

文章编号: 1004-7271(2005)01-0035-05

HPLC/MS 法对呋喃唑酮及其代谢物 AOZ 在罗非鱼体内残留研究

徐维海^{1,2}, 林黎明³, 朱校斌², 王新亭², 张干¹

- (1. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640;
2. 中国科学院海洋研究所生物工程中心, 山东 青岛 266071;
3. 青岛出入境检验检疫局食品实验室, 山东 青岛 266002)

摘要: 采取高效液相色谱(HPLC)与质谱(MS)联用技术研究呋喃唑酮[3-(5-硝基糠醛缩氨基)-2-唑烷酮]及其主要代谢产物 3-氨基-2-唑酮(AOZ)在罗非鱼体内的残留规律。该方法对呋喃唑酮及其代谢物 AOZ 的检出限分别为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。给罗非鱼投喂剂量为 30 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的呋喃唑酮药饵 7 d。结果表明,罗非鱼肌肉中呋喃唑酮和 AOZ 的含量分别在停药 6 h 后和停药“零时”达到最高,分别为 413.00 \pm 91.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、31.15 \pm 9.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。24 h 后呋喃唑酮含量就低于检出限,而肌肉中 AOZ 的含量在 528 h 后才低于 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。鱼肌肉中呋喃唑酮和 AOZ 的消除半衰期分别为 9.34 h、38.2 h,平均消除速率分别为 22.7 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 、0.058 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。由实验结果可以看出,鱼肌肉中呋喃唑酮代谢很快,而 AOZ 却很难消除。考虑到呋喃唑酮的代谢物 AOZ 在罗非鱼体内不容易消除,在本实验条件下,建议给罗非鱼投喂呋喃唑酮药饵的停药期至少在 22 d。

关键词: 罗非鱼; 呋喃唑酮; 3-氨基-2-唑酮; 残留

中图分类号 S 948 文献标识码: A

The research of residues of furazolidone and its metabolite in tilapias by HPLC/MS

XU Wei-hai^{1,2}, LIN Li-ming³, ZHU Xiao-bin², WANG Xin-ting², ZHANG Gan¹

- (1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry,
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. Center of Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;
3. Food Laboratory of Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R., Qingdao 266002, China)

Abstract: The residues of furazolidone [3-(5-nitrofurfurylidenamino)-2-oxazolidinone] and its main metabolite 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) in tilapia were first studied by HPLC/MS. The detection limit of furazolidone and AOZ were 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively. After oral dose of 30 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ for 7 days, the maximum level of furazolidone in tilapias was 413.00 \pm 91.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 6 h, but that of AOZ reached maximum (31.15 \pm 9.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$) when stopping giving drug, the concentration of furazolidone was lower than 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 24 h, but that of AOZ was just lower than 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 528 h; the elimination half-life of furazolidone and AOZ were 9.34 h and 38.2 h.

收稿日期 2003-10-28

基金项目 973 课题(2002CB412402)和中国科学院重大项目(KJ9315W-215)

作者简介 徐维海(1978-)男,江苏干于人,在读博士生,从事环境科学方面的研究。

通讯作者 朱校斌(1952-)男,研究员, Tel 0532-2898710, E-mail: zxbzhu@ms.qdio.ac.cn

respectively, and the rate of speed were $22.7 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ and $0.058 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ respectively. The results show that AOZ is very hard to eliminate compared to furazolidone. In view of AOZ is very hard to eliminate, the predicted withdrawal time of furazolidone for tilapia was 22 d at least in this condition.

