

潮河口邻近海域氨基脲污染现状调查研究*

徐英江 孙玉增 宋秀凯 田秀慧 宫向红 张秀珍 张利民

(山东省海洋水产研究所 烟台 264006)

提要 采用超高效液相色谱-串联质谱法,对山东东营潮河入海口邻近海域海水、沉积物及贝类体内氨基脲污染状况进行了调查研究。结果表明,潮河入海口邻近海域海水中氨基脲的浓度为0.18—70.6 $\mu\text{g/L}$,沉积物中浓度为0.26—18.9 $\mu\text{g/kg}$,生物体内含量为0.82—6.46 $\mu\text{g/kg}$,与作者调查的其它海域相比,污染最为严重。氨基脲在潮河口邻近海域海水、沉积物和生物体内浓度都沿潮河向下呈放射性递减分布,说明潮河是污染的主要来源。本研究同时对不同品种生物体对氨基脲富集差异进行了比较,发现不同品种生物体对氨基脲的富集能力不尽相同。

关键词 潮河,氨基脲,海水,沉积物,贝类

中图分类号 X511

氨基脲(Semicarbazide, SEM)既是制取硝基咪唑类等药物的工业原料,也可作为测定酮、醛的试剂,色谱分析、分离激素精油的溶剂,同时也是农药中间体(Aizhong *et al.*, 2007)。食品添加剂偶氮甲酰胺高温分解产生的副产物中也有氨基脲存在(Scheilla *et al.*, 2005),含有偶氮甲酰胺的面粉在高温干燥烘焙时表面氨基脲含量高达0.2mg/kg。水产养殖业中时有使用的呋喃西林在动物体内也可代谢成为氨基脲(Samsonova *et al.*, 2008)。各种途径产生的氨基脲最终随着径流排入大海。氨基脲已逐渐成为海洋环境中一种全新的环境污染物质。从毒理学角度来说,氨基脲具有潜在的弱毒性及致癌性(Kelly *et al.*, 1998)。早在2003年,欧洲食品安全局(EFSA)就在国际上发出预警,发现在玻璃瓶装食品金属盖的垫圈中检出氨基脲,金属盖经过高温处理后垫圈中的氨基脲被溶入食品中,会对人体产生危害(Maranghi *et al.*, 2009),证明该类化学物质在小鼠体内是致癌物(Miwa *et al.*, 2009; Kazutaka *et al.*, 2003),并已经断言食品中氨基脲的聚集必然危害人类的健康(宋阳威, 2003; 张仲秋等, 2000)。

目前我国还未见关于氨基脲在海洋环境中污染

状况的研究报道,国外也鲜有这方面的资料,其在海洋环境中污染程度以及对海洋生物的影响都无从评估。本文研究分析了山东东营潮河入海口邻近海域的水体、沉积物和贝类样品中氨基脲的分布规律,估算了部分海洋生物对氨基脲的浓缩系数,初步探讨了生物体内氨基脲残留的原因,旨在为氨基脲的生态和健康风险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

超高效液相色谱-串联质谱仪(Quattro Premier XE, Waters, USA),超纯水仪(Milli-Q Gradient, Millipore, France),高速离心机(TGL-10C, 上海安亭科学仪器厂, 上海),超声波清洗器(KQ-600E, 昆山市超声仪器有限公司, 昆山),氮吹仪(N-EVAPTM112, Organomation Associates, USA),旋转蒸发仪(Laborota 4001, Heidolph, Germany)。

乙腈, 甲醇, 乙酸乙酯, 甲酸, 为色谱纯; 2-硝基苯甲醛, 分析纯; 盐酸, 优级纯; 磷酸氢二钾, 乙酸铵, 为分析纯, 所用水为超纯水; SEM 标准品(纯度>98%), 内标 SEM-¹³C¹⁵N₂ (纯度>95%)。

* 海洋公益性行业科研专项“黄渤海重点海域贝类养殖环境安全评价及其监控体系技术研究”(200805031)资助; 水生动物营养与饲料泰山学者岗位(2006—)资助。徐英江, 助理研究员, E-mail: xuyingjiang@yeah.net

