

亚硝酸盐在鲫鱼体内的消除及 氯、溴离子对其吸收的影响

陈永平¹ 林黎明^{2*} 官庆礼³

(¹ 农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心, 天津 300221)

(² 山东出入境检验检疫局, 青岛 266001)

(³ 中国海洋大学, 青岛 266003)

摘要 研究了浸浴给药方式下, 亚硝酸盐在鲫鱼 *Carassius auratus* 体内的药物动力学和残留情况, 同时研究了 Cl^- 、 Br^- 对鲫鱼吸收 NO_2^- 离子的影响。结果显示, 在 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ 水温条件下, 以 60 mg/L 亚硝酸盐水体浸浴 10 d 后, 其血药浓度-时间数据用一级吸收二室模型描述较为合适, 血浆和肌肉的主要药动学参数: $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 、 AUC 及 CL (s) 分别为 0.92 d、1.50 d; 5.36 d、7.98 d; 0.72 d·mg/L(kg)、1.10 d·mg/L(kg); 83.1 mg/L(kg)·d、54.7 mg/L(kg)·d。线性回归系数 $r=0.9999$, 方法检出限为 0.01 mg/kg, 回收率为 78.0%~93.7%, 相对标准偏差为 4.88%~9.17%。肌肉作为可食性组织, 且消除最慢, 因此选取肌肉组织作为残留检测的靶组织, 以 0.02 mg/kg 为最高残留限量, 在 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ 水温条件下, 10 d 后亚硝酸盐代谢完全。检测结果表明, 加入氯化钠、溴化钠后各组织亚硝酸盐的含量前者最低, 对照组最高。结果表明, Cl^- 对 NO_2^- 吸收影响程度比 Br^- 高, 氯、溴离子可以减轻亚硝酸盐的毒害性。

关键词 亚硝酸盐 消除 氯化钠 溴化钠

中图分类号 S948 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0029-07

Elimination of NO_2^- in *Carassius auratus* and impact of chlorine and bromine ion on its absorption

CHEN Yong-ping¹ LIN Li-ming^{2*} GONG Qing-li³

(¹ Quality of Fishery Environment and Aquatic Products Supervision and Testing, Ministry of Agriculture, Tianjin 300221)

(² Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001)

(³ Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT Pharmacokinetics and residues of nitrite in *Carassius auratus* were investigated in this study. Also, the impact of chlorine and bromine ion on nitrite adsorption by *C. auratus* was studied. *C. auratus* was exposed to nitrite at concentration of 60 mg/L in bath water for 10d at $18 \pm 2^\circ\text{C}$. The concentration of the drug in the serum and muscle was described as a two compartmental open model, and the main pharmacokinetics parameters $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, AUC , and

国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2006IK104)资助

* 通讯作者。E-mail: sdcqllm@126.com, Tel: (0532)80885012

收稿日期: 2008-12-22; 接受日期: 2009-03-10

作者简介: 陈永平, (1979-), 男, 助理工程师, 主要从事水生生物学研究。E-mail: yongping008@yahoo.com.cn, Tel: 15822807976

$CL(s)$ were 0.92d, 1.50d; 5.36d, 7.98d; 0.72 d · mg/L(kg), 1.10 d · mg/L(kg); 83.1mg/L(kg) · d, 54.7 mg/L(kg) · d, respectively. The limit of quantification (LQ) was 0.01mg/kg. The linear plots were obtained with linear regression coefficient (r) of 0.999 9. Average recoveries were between 78.0%~93.7% with RSD values between 4.88%~9.17%. According to the maximum residue limit (MRL) of 0.02 mg/kg in muscle, the nitrite would be metabolized completely after ten days in *C. auratus* at the water temperature of 18 ± 2 °C. The other results showed that the content of nitrite in the three tissues of treatments with both nitrite and NaCl or NaBr added were lower than the nitrite-only treatments. The lowest nitrite values were detected in treatments with NaCl. The results indicate that chlorine and bromine ion are capable of reducing nitrite toxicity.