Key words tilapia; furazolidone; 3-amino-2-oxazolindione (AOZ); residues

呋喃唑酮(furazolidone)是20世纪40年代后期开始使用的合成抗菌药物,主要用来防治水生动物的细菌性疾病^[1],在水产养殖中被广泛应用。但是许多研究已经证明了呋喃唑酮具有很强的副作用^[2],是一种诱变致癌剂,美国、日本及我国都已经禁止在水产养殖中使用该药。由于呋喃唑酮在生物体内代谢速率很快^[3],在很短时间内即代谢完全,所以在水产养殖中仍然广泛使用,但是其主要代谢物3-氨基-2-唑酮(AOZ)却是一种致癌作用更强的物质,不但能够与组织蛋白结合,很难消除,并且与蛋白结合后能够释放出来一种诱导有机体突变的物质^[4]。随着我国加入WTO,欧盟、美国、日本等国家对我国出口水产品中抗菌药物的残留量提出了更高要求,特别是呋喃唑酮及AOZ,要求水产品中检不出。本文建立了高效液相色谱与质谱连用技术(HPLC/MS)检测呋喃唑酮及其代谢物AOZ的方法,研究了呋喃唑酮及AOZ在罗非鱼体内的残留与代谢规律,确定了停药期。研究结果对保障消费者身体健康,扩大我国水产品出口具有重要意义,并对药物代谢动力学研究具有参考价值。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与养殖条件

实验用罗非鱼为吉富罗非鱼,购自国家级青岛罗非鱼良种场,体重 $200 \pm 50 \text{ g}$,在中国科学院海洋研究所水族楼暂养1个月,放养密度每立方米10尾,水温 $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$,自然光节律,充气,每日投喂无药物残留饵料(由鱼粉、淀粉、矿物质等组成),次日上午换水并清除粪便和残饵。

1.2 主要仪器和设备

高效液相色谱仪(安捷伦1100)和MS检测器;振荡水浴(Memmert);高速离心机5810 R(Eppendorf);均质器加直径为25 mm 聚集器(ULTRA-TURRAX);快速混匀器(美国MODEL M37610-26);超声波水浴;pH计;旋转蒸发仪;氮气浓缩装置(PIERCE MODEL 1878);30 mL带接口的漏斗塑料柱;一次性注射器滤器;过滤膜($0.45 \mu\text{m}$,DURAPORE)。

1.3 化学试剂与溶液

乙腈(色谱纯);25%氨水;甲醇;甲酸;磷酸;乙酸乙酯;二甲亚砜;氢氧化钠;盐酸;三(羟甲基)氨基甲烷;2-硝基苯甲醛;醋酸;正己烷;正丙醇;乙腈-水溶液(1:1);0.1 mol/L氨水;25%甲醇;呋喃唑酮与AOZ标准品(Sigma公司,含量大于99.9%);呋喃唑酮原药(中国济南鲁雅制药有限公司,含量大于98%,批号:971215)。未注明的试剂均为分析纯。

1.4 给药方式及取样

将实验用罗非鱼随机分组,每组5尾,每天按剂量 $30 \text{ mg}/\text{kg}$ 投喂药饵(称取3.6 g呋喃唑酮原粉,1500 g鱼饲料和30 g面粉混合后制成药饵),连续喂药7 d。对照组投喂无药物残留的饵料。停药后,实验组和对照组按1.1所述的实验条件养殖。

停药后,按不同的时间间隔取罗非鱼肌肉进行测定,每个时间点取1组鱼,取样的时间点为0、6、12、24、48、96、144、192、288、384、528 h。

1.5 药物的提取方法

1.5.1 呋喃唑酮的提取

称取5.0 g鱼肌肉样品,置于50 mL棕色离心管中,加入25 mL乙腈和10 g无水硫酸钠,高速均质3 min后,以6000 r/min离心10 min,将乙腈层移入100 mL棕色分液漏斗中。离心后的沉淀物再加入25

mL 乙腈于混匀器摇匀, 超声波提取 30 s, 以 6000 r/min 离心 5 min, 合并乙腈提取液, 加入 25 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 振荡 5 min, 将底层乙腈溶液移入 100 mL 棕色茄形瓶中, 加入 5 mL 正丙醇, 40 °C 旋转蒸发至近干后, 用氮气吹干。然后加入 1.0 mL 乙腈-水溶液, 超声 30 s 溶解残渣。将溶解液移入 10 mL 棕色离心管中, 加 0.5 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 以 3000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层, 将底层乙腈水溶液过 0.45 μm 滤膜后移入棕色样品瓶中, 供 HPLC 测定。