通讯作者: 张利民, 研究员, E-mail: zhanglimin@126.com

收稿日期: 2009-11-26, 收修改稿日期: 2010-01-25

1.2 实验方法

1.2.1 监测站位 2009 年 9 月, 在山东东营潮河及邻近海域按照辐射状布点原则设置了 3 个断面 15 个站位, 站位如图 1 所示。

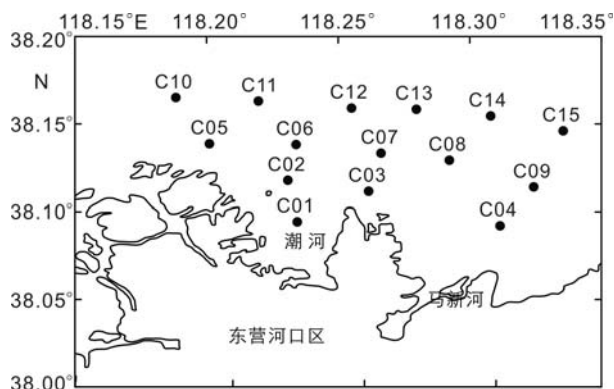


图 1 取样站位示意图

Fig.1 Sampling stations

1.2.2 样品采集 水样采集使用 500ml 棕色玻璃瓶, 采样瓶预先经 1:3 的优级纯盐酸浸泡过夜后洗净, 并在 400 马弗炉内烘烤 4h 后冷却, 经乙酸乙酯清洗后备用。每个站点自制采水器采集 500ml 水样, 用优级纯盐酸调节 pH = 2, 以抑制微生物活动。

沉积物样品采用 0.05m² 曙光采泥器采集, 每个站位采集约 100g 表层(3cm 厚度以内)沉积物, 置于预先洗净并经马弗炉烘烤的玻璃瓶内。

生物样品用通河公司的采贝船采集。

采样途中样品放在加冰块的保温箱内, 运回实验室后, 水样立即用玻璃纤维滤膜(47mm GF/F, 0.7 μm, 美国 Millipore 公司, 用前在 450 °C 下焙烧 4h)过滤, 过滤后的水样于 4 °C 保存, 并于 3 日内完成萃取和分析。沉积物样品不经干燥, 直接置于 -20 °C 的冰柜中保存, 并于 1 个月内完成分析。生物样品取可食部分 4 °C 保存, 并于 7 日内完成分析。

1.2.3 样品前处理

(1) 贝类样品 按照农业部 783 号公告 -1-2006 进行。

(2) 海水样品 取 100ml 海水于 250ml 离心管中, 加入 100μl 内标工作液, 再加入 150μl 衍生溶液, 漩涡 2min, 置于恒温水浴振荡器上 37 °C 避光振荡约 16h。取出离心管放置至室温后, 用磷酸氢二钾溶液调节 pH 至 7.4, 加入 20ml 乙酸乙酯, 漩涡 2—3min, 以 7000r/min 离心 5min, 吸取上清液至吹 100ml 离心瓶中, 用 20ml 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液,

于 45 °C 旋转蒸发至干, 残渣用 1.0ml 流动相溶解, 过 0.2μm 滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

(3) 沉积物样品 取沉积物样品 2.00g 于 25ml 离心管中, 加入 100μl 内标工作液, 再加入 150μl 的衍生溶液, 加入 10ml 盐酸溶液, 漩涡 2min, 超声 30min, 然后置于恒温水浴振荡器上 37 °C 避光振荡约 16h。取出离心管放置至室温后, 用磷酸氢二钾溶液调节 pH 至 7.4, 加入 5ml 乙酸乙酯, 漩涡 2—3min, 以 7000r/min 离心 5min, 吸取上清液至 15ml 离心管中, 用 5ml 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 然后用 Bond Elut[®] Plexa[™] 柱净化, 洗脱液在 40 °C 水浴下蒸干, 用 1.0ml 流动相定容, 过 0.2μm 滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2.4 测定条件

(1) 色谱条件:

色谱柱: ACQUITY[™] BEH C₁₈ (1.7μm, 2.1mm i.d.×100mm);

