

# 高效液相色谱法测定硝基呋喃类药物代谢物及其在对虾体内的代谢

辛少平<sup>1,2</sup>, 邓建朝<sup>1</sup>, 杨贤庆<sup>1</sup>, 岑剑伟<sup>1</sup>, 魏 涯<sup>1</sup>, 郝淑贤<sup>1</sup>, 李来好<sup>1,\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,

国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 建立高效液相色谱法测定对虾中胺基脒 (semicarbazide, SEM)、1-氨基-2-内酰脲 (1-aminohydantoin, AHD)、5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻唑烷酮 (5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxazolidone, AMOZ) 和3-氨基-2-恶唑基酮 (3-amino-2-oxazolidone, AOZ) 4种硝基呋喃类药物代谢物。采用含100 g/L三氯乙酸的甲醇-水 (50:50, V/V) 溶液提取, 邻氯苯甲醛衍生, 经乙酸乙酯萃取、异辛烷净化, 以0.05 mol/L乙酸铵-乙腈 (30:70, V/V) 为流动相, 反相高效液相色谱分析, 外标法定量。结果表明, 4种待测物在0.1~50 nmol/mL 浓度范围内线性良好, 检出限分别为SEM 0.75 µg/kg、AHD 1.2 µg/kg、AMOZ 2.0 µg/kg、AOZ 1.0 µg/kg。停药后4种硝基呋喃类药物代谢物在对虾肌肉内富集最高含量分别为51.5、35.8、79.3 µg/kg和127 µg/kg, 代谢物残留低于0.5 µg/kg所需代谢时间为SEM 21 d、AHD 15 d、AMOZ 17 d和AOZ 23 d。

**关键词:** 高效液相色谱; 硝基呋喃代谢产物; 代谢规律; 对虾

## Determination of Nitrofurans Metabolites by High Performance Liquid Chromatography and Their Metabolism in Shrimp

XIN Shao-ping<sup>1,2</sup>, DENG Jian-chao<sup>1</sup>, YANG Xian-qing<sup>1</sup>, CEN Jian-wei<sup>1</sup>, WEI Ya<sup>1</sup>, HAO Shu-xian<sup>1</sup>, LI Lai-hao<sup>1,\*</sup>

(1. National R & D Center for Aquatic Product Processing, Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of nitrofurans metabolites in shrimp has been established. After being extracted by 100 g/L trichloroacetic acid in methanol-water (50:50, V/V), the four metabolites semicarbazide (SEM), 1-aminohydantoin (AHD), 5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxazolidone (AMOZ) and 3-amino-2-oxazolidone (AOZ), were reacted with 2-chlorobenzaldehyde. The analytes were separated in a C<sub>18</sub> column with 0.05 mol/L ammonium acetate-acetonitrile (30:70, V/V) as the mobile phase and detected by a UV detector. SEM, AHD, AMOZ and AOZ were quantified by external standard method. The response signals were all linearly proportional to concentrations of the four metabolites in the range of 0.1–50 nmol/mL, and the limits of detection (LODs) were calculated as 0.75, 1.2, 2.0 and 1.0 µg/kg, respectively. The maximum values of the four metabolites accumulated in shrimp muscle were found to be 51.5, 35.8, 79.3 and 127 µg/kg after the discontinuation of the drugs, and the elimination life turns out to be 21, 15, 17 and 23 days in this study, respectively.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); nitrofurans metabolites; metabolism; shrimp

中图分类号: O657.72; R978.25

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 24-0151-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424029

硝基呋喃类药物是一类被广泛应用于医药、畜牧及水产养殖中防治细菌感染疾病的人工合成广谱抗生素。药物进入动物体内后, 呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑

酮和呋喃它酮分别迅速代谢为胺基脒 (semicarbazide, SEM)、1-氨基-2-内酰脲 (1-aminohydantoin, AHD)、5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻唑烷酮 (5-morpholinomethyl-

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD28B00); 国家现代农业 (罗非鱼) 产业技术体系建设专项 (CARS-49); 广东省水产品质量安全专项 (2130109A-2-1); 省部产学研结合示范基地项目 (2011B090500015); 广东省海洋渔业科技推广专项 (B201300C03)

作者简介: 辛少平 (1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事水产品加工和质量安全研究。E-mail: xinsp86@gmail.com

\*通信作者: 李来好 (1963—), 男, 研究员, 博士, 主要从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: laihao@163.com

3-amino-2-oxazolidone, AMOZ)和3-氨基-2-恶唑基酮(3-amino-2-oxazolidone, AOZ), 这些代谢物以与蛋白结合的形式稳定存在。硝基呋喃类药物有一定的毒性, 尤其代谢物被证实具有致畸、致突变和致癌作用, 而引起高度重视<sup>[1-2]</sup>。虽然世界各国已严令禁止该类药物在食源性动物中的使用, 但硝基呋喃类药物及其代谢物残留仍不断被检出<sup>[3-4]</sup>。此类药物残留检测方法主要有免疫学法<sup>[5-7]</sup>、高效液相色谱法<sup>[8-10]</sup>和液相色谱-质谱联用<sup>[11-15]</sup>等。免疫学法包括酶联免疫和免疫层析法, 灵敏度高、特异性强, 但难免出现假阳性结果, 目前酶联免疫不能同时检测多种代谢物, 胶体金免疫层析法虽可实现同时检测但尚不成熟<sup>[16]</sup>。高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法利用色谱条件将目标物与干扰物分开再检测, 具有灵敏度高、准确度高优点, 被广泛采用。中国农业部于2006年和2008年相继颁布了液相色谱-质谱联用和高效液相色谱-紫外检测法作为食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定的标准方法<sup>[8,11-12]</sup>。液相色谱-质谱联用作为一种检测和确证手段, 被广泛认可, 但因其设备昂贵, 检测成本高, 而难以被大规模推广使用。高效液相色谱法设备价格和检测成本相对较低, 国内大部分实验室配备有高效液相色谱仪, 但标准方法中样品前处理复杂, 步骤繁琐, 给实际操作带来不便, 有必要进行改进。