1.5.2 AOZ 的提取

水解衍生化: 准确称取 3.0 g 鱼肌肉置于 50 mL 离心管中, 加 30 mL 0.125 mol/L HCl 及 1.0 mL 8 mg/mL 12-硝基苯甲醛溶液(当日配制), 匀浆约 2 min, 转速 8000 r/min, 在 37 °C 水浴中振荡 16 h(过夜), 频率 60 Hz, 加 3.6 mL 1 mol/L NaOH, 调节 pH 至 7.0~7.5, 然后以 2000 r/min 离心 15 min, 125 mm 滤纸过滤上清液, 用乙酸乙酯提取滤液两次后过滤, 另用 10 mL 0.3 g/mL NaOH 溶液提取, 将滤液乙酸乙酯层移入 100 mL 含 2g 无水 Na₂SO₄ 的锥形瓶中干燥, 经脱脂棉过滤于 100 mL 烧瓶中, 50 °C 旋转蒸发近干, 氮气吹干, 用 3 mL 甲醇溶解残渣后加 9.0 mL 0.1 mol/L 氨水, 混匀。

Oasis HLB 柱净化: 将混匀的溶液通过已经活化好的 Oasis HLB 柱, 然后用 3 mL [水/甲醇/25% 氨水 = 75:25:4 (v/v/v)] 溶液淋洗。真空干燥 Oasis 柱约 2 min。准备 10 mL 样品瓶, 用 [甲醇/水/25% 氨水 = 90:2:8 (v/v/v)] 溶液洗脱, 在 40 °C 40 MPa 压力下旋转干燥, 将残留物溶于 0.50 mL HPLC 流动相(0.125 mol/L HCl 3:1)。过 0.45 μm 滤膜后移入棕色样品瓶中, 待测。

1.6 色谱及质谱条件

1.6.1 呋喃唑酮检测的色谱条件

色谱柱 Intersil OD3, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 30 μL, 检测波长 365 nm。流动相 3% 冰醋酸-乙腈按(85:15)混合, 使用前超声脱气 10 min。

1.6.2 AOZ 检测的色谱及质谱条件

色谱条件: 色谱柱 Intersil OD3, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 柱温 35 °C, 流速 0.6 mL/min, 约 0.6 × 2/3 mL/min 入 MSD, 进样量 30 μL, 流动相 A: 0.1% 甲酸溶液, B: 乙腈, 采取梯度淋洗: 在 0~10 min, A 的比例由 90% 降为 50% (相应的 B 由 10% 升至 50%), 在 10~20 min, A 由 50% 变为 95% (相应的 B 由 50% 降至 5%), 在此条件下保持 15 min。质谱条件: 大气压化学电离源 (APCI), 选择性监测质荷比 (m/z) 为 236, APCI 电晕放电针电压 2.90 kV, 干燥气 (N₂) 流速为 3.0 L/min, APCI 探头温度 300 °C。

1.7 数据处理

所有数据均采用平均值 ± 标准差表示。消除半衰期 $t_{1/2}$, 平均消除速率 V 分别按下列公式计算。

$$t = \text{Log} \frac{C_{\max}}{C_t} \times \frac{2.303}{\frac{dc}{dt}}, K = \frac{-dc}{dt}, V = \frac{C_{\max} - C_{\min}}{\Delta t}$$

其中 C_{\max} , C_{\min} 为药物的最高和最低含量, K 为消除速率常数, C_t 为停药 't' 时的药物浓度。当 $C_t = 1/2 C_{\max}$ 时, t 即为消除半衰期 $t_{1/2}$, Δt 为药物由最高降至最低所需要的时间。

2 结果

2.1 呋喃唑酮的色谱确认及 AOZ 的质谱定性

呋喃唑酮的检测多采用 HPLC 法^[5-7], 本实验采用乙腈提取呋喃唑酮, 乙腈饱和正己烷净化, 既减少了溶剂的毒性, 又取得了良好的净化效果。在本实验的色谱条件下, 呋喃唑酮的保留时间约在 6.0 min, 峰形尖锐, 峰对称性好, 无拖尾现象, 最低检出限为 10 μg/kg。Robert^[3,8]等研究了 HPLC/MS 法对 AOZ 的检测, 在本实验条件下, AOZ 的保留时间约在 7.4 min, AOZ 的核质比 (m/z) 为 236, 具有很高的定性意义, 最低检出限为 1 μg/kg。

