

液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基脲的含量

于慧娟^{*1} 李冰² 蔡友琼¹ 叶芳挺³ 台建明⁴
惠芸华¹ 徐捷¹ 冯兵¹

¹(农业部水产品监督检验测试中心(上海),上海 200090) ²(上海海洋大学,上海 201306)

³(赛默飞世尔科技(中国)有限公司 色谱与质谱科学仪器部,上海 201206)

⁴(安徽省水产技术推广总站,合肥 203061)

摘要 利用液相色谱-串联质谱技术测定了甲壳类水产品中氨基脲的含量。样品用 HCl 水解、2-硝基苯甲醛衍生、乙酸乙酯萃取、液相色谱分离、串联质谱检测、内标法定量。方法检出限为 0.25 μg/kg ($S/N > 3$);定量限为 0.5 μg/kg ($S/N > 10$)。甲壳类水产品的品种涉及青虾、斑节对虾、罗氏沼虾、南美白对虾、小龙虾、青蟹、珍宝蟹、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹和鲎等。虾类样品中氨基脲的含量在未检出 ~370.4 μg/kg 之间,蟹类样品中氨基脲的含量在未检出 ~87.5 μg/kg 之间。氨基脲在甲壳中含量最高,在肌肉中含量最低。结果表明:氨基脲作为内源性物质普遍存在于甲壳类水产品中。

关键词 氨基脲;内源性物质;甲壳类水产品;分布特征

1 引言

氨基脲是一种联胺类小分子化合物,被认为是禁用药物呋喃西林的代谢产物。动物源性食品中氨基脲的残留通常是由于在动物养殖过程中使用了呋喃西林后代谢产生的^[1]。目前,很多国家都以检测呋喃西林代谢产物——氨基脲判断是否在养殖过程中非法使用了呋喃西林,以达到对呋喃西林原药监控的目的。欧盟、日本及中国^[2]先后规定呋喃西林及代谢物在动物源性食品中不得检出。然而,从近年来我国青虾监督抽查和虾蟹苗种抽检过程中发现,氨基脲超标现象比较严重,尤其是青虾产品,阳性率高达 50% 以上,使水产品的质量备受质疑,给养殖企业带来经济损失。在一些非动物源性食品(如婴儿食品、果汁、果酱、冰淇淋、布丁、酸奶及玻璃瓶包装的食品)和甲壳类水产品(虾和蟹)中均已检出氨基脲^[3-9]。非动物源性食品中的氨基脲主要来源于发泡剂偶氮酰胺和食品添加剂卡拉胶的使用,而鲜活甲壳类水产品中的氨基脲则作为内源性物质存在于甲壳类水产动物体中^[3,4]。呋喃西林并非是氨基脲的唯一来源。为了弄清我国青虾和虾、蟹苗种氨基脲超标的原因,本实验通过对来自不同地点的虾、蟹等甲壳类生物体中氨基脲的研究,证实了甲壳类生物体中会有氨基脲自然存在的现象;此结果从根本上解释了我 国部分甲壳类水产品中氨基脲超标的原因,为重新评价水产品中氨基脲的残留提供了技术支撑。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Thermo TSQ Quantum Access 液相色谱-串联质谱仪(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);TD5A-WS 离心机(上海湘仪离心机厂);Organomation 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

氨基脲盐酸盐和氨基脲同位素标准品(纯度 ≥ 99%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);甲醇、乙酸乙酯(色谱纯, Sigma 公司);正己烷、HCl、NaOH(分析纯,上海国药集团);2-硝基苯甲醛(纯度 ≥ 98%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。实验用水由 Milli-Q 纯水仪制备。

2.2 标准溶液配制

2.2.1 氨基脲标准储备液和标准中间液 准确称取 14.9 mg 氨基脲盐酸盐标准品,用甲醇溶解并稀释

2012-02-22 收稿;2012-05-25 接受

本文系农业部财政专项(No. 2130109)资助

* E-mail: yuhuijuan607@sohu.com

至 10 mL 棕色容量瓶中, 即得 1.0 g/L 标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 6 个月。取适量储备液, 用水逐级稀释, 配制成 100 和 500 $\mu\text{g/L}$ 的标准中间液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 7 d。

