入缓慢下降阶段,肌肉中 270 d 未检出,水体中 270 d 后低于检测限;鱼皮中在第 3 d 和第 5 d 呈现短期的蓄积现象,随后快速下降,30 d 后进入缓慢下降阶段,第 300 d 仍高于检测限;底泥中 SEM 整体呈逐渐降低的趋势,但并不呈一定的线性关系,至第 330 d,底泥中 SEM 的含量仍然高于检测限。

2.4 肌肉、皮肤和水体中 SEM 消除参数比较

数据经回归处理得到组织及水体中药物浓度(C)与时间(t)关系的消除曲线方程、相关性指数(r^2)及消除半衰期($T_{1/2}$)(表 4)。SEM 在肌肉、皮肤和水样中的消除半衰期 $T_{1/2}(\text{d})$ 为皮肤>肌肉>边缘水体=中间水体。

2.5 斑点叉尾鲴组织与环境 SEM 含量的相关性分析

数据经 SPSS16.0 进行相关性分析,所得相关系数见表 5。

3 讨论

3.1 受试动物及实验环境的选择

氨基脲(SEM)一直被认为是呋喃西林的特征代谢物,并作为监测水产品非法使用呋喃西林的标志,研究表明,对于鲜活水产品而言,除了甲壳类动物甲壳和与甲壳相连的上皮层中自然产生的氨基脲^[9]外,其他水产动物尚未有自身能产生氨基脲的报道。本实验以斑点叉尾鲴为受试对象,排除了受试动物自身产生氨基脲的干扰情况;对实验环境(水体和底泥)以及所用斑点叉尾鲴进行了本底筛查,结果均不含 SEM,确保了实验的可行性。同时,选择偏离市区而毗邻武汉梁子湖的江夏养殖基地,完全在实际养殖条件下进行实验,使得实验结果更加符合实际。

3.2 SEM 在环境及斑点叉尾鲴组织中残留消除结果分析

第 1 d 的数据显示肌肉、鱼皮、底泥和水体中均出现了较高含量的 SEM,同时环境中明显高于鱼体。第 1 d 水体和底泥中具有较高含量 SEM,可能是由于

表 3 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呋喃西林泼洒于池塘后 SEM 在养殖环境和斑点叉尾鲴组织中的浓度($n=5$)

Table 3 The concentrations of SEM in aquaculture environment and channel catfish (*Ictalurus Punetaus*) tissue after 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrofurazone splashed into the pond($n=5$)

时间 Time/d	呋喃西林代谢物 SEM($\bar{x}\pm\text{SD}$)					
	肌肉 Muscle/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	皮肤 Skin/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	中间水样 Intermediate water/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	边缘水样 Edge water/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	中间底泥 Intermediate mud/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	边缘底泥 Edge mud/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
1	28.95±1.54	75.26±10.03	133.53±18.85	165.48±34.76	92.85±5.62	101.77±17.98
3	27.68±1.12	86.20±0.02	77.63±7.52	91.15±12.05	37.70±3.79	144.15±6.34
5	23.06±1.08	84.87±17.72	50.15±13.23	56.66±6.25	25.08±1.73	37.47±0.86
10	19.88±0.45	57.11±4.87	33.10±0.42	30.94±2.35	21.52±0.31	60.21±5.22
15	10.53±0.97	38.16±12.42	26.83±3.31	26.83±1.77	70.09±5.33	98.24±8.45
30	5.27±0.70	20.97±5.64	16.29±0.24	15.15±0.07	78.16±9.48	83.64±3.40
45	4.65±0.88	15.52±6.13	14.71±0.19	12.5±0.74	81.63±5.41	67.75±8.54
60	2.84±0.87	13.42±4.85	9.66±0.57	6.90±0.18	74.50±4.33	64.03±1.64
90	2.01±0.58	11.31±6.15	7.89±0.33	5.90±0.23	8.31±0.61	47.52±0.01
120	1.67±0.26	8.86±3.61	5.23±0.17	5.30±0.20	14.91±1.55	8.48±1.12
180	1.26±0.52	8.28±5.44	4.46±0.12	5.06±0.12	19.54±2.09	66.02±6.58
210	0.99±0.20	6.68±0.29	2.21±0.07	2.50±0.07	18.89±1.17	34.71±0.23
240	0.93±0.23	6.30±0.57	0.94±0.03	1.13±0.03	5.66±0.47	22.88±2.23
270	ND	2.66±0.22	0.56±0.14	0.75±0.02	4.78±0.30	13.22±1.08
300	ND	0.86±0.24	0.26±0.03	0.30±0.02	8.29±0.21	9.83±0.39
330	ND	ND	0.24±0.03	0.21±0.02	1.20±0.11	4.74±0.56

注:DN-未检出。Notes:ND-no detection.