2.2 呋喃唑酮及 AOZ 在罗非鱼肌肉中的残留

采取 1.6 所述的色谱与质谱条件, 进行罗非鱼样品残留量的测定。表 1 列出了鱼肌肉中呋喃唑酮

及 AOZ 在不同时间间隔的残留量。

2.3 呋喃唑酮及 AOZ 代谢的消除半衰期和平均消除速率

将实验测定的结果,按 1.7 所列公式计算出呋喃唑酮及 AOZ 代谢的消除半衰期和平均消除速率(表 2)。

表 1 肌肉中呋喃唑酮和 AOZ 残留量

Tab.1 Concentrations of furazolidone and AOZ in muscle

时间(h)	呋喃唑酮($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AOZ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
0	361.12 \pm 78.01	31.15 \pm 9.68
6	413.00 \pm 91.68	30.96 \pm 10.23
12	31.12 \pm 13.25	23.55 \pm 8.76
24	4.20 \pm 0.56	17.72 \pm 5.01
48	-	14.21 \pm 5.23
96	-	9.80 \pm 3.87
144	-	7.30 \pm 1.50
192	-	5.89 \pm 1.24
288	-	4.01 \pm 0.87
384	-	1.94 \pm 0.83
528	-	0.57 \pm 0.44

注:“-”表示未检出,所有数据均为平均值 \pm 标准差

表 2 呋喃唑酮及 AOZ 代谢的消除半衰期和平均消除速率

Tab.2 Elimination half-life and rate of elimination of furazolidone and AOZ

	消除半衰期(h)	平均消除速率($\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$)
呋喃唑酮	9.34	22.7
3-氨基-唑酮	38.2	0.058

3 讨论

HPLC/MS 与紫外(UV)和二极阵列检测器相比,对被测化合物的确认有很高的可信度,具有灵敏度高(比 UV 和二极阵列检测器高 10 倍以上)、选择性好、精密度高等优点,而且 HPLC/MS 有易于操作和自动化的特点。目前 HPLC/MS 连用技术已经成为制药业、药物分析与研制等领域十分重要的分析方法^[9,10],在环境分析中也起着重要作用^[11,12],同时也是生物化学和生物技术大量使用的工具。近几年国内外采用 HPLC/MS 对各种药物及其代谢物的研究取得了一定的进展^[13,14]。本文建立了 HPLC/MS 对鱼肌肉中呋喃唑酮及代谢物 AOZ 含量的检测,确定了代谢物 AOZ 的核质比(m/z)为 236,具有较高的灵敏度和可信度,同时具有色谱分离与质谱分离的双重功能,可以依靠质谱的分辨能力区分不同物质的色谱峰,抗干扰能力强,能够满足水产品中低浓度的呋喃唑酮及 AOZ 的检测。

在停药“零”时,鱼肌肉中呋喃唑酮及 AOZ 的含量分别为 361.12 \pm 78.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 31.15 \pm 9.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 该结果为连续投喂药饵 7 d 后的累积结果。鱼肉中呋喃唑酮在停药 6h 后略有上升,达到 413.00 \pm 91.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$,主要原因之一为水体中有残留的呋喃唑酮以及鱼体中尚有未吸收的呋喃唑酮。呋喃唑酮在鱼肌肉中代谢很快,12 h 后含量为 31.12 \pm 13.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,48 h 后则未检出,消除半衰期和平均消除速率分别 9.34 h, 22.7 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,可以看出呋喃唑酮的消除半衰期很短,具有很高的消除速率,这就是呋喃唑酮为水产养殖中的禁药却仍然在广泛使用的一个重要原因。我们的研究结果表明,尽管呋喃唑酮在鱼体内代谢很快,但是其主要代谢产物 AOZ 却很难消除。在停药“零”时 AOZ 含量达到最高 31.15 \pm 9.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (约为呋喃唑酮最高含量的 1/13,这在一定程度上说明呋喃唑酮的代谢率较低),384 h 后含量仍然