KEY WORDS Nitrite Elimination NaCl NaBr

投饵可造成高蛋白残饵和高含氮排泄物不断沉积水底,使养殖水体中亚硝酸盐和分子氨等有害物质浓度不断增加(余瑞兰等 1999)。分子氨的增加可损伤鱼鳃表皮细胞而降低自身免疫力;亚硝酸盐可引起鱼类中毒而使血液中的高铁血红蛋白的含量升高,载氧能力下降直接造成组织缺氧,神经麻痹,甚至窒息死亡(Krous 1982)。亚硝酸盐对人也有极大的危害性,正常人一次性摄入量大于 4 mg 时就会产生毒性(Abdul Galil *et al.* 2006)。其可使正常血红蛋白转变成高铁血红蛋白从而失去携氧功能,且能与蛋白质中的二级胺或三级胺结合转化成强烈致癌物质—亚硝胺从而诱发癌变(Burakham *et al.* 2004),1g 亚硝酸钠就可致命(Huang *et al.* 2006)。鉴于亚硝酸盐的毒害性,国标规定肉类食品中亚硝酸盐的浓度必须低于 0.5 mg/kg。本实验研究了亚硝酸盐在鲫鱼体内的消除代谢和 Cl^- 、 Br^- 对 NO_2^- 吸收的影响,目的是为水产品食品安全和卫生监测提供科学依据,及探索减轻或消除亚硝酸盐对水产鱼类毒害性的科学、有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

健康鲫鱼 *Carassius auratus*, 体重 125 ± 9 g, 购于青岛市南山水产品批发市场,实验前暂养 14d, 每日投喂饵料, 水温 18 ± 2 °C。

1.1.2 化学药品与试剂

亚硝酸钠(天津化学试剂六厂), 氯化钠(天津试剂三厂), 溴化钠(天津化学试剂三厂), 2,3-萘二铵(400 μ mol/L)(西格玛公司)。

1.1.3 主要实验仪器

高效液相色谱仪 Agilent 1100(美国), HP1100 四元泵, HP1100 荧光检测器(FLD)(美国)。

1.2 方法

1.2.1 给药途径和取样

实验前将鲫鱼随机分组,参考 Boudreaux 等(2007)关于氯离子抑制亚硝酸盐的吸收一文。以 60 mg/L 的亚硝酸盐水体为两组,1 组为实验组,1 组为空白对照;20 mg/L 时为 3 组,1 组添加 17.1 g 氯化钠,1 组添加 29.8 g 的溴化钠(二者与亚硝酸钠的物质的量比均为 20:1),1 组为空白对照。5 mg/L 的亚硝酸盐水体为两组,1 组为实验组,1 组为空白对照。每组 3 个平行,每个平行 10~11 尾鱼。给药前按分组编号取出,称重记录。

在 18 ± 2 °C 水温条件下,准确称量 0.30g $NaNO_2$ 于 50 L 经曝晒的健康水体中(相当于 60 mg/L)暂养 10 d,

每天测定水体亚硝酸盐浓度。停止浸浴后及停药后 1、2、3、4、5、7、10、15 d,在不同的给药时间取 5 尾鱼的肝脏、肌肉和鳃各 5 g。自贴近胸鳍后下方将注射器插入心脏取血,放入离心管(离心管事先加入 0.3 ml 1%肝素钠)至 2 ml,混合均匀,然后以 10 000 r/min 离心 5 min,取上层血浆 1.0 ml 迅速置于-20 °C 冰箱中保存。

准确称量 0.10g NaNO_2 于 50L 经曝晒的健康水体中(相当于 20 mg/L),1 组添加 17.1 g 氯化钠,1 组添加 29.8 g 的溴化钠(二者与亚硝酸钠的物质的量比均为 20 : 1),1 组为空白对照暂养。取样从加入试剂后第 1、2、3、4、5、7、10 天,每个浓度和时间点取 5 尾鱼的肝脏、肌肉、鳃各 5 g。自尾静脉取血,然后以 10 000 r/min 离心 5 min,取上层血浆 1.0 ml 迅速置于-20 °C 冰箱中保存。