2.2.2 氨基脒同位素内标储备液和内标工作液 准确称取 10.0 mg 氨基脒同位素标准品, 用甲醇溶解并稀释至 10 mL 棕色容量瓶中, 即得 1.0 g/L 的内标标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 6 个月。取适量内标储备液, 用水逐级稀释, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 内标工作液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 7 d。

2.3 样品来源

青虾取自千岛湖、洞庭湖和南京养殖基地; 斑节对虾、罗氏沼虾、南美白对虾、小龙虾、青蟹、珍宝蟹及中华绒螯蟹取自上海市农贸市场; 三疣梭子蟹取自上海市军工路码头; 鬻取自浙江舟山农贸市场。所有样品保存在低温条件下运回实验室, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。分析前将样品解冻至室温, 按实验要求分别进行处理和均质混匀(蟹壳在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干后粉碎), 然后测定氨基脒的含量。

2.4 样品前处理方法

2.4.1 水解与衍生 称取样品 2.0 g(精确到 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 0.05 mL 内标工作液, 涡旋混合 50 s, 放置 20 min 使内标物完全渗透到样品中; 加入 5 mL 0.2 mol/L HCl 溶液(虾壳: 加 7 mL, 蟹壳: 加 5 mL 1.2 mol/L HCl) 和 0.15 mL 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液, 涡旋 50 s 后, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器中避光振荡 16 h。

2.4.2 萃取 取出离心管冷却至室温, 加 5 mL 1.0 mol/L K_2HPO_4 溶液混匀后, 用 5% NaOH 溶液调至 pH 7.0~7.5; 加入 8 mL 乙酸乙酯, 涡旋 60 s, 以 4000 r/min 离心 5 min, 取上层清液至 10 mL 玻璃离心管中于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干。准确加入 1.0 mL 5% 甲醇溶液, 涡旋混合 1 min; 以 6000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-质谱测定。

2.4.3 标准工作液 准确移取 100 $\mu\text{g/L}$ 氨基脒标准中间液 0.010, 0.020, 0.050 和 0.20 mL, 500 $\mu\text{g/L}$ 氨基脒标准中间液 0.20 和 1.0 mL 于 6 个 50 mL 离心管中, 除不加样品外, 按 2.4.1 和 2.4.2 节进行操作; 标准工作液的浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 20.0, 100.0 和 500.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 色谱-质谱分析条件

CAPCELL MGII C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 5 μm); 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 流动相: A 为 2 mmol/L 醋酸铵溶液 + 0.1% 甲酸, B 为甲醇; 梯度洗脱条件为: 0~2 min 80% A; 2.1~9 min 10% A; 9.1~12 min 80% A。

离子源: 电喷雾离子源, 正离子扫描, 选择反应监测(SRM); 喷雾电压: 4.1 kV; 鞘气: 11.7 L/min; 辅助气: 3 L/min; 离子传输毛细管温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 源内碰撞诱导解离电压: 10 V; 氨基脒及同位素内标物的母离子、子离子及碰撞能量见表 1。氨基脒标准品的色谱图和质谱图见图 1。

表 1 氨基脒和同位素内标物的母离子、子离子及碰撞能量
Table 1 Parent/daughter ions and collision energy for semicarbazide (SEM) and internal standard

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
SEM	209.0	166. 0°	11 13
SEM- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$	212.0	192.0 168. 0°	11

* : 定量离子(Quantitative ion)。

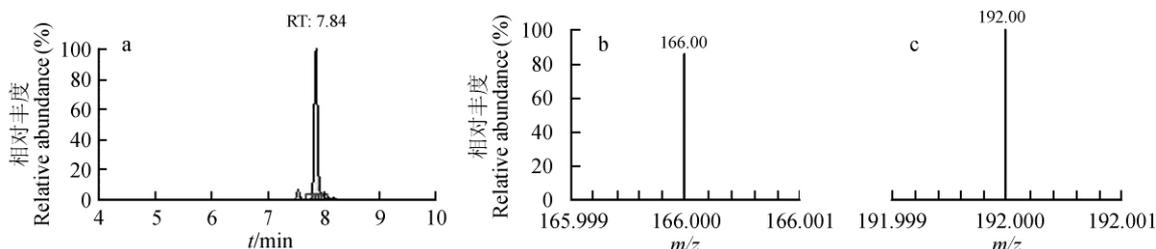


图 1 氨基脒标准溶液的总离子流图(a)和质谱图(b, c)