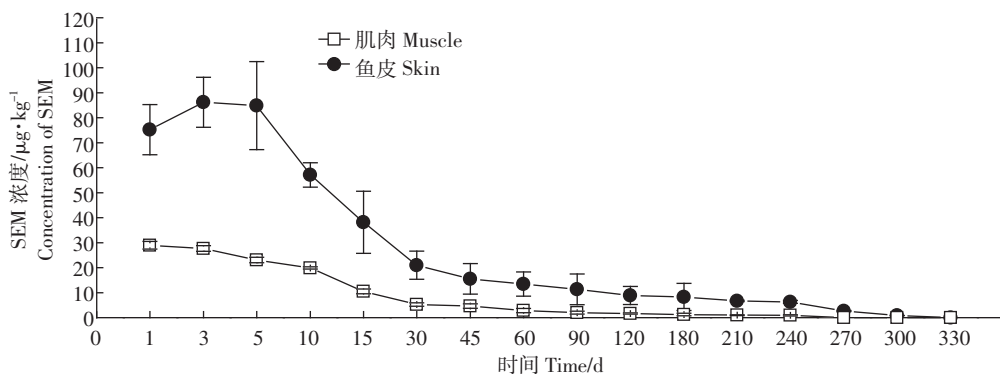


图2 斑点叉尾鮰组织中 SEM 药时曲线图

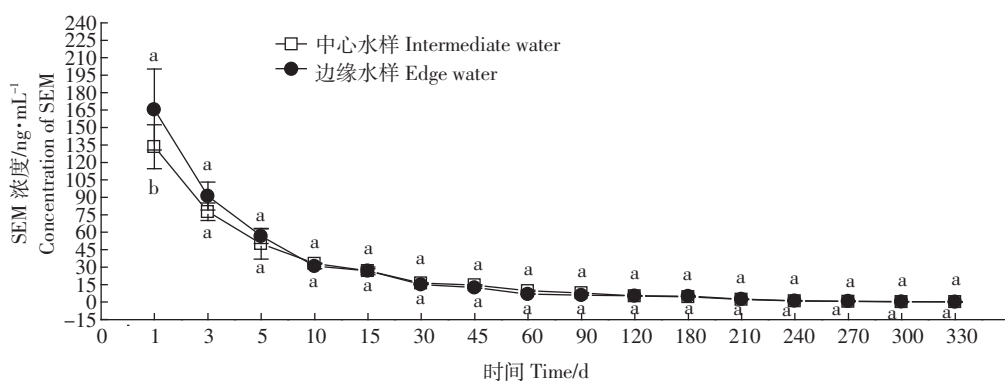
Figure 2 The curve of SEM concentrations–time in channel catfish (*Ictalurus Punetaus*) tissue不同小写字母代表不同时间点所对应试验组差异显著 ($P < 0.05$)。下同Different small letter shows significant difference ($P < 0.05$) between groups. The same below

图3 养殖水体中 SEM 药时曲线图

Figure 3 The curve of SEM concentrations–time in aquaculture water

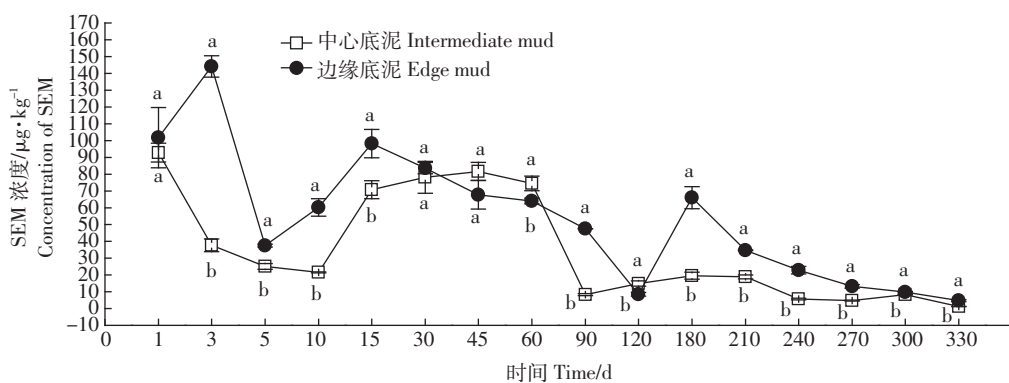


图4 底泥中 SEM 药时曲线图

Figure 4 The curve of SEM concentrations–time in mud

环境中部分原药受到温度、光照和微生物等作用,被代谢为 SEM。对此虽然目前尚未有实验证明,但是李东燕等^[11]通过实验证明随着光照时间的延长、反应温度的升高,呋喃西林分解速度加快,而鱼体中具有较高含量的 SEM, 本文推断 SEM 可能来自鱼体自身通过体表、口腔摄入呋喃西林后被机体代谢转化为代谢