流动相: 甲醇和含有 0.1% 甲酸的 5mmol/L 乙酸铵溶液梯度洗脱, 见表 1。流速 0.25ml/min, 进样量 10μl, 柱温 40 °C。

(2) 质谱条件 见表 2。电离方式: ESI⁺; 电离电压 2.80kV; 离子源温度: 110 °C; 锥孔反吹气流量: 50L/h; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流量: 700L/h。

1.2.5 液相色谱-串联质谱测定 按照 1.2.4 条件测定样品和标准工作溶液, 用内标法定量色谱峰面积, 以标准品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标, 以标准品浓度与内标浓度之比为横坐标, 绘制标准曲线, 计算氨基脒浓度。

表 1 梯度洗脱程序
Tab.1 Program of gradient elution

时间(min)	甲醇比例(%)	水相比例(%)	梯度变化曲线
0	10	90	—
3	90	10	6
4	90	10	1
5.5	10	90	1

表 2 氨基脒的 UPLC-ESI MS/MS 仪器参数
Tab.2 UPLC-ESI MS/MS parameters for detecting semicarbazide

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
SEM	209.27	166.02*	20	12
		192.01	20	12
SEM-HCl- ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212.22	168.04	20	10

注: *为定量离子

1.3 质量保证 QA/QC

在 100ml 高纯水中分别加入氨基脒 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液 1.0ml, 平行 5 个样品, 平均回收率为 95.6%, 相对标准偏差为 4.6%。氨基脒的仪器检测限($S/N=3$) 分别为 0.25 $\mu\text{g/L}$, 经过回收率和浓缩倍数换算, 方法检测限为 2.5ng/L。

在 2.00g 生物体样品中添加氨基脒 10 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液 100 μl , 平行 5 个样品, 平均回收率为 93.6%, 相对标准偏差为 5.2%, 经回收率和浓缩倍数换算方法检测限为 0.25 $\mu\text{g/kg}$ 。

在 2.00g 沉积物样品中添加氨基脒 10 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液 100 μl , 平行 5 个样品, 平均回收率为 87.6%, 相对标准偏差为 7.5%, 经回收率和浓缩倍数换算方法检测限为 0.25 $\mu\text{g/kg}$ 。

在样品分析过程中, 每隔 10 个样品, 进行 QA/QC 控制样品分析: 溶剂空白、标准溶液以及过程空白。在提取前加入内标, 用于监测样品的预处理以及仪器分析过程和基质的影响。

2 结果与讨论

2.1 潮河口邻近海域海水中氨基脒平面分布

潮河口邻近海域水体中氨基脒含量为 0.18—70.6 $\mu\text{g/L}$, 平均浓度为 14.4 $\mu\text{g/L}$ 。氨基脒在潮河口邻近海域分布不均, 河道和入海口区浓度较高, 远离河道, 数值逐渐降低(图 2)。最高点出现在河道最内处的 C01 站, 最低点出现在离河道最远的 C10 站, 由河道向入海口外氨基脒浓度呈辐射形逐渐降低的趋势(万修全等, 2003), 这是由于潮河沿岸大量废水排放入潮河, 氨基脒浓度较高, 而后受到海水的稀释作用浓度逐渐降低(李培泉等, 1990), 而 C04、C09、C15

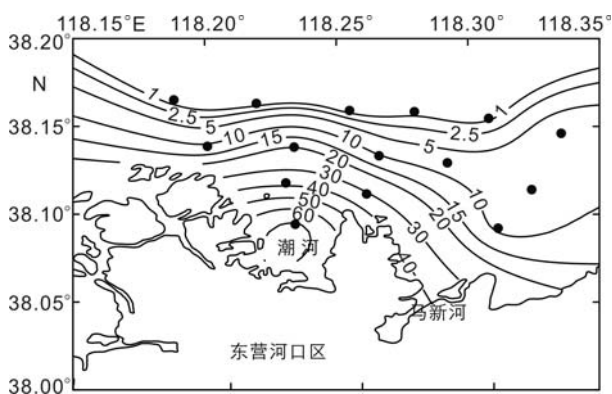


图 2 潮河邻近海域水体中氨基脒分布示意图($\mu\text{g/L}$)

Fig.2 Concentrations of semicarbazide in seawaters adjacent to the Chaohe River ($\mu\text{g/L}$)