Fig. 1 Total ion-current chromatogram (a) and mass chromatogram (b, c) of semicarbazide

3 结果与讨论

3.1 酸度对虾壳和蟹壳中氨基脲测定的影响

氨基脲以游离态和结合态(与蛋白质结合)的形式存在于水生物体中。肌肉组织和虾的头部组织中氨基脲的测定采用农业部783号公告-1-2006的方法进行测定^[10]。该方法主要由酸水解、衍生、提取、浓缩和上机测定5步组成。其中,酸度将影响氨基脲从蛋白质上的解离和氨基脲的衍生。虾壳和蟹壳的组成与肌肉组织不同,主要由几丁质和CaCO₃构成,尤其是蟹壳, CaCO₃的含量很高。CaCO₃的存在消耗了HCl,使反应体系酸度下降,从而影响氨基脲从蛋白质上的解离和氨基脲的衍生效率,导致采用标准方法测定虾壳和蟹壳中的氨基脲时结果偏低。本实验对样品前处理过程酸的用量作了调整,通过加大加酸量的方法抵消CaCO₃消耗的酸,使反应体系维持在一定的酸度。经优化和对比实验,确定测定甲壳中氨基脲的最佳加酸量分别为:虾壳(2.0 g):加7 mL 0.2 mol/L HCl溶液;蟹壳(2.0 g):加5 mL 1.2 mol/L HCl溶液。在此酸性条件下可确保虾壳和蟹壳中与蛋白质结合的氨基脲完全解离和氨基脲的衍生反应顺利进行。

3.2 方法线性范围和检出限

按2.4.3节的方法配制标准工作液,经液相色谱-质谱测定后,以浓度为横坐标,氨基脲峰面积与内标物峰面积比值为纵坐标,绘制标准工作曲线。实验表明,氨基脲浓度在1.0~500 μg/L范围内与其峰面积比值呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 0.0285 + 0.1154x$, $r = 0.9992$ 。经实际加标确定方法检出限为0.25 μg/kg ($S/N \geq 3$),定量限为0.5 μg/kg ($S/N \geq 10$)。

3.3 方法回收率、精密度和特异性

以南美白对虾和中华绒螯蟹的蟹壳为研究对象,进行标准添加回收实验。氨基脲的添加水平为2.5和5.0 μg/kg,每个添加水平做5个平行样,通过回收率和精密度评价方法的准确度、重复性和适用性;日间精密度的测定采用2.5和5.0 μg/kg添加水平的样品连续测定5 d,测定结果见表2。

表2 不同组织中氨基脲加标回收率及精密度($n = 5$)

Table 2 Results of recovery test and precision from fortified samples($n = 5$)

样品 Sample	添加水平 Spiked level (μg/kg)	平均回收率 Recovery (%)	日内精密度 Intra-day RSD (%)	日间精密度 Inter-day RSD (%)
肌肉 Muscle	2.5	93.6	5.2	8.5
	5.0	97.8	4.8	
虾头部组织 Head	2.5	90.6	7.5	9.8
	5.0	96.3	5.6	
虾壳 Shrimpshell	2.5	95.6	5.5	9.0
	5.0	99.8	4.3	
蟹壳 Crabshell	2.5	96.5	4.3	10.5
	5.0	97.8	6.5	

由表2可知:4种组织中氨基脲的平均回收率在90.6%~99.8%之间,日内精密度小于7.5%,日间精密度小于10.5%。基质效应采用提取液加标的方法进行评估,取南美白对虾不同组织(肌肉、头部组织、虾壳)提取液和空白提取液,分别添加5 μg/kg的氨基脲,经分析、计算,不同组织中氨基脲测定结果同空白提取液中氨基脲测定结果的偏差均小于10%,说明样品的基质效应对方法的影响并不显著。此外,经空白样品谱图、加标样品谱图和标准溶液谱图对比分析可知,本方法选择性高,在目标物出峰处没有发现干扰峰。以上研究结果表明,本方法基质干扰小,准确度、精密度和重现性均可满足药物残留分析的要求。虾肌肉样品谱图和加标样品谱图见图2和图3。