1.2.2 样品处理

准确称取匀质组织(肝脏、肌肉和鳃)试样 5.0 g 及 1ml 血清置于 50 ml 烧杯中,加入 35 ml 的蒸馏水后用玻璃棒混匀,静置 10 min,再加入 1 mol/L NaOH 溶液 1 ml,1.1 mol/L 乙酸锌溶液 1 ml,混匀,静置 10 min,60 °C 水浴 15 min;取出冷却至室温,过滤至 100 ml 容量瓶中,30 ml 蒸馏水洗两次,定容至刻度。准确量取抽提滤液 0.97 ml 于进样瓶中,加入 30 μl 衍生试剂 DAN,涡旋器振荡 1 min 混匀,30 °C 水浴 10 min,立即用高效液相色谱法(HPLC)检测,求得各组织的含量。

1.2.3 色谱条件

C_8 (5 μm , 250×4.6 mm i. d.) 分析柱; C_{18} (4 μm , 50×4.6 mm i. d.) 预柱; 流动相 V(双蒸水) : V(乙腈) = 60 : 40; 流速: 0.8 ml/min; FLD 检测波长: 激发波长 375 nm, 发射波长 415 nm; 柱温: 50 °C; 进样量: 10 μl 。

1.2.4 亚硝酸钠标准溶液及工作曲线的制备

将亚硝酸钠试剂置于 100 °C 烘箱中烘烤 24 h,准确称取 0.005 g 于 50 ml 的烧杯中,滴入 0.1 ml 三氯甲烷,0.5 ml 浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠(防止亚硝酸分解和细菌的繁殖)(Li *et al.* 2004),双蒸水溶解然后转移至 1 000 ml 的容量瓶,最后用双蒸水定容至刻度。

分别取 5 mg/L 亚硝酸钠标准储备液 0.2、0.4 ml,定容于 1 000 ml 容量瓶,2.0、4.0、8.0、10.0 ml 定容至 250 ml。浓度相当于 0.000 5、0.001、0.02、0.04、0.08、0.15、0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以 HPLC 法分别测定其峰面积,然后以上述浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标作标准曲线,并求出其标准曲线的回归方程和相关系数。

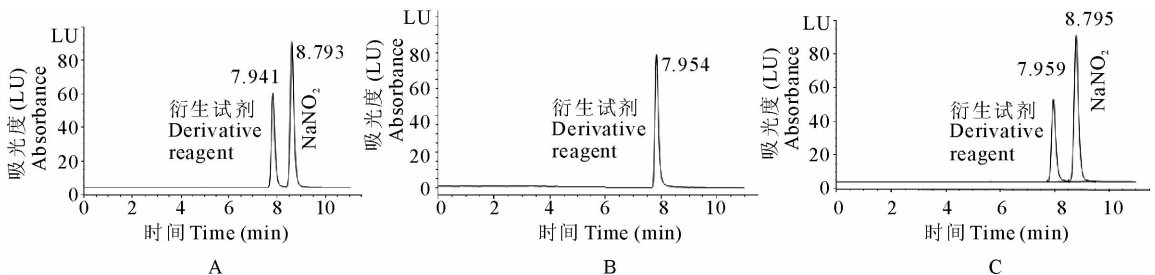
1.2.5 亚硝酸钠回收率的测定

添加相当于 0.5、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 不同浓度的亚硝酸钠标准液于空白组织或血清中。按 1.2.2 方法处理后作 HPLC 测定,测定浓度占添加浓度的百分率为回收率。

2 结果

2.1 线性关系及检测限

由数据得出浓度-峰面积曲线,浓度为 0.000 5~0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时呈良好的线性关系,回归方程为 $y=4\,419.2x$,相关系数 r 为 0.999 9。线性范围为 0.01~6 mg/kg,方法检出限为 0.01 mg/kg。



注: A、B、C 表示鲫鱼血浆、血浆空白、血浆加标

Note: A. Plasma sample; B. Plasma blank; C. Plasma added nitrite standard

图 1 鲫鱼血浆中亚硝酸的色谱

Fig. 1 Liquid chromatogram of nitrite in *Carassius auratus* plasma

2.2 回收率实验

实验分别测定添加相当于肝脏、肌肉、鳃:0.5、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 血浆:0.5、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的回收率, 平均回收率均在 78% 以上(表 1)。

表 1 亚硝酸钠在组织中的平均加标回收率和精密度 ($n=6$)

Table 1 Average recovery and precision of nitrite concentration in tissue samples ($n=6$)