物 SEM,以及直接从环境中摄入 SEM。研究已表明,呋喃西林可以在水产品生物中富集,并在数小时之内被分解成代谢物 SEM^[10],而 SEM 与细胞膜蛋白稳定结合不易消除^[2],在鱼池面积相对于所放鱼数量较大的情况下,环境中第一天的 SEM 含量显著高于肌肉和鱼皮中的含量。由此推测,呋喃西林泼洒到池塘后,

表 4 SEM 在斑点叉尾鮰组织及环境中消除曲线方程及相关指数

Table 4 The equation of elimination curve and correlation index in channel catfish(*Ictalurus Punetaus*) tissue and aquaculture environment

采样位置 Sampling location	方程 Equation	相关指数 r^2 correlation index	消除半衰期 $T_{1/2}$ /d
肌肉 Muscle	$C=50.193e^{-0.331t}$	0.972 7	2.09
皮肤 Skin	$C=148.66e^{-0.287t}$	0.933 1	2.42
中间水体 Intermediate water	$C=213.55e^{-0.408t}$	0.974 6	1.70
边缘水体 Edge water	$C=214.79e^{-0.407t}$	0.974 6	1.70

表 5 斑点叉尾鮰组织与环境中 SEM 含量的相关性分析

Table 5 The correlation coefficient of SEM in channel catfish(*Ictalurus Punetaus*) and aquaculture environment

	肌肉 Muscle	鱼皮 Skin	中心水样 Intermediate water	边缘水样 Edge water	中心底泥 Intermediate mud	边缘底泥 Edge mud	时间 Time
肌肉 Muscle	1						
鱼皮 Skin	0.985**	1					
中心水样 Intermediate water	0.913**	0.854**	1				
边缘水样 Edge water	0.890**	0.826**	0.668**	1			
中心底泥 Intermediate mud	0.392	0.359	0.520*	0.497	1		
边缘底泥 Edge mud	0.674**	0.660**	0.668**	0.639**	0.686**	1	
时间 Time	-0.718**	-0.744**	-0.619*	-0.571*	-0.569*	-0.631*	1

注: * 表示相关性显著($P<0.05$); ** 表示相关性极显著($P<0.01$)。

Note: * donates significant correlation($P<0.05$); ** donates extremely significant correlation($P<0.01$).

SEM 主要来源于环境中呋喃西林的降解。

本实验理论泼洒浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而检测到的肌肉、鱼皮、底泥和水样中 SEM 最高浓度分别为 28.95、75.26、144.15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 165.48 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最高浓度仅为理论泼洒浓度的 2.90%、7.53%、14.42%和 16.55%, 可见本实验条件下该原药在肌肉、鱼皮和养殖环境中代谢为 SEM 的转化率区别较大, 肌肉、鱼皮中浓度明显低于环境可能与鱼体本身对药物吸收率有关。但是本实验得到的肌肉中 SEM 转化率与其他研究结果有较大区别: 黄玉英等^[12]通过单次口灌 $98\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的呋喃唑酮, 鲤鱼肌肉中检测 AOZ 最高转化率仅约 0.25%; 徐维海等^[13]给罗非鱼投喂 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的呋喃唑酮, 随后检测肌肉中 AOZ 最高转化率约为呋喃唑酮最高含量的 1/13; 谭志军等^[7]通过 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 呋喃西林浸泡大菱鲈后检测到肌肉中 SEM 最高转化率为 0.56%, 同时又远高于与呋喃唑酮共同给药下的 SEM 转化率。因此, 不同的给药方式下, 组织中 SEM 累积能力并不相同, 同时说明直接对鱼池进行泼洒的方式可能更容易导致鱼体内 SEM 的累积。

本实验前期, 斑点叉尾鮰肌肉中呋喃西林代谢物 SEM 浓度消除规律与谭志军等^[7]对大菱鲈肌肉中 SEM 消除规律相似, 都表现出前期急剧下降, 30 d 后进入缓慢消除阶段并持续较长时间, 至 180 d 仍高于