三个站点氨基脒的含量突然升高, 可能与潮河东面的马新河同样存在氨基脒污染有关, 有待进一步调查研究。

2.2 潮河口邻近海域沉积物中氨基脒平面分布

潮河口邻近海域沉积物中氨基脒含量为 0.26—18.9 $\mu\text{g/kg}$, 平均为 2.82 $\mu\text{g/kg}$ 。氨基脒在沉积物中分布不均, 与其在海水中分布规律基本一致, 潮河及入海口处较高, 远离潮河含量迅速下降。最高值出现在河道最内处的 C01 站, 最低点出现在离河道最远的 C10 站(李正炎等, 2008)。沉积物中氨基脒含量较水体中相对较低, 这可能有两方面的原因: 一是可能与氨基脒的高水溶性有关(马桂霞等, 2003)。沉积物可以吸附水中的污染物, 而水溶性高的化合物在有机碳上的解吸附能力远大于吸附能力, 因而沉积物就很难富集此类物质。二是由于氨基脒在沉积物中的富集是一个长期的过程, 加上水体中大量悬浮泥沙的运送移动和沉积, 特别是黄河水带来的大量悬浮泥沙沉积, 使表层泥样多为最新沉降泥沙, 富集水体中氨基脒时间较短(陶贞等, 2002), 所以沉积物中氨基脒的含量会低于水体中的含量(图 3)。

2.3 潮河口邻近海域海洋贝类中氨基脒含量和浓缩系数

本次调查在潮河口和邻近海域共采集了四角蛤 (*Macra veneriformis*)、青蛤 (*Cyclina smensis*)、毛蚶 (*Scapharca subcrenata*)、文蛤 (*Meretrix meretrix*)、梭鱼 (*Mugil soiyu*) 和鲮 (*Platycephalus indicus*) 6 种海洋生物, 其氨基脒含量和浓缩系数见表 3。其中四角蛤氨基脒含量最高为 6.46 $\mu\text{g/kg}$, 青蛤次之为 5.63 $\mu\text{g/kg}$, 毛蚶和文蛤中含量也比较高, 分别为 3.82 $\mu\text{g/kg}$ 和 3.14 $\mu\text{g/kg}$, 梭鱼和鲮含量相对较低, 分别为 0.82 $\mu\text{g/kg}$

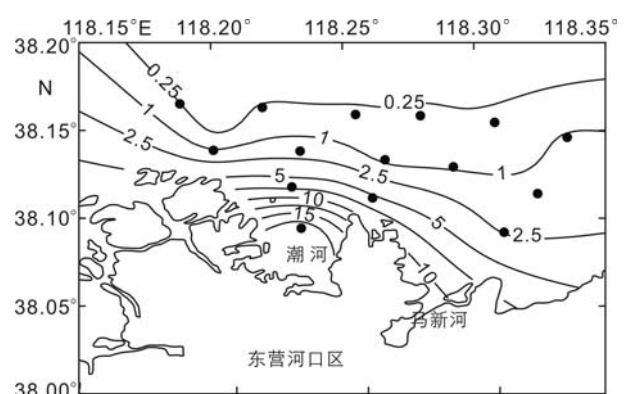


图 3 潮河邻近海域沉积物中氨基脒分布示意图($\mu\text{g/kg}$)

Fig.3 Contents of semicarbazide in marine sediments adjacent to the Chaohe River ($\mu\text{g/kg}$)

和 $1.21\mu\text{g}/\text{kg}$ 。通过浓缩系数来看, 青蛤浓缩系数相对较高, 其它生物浓缩系数均在 0.5 以下。海洋生物体内含量低于表层海水中氨基脲的含量, 可能是因为氨基脲在生物体内可能没有跟蛋白结合, 这与呋喃西林在贝类体内代谢而成的氨基脲的存在形式(吴永宁等, 2007)不同, 具体结论有待进一步研究。

2.4 潮河口邻近海域氨基脲污染与其它海域对比状况

本文在潮河口邻近海域调查同时检测分析了烟台四十里湾、莱州金城湾和养马岛附近海域海水、沉积物和海洋生物样品中氨基脲含量, 结果见表 4。由表 4 可知, 潮河口邻近海域严重偏高, 潮河口海水、沉积物和生物体中氨基脲平均含量分别高达 $(46.41\pm 21.22)\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $(10.44\pm 7.36)\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $(6.46\pm 0.03)\mu\text{g}/\text{kg}$;