本实验以对虾为对象, 研究SEM、AHD、AMOZ、AOZ 4种硝基呋喃类药物代谢物在水产品中残留量的测定, 建立以100 g/L三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)-甲醇溶液提取、乙酸乙酯萃取纯化、高效液相色谱-紫外法测定的方法, 简化了操作过程。在此基础上测定了药物在对虾体内的代谢规律, 丰富了硝基呋喃类药物代谢研究的基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*), 采自中国水产科学研究院南海水产研究所深圳大鹏湾养殖基地。

呋喃西林 南昌白云药业有限公司; 呋喃妥因 苏州瑜创生物科技有限公司; 呋喃唑酮 河南科牧动物药业有限公司; 呋喃它酮 济南百纳兽药原料有限公司; 呋喃西林代谢物SEM、呋喃妥因代谢物AHD 德国DR公司; 呋喃唑酮代谢物AOZ、呋喃它酮代谢物AMOZ 德国Witega公司; 乙腈(色谱纯) 美国Sigma-Aldrich公司; 邻氯苯甲醛、冰醋酸、甲醇、TCA、乙酸乙酯、磷酸二氢铵均分析纯; 实验用水均符合GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》一级水的标准。

### 1.2 仪器与设备

1100高效液相色谱(配有二极管阵列检测器) 美国

Agilent公司; 自动平衡离心机 湖南湘仪仪器公司; 分析天平 瑞士Mettler-Toledo公司; 超声波清洗仪 德国Elma公司; RE-2000A旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 试剂的配制

提取液: 含有100 g/L TCA的甲醇-水(50:50, V/V)溶液; 衍生化试剂: 取1 mL邻氯苯甲醛, 溶解于5 mL冰乙酸和20 mL甲醇混合液中; 10 mol/L NaOH溶液: 称取40 g氢氧化钠固体, 溶于蒸馏水, 定容至100 mL; 5 mol/L乙酸铵缓冲液: 称取38.5 g乙酸铵溶于蒸馏水, 定容至100 mL; 50 mmol/L磷酸二氢铵溶液: 称取5.75 g磷酸二氢铵溶于超纯水中, 定容至1 L, 过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜; 标准贮备液(100 nmol/mL): 称取75.1 mg SEM、115.0 mg AHD、102.1 mg AOZ、201.2 mg AMOZ, 溶于30%乙腈-水溶液, 定容至10 mL, 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.3.2 衍生条件的优化

酸碱性对衍生的影响: 分别将代谢物溶于酸性甲醇-水溶液(含TCA)和中性的甲醇-水中衍生30 min, 测定衍生产物含量。

温度对衍生的影响: 将代谢物溶于酸性甲醇-水溶液中, 分别于37、50  $^{\circ}\text{C}$ 和60  $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下衍生, 测定衍生产物含量。

#### 1.3.3 样品前处理的优化

将用药1 d后的南美白对虾肌肉匀浆为样品, 分别考察不同提取方式(水浴振荡法(150 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ )、水浴超声法(37  $^{\circ}\text{C}$ 、35 kHz、强度100%))、不同质量浓度TCA的提取液(20、50、100、150 g/L)、衍生提取时间(2、4、8、12、16、20、24 h), 以及净化时不同液相萃取试剂(二氯甲烷、乙酸乙酯)对结果的影响。具体测定过程如下:

称取试样(5.00 g)置于具塞离心管中, 加提取液(15 mL), 均质, 用5 mL提取液洗涤刀头。加入1 mL衍生化试剂, 密封, 于控温水浴摇床振荡衍生提取(180 r/min)。之后取出, 4 000 r/min离心5 min, 取上清液; 沉淀再加入提取液(10 mL)悬浮洗涤, 离心、合并上清液, 转移至分液漏斗。加一定量10 mol/L氢氧化钠以及5 mL乙酸铵缓冲液调节并维持pH值中性后, 加50 mL液相萃取剂充分振荡萃取, 分层后弃去水层。再加入一半体积蒸馏水洗涤萃取剂层。收集萃取液于45  $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下减压蒸发至近干。加0.5 mL 30%的乙腈-水溶液和1 mL异辛烷溶解残渣, 离心分层后, 取下层液体, 过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜, 注入高效液相色谱仪测定。