组织名称 Tissue	添加浓度值 Theoretic value (mg/L(kg))	测定值 Actual value (mg/L(kg))	回收率 Recovery (%)	精密度 Precision (%)
血浆 Plasma	0.5	0.41	82.0	8.66
	1.5	1.33	88.7	7.23
	3.0	2.56	85.3	5.69
肝脏 Liver	0.5	0.39	78.0	9.17
	1.5	1.21	80.6	6.34
	3.0	2.38	79.4	6.22
肌肉 Muscle	0.5	0.43	86.0	7.83
	1.5	1.36	90.6	6.65
	3.0	2.62	87.3	5.47
鳃 Gill	0.5	0.45	89.2	6.79
	1.5	1.37	91.3	5.71
	3.0	2.81	93.7	4.88

2.3 亚硝酸盐在鲫鱼血浆及其他组织中的残留量

按亚硝酸钠剂量浓度相当于 60 mg/L 的浓度暂养 10d 后, 试验鱼的血浆、肝脏、肌肉和鳃组织中的亚硝酸盐浓度见表 2。

表 2 血浆及组织中亚硝酸盐的浓度

Table 2 Concentration of nitrite in plasma and tissues

浸浴时间 Bathing time(d)	血浆(mg/L) Plasma	肌肉(mg/kg) Muscle	肝脏(mg/kg) Liver	鳃(mg/kg) Gill
1	0.180	0.171	1.178	0.300
2	0.135	0.139	1.041	0.240
3	0.107	0.125	0.760	0.183
4	0.062	0.107	0.447	0.137
5	0.028	0.075	0.289	0.078
7	0.018	0.039	0.183	0.046
10	0.011	0.025	0.122	0.032
15	0.009	0.017	0.078	0.019

2.4 亚硝酸盐在鲫鱼体内的代谢动力学参数

以 60 mg/L 的剂量浸浴给药后,将血药浓度-时间数据采用 DAS 1.0 药动学程序进行分析,根据 AIC 值最小和 R^2 值最大的原则,判定鲫鱼浸浴亚硝酸盐后血药经时过程符合一级吸收二室开放式模型,代谢动力学参数见表 3。

表 3 鲫鱼血浆及肌肉中的动力学参数比较
Table 3 Pharmacokinetic parameters of nitrite in plasma and muscle

组织 Tissue	动力学参数 Pharmacokinetic parameters							
	剂量 Dose(mg/L)	$t_{1/2\alpha}$ (d)	$t_{1/2\beta}$ (d)	$t_{1/2ka}$ (d)	K_{12} (d^{-1})	K_{21} (d^{-1})	AUC d · mg/L(kg)	CL(s) mg/L(kg) · d
血浆 Plasma	60	0.92	5.36	0.55	0.18	0.19	0.72	83.1
肌肉 Muscle	60	1.50	7.98	0.58	0.14	0.16	1.10	54.7

$t_{1/2\alpha}$ 为分布相半衰期; $t_{1/2\beta}$ 为消除相半衰期; $t_{1/2ka}$ 为吸收半衰期; k_{12} 为由中央室到周边室的一级转运速率常数; k_{21} 为药物由周边室到中央室的一级转运速率常数; AUC 为药时曲线下总面积; CL(s) 为体内总清除率

2.5 对照组与添加氯溴离子组亚硝酸盐的浓度变化

实验将 20 mg/kg 亚硝酸钠养殖水体设定为对照组,分别在对照组中添加一定量的氯化钠、溴化钠后在不同给药时间点取其组织并检测。表 4 中的实验结果显示,在养殖鲫鱼受到亚硝酸钠污染时完全可以喷洒 NaCl 或 NaBr 与 NO_2^- 离子(物质的量比为 20 : 1)来减轻其毒害性。

表 4 添加氯化钠、溴化钠组及对照组在不同时间点亚硝酸盐的富集浓度
Table 4 Concentration of nitrite at different time points in different treatments with NaCl or NaBr and control