潮河口邻近海域相应氨基脲含量也较高, 数值分别为 $(6.34\pm 6.11)\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $(0.89\pm 0.60)\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $(2.92\pm 1.97)\mu\text{g}/\text{kg}$ 。但是莱州金城湾和牟平养马岛附近海域数值普遍较低, 烟台四十里湾水体和生物体中均未检出氨基脲; 牟平养马岛海域仅水体中检出少量氨基脲, 数值为 $(0.0042\pm 0.0015)\mu\text{g}/\text{L}$, 仅为潮河口处含量的万分之一; 莱州金城湾生物体中氨基脲为 $(0.71\pm 0.21)\mu\text{g}/\text{kg}$, 水体中氨基脲含量为 $(0.0172\pm 0.0102)\mu\text{g}/\text{L}$, 略高于牟平养马岛海域, 但仍低于潮河口三个数量级。潮河口及邻近海域氨基脲污染严重, 许多贝类体内氨基脲含量已超过食品安全限量, 影响产品出口和销售, 氨基脲污染已给当地滩涂养殖企业造成严重损失。

表 3 潮河口邻近海域生物体内氨基脲的含量

Tab.3 Concentrations of semicarbazide in marine organisms near the Chaohe River

种类	生物体内氨基脲含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	水体中氨基脲含量($\mu\text{g}/\text{L}$)	浓缩系数 BCF
四角蛤	6.46 ± 0.03	46.4 ± 0.08	0.139 ± 0.001
毛蚶	3.82 ± 0.05	7.78 ± 0.01	0.491 ± 0.004
青蛤	5.63 ± 0.03	7.78 ± 0.01	0.724 ± 0.004
文蛤	3.14 ± 0.03	7.78 ± 0.01	0.404 ± 0.003
梭鱼	0.82 ± 0.02	6.34 ± 0.02	0.129 ± 0.002
鲷	1.21 ± 0.03	6.34 ± 0.02	0.191 ± 0.004

注: 浓缩系数 $BCF = \text{生物体内氨基脲的浓度}/\text{海水中氨基脲的浓度}$

表 4 不同海域海水、沉积物和生物样品中氨基脲含量

Tab.4 Concentrations of semicarbazide in seawater, sediments and organisms from different seas

海区	海水中氨基脲平均含量($\mu\text{g}/\text{L}$)	沉积物中氨基脲平均含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	生物体中氨基脲平均含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)
潮河口	46.41 ± 21.22	10.44 ± 7.36	6.46 ± 0.03
潮河口邻近海域	6.34 ± 6.11	0.89 ± 0.60	2.92 ± 1.97
烟台四十里湾	未检出	未检出	未检出
莱州金城湾	0.0172 ± 0.0102	未检出	0.71 ± 0.21
牟平养马岛邻近海域	0.0042 ± 0.0015	未检出	未检出

2.5 潮河口邻近海域氨基脲污染对池塘养殖的危害

潮河口位于东营和滨州分界地带, 滩涂面积非常大, 近岸池塘养殖业十分发达, 主要养殖品种以虾、蟹为主, 池塘定期从近岸海水中纳水。许多养殖业户在养殖过程中没有投用呋喃西林药物, 但是在国家监督检查时养殖产品中却经常会检出氨基脲(呋喃西林代谢物), 导致产品质量不合格, 有些甚至被执法部门销毁, 给当地养殖企业造成严重损失。作者随机选取的几个池塘水质中均检出氨基脲, 平均含量为 $(2.54\pm 0.86)\mu\text{g}/\text{L}$, 可能是从潮河口邻近海域纳水带来的污染。氨基脲是新发现的一种新型污染物, 其

对环境和产品危害有待进一步研究。针对潮河口氨基脲的污染现状, 建议有关部门查明氨基脲的污染源, 杜绝氨基脲污染, 保障潮河口邻近海域养殖企业的合法权益。

3 结论

3.1 潮河口入海口邻近海域水体中氨基脲的浓度为 $0.18\text{—}70.6\mu\text{g}/\text{L}$, 沉积物中氨基脲的浓度为 $0.26\text{—}18.9\mu\text{g}/\text{kg}$, 在两种介质中氨基脲的浓度都呈辐射形向外逐渐降低, 潮河污水排放是污染的重要来源。