#### 1.3.4 色谱条件的优化

比较不同检测波长和流动相对色谱分离检测的影

响,其他色谱条件不变:色谱柱Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流速1.0 mL/min;柱温30℃;进样量20 μL;检测波长:280~300 nm;流动相:0.05 mol/L磷酸铵-乙腈(30:70, V/V),用氨水或乙酸调节pH值至3.6~7.0。

### 1.3.5 药物在对虾体内的代谢实验

配制含呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑酮和呋喃它酮药物饲料,含量各约为1 g/kg。将养殖至体长4~5 cm的对虾放入试验池,养殖密度约200尾/m<sup>3</sup>;按每天喂养呋喃类药剂100 mg/kg(以体质量计)的剂量投料,连续投喂3 d。最后一次投药后2 h开始采样检测,连续采样直至所有代谢物不检出,期间日换水量10%,养殖水温(27±2)℃。

### 1.3.6 计算公式

样品中硝基呋喃代谢物的含量按以下公式计算:

$$X = \frac{X \times V \times M}{m}$$

式中: $X$ 为样品中代谢物的含量/(μg/kg); $C$ 为提取液中代谢物的浓度/(nmol/mL),即液相色谱仪测定的值; $V$ 为提取液最终定容体积/mL; $M$ 为代谢物摩尔质量/(g/mol); $m$ 为样品的称取量/g。

## 2 结果与分析

### 2.1 衍生条件的优化

硝基呋喃代谢物与邻氯苯甲醛反应生成较稳定的西佛碱化合物,结果表明反应体系酸强度对衍生结果影响不大,该反应无论在酸性或中性条件下进行,结果均相同。因此,反应时只需粗略控制pH值在7.0以下。

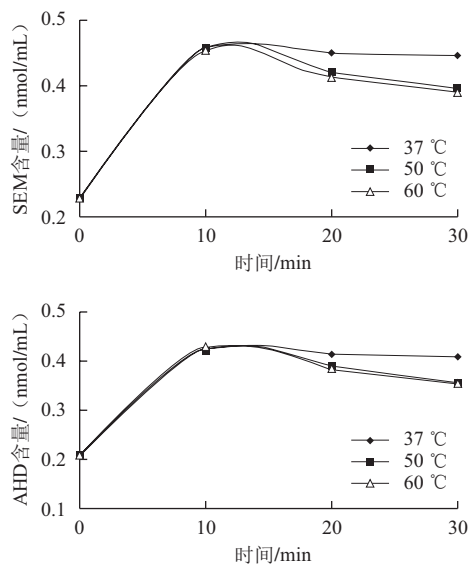


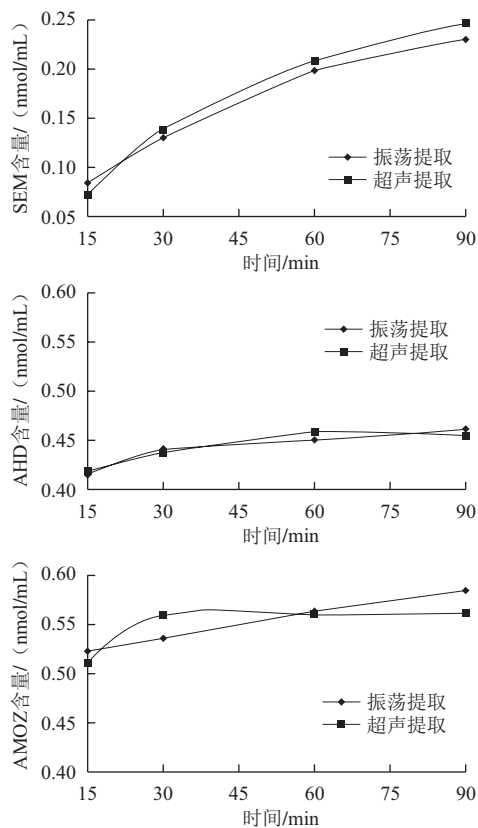
图1 温度对衍生效果的影响

Fig.1 Effect of different temperatures on the derivatization reactions

如图1所示,在各温度条件下衍生,产物在10 min即达到最大值。但随着衍生时间延长,37℃时产物的含量无明显变化,而在较高温度条件下(50、60℃),衍生产物逐渐减少,尤其AMOZ和AOZ的衍生产物降解明显。结果表明,衍生反应不宜在较高温条件下进行,本方法选择在37℃条件下衍生。

### 2.2 样品前处理的优化

#### 2.2.1 提取方式的确定



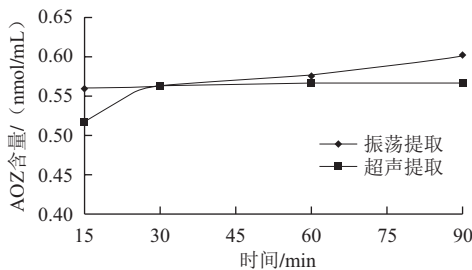


图2 提取方式对提取效果的影响

Fig.2 Effect of different extraction methods on the yield of nitrofur metabolites

如图2所示, 超声波提取和振荡提取2种方法提取4种代谢物的效率相当, 在相同的时间内提取量相近, 无明显地区别。这结果表明超声波并不能更有效促进代谢物从蛋白质结合物中解离。反而在长时间提取过程中, 造成样品温度上升, 这也可能是在提取60 min后超声波提取AMOZ和AOZ结果低于振荡提取的原因, 因二者产物在较高温度条件下降解较快。两种方法中, 短时间内SEM提取量低于其他3种代谢物, 可能是因为SEM与蛋白质的结合较牢固, 需要更长时间水解才能解离出来。显然, 振荡法更适合于硝基呋喃类药物代谢物的提取。

