

动物源食品中硝基呋喃类物质及其代谢物残留的检测技术研究

徐一平, 胥传来

(江南大学食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要: 呋喃类物质由于它的强毒性和致癌的副作用, 已引起世界各国的高度重视。由于呋喃类物质在动物体内稳定性较差, 而其代谢物与组织蛋白结合可以形成稳定的化合物, 故对于呋喃类物质代谢物的研究和检测的意义就显得更为重要。本文介绍了硝基呋喃类物质的基本种类, 分为呋喃唑酮(furazolidone), 呋喃西林(nitrofurazone), 呋喃妥因(furantoin)和呋喃它酮(furaltadone) 及相应的理化特性和目前国内外的应用情况。着重介绍了硝基呋喃类物质代谢物的种类, 分为呋喃唑酮(AOZ)、呋喃它酮(AMOZ)、呋喃西林(SEM)和呋喃妥因(AHD), 及其毒性和危害; 目前各国常用的检测方法有液相色谱-紫外法(HPLC-UV)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)和酶联免疫法(ELISA)。比较了各种方法的工作原理、适用范围以及各自的特点。重点介绍了酶联免疫法(ELISA)的基理、分析方法和注意事项。并就目前国内硝基呋喃类物质代谢物相关检测标准的不足, 提出了建议。

关键词: 动物源性食品; 硝基呋喃类物质及代谢物; 检测

Determination Overview on Nitrofurant Antibiotics and Their Metabolites Residues in Animal Foods Type

XU Yi-ping, XU Chuan-lai

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Many countries have paid great attentions to nitrofurant antibiotics due to their intense toxicity and carcinogenic effect. Nitrofurant has poor stability inside the animals. Its metabolites can bind the protein to form steady compound. So the determination results of nitrofurant metabolites are very essential. This paper introduced furazolidone, nitrofurazone, furantoin and furaltadone as the basic constituents of nitrofurant. The paper laid emphasis on the kinds, the toxicity and the harms of nitrofurant metabolites, AOZ(3-amino-2-oxazolidinone), AMOZ(3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone), SEM(semicarbazide) or AHD(1-Aminohydantoin hydrochloride). At present the common determination methods are HPLC-UV(high performance liquid chromatography-ultraviolet), LC-MS(high performance liquid chromatograph/mass spectrum), LC-MS/MS and ELISA(enzyme linked immunosorbent assay). Different elements, applying range, peculiarities of various methods had been compared and ELISA was emphasized particularly on. The paper also made individual suggestions to the deficiency concerned with the determination standards of nitrofurant metabolites in China nowadays.

Key words: animal food; nitrofurans and their metabolites; determination

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0590-04

1 硝基呋喃类物质的使用

1.1 理化性质和作用

硝基呋喃类抗生素(nitrofurant antibiotics)主要是指呋喃唑酮(furazolidone)、呋喃西林(nitrofurazone)、呋喃妥因(furantoin)和呋喃它酮(furaltadone) 为一类广谱抗生素对革兰阳性及阴性菌均有一定抗菌作用。呋喃类物质均

为性质稳定的黄色粉末, 无味或味微苦。呋喃西林难溶于水(1:4200), 微溶于乙醇(1:590), 呋喃唑酮几乎不溶于水和乙醇; 呋喃妥因几乎不溶于水, 微溶于乙醇。

呋喃类药物抗菌谱较广, $5 \times 10^{-6} \sim 10 \times 10^{-6}$ 即能抑制多种革兰氏阳性和阴性菌, $20 \times 10^{-6} \sim 50 \times 10^{-6}$ 有杀菌作用, 对某些原虫、真菌亦有一定作用。其抗菌力不受血液、粪便、脓汁和组织分解产物影响, 外用

收稿日期: 2006-05-14

作者简介: 徐一平(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向食品安全和质量监控。

对组织刺激性小,细菌对本类药物亦较少产生耐药性。呋喃西林曾用于禽白痢病和兔球虫病,但毒性太大,现多外用抗感染。呋喃唑酮可用于肠道感染和球虫病。呋喃妥因是治疗泌尿道的常用药物。作为医药,呋喃唑酮用于治疗细菌和原虫引起的腹泻、结肠炎和霍乱等^[1]。

1.2 应用情况

呋喃唑酮可用于治疗小儿菌痢、伤寒、消化性溃疡等疾病,呋喃唑酮的复方缓释制剂是卫生部批准的抗HP(HP是胃溃疡的主要致病菌)感染的药物。呋喃唑酮用于防治水生动物疾病,如用 $1 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-6}$ 防治观赏鱼蛀鳍烂尾病和罗非鱼溃烂病。呋喃唑酮用于罗氏沼虾、鳊鱼、对虾和河蟹等水生动物养殖环境的消毒药物。呋喃唑酮用于防治畜禽肠道感染,如兔球虫病、猪痢疾、禽白痢、火鸡黑头病等^[2]。呋喃西林一般用作外用消毒药物,也有拌饵投喂防治水生动物疾病,或防治幼兔球虫病的报道。据化学医药行业2001年上半年分析,呋喃唑酮产量上升7%。