实验组 Experimental group	组织 Tissue (mg/kg)	浸浴时间(d) Bathing time							
		0.3	1	2	3	4	6	8	10
氯化钠组 NaCl group	肝脏 Liver	0.058	0.084	0.111	0.137	0.158	0.168	0.187	0.189
	鳃 Gill	0.015	0.023	0.032	0.041	0.054	0.064	0.075	0.079
	肌肉 Muscle	0.016	0.021	0.036	0.043	0.053	0.056	0.067	0.071
溴化钠组 NaBr group	肝脏 Liver	0.069	0.107	0.146	0.216	0.252	0.282	0.298	0.301
	鳃 Gill	0.029	0.042	0.070	0.091	0.104	0.122	0.134	0.139
	肌肉 Muscle	0.022	0.038	0.057	0.069	0.076	0.089	0.097	0.108
对照组 Control	肝脏 Liver	0.097	0.228	0.389	0.577	0.681	0.802	0.887	0.901
	鳃 Gill	0.041	0.072	0.127	0.158	0.203	0.221	0.244	0.270
	肌肉 Muscle	0.020	0.057	0.104	0.126	0.144	0.153	0.173	0.181

6 d 后组织中亚硝酸钠浓度增加缓慢,第 8 天、第 10 天的含量接近,可认为亚硝酸钠吸收达到峰值,肝脏是亚硝酸钠含量最高的组织,是肌肉和鳃中最大含量的 3 倍。

图 3 表示水体 1(含 Cl^- , NO_2^-)、水体 2(含 Br^- , NO_2^-)、水体 3(含 NO_2^-) 浸浴后各组织中亚硝酸盐含量随时间变化的曲线。

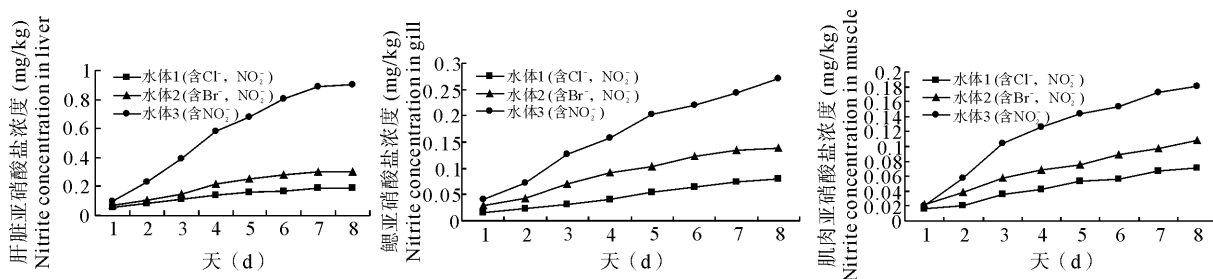


图3 肝脏、鳃和肌肉亚硝酸盐浓度-时间曲线

Fig. 3 Nitrite concentrations in liver, gill and muscle

3 讨论

3.1 HPLC 方法检测亚硝酸盐的探讨

HPLC 方法是药物检测的一种常用方法,很少用来检测无机物,本实验打破了传统的分光光度计检测方法 (Moorcroft *et al.* 2001),优化后的流动相能使衍生产物 NAT 与其他物质峰彻底分离,具有分离效果好、特异性强、测定精密度高、重现性好和使用较方便的特点。

3.2 浸浴给药的药物代谢动力学特征比较

分布相半衰期:肌肉 $t_{1/2\alpha}$ (1.50 d) > 血浆 $t_{1/2\alpha}$ (0.92 d),肌肉中亚硝酸盐的存在,除了来自血液循环,还有可能来自亚硝酸盐通过皮肤渗透;消除相半衰期:肌肉 $t_{1/2\beta}$ (5.36 d) < 血浆 $t_{1/2\beta}$ (7.98d),表明亚硝酸盐在食用组织肌肉中残留时间较长;药时曲线下面积 AUC 肌肉中为 1.10 d · mg/kg,大于血浆中的 0.72 d · mg/L,表明亚硝酸盐在肌肉中分布量较大,可食用部分毒性较强;药时曲线表明亚硝酸盐在血浆中 1~5d 内浓度下降较快。5 d 后下降速率减慢;肌肉中第 1 天亚硝酸盐浓度降低较快,第 2~6 天下降速率减慢,这可能是 NO_2^- 作为鱼体内自身代谢中间产物,导致亚硝酸盐清除速率缓慢。