3.4 甲壳类水产品中氨基脲的含量及分布特征

测定了典型甲壳类水产品(罗氏沼虾、南美白对虾、小龙虾、斑节对虾、青虾、中华绒螯蟹、三疣梭子蟹、青蟹及蜆)中氨基脲的含量,同时为了了解氨基脲在各种生物体中的分布特征,分别对每种水产品的肌肉组织、头部组织及甲壳进行了氨基脲的测定。除蜆为1个样品外,所有品种均取3个样品,测定结果见表3。

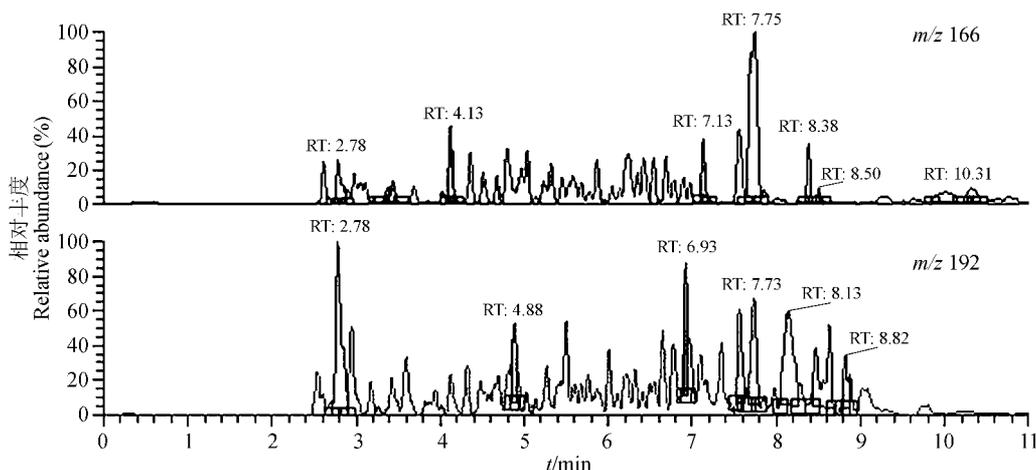


图 2 虾肌肉样品谱图

Fig. 2 Chromatogram of shrimp muscle

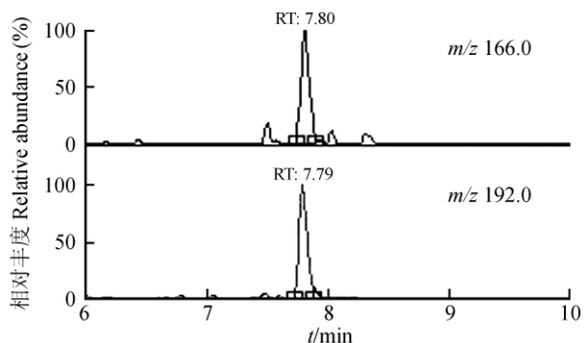


图 3 虾肉加标谱图

Fig. 3 Chromatogram of spiked with semicarbazide in shrimp blank muscle

表 3 甲壳类水产品中氨基脒的测定结果($X \pm SD$ $n = 3$)

Table 3 Detection results of semicarbazide in crustacean($X \pm SD$ $n = 3$)

样品 Sample	取样日期 Sampling data	取样地点 Lotation	测定值 Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
			肌肉组织 Muscle	头部组织 Head	甲壳 Shell
青虾 Oriental river prawn	2011. 10	千岛湖 Qiandao lake	11. 87 \pm 0. 35	81. 3 \pm 2. 4	219. 4 \pm 7. 9
	2011. 7	南洞庭湖 South Dongting Lake	5. 38 \pm 0. 25	58. 6 \pm 1. 4	68. 4 \pm 4. 8
	2011. 9	南京养殖场 Aquaculture farming Nanjing	4. 06 \pm 0. 20	71. 0 \pm 5. 0	315. 3 \pm 15. 4
罗氏沼虾 Giant freshwaterprawn	2011. 7	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	1. 23 \pm 0. 05	23. 8 \pm 2. 3	73. 2 \pm 9. 7
南美白对虾 White-leg shrimp	2011. 7	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	未检出 Note detected	0. 85 \pm 0. 06	4. 4 \pm 1. 5
小龙虾 Red swamp crayfish	2011. 9	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	0. 52 \pm 0. 03	2. 06 \pm 0. 09	3. 57 \pm 0. 09
斑节虾 Giant tiger prawn	2011. 7	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanhai	未检出 Note detected	0. 95 \pm 0. 07	1. 46 \pm 0. 41
中华绒螯蟹 Mitten crab	2011. 10	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	2. 05	—	10. 55 \pm 0. 53