检测限。由于本实验前期(前 30 d)正处于 9 月至 10 月, 水温相对较高, 鱼体摄食与自身代谢速率较快, 可能是导致前期 SEM 快速下降的重要原因, 进入 11 月后, 水温逐渐降低, SEM 浓度即呈现缓慢下降的趋势。斑点叉尾鮰皮肤中呋喃西林代谢物 SEM 呈现的规律与肌肉有所不同, 起始浓度显著高于肌肉, 第 3 d 浓度累积至最高峰值为 $(86.20\pm10.02)\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 随后与肌肉呈现相同规律。这可能是由于药浴开始阶段, 吸附在斑点叉尾鮰体表(皮)的呋喃西林原药被迅速代谢为 SEM, 而经口进入体内的药物通过鱼体自身代谢后部分不断积累到鱼皮上, 同时水体中的 SEM 也源源不断富集所致。但从 SEM 整个消除过程来看, 养殖环境中直接泼洒呋喃西林, 与一般药物通过饲料投喂后或者通过浸泡后放养水产品, 组织中 SEM 呈现相似的消除规律: 在实验前阶段浓度急剧下降, 然后消除速率逐渐平缓并持续较长时间。另外本实验条件下, 肌肉及鱼皮中 SEM 半衰期($T_{1/2}$)显著小于其在大菱鲈中^[7]的半衰期, 可能与给药方法、给药剂量、给药环境和鱼类品种的差异有关。已有研究表明^[14], 在太湖开放性水域条件下中华绒螯蟹体内的 SEM 的衰减速率要快于室内条件。这些实验结果都说明温度、光强、开放性水域的水交换和底泥吸附以及生物降解和腐植酸作用都可能是影响 SEM 消除的因素。

为避免采样期间风向变化造成采样不均匀等问题,本实验将每个时间点的采样点设置为:水池周边随机采取5次水样和底泥,水池中间采集5次水样和底泥,尽可能的确保采样的均匀性,使所得的实验结果更具有科学性。每个时间点,中间水体和边缘水体中SEM浓度的差异性结果由图3所示。边缘水体中呋喃西林代谢物SEM的起始浓度为 $(165.48 \pm 18.85) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,显著高于($P < 0.01$)中间水样 $(133.53 \pm 34.76) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,第3d至采样结束,中间水样与边缘水样中SEM浓度值无差异性($P > 0.05$),这可能是由于在药物泼洒后,未溶解的原药受到风向作用向池边累积后快速代谢,从而导致首次结果显示出显著差异。实验至第3d,水中SEM经过水体自身的对流以及药物自身的扩散作用,逐步分布均匀。对每个时间点,中间底泥和边缘底泥中SEM浓度的差异性如图4所示,底泥中呋喃西林代谢物SEM的浓度整体呈现逐渐降低的趋势,但是各时间点之间并没有呈现一定的线性关系,可能是由于底泥采样不可重复性,以及底泥生物群落差异及腐植酸等因素的不均,导致吸附药物具有较大差异,其具体原因还有待研究。分析边缘与中间底泥中SEM浓度值的差异性,结果显示第1、3d和第45d差异不显著($P > 0.05$),剩余多个时间点边缘底泥中SEM浓度显著高于($P < 0.05$)中间底泥,可能是由于施药初期呋喃西林原药不均匀沉降,底泥吸附后不可移动性所致,与水体中前期结果(边缘水体高于中间水体)保持一致。到采样结束时,斑点叉尾鲶组织及养殖水体中SEM都已经完全消除,但底泥中SEM的浓度仍然高于检测限,可见SEM在底泥中的消除更加缓慢。

3.3 对斑点叉尾鲶组织SEM残留风险评估

由表3可以看出,呋喃西林代谢物SEM在斑点叉尾鲶组织及环境中的起始浓度水平为边缘水样>中心水样>边缘底泥>中间底泥>皮肤>肌肉,虽然前期鱼皮中SEM出现了短暂的蓄积现象,但在5d后便与肌肉中SEM同步快速降低,最终皮肤于330d完全消除,肌肉于270d完全消除,而水样和底泥至实验第330d仍未完全消除。SEM在肌肉、鱼皮和水环境中的消除半衰期之间无明显差别。肌肉、鱼皮与水体和边缘底泥中SEM值呈显著正相关,与时间呈显著性负相关,与SEM溶于水^[15],同时易与蛋白质稳定结合,只有在酸性条件下才被释放出来^[2]等特性保持一致。徐英江等^[16]通过实验说明文蛤能吸收水体中的氨基脒,说明环境中SEM与鱼体肌肉和鱼皮中SEM