2 硝基呋喃类物质及其代谢物的危害

硝基呋喃类药物及其对应的代谢产物有呋喃唑酮(AOZ)、呋喃它酮(AMOZ)、呋喃西林(SEM)和呋喃妥因(AHD)。但有关研究证明,硝基呋喃类药物及其代谢物具有相当大的毒性和副作用,能诱导有机体基因突变,有致畸胎的诱导作用,且能诱发癌症,因而引起了人们的高度重视。美国和日本分别于1975年、1977年禁止呋喃唑酮作为医药使用。美国1993年禁止呋喃唑酮作为兽药。欧盟在1995年禁止使用呋喃西林^[1]。

呋喃唑酮(AOZ)为硝基呋喃类药物中最具代表性的一种,以呋喃唑酮(AOZ)为例。动物服用呋喃唑酮后,原药分子在动物体内迅速代谢,其在体内的稳定性不超过几小时;代谢的部分化合物分子与细胞膜蛋白结合成为结合态,结合态可长期保持稳定,从而延缓原药在体内的清除速度。而普通的食品加工方法(如烧烤、微波加工、烹调等)难以使蛋白结合态呋喃唑酮残留物大量降解,食用含有该残留物的肉制品会对人体产生一定的毒副作用。研究表明:蛋白结合态的呋喃唑酮残留物含有称为3-氨基-2-呋喃酮(AOZ)的完整侧链,在人胃的弱酸性条件下,侧链可以从蛋白结合态的母体分子上解离下来,AOZ可以代谢成为 β -羟乙基肼,该代谢物是致突变和致癌化合物。同样硝基呋喃类物质的其他代谢物AMOZ、SEM、AHD等都能在体内与细胞膜蛋白结合形成稳定的结合态长期存在,对人体产生毒副作用^[3-4]。

欧盟(EU)从1997年开始将所有的硝基呋喃类抗生素全部列为违禁药物。1990年7月欧盟颁布2377/90/EEC条例,将硝基呋喃类药物及其代谢产物列为A类禁用药物,规定其在动物源性食品中的残留检测限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$

^[7]。由于对呋喃唑酮蛋白结合态残留物的安全性产生怀疑,自1995年起欧盟全面规定禁止使用呋喃类抗菌物质,在动物源性食品中呋喃类残留物的检出限为不得检出。2004年美国FDA公布了禁止在进口动物源性食品中使用的11种药物名单,其中包括呋喃西林和呋喃唑酮。我国农业部文件农牧发[2002]1号也规定动物源性食品中呋喃唑酮的检出限为不得检出。

目前国内外都对呋喃类物质的控制相当严格,各国对于测定的标准都有明确的规定。美国21CFR530.41规定:食源性动物禁止使用呋喃唑酮和呋喃妥因。韩国2002年版《食品公典》规定猪肉中不得检出呋喃唑酮。欧盟EEC2377/90规定动物源性食品中不得检出硝基呋喃(包括呋喃唑酮)。在我国,呋喃唑酮是农业部禁用抗菌素类药物之一。欧盟(EU)N0807/2001法规中,规定使用HPLC方法检测呋喃唑酮,检测限量 $2 \times 10^{-9} \sim 4 \times 10^{-9}$ 。我国目前使用行业标准SN0530-1996出口肉品中呋喃唑酮残留量检验方法:液相色谱法,检测限量 0.1×10^{-6} ^[10-11]。

3 硝基呋喃类物质及其代谢物的种类和检测

3.1 硝基呋喃类物质代谢物的种类

硝基呋喃类物质在动物体内迅速分解,其原位稳定性只有数小时,因此,测定硝基呋喃类抗生素母体就显得没有意义。通过C标记的呋喃唑酮代谢物研究表明,其代谢产物可以与蛋白质紧密结合,形成稳定的残留物,残留时间达数周之久,甚至在蒸煮、烘烤、磨碎和微波加热过程中也无法有效降解。经过适当的酸性水解,可以使这些代谢物解离出来,其他三种代谢物也有类似的发现报道^[6]。当原药浓度降至检测限以下时,检测其代谢物浓度是可能的,测定其代谢物就等价于测定硝基呋喃类药物。因此检测硝基呋喃类药物的代谢产物,更能起到监控作用。目前欧盟对硝基呋喃类代谢物的检测方法灵敏度规定为 1g/kg 。硝基呋喃类药物及其对应的代谢产物有呋喃唑酮(AOZ)、呋喃它酮(AMOZ)、呋喃西林(SEM)和呋喃妥因(AHD)。