达到 $1.94 \pm 0.83 \mu\text{g}/\text{kg}$, 消除半衰期和平均消除速率分别 38.2 h、 $0.058 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 其消除半衰期为呋喃唑酮 4 倍之多, 而呋喃唑酮的平均消除速率要比 AOZ 快近 400 倍。许多相关研究也已经证实, 呋喃唑酮在猪、鸡等家畜家禽体内的主要代谢物同样是 AOZ, 且不容易消除^[4, 8, 15]。欧盟、日本等国家已经开始对我国出口的动物源食品中 AOZ 的残留进行检测, 尽管呋喃唑酮在水产品中代谢较快, 不容易检出, 但是可以通过检测其主要代谢产物 AOZ 达到检测呋喃唑酮的目的。

在一般情况下, 药物的吸收和消除速率随水温的增高而加快^[16]。罗非鱼属热带鱼类, 最适宜的生长温度是 $24 \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$, 本实验水温为 $27 \sim 29 \text{ }^\circ\text{C}$, 略低于我国人工养殖的实际水温 ($30 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$)。此外, 现实水产养殖中一般采用循环水, 消除速率也应快于实验室中养殖的消除速率。与现实水产养殖相比, 本实验所得消除半衰期略长。在本实验条件下, 考虑到呋喃唑酮的代谢物 AOZ 不容易消除, 建议投喂呋喃唑酮的停药期至少为 22 d。

由于呋喃唑酮及 AOZ 都具有很强的副作用, 所以很有必要对水产品中呋喃唑酮特别是 AOZ 的残留量进行检测, 并对其进行有效监控, 以保障消费者健康和扩大我国水产品出口。

参考文献:

- [1] 操玉涛, 陈孝煊, 吴志新. 口服呋喃唑酮对中华鳖消化道菌群的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(2): 163 - 165.
- [2] 五庆伟, 刘雪英. 呋喃唑酮的不良反应及防治 [J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(3): 183 - 184.
- [3] Robert J, McCracken D, Glenn K. Determination of furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland [J]. J Chromatography B, 1997, 691: 87 - 94.
- [4] Laurentius A P, Hoogenboom, Gerard D, et al. Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002, 11: 273 - 287.
- [5] Diaz T G, Cabanillas A G, Valenzuela M I, et al. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detector [J]. J Chromatography A, 1997, 764: 243 - 248.
- [6] Robert J, McCracken D, Glenn K. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detector [J]. J Chromatography A, 1997, 771: 349 - 354.
- [7] 葛宝坤, 王云凤, 常春艳, 等. 测定鸡肉、水产品中四种硝基呋喃类药物残留量的固相萃取-液相色谱法 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 91 - 93.
- [8] Alexander L, Peter Z, Wolfgang L. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatography A, 2001, 939: 49 - 58.
- [9] Mike S L. LC/MS application in drug development [J]. Mass Spectrometry, 1999, 18(3/4): 187 - 279.
- [10] Thompson H C. HPLC determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. J Agric Chem, 1996, 44(10): 3164 - 3169.
- [11] 沈慧芳, 张燕红, 兰仁华, 等. α -三连噻吩与麻保沙星的 HPLC/MS 分析 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2001, 29(11): 47 - 50.
- [12] Angelino S. Simultaneous determination of acidic and basic-neutral pesticides in water at ppt concentration level by ion-interaction micro-HPLC/MS [J]. Environmental Science & Technology, 1999, 33(21): 3905 - 3910.
- [13] 孙春华, 刘 蕾, 殷 琦. HPLC/MS 研究国产盐酸班布特罗片及其代谢物特布他林人体生物等效性 [J]. 药学学报, 2001, 36(5): 368 - 372.
- [14] Kanazawa H. Determination of theophylline and its metabolites in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatography A, 2000, 870(1 - 2): 87 - 96.
- [15] Eleonor A, Tendencia, Leobert D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds [J]. Aquaculture, 2001, 195: 193 - 204.
- [16] Bjorklund H V, Bylund G. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in Trout (*Salmo gairdneri* R.) [J]. Aquaculture, 1990, 84: 363 - 372.