3.3 不同养殖环境下各组织亚硝酸盐残留量对比

肝脏富集亚硝酸钠量最大,可能由于肝脏作为最重要的代谢器官,最终将部分亚硝酸盐氧化成硝酸盐进行排泄。肌肉较血浆浓度大,可能与肌肉组织渗透压较高有关 (邓树海等 1992)。鳃中亚硝酸盐的浓度仅次于肝脏,可能由于鳃内有丰富的毛细血管,其不仅是气体交换的重要场所,还是重要的吸收排泄器官,导致鳃内亚硝酸盐浓度高于血液中的浓度。

在实验室条件下水体亚硝酸盐浓度为 12 : 4 : 1 养殖时,测定鲫鱼体内各组织的亚硝酸盐含量并非成线性关系,在 60 mg/L 亚硝酸钠浓度养殖时各组织含量较高,20 和 5 mg/L 时各组织的含量较接近,推测其原因可能是个体在低浓度亚硝酸钠环境中受的毒害较小,适应环境较快,所以吸收较多,代谢速度和较高浓度亚硝酸盐相当。检测结果显示肝脏中含量最高,其他组织含量均低于国标检出限 0.5 mg/kg。由动力学参数可知在 7 d 以后各组织亚硝酸钠的浓度基本保持不变,可认为达到最大富集浓度,消除半衰期肌肉最长,15 d 后各组织均可代谢到较低浓度。

3.4 氯、溴离子对亚硝酸盐作用效果的探讨

本实验以鲫鱼作材料,研究了氯、溴离子对其吸收亚硝酸盐的影响。结果表明, Cl^- 或 Br^- 存在时,体内仅含少量亚硝酸钠, Cl^- 比 Br^- 作用效果好但不明显。这与 Grosell 等 (2005) 研究的雀鳝、白鲟等鱼中 Cl^- 、 Br^- 对 NO_2^- 离子的吸收影响结果一致,这可能与 Cl^- 、 NO_2^- 离子半径较接近, Br^- 半径较大有关。

参 考 文 献

- 邓树海,张秀珍. 1992. 药物动力学与生物药剂学(第 1 版). 天津:天津科技翻译出版公司
- 余瑞兰, 聂湘平, 魏泰莉, 郭叶华, 赖子尼. 1999. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策. 中国水产科学, 6(3): 1~5
- Abdul Galil, M. S., Mahadevaiah, M. S., Kumar, Y., and Nagendrapp, G. 2006. A simple and rapid spectrophotometric method for the determination of nitrite by its decolorizing effect on peroxyvanadate complex. Spectrochimica Acta Part A, 56: 22~31
- Boudreaux, P. J., Ferrara, A. M., and Fontenot, Q. C. 2007. Chloride inhibition of nitrite uptake for non-teleost Actinopterygian fishes. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 147(2):420~423
- Burakham, R., Oshima, M., Grudpan, K., and Motomizu, S. 2004. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. Talanta, 64: 1 259~1 265
- Grosell, M., and Tomasso, J. R. 2005. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater and freshwater-acclimated euryhaline fishes. Environment Scientific Technology, 39: 98~102
- Huang, K. J., Wang, H., Guo, Y. H., Fan, R. L., and Zhang, H. S. 2006. Spectrofluorimetric determination of trace nitrite in food products with a new fluorescent probe 1,3,5,7-tetra-methyl-2,6-dicarboxy-8-(3,4-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-s-indacene. Talanta, 69: 73~78
- Krous, S. R. 1982. Effect of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout. Fish Culture, 44(2): 126~130
- Li, M. L., Wang, H., Zhang, X., and Zhang, H. S. 2004. Development of a new fluorescent probe: 1,3,5,7-tetra-methyl-8-(4-aminophenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, for the determination of trace nitrite. Spectrochimica Acta Part A. Talanta, 60: 987~993
- Moorcroft, M. J., Davis, J., and Compton, R. G. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite. Talanta, 54: 785~803

《渔业科学进展》网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部从 2010 年 1 月开始采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者登陆 <http://221.3.9.62:8080/qikan/> 投稿。投稿程序请参看《渔业科学进展》网络化稿件处理系统作者使用指南。

如有疑问,请致电 0532-85833580,13553001056 陈 严老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询,E-mail: chenyan@ysfri.ac.cn。

《渔业科学进展》编辑部

2010 年 12 月 10 日