3.2 贝类等生物体对氨基脲有一定的富集能力, 且

不同品种的生物体对氨基脲的富集能力存在较大差异。
3.3 氨基脲已对贝类等生物体形成污染, 有的生物体内氨基脲的含量已远远超过食品安全限量, 希望能够引起有关部门重视, 加强对污染源的监管力度。

参 考 文 献

- 万修全, 鲍献文, 吴德星等, 2003. 胶州湾及其邻近海域潮流和污染物扩散的数值模拟. *海洋科学*, 27: 31—36
- 马桂霞, 张同来, 张建国等, 2003. 盐酸氨基脲的分子结构及热分解特性. *火炸药学报*, 26(2): 58—61
- 李正炎, 傅明珠, 卫 东, 2008. 胶州湾及其邻近河流中壬基酚等有机污染物的分布特征. *海洋与湖沼*, 39(6): 599—603
- 李培泉, 苗绿田, 夏达英等, 1990. 长江九江段水中污染物稀释扩散规律的研究. *海洋与湖沼*, 21(2): 144—153
- 吴永宁, 邵 兵, 沈建忠等, 2007. 兽药残留检测与监控技术. 北京: 化学工业出版社, 461
- 宋阳威, 2003. 呋喃类药物检验现状及对策. *中国动物检疫*, 20(3): 37—38
- 张仲秋, 郑 明, 2000. 畜禽药物使用手册. 北京: 中国农业大学出版社, 74
- 陶 贞, 高全洲, 谢美琪等, 2002. 水文过程对河流悬移质化学组成的影响——以珠江流域为例. *海洋与湖沼*, 33(6): 569—576
- Aizhong G, Qiaolin C, Yu C *et al*, 2007. Preparation of monoclonal antibodies against a derivative of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone. *Analytica Chimica Acta*, 592: 58—63
- Kazutaka H, Kaoru M, Shinji O *et al*, 2003. Carcinogenic semicarbazide induces sequence-specific DNA damage through the generation of reactive oxygen species and the derived organic radicals. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536: 91—101
- Kelly B D, Heneghan M A, Connolly C E *et al*, 1998. Nitrofurantoin-n-ced hepatotoxicity mediated by CD8+ T cells. *American Journal of Gastroenterology*, 93(5): 819—821
- Maranghi F, Tassinari R, Lagatta V *et al*, 2009. Effects of the food contaminant semicarbazide following oral administration in juvenile Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 472—479
- Miwa T, Midori Y, Tomomi M *et al*, 2009. A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2490—2498
- Samsonova J V, Douglas A J, Cooper K M *et al*, 2008. The identification of potential alternative biomarkers of nitrofurazone abuse in animal derived food products. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1548—1554
- Scheilla V C, Roberto G J *et al*, 2005. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry-in-house method validation. *Journal of Chromatography A*, 1077: 151—158

SURVEY OF SEMICARBAZIDE CONTAMINATION IN COASTAL WATERS ADJACENT TO THE CHAOHE RIVER ESTUARY

XU Ying-Jiang, SUN Yu-Zeng, SONG Xiu-Kai, TIAN Xiu-Hui, GONG Xiang-Hong,
 ZHANG Xiu-Zhen, ZHANG Li-Min

(Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006)

Abstract Semicarbazide in coastal waters adjacent to the Chaohe River estuary was analyzed in our work. The concentration of semicarbazide is 0.18—70.6 $\mu\text{g/L}$ in seawater, 0.26—18.9 $\mu\text{g/kg}$ in sediments and 0.82—6.46 $\mu\text{g/kg}$ in marine organisms. The levels of semicarbazide in coastal waters adjacent to the Chaohe River estuary are quite higher than those of other locations. The concentrations of semicarbazide in seawaters, sediments, and seashells decreased gradually and present radial distributions along the Chaohe River, indicating that the Chaohe River is the main pollution source. We also studied accumulation of semicarbazide in different kinds of seashells.

Key words Chaohe River, Semicarbazide, Seawater, Sediment, Seashell