含量密切相关。但环境中的药物并没有导致鱼肉和鱼皮中SEM的明显蓄积。

4 结论

本实验首次报道了环境中呋喃西林代谢物SEM在池塘和斑点叉尾鲶中的消除规律,通过1年的研究发现,在养殖水体直接泼洒呋喃西林药物后的初期,环境中SEM浓度较高,更容易导致鱼体内SEM累积,环境和鱼体中SEM的消除均需要较长时间,但肌肉和鱼皮中SEM并未出现明显蓄积的现象。

参考文献:

- [1] Cooper K M, Mulder P P, et al. Depletion of four nitrofurantoin antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UC[J]. *Food Addit Contam*, 2005, 22(5): 406.
- [2] 何方洋, 沈建忠, 万宇平, 等. 呋喃西林及其代谢物残留检测研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(4): 51-54.
HE Fang-yang, SHEN Jian-zhong, WAN Yu-ping, et al. Research progress on determination of nitrofurazone and its metabolite residue[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009, 43(4): 51-54.
- [3] Kelly B D, Heneghan M A, Bennani F, et al. Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity mediated by CD8+ T cells[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 1998, 93(5): 819-821.
- [4] Bock C, Gowik P, Stachel C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 856(1/2): 178-189.
- [5] Barbosa J, Moura S, Barbosa R, et al. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586: 359-365.
- [6] Council Regulation (EEC) 2377/90, Off. J. Eur. Commun. No. L224 (1990)1.
- [7] 谭志军, 翟毓秀, 冷凯良, 等. 呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(增刊): 63-69.
TAN Zhi-jun, ZHAI Yu-xiu, LENG Kai-liang, et al. The depuration rules of the metabolites of furazolidone and nitrofurazone in Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Sun Yatsen University (Social Science Edition)*, 2008, 47(Suppl): 63-69.
- [8] 食品动物禁用的兽药及其他化合物清单, 中华人民共和国农业部文件农牧发(2002)1号.
The list of animal medicine and other compound forbidden using in food animals, Announcement No.(2002)1 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, published by Animal Husbandry Bureau.
- [9] McCracken R, Hanna B, Ennis D, et al. The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp[J]. *Food Chemistry*, 2011, 11: 088.

- [10] Xu W H, Zhu J B, Wang X T, et al. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 254: 1-8.
- [11] 李东燕, 徐睿来, 李光汉, 等. 台阶恒温加速法对复方呋喃西林滴鼻液的稳定性观察[J]. 江西医学院学报, 2003, 43(6): 123-124.
- LI Dong-yan, XU Rui-lai, LI Guang-han, et al. The stability observation of compound nitrofurazone nasal drops by the method of step constant temperature accelerated [J]. *Acta Academiae Medicinae Jiangxi*, 2003, 43(6): 123-124.
- [12] 黄玉英, 彭爱红, 黄志勇, 等. 呋喃唑酮及代谢产物 3-氨基-2-恶唑烷酮在鲤鱼体内的残留规律[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2009, 38(2): 181-185.
- HUANG Yu-ying, PENG Ai-hong, HUANG Zhi-yong, et al. Pharmacokinetics of furazolidone and its metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2009, 38(2): 181-185.
- [13] 徐维海, 林黎明, 朱校斌, 等. HPLC/MS 法对呋喃唑酮及代谢物 AOX 在罗非鱼体内残留研究[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 35-39.
- XU Wei-hai, LIN Li-ming, ZHU Xiao-bin, et al. The research of residues of furazolidone and its metabolite in tilapias by HPLC/MS [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, 14(1): 35-39.
- [14] 樊新华, 郑浩, 钱伟, 等. 呋喃西林代谢物氨基脒在中华绒螯蟹体内的衰减研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 238-370.
- FAN Xin-hua, ZHEN Hao, Qian wei, et al. The reduction rules of the metabolites of nitrofurazone in *Eriocheir sinensis* [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2010(6): 238-370.
- [15] 吴晓君, 施高茂. 硝基呋喃西林代谢物—氨基脒的应对设想[J]. 海洋与渔业, 2007(4): 25-26.
- WU Xiao-jun, SHI Gao-mao. The conceive of replying the metabolites of nitrofurazone—semicarbazide [J]. *Ocean and Fishery*, 2007(4): 25-26.
- [16] 徐英江, 田秀慧, 张秀珍, 等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 体内氨基脒含量与环境相关性研究[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 587-591.
- XU Ying-jiang, TIAN Xiu-hui, ZHANG Xiu-zhen, et al. Study on the correlation between semicarbazide in Clam *Meretrix meretrix* and environment pollution [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 587-591.