3.2 硝基呋喃类物质代谢物的检测

硝基呋喃代谢产物(AOZ、AMOZ、SEM、AHD)可在酸性条件下被水解,同时可用2-硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde NBA)衍生化,经提取和进一步净化,残留量可用液相色谱-紫外法(HPLC-UV)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)或酶联免疫法(ELISA)进行检测。

HPLC法和LC-MS法是目前国际上最常用来测定呋喃唑酮的方法。这两种方法检测的基本过程都是将样品粉碎后利用有机溶剂或其他方法去除水分,再用有机溶剂(如乙酸乙酯)洗脱,然后浓缩、流动相溶解、净化、

上机检测,虽然目前有利用固相萃取柱(SPE)对溶液进行浓缩净化,但其仍涉及到大量的有机溶剂处理,过程比较复杂,周期也比较长^[12-16]。

通常用高效液相色谱结合紫外检测器测定硝基呋喃类药物代谢物时,因为呋喃结构的紫外光谱吸收不明显,导致灵敏度过低,不能满足出口产品检测硝基呋喃类代谢产物残留限量的要求^[16]。经衍生化试剂衍生化后,产生强紫外吸收,其检测限可以达到 $1\mu\text{g}/\text{kg}$,但是复杂的基质会导致测定困难和干扰。

近些年来,高效液相色谱配合质谱技术(LC-MS)测定硝基呋喃类代谢物在动物组织中的残留越来越多被采用,与用紫外检测器的检测方法比较,质谱检测器技术具有定性、定量准确,抗干扰能力强,检测限低,测定快速等特点^[8]。对被测化合物的确认有很高的可信度,具有灵敏度高(比UV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。LC-MS法可以利用待测分子的结构来定性,可以排除酶联免疫方法和HPLC法检测的假阳性结果,用以确证检测结果。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,在环境分析中也起着重要作用,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通常采用LC-UV只能检测AOZ和AMOZ,且检出限达不到欧盟规定的要求。欧盟目前认为HPLC-MS只能用于对硝基呋喃代谢产物进行筛选实验,对检出的阳性结果必须再用HPLC-MS/MS进行确证^[9]。欧盟EEC/657/2002指令规定对于禁用药物的质谱确证方法必须达到四个确证点(一个质谱离子为一个确证点)。显然,并非所有的残留检测实验室都具备HPLC-MS/MS仪器条件^[10-11]。

荷兰瓦赫尼罕RIKILT-DLO实验室建立了完整的LC-MS法检测呋喃唑酮代谢物AOZ及其他代谢物^[1]。Horne E等进一步对该方法进行改进,利用SPE简化了衍生后的呋喃唑酮代谢物NPAOZ的提取过程,再用LC-MS法进行定性分析,对检测猪肝中呋喃唑酮代谢物AOZ的不同方法进行比较研究,表明利用HPLC法和LC-MS法测定AOZ的结果基本相同^[12]。目前,HPLC、LC-MS相关联的NPAOZ提取方法已经得到改良,并通过一系列的加标样品研究得以验证。徐维海等采取LC-MS法研究呋喃唑酮及其主要代谢产物AOZ在罗非鱼体内的残留规律,利用该方法对呋喃唑酮及其代谢物AOZ的检出限分别为10、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6]。

LC-UV、LC-MS及LC-MS/MS是用来检测呋喃唑酮(AOZ)、呋喃它酮(AMOZ)、呋喃西林(SEM)和呋喃妥因(AHD)的最常用方法,但在实际操作中需要有LC-

UV、LC-MS及LC-MS/MS等高档仪器,且前处理复杂、烦琐,时间长、成本高、操作技术要求高。而酶联免疫法(ELISA)测定的基础是抗原抗体反应(双抗体反应)^[15]。此外,采用RIDASCREEN呋喃类药物酶联免疫试剂盒可以测定鱼虾、肉类(鸡、猪、牛)和牛奶中的呋喃类药物的残留。对于代谢物的检测,酶联免疫方法(ELISA)结合了色谱技术,采用AOZ、AMOZ、SEM、AHD的特异性抗体,可以有很高的精确度、更灵敏的反应,更强的特异性、不高的技术要求、更短的检测时间和大批量测定等优点^[13]。