2.2.2 提取液中TCA质量浓度确定

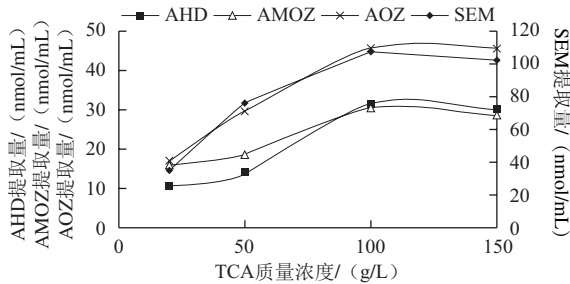


图3 TCA质量浓度对提取量的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of trichloroacetic acid on the yield of nitrofur metabolites

如图3所示, 在37℃水浴振荡条件下提取12 h, 4种代谢物提取量随着TCA质量浓度的增加而增加, TCA质量浓度为100 g/L时达最大值, 再增加TCA质量浓度, 提取量不再增加。

2.2.3 提取时间的确定

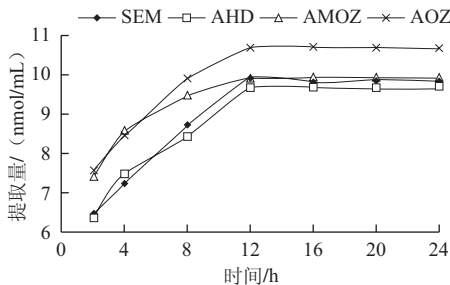


图4 提取时间对提取量的影响

Fig.4 Effect of different extraction durations on the yield of nitrofur metabolites

提取时间对结果的影响如图4所示, 衍生产物含量随着时间的延长而上升, 提取12 h后达到最高值, 之后随时间变化增长不明显。因此提取时间应大于12 h。

2.2.4 提取次数的确定

为考察方法的提取能力, 实验以含药南美白对虾肌肉为样品, 加入15 mL提取液(100 g/L TCA)和1 mL衍生化试剂, 均质, 37℃水浴振荡提取12 h, 离心, 取上清液, 为1次提取液; 再分别提取第2、3次, 测定衍生产物含量。结果如表2所示, 使用规定方法提取样品中4种代谢物, 1次提取其提取率达75%以上可满足日常样品分析, 样品经2次提取则超过96%, 方法提取效果较好。为缩短检测时间, 本实验采用1次提取后再加少量提取液洗涤沉淀的操作方式, 其提取率可达80%以上, 可满足分析要求。

表2 提取次数对提取率的影响

Table 2 Effect of different extraction cycles on the yield of nitrofur metabolites

提取次数	测定含量/(nmol/mL)				提取率/%			
	SEM	AHD	AMOZ	AOZ	SEM	AHD	AMOZ	AOZ
1	7.60	3.24	2.56	4.25	78.4	79.1	84.3	77.6
2	1.69	0.699	0.409	1.02	17.4	17.1	13.5	18.6
3	0.412	0.158	0.067 2	0.206	4.3	3.9	2.2	3.8

2.2.5 净化溶剂的确定

用二氯甲烷和乙酸乙酯分别萃取水相中衍生产物, 结果表明二氯甲烷萃取能力较弱, 1次萃取率(萃取体积比1:1时)不足50%, 而乙酸乙酯萃取效果较好, 能达90%以上。为确定适合的试剂用量, 对比了不同萃取比的萃取效率, 结果如表3所示。当乙酸乙酯和样品液体积比1.5:1时, 1次萃取率超过95.9%, 再增加用量对结果提升不明显。另外, 在萃取时用等体积水对乙酸乙酯层进行洗涤, 可以有效除去乙酸乙酯层的水溶性杂质, 且不会对衍生物造成损失。

表3 溶剂体积比对萃取率的影响

Table 3 Effect of different volume ratios of ethyl acetate to extract on the recovery of nitrofur metabolites

组分	V(乙酸乙酯):V(提取液)			
	0.5:1	1:1	1.5:1	2:1
SEM	81.8	91.0	97.0	97.4
AHD	85.3	92.7	97.9	97.5
AMOZ	84.7	90.8	95.9	97.4
AOZ	86.6	91.9	98.1	97.9

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 流动相的选择

流动相的pH值对AMOZ衍生物的出峰时间及峰形有一定影响, 其出峰时间随着pH值变化而变化, 对其他3种则影响不大。当pH值为5.2时, AMOZ与AOZ峰重叠不能分开; pH>5.6时, AMOZ在AOZ之后出峰, 出峰



较靠后, 峰宽变宽;  $4.3 < \text{pH} < 4.8$  时, AMOZ 在 AHD 与 AOZ 之间出峰, 各峰互不干扰, 峰形对称;  $\text{pH} < 3.6$  时, AMOZ 最早出峰, 与样品杂质峰重叠, 不能分开。以  $0.05 \text{ mol/L}$  磷酸铵-乙腈 (30:70,  $\text{pH} 4.6$ ) 作为流动相, 各峰分离较好, 峰形对称美观 (图5、6)。