续表 3(Continued Table 3)

样品 Sample	取样日期 Sampling data	取样地点 Lotation	测定值 Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
			肌肉组织 Muscle	头部组织 Head	甲壳 Shell
三疣梭子蟹 Swimming crab	2011.9	上海军工路码头 Jungong road wharf in Shanghai	未检出 Note detected	—	16.2 ± 1.4
锯缘青蟹 Mud crab	2011.8	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	未检出 Note detected	—	81.8 ± 7.0
珍宝蟹 Dungeness crab	2011.8	上海农贸市场 Free market of agricultural products in Shanghai	未检出 Note detected	—	46.3 ± 4.8
中国鲎 Horse shoe crab	2011.10	浙江舟山农贸市场 Zhoushan free market of agricultural products in Zhejiang	未检出 Note detected	—	1.36

由表 3 可见,在所检测的甲壳类水产品中,均存在氨基脲;甲壳中的氨基脲含量在 $1.36 \sim 315.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内;肌肉中氨基脲含量在未检出至 $11.87 \mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内。水产品品种不同,氨基脲的含量也不同。在虾类样品中,青虾和罗氏沼虾的肌肉组织、头部组织和甲壳组织中氨基脲含量均较高;蟹类样品中,珍宝蟹和青蟹甲壳中氨基脲含量较高;而肌肉中除中华绒螯蟹外,其它品种氨基脲均未检出。氨基脲在不同的生物体中均呈现甲壳中氨基脲含量最高,肌肉中氨基脲含量最低的分布特征。由于甲壳中均含有氨基脲,且含量均大于 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,因此可以推断虾、蟹苗种氨基脲超标是由甲壳引起的,因为苗种中氨基脲检测是带壳进行的。

千岛湖和洞庭湖是众所周知的天然水域,但从该区域取的青虾样品,不论是在甲壳中,还是在头部组织或肌肉中均有氨基脲的存在,氨基脲的分布特征同南京养殖基地的青虾及其它甲壳类水产品一致,此样品中存在的氨基脲可以排除是呋喃西林药物所致,因为天然水域中不会存在呋喃西林。梭子蟹和鲎为纯海捕、野生品种;梭子蟹取自东海长江口海区,鲎取自东海舟山群岛海区;经质谱检测,梭子蟹和鲎的甲壳中也存在氨基脲,这也并非呋喃西林用药所致。所有被测定的样品,种类不同,取样时间不同,取样地点分布如此广,但却有一个共同的特征,即甲壳中均有氨基脲的存在。因此,可以推断,氨基脲应该是甲壳类水产品中的内源性物质,自然存在于甲壳类水产品中;呋喃西林并不是甲壳类水产品中氨基脲的唯一来源。此项研究结论同文献 [3 4] 的研究结论一致。

本研究在前人研究的基础上扩大了研究对象和样品采集区域,重点研究了氨基脲在不同生物体中的分布特征,通过不同来源样品的对比分析,使研究结论更具可靠性。此研究结果解释了我国青虾等一些甲壳类水产品中氨基脲阳性率高的原因,为今后正确评价青虾等产品的质量提供了新的思路。

References

- Leitner A, Zollner P, Lindner W. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 939(1-2): 49-58
- Bulletin of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China 235
中华人民共和国农业部公告第 235 号
- Robert M C, Bob H, David E, Lynne C, Dermot F, Kennedy D G. *Food Chemistry*, Available online 25 November **2011**
- Christof V P, Christ D, Mathieu W, Jan K, Patrick S, Carlos V P. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59: 2107-2112
- Saari L, Peltonen K. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, 21(9): 825-832
- CHEN Zhi-Feng, LI Cheng, SUN Li, YONG Wei. *Food & Machinery*, **2009**, 25(2): 6-7
陈志锋,李成,孙利,雍炜. *食品与机械*, **2009**, 25(2): 6-7
- Samsonova J V, Douglas A J, Cooper K M, Kennedy D G, Elliott C T. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46: 1548-1554
- WU Xiao-Jun, SHI Gao-Mao. *Ocean and Fishery*, **2007**, 4: 25-26