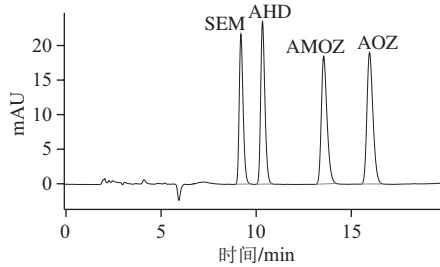


图5 标准品色谱图

Fig.5 Chromatogram of mixed standard solution of nitrofuran metabolites

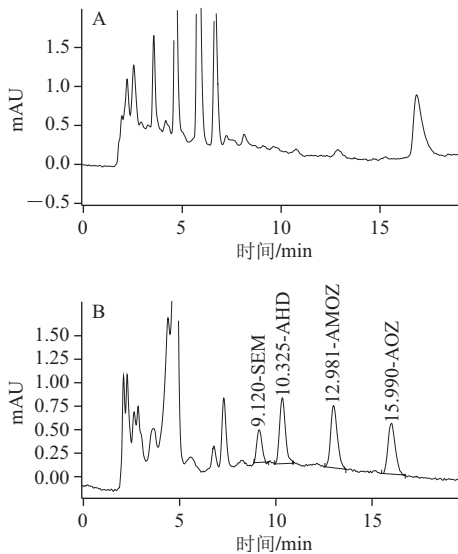


图6 虾肉空白 (A) 和加标30 nmol/kg (B) 色谱图

Fig.6 Chromatograms of a blank sample of shrimp alone (A) and spiked with nitrofuran metabolites (B) (30 nmol/kg)

### 2.3.2 检测波长的选择

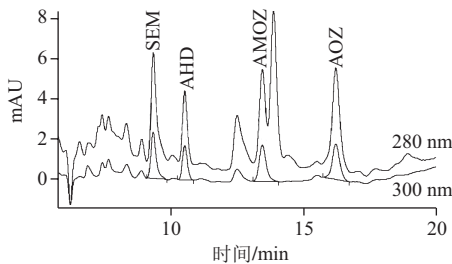


图7 280 nm和300 nm检测波长处的样品色谱图

Fig.7 Chromatogram of sample at 280 and 300 nm

4 种代谢物在  $280 \text{ nm}$  波长处有最强吸收, 但在  $280 \text{ nm}$  波长处检测样品时, 样品中的基质也有较强的吸

收, 对目标峰造成干扰。图7为虾肉加标样品色谱图, 在  $280 \text{ nm}$  波长处检测时, 基线波动较大, 且有明显杂质峰干扰。使用  $300 \text{ nm}$  作为检测波长时, 杂质峰明显减小, 尤其 AMOZ 右侧的干扰物质基本不出峰, 基线相对较平稳, 信噪比比  $280 \text{ nm}$  时高, 因此选择  $300 \text{ nm}$  作为检测波长。

### 2.4 方法线性范围、检出限和回收率

配制不同浓度代谢物混合标准液, 加入提取液后, 经衍生、萃取、浓缩等处理, 用液相色谱分析, 测定不同浓度工作液的峰面积, 绘制峰面积-浓度校正曲线, 在  $0.1 \sim 50 \text{ nmol/mL}$  范围内, 各物质标准曲线线性良好, 相关系数均大于  $0.990$ , 以各峰信噪比为3时对应的浓度作为检出限, 代入公式计算各物质浓度, 得各物质检出限。用规定方法测定 SEM、AHD、AMOZ 和 AOZ 检出限依次为  $0.75$ 、 $1.2$ 、 $2.0$ 、 $1.0 \mu\text{g/kg}$  (表4)。

表4 硝基呋喃类药物代谢物线性方程及检出限

Table 4 Linear equations and detection limits of nitrofuran metabolites

组分	线性方程	相关系数 $r$	线性范围/ ( $\text{nmol/mL}$ )	检出限/ ( $\mu\text{g/kg}$ )
SEM	$y = 19.869x - 3.7021$	0.9984	$0.1 \sim 50$	0.75
AHD	$y = 20.17x - 4.2384$	0.9976	$0.1 \sim 50$	1.2
AMOZ	$y = 28.855x - 4.4613$	0.9992	$0.1 \sim 50$	2.0
AOZ	$y = 32.979x - 2.7465$	0.9993	$0.1 \sim 50$	1.0

另以阴性虾样为样品, 添加代谢物水平分别为  $0.020$ 、 $0.20$ 、 $2.0 \mu\text{mol/kg}$ , 每个水平做3个平行, 加标充分混匀, 静置2 h 以上后, 样品按规定方法进行提取、净化、检测, 4 种代谢物在虾样中的回收率在  $81.9\% \sim 92.1\%$ , 相对标准偏差 (relative standard deviations, RSD) 为  $1.4\% \sim 7.9\%$  (表5), 准确度较高。

表5 加标回收率和相对标准偏差 ( $n=3$ )

Table 5 Recoveries and relative standard deviations for spiked blank samples ( $n=3$ )

组分	加标量/ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	测定值/ ( $\mu\text{mol/kg}$ )				回收率/%	RSD/%
		1	2	3	平均		
SEM	0.02	0.0169	0.0180	0.0198	0.0182	91.1	7.9
	0.2	0.193	0.180	0.179	0.184	92.1	4.3
	2.0	1.65	1.84	1.66	1.72	85.9	6.3
AHD	0.02	0.0171	0.0156	0.0178	0.0168	84.2	6.9
	0.2	0.185	0.180	0.184	0.183	91.4	1.4
	2.0	1.65	1.69	1.58	1.64	81.9	3.4
AMOZ	0.02	0.0172	0.0163	0.0159	0.0165	82.4	4.1
	0.2	0.197	0.175	0.171	0.181	90.5	7.6
	2.0	1.66	1.68	1.64	1.66	83.1	1.4
AOZ	0.02	0.0170	0.0185	0.0195	0.0183	91.7	6.8
	0.2	0.185	0.175	0.193	0.184	92.1	4.8
	2.0	1.70	1.77	1.73	1.74	86.8	2.0

### 2.5 药物在对虾体内的代谢规律

#### 2.5.1 代谢物在对虾肌肉内残留情况

硝基呋喃药物在虾体内残留测定结果见表6。用药

后SEM、AHD、AM0Z和AOZ在虾体内富集最高含量分别为51.5、35.8、79.3 μg/kg和127 μg/kg；前期药物代谢较快，停药2 d后分别降为17.0、9.27、22.1 μg/kg和29.2 μg/kg，分别约消除67.0%、74.2%、72.2%和77.0%；但该类药物后期代谢较慢，分别在第24、12、12、24天后低于检出限。

表6 硝基呋喃类药物代谢物在对虾肌肉内的代谢情况  
Table 6 Nitrofurantol metabolite residues in shrimp muscle

μg/kg				
时间	SEM	AHD	AM0Z	AOZ
0	33.7±1.82	15.8±0.51	28.7±4.71	36.6±10.09
2 h	51.5±3.52	35.8±1.87	79.3±8.12	127±8.66
4 h	31.8±2.96	28.9±1.21	64.7±4.66	73.8±6.11
12 h	26.3±0.49	17.8±1.39	37.8±1.77	53.5±0.81
1 d	23.6±0.70	15.2±1.06	34.2±1.32	35.2±1.07
2 d	16.9±1.01	9.27±1.25	22.1±1.25	29.2±5.83
3 d	13.9±1.32	6.17±1.39	16.3±0.64	23.9±3.47
4 d	11.0±0.91	4.49±1.06	11.6±0.89	15.1±4.06
6 d	7.26±0.61	2.80±0.46	7.27±1.29	10.9±3.56
8 d	4.66±0.83	1.62±0.25	4.82±0.64	6.37±2.86
10 d	3.42±0.09	1.43±0.39	2.76±0.89	3.45±1.52
12 d	1.79±0.15	ND	ND	2.43±0.68
16 d	1.23±0.18	ND	ND	1.50±0.14
20 d	0.77±0.19	ND	ND	1.02±0.14
24 d	ND	ND	ND	ND

注：ND.低于检出限，未检出。

2.5.2 代谢物在对虾肌肉中代谢规律分析

表7 代谢物在对虾肌肉中的药代动力学参数  
Table 7 Pharmacokinetic parameters of SEM, AHD, AM0Z and AOZ in shrimp muscle

参数	SEM	AHD	AM0Z	AOZ
$A/(\mu\text{g/L})$	8.615	22.156	78.913	60.212
$\alpha/\text{h}^{-1}$	0.01	0.048	0.025	0.022
$B/(\mu\text{g/L})$	9.851	9.847	38.234	13.661
$\beta/\text{h}^{-1}$	0.01	0.009	0.011	0.006
$K/\text{h}^{-1}$	0.107	16.253	88.453	37.317
$K_a/\text{h}^{-1}$	0.01	17.872	1.236	9.498
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	69.315	14.414	2.770	30.880
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	69.315	69.315	62.205	69.315
$t_{1/2K_a}/\text{h}$	69.315	0.039	0.561	0.073
$V_{1/F}/(\text{L/kg})$	2.349	3 131.098	991.802	1 356.544
$CL/F/(\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg}))$	0.002	63.554	26.739	19.284
$AUC_{0\sim t}/(\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h}))$	8 812.282	1 463.611	3 476.510	4 985.465
$AUC_{0\sim\infty}/(\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h}))$	11 754.980	1 573.455	3 739.803	5 185.742
$K_{10}/\text{h}^{-1}$	0.000	0.020	0.027	0.014
$K_{12}/\text{h}^{-1}$		0.016	0.133	0.006
$K_{21}/\text{h}^{-1}$		0.022	0.101	0.012
$T_{\text{max}}/\text{h}$	2.000	1.000	2.000	2.000
$C_{\text{max}}/(\mu\text{g/L})$	51.500	35.800	79.280	127.220

注：A.分布相的零时截距；α.分布速率常数；B.消除相的零时截距；β.消除速率常数；K.表观吸收速率常数；K<sub>a</sub>.药物自体内消除速率常数；t<sub>1/2α</sub>.分布半衰期；t<sub>1/2β</sub>.消除半衰期；t<sub>1/2K<sub>a</sub></sub>.吸收半衰期；V<sub>1/F</sub>.表观分布容积；CL/F.体内总清除率；AUC<sub>0~t</sub>.0~t时的药时曲线下总面积；AUC<sub>0~∞</sub>.0~∞的药时曲线下总面积；K<sub>10</sub>.描述药物从中央室消除的一级速率常数；K<sub>12</sub>.由中央室到浅外室的一级转运速率常数；K<sub>21</sub>.药物由浅外室到中央室的一级转运速率常数；T<sub>max</sub>.达峰时间；C<sub>max</sub>.峰质量浓度。

硝基呋喃类药物代谢物在对虾肌肉中残留数据经DAS 2.0分析，其主要药代动力学参数见表7。4种代谢物在肌肉中的SEM、AHD和AOZ代谢半衰期同为69.315 h，AM0Z为62.205 h。在本研究中，以半衰期推算，代谢物在对虾肌肉中残留量低于0.5 μg/kg所需代谢时间分别约为：SEM 21 d、AHD 15 d、AM0Z 17 d、AOZ 23 d。

3 讨论

3.1 样品提取

硝基呋喃代谢物在样品中以蛋白结合物的形式存在，大多数方法中样品提取时使用盐酸水解<sup>[11-15,17-23]</sup>，较少使用TCA<sup>[8]</sup>。研究对比了两种酸的提取效果，盐酸提取液浑浊黏稠，含有大量的杂质，主要是由于提取过程促进了蛋白质的水解而使大量的蛋白多肽溶入，影响了之后的萃取纯化；而由于TCA兼具沉淀蛋白的作用，提取液较澄清，杂质少。提取液中TCA质量浓度对提取率影响较大，从20 g/L增加到100 g/L，溶剂的提取能力显著提高，100 g/L时达到最高值。提取液中甲醇也有助提作用，仅用含TCA的水溶液提取率低于含甲醇的提取剂，尤其对AHD、AM0Z、AOZ三种代谢物的影响更为明显。另外，有些研究者采用冰温的甲醇和水的混合液洗涤样品<sup>[11-12,15,23]</sup>，认为有去杂质的作用，但本研究中发现甲醇和水的混合液（8:1）洗涤喂药南美白对虾样品，在洗涤液检测出了一定含量的AHD、AM0Z和AOZ，造成了目标物的损失，因此，不建议使用甲醇溶液洗涤样品的方式来除杂。

3.2 色谱条件

实验比较了流动相在pH 3.0~7.0之间4种代谢物衍生物在反相色谱柱上分离情况，除AM0Z外，其余3种代谢物几乎不受流动相pH值变化影响，当流动相在pH 4.3~4.8之间时，4种代谢物的分离效果较好。比较缓冲盐使用乙酸铵或磷酸铵对代谢物的分离效果，结果表明分离情况相似。磷酸铵缓冲液不需调节pH值，避免因调节不精确而造成色谱分离不稳定的问题。与农业部1077号公告规定的方法比较，本方法流动相配制简便。另外，以0.05 mol/L磷酸铵（pH 4.6）-乙腈（30:70）为流动相等度洗脱，样品在Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>、GraceSmart RP-18、Athena C<sub>18</sub>-WP色谱柱上分离良好，方法的适用性较好。

3.3 药物消除时间

一般来说，硝基呋喃类药物代谢物在动物体内与蛋白稳固结合，消除缓慢。张海琪等<sup>[24]</sup>研究呋喃唑酮在凡纳滨对虾体内的代谢，AOZ在肌肉中富集最高含量为210 μg/kg，消除半衰期长达505 h；王明兴等<sup>[25]</sup>研

究呋喃西林代谢, 其代谢物SEM在对虾肌肉内富集达361  $\mu\text{g/kg}$ , 消除半衰期也长达11.75 d; 表明了这类药物一旦使用, 短时间内难以消除。但本实验结果则为, 药物残留低于0.5  $\mu\text{g/kg}$ 所需代谢时间为SEM 21 d、AHD15 d、AMOZ 17 d和AOZ 23 d, 相对较短。硝基呋喃类药物在动物体内的消除速率, 与种属、用药方式、富集含量、水温、期间换水情况等因素有关<sup>[25-27]</sup>。本研究对虾体内药物富集浓度较低, 养殖水温在25~29  $^{\circ}\text{C}$ , 日换水量达10%, 这可能是本研究药物代谢周期短的原因。除此之外, 也可能与用药对象龄期(个体大小)有较大关系。赵东豪等<sup>[28]</sup>对虾苗的代谢实验, SEM(初始含量518  $\mu\text{g/kg}$ ) 在虾苗体内残留时间最长不超过50 d, AOZ(初始含量173  $\mu\text{g/kg}$ ) 在虾苗体内残留时间最长不超过20 d, 结果与本实验类似。对于对虾而言, 其生长较快, 体质量成倍增加而引起的稀释作用影响很大, 通常对小虾如虾苗用药, 药物消除半衰期更短。本研究使用体长约为4.5 cm、体质量约为3 g的小虾为用药对象, 养殖28 d后, 体长增至约6 cm, 体质量约增至原来3倍, 这可能是硝基呋喃类药物在本研究中代谢周期较短的一大主因。

#### 4 结 论

本实验建立以100 g/L TCA-甲醇溶液提取、乙酸乙酯萃取纯化、高效液相色谱-紫外法测定4种硝基呋喃类药物代谢物在虾肉组织中残留量的方法, 优化了提取过程和除杂步骤, 不需使用固相萃取柱净化, 简化了操作。方法检出限分别为SEM 0.75  $\mu\text{g/kg}$ 、AHD 1.2  $\mu\text{g/kg}$ 、AMOZ 2.0  $\mu\text{g/kg}$ 、AOZ 1.0  $\mu\text{g/kg}$ 。使用该方法监测硝基呋喃类药物代谢物在中等规格的南美白对虾体肌肉内的残留, 以模拟在养殖中间阶段用药的情况, 结果表明, 代谢物在对虾肌肉中残留量低于0.5  $\mu\text{g/kg}$ 所需代谢时间分别约为: SEM 21 d、AHD 15 d、AMOZ 17 d、AOZ 23 d。

#### 参考文献:

- [1] BARTEL L C, de MECCA M, CASTRO J A. Nitroreductive metabolic activation of some carcinogenic nitro heterocyclic food contaminants in rat mammary tissue cellular fractions[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(1): 140-144.
- [2] VASS M, HRUSKA K, FRANEK M. Nitrofurant antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis[J]. Veterinarni Medicina, 2008, 53(9): 469-500.
- [3] 陈威风, 陈敬鑫. 肉制品中硝基呋喃类药物残留的研究进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(12): 53-57.
- [4] 禁用药物中孔雀石绿、氯霉素和硝基呋喃类使用频率高[J]. 海洋与渔业, 2011(11): 2.
- [5] 柳爱春, 刘超, 赵芸, 等. 免疫胶体金法快速检测水产品中硝基呋喃类代谢物的研究[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(1): 95-102.
- [6] 潘心红, 邓艳芬, 李军涛, 等. 用胶体金试纸法直接测定鱼肉中硝基呋喃类残留的方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 568-569.
- [7] 潘心红, 罗晓燕, 李军涛, 等. 直接测定虾类硝基呋喃类残留量方法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 740-741.
- [8] 全国水产标准化技术委员会, 水产品加工分技术委员会. 农业部1077号公告-2—2008 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定: 高效液相色谱法[S]. 2008.
- [9] 王媛, 蔡友琼, 贾东芬, 等. 高效液相色谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 分析实验室, 2009, 28(12): 86-90.
- [10] DU Nana, CHEN Mingming, SHENG Liangquan, et al. Determination of nitrofurant metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1327: 90-96.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20752—2006 猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [12] 农业部. 农业部公告781-4—2006 动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定: 高效液相色谱-串联质谱法[S]. 2006.
- [13] 于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基胍的含量[J]. 分析化学, 2012, 40(10): 1530-1535.
- [14] 邢丽红, 孙伟红, 李兆新, 等. 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法快速测定水产品中硝基呋喃类代谢物[J]. 环境化学, 2011, 30(6): 1202-1203.
- [15] 刘红卫, 高志莹, 周围, 等. UPLC-MS/MS法测定肠衣中四种硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(11): 20-23.
- [16] 刘辉, 梁德沛, 花铁果, 等. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 383-388.
- [17] 杨奕, 邵兵. 超高压液相色谱-串联质谱法测定虾中硝基呋喃代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 135-140.
- [18] 王传现, 黄帆, 王敏, 等. 液相色谱-串联质谱法检测水产品中残留的硝基呋喃类药物的代谢物[J]. 色谱, 2013, 31(3): 206-210.
- [19] 张秀妍, 马琳, 王慧龙. 海参和海参苗中硝基呋喃类代谢物残留的液质联用检测法[J]. 口岸卫生控制, 2012, 17(6): 24-28.
- [20] 祝伟霞, 袁萍, 杨冀州, 等. 固相支撑液液萃取-平行蒸发前处理技术测定动物源性食品中4种硝基呋喃类代谢物[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 300-303.
- [21] 孙慧宇, 陈君义, 王玥, 等. 液相色谱-同位素稀释串联质谱法测定动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留[J]. 分析实验室, 2011, 30(7): 115-118.
- [22] 钱卓真, 位绍红, 余颖, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鲍鱼中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 福建水产, 2010(2): 43-49.
- [23] 庞国芳, 张进杰, 曹彦忠, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定家禽组织中硝基呋喃类抗生素代谢物残留的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 160-165.
- [24] 张海琪, 丁雪燕, 薛辉利, 等. 呋喃唑酮在凡纳滨对虾组织中代谢动力学研究[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(4): 472-476.
- [25] 王明兴, 吴晓萍, 廖艳, 等. 呋喃西林代谢物在凡纳滨对虾体内代谢及残留[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 76-80.
- [26] 樊新华, 郑浩, 钱伟, 等. 呋喃西林代谢物氨基胍在中华绒螯蟹体内的衰减研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 368-370.
- [27] 蒋原, 丁涛, 徐锦忠, 等. 硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中消除规律的研究[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(2): 34-37.
- [28] 赵东豪, 黎智广, 李刘冬, 等. 虾苗使用呋喃西林和呋喃唑酮的残留评估[J]. 南方水产科学, 2012, 8(3): 54-58.