竞争性酶联免疫法(ELISA)测定的基础是抗原抗体反应(双抗体反应)。所涉及的设备有组织捣碎机、微孔板酶标仪(450nm)、离心机、振荡器、旋转蒸发器、磁力搅拌器、微量加样器、多道移液器、混合器(旋转后超声)等。各种硝基呋喃类物质代谢物中以AOZ较为典型,以此为例。其原理是:将被测样本中的结合代谢残留物经水解、衍生形成NPAOZ,其与过氧化物酶标记的NPAOZ竞争结合有限的NPAOZ抗体(竞争性酶免疫分析),同时此抗体又与包被在微孔板条上针对它的抗体结合,经洗涤除去未结合的NPAOZ后,加入酶反应底物和生色剂到孔中并且孵育,结合的酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的产物。加入反应终止液后使颜色由蓝转变为黄色。在450nm处测量(选择参比波长>600nm),吸光度与样品中的AOZ浓度成反比^[14]。其分析方法:方法检测限和定量检测限 根据试剂空白 A_{450} 值由校准曲线求出相应浓度,以其3倍标准偏差和10倍标准偏差乘以前处理稀释倍数2分别作为检测限(LOD)和定量检测限(LOQ),得到相应的试剂空白对应的浓度,标准偏差SD;检测限(LOD);定量检测限(LOQ);方法回收率和精密度。添加实验是在阴性样品中加入AOZ标准溶液后按样品前处理和样品分析进行平行实验。得到平均回收率和变异系数RSD;方法重现性。测定了不同批次(n=5)测试时添加实验的变异系数。不同的添加水平,得到相应的平均回收率和变异系数RSD;交叉反应。另外几种硝基呋喃类药物呋喃他酮(AMOZ)、呋喃妥因(AHD)和硝基呋喃酮(SEM)的药代动力学与呋喃唑酮相似,共同的亚糠基主链代谢很快,而相应的侧链AMOZ、AHD和SEM结构差异较大,其NBA衍生物与NPAOZ相比,其 IC_{50} 均大于 $0.5\text{mg}/\text{L}$,即以NPAOZ为基准抗原,它们的交叉反应率均低于0.1%,表明此NPAOZ的蛋白抗体特异性良好^[17]。

在所有恒温孵育过程中,应避免光线照射,用试剂盒中提供的盖板盖住微孔板。对检测量大、条件较好的实验室,可用全自动酶标仪进行检测,上述操作中的加样、孵育、洗板、发色、终止、测量、计算等步骤可全部由全自动酶标仪来完成。对没有全自动

酶标仪的实验室而言,结果计算时也可用由试剂盒供应商提供的数据处理软件经电脑进行处理。因ELISA方法特异性较强,无法同时一次性检测多个项目,如同时要检测样品中的呋喃唑酮及AOZ、呋喃它酮及AMOZ、硝基呋喃妥因及AHD、硝基糠腈(硝基呋喃腈)及SEM,样品数量又不是太多的情况下,则用LC-MS和LC-MS/MS方法较好。

另外,当动物服用硝基呋喃类物质后,即被代谢为各种不同形式的蛋白质结合物,其中的许多代谢物并无毒性^[13]。因此,加标样品并不能实际模拟为含有硝基呋喃类残留药物蛋白质结合体的样品组织,需要对加标样品和实际服用硝基呋喃类物质后的样品进行差异研究,并评估出食用组织中残留药物具有活性的持续时间,以及确定利用标记残留药物(AOZ、AMOZ、AHD、SEM)分析具有生物活性残留药物的有效性。

目前,有关研究已经分析了多种动物源性食品(猪肉、猪内脏、牛肉、鸡肉、鸭肉、鱼、虾、蛋等的鲜样和干制品)中的硝基呋喃类物质原药分子和硝基呋喃类物质的代谢残留物^[18]。由于在水和普通非动物源性食品基质存在呋喃类物质代谢的可能性不大,因此分析时只需检测呋喃类物质原药分子即可。

4 结 论

迄今为止,我国仍有大量养殖户使用呋喃类物质药物,导致出口欧盟的畜产品和水产品由于呋喃类药物检出而就地销毁的事件屡有发生,而且目前我国的动物源性食品中呋喃类药物检测标准仍以呋喃类原药分子作为检测对象,并未对其代谢残留物检测加以规定,这明显滞后于国际研究水平。为此,我国政府应加强对呋喃类物质的生产使用监管力度,加快推行生产加工标准化体系的建设步伐,借鉴美国、欧盟等在畜产品生产和食品工业上实施良好的生产规范(GMP)、危害分析及关键控制点(HACCP)等管理经验,并结合我国畜产品生产的特点,引入全过程质量控制(IKB)的新理念,尤其在畜牧业、水产业等生产全过程实行监管,从而在生产源头控制呋喃类物质残留超标的问题。

我国农业部文件农牧发[2002]1号规定呋喃唑酮不得用于食品性动物,检测未涉及到其代谢物。2004年底我国进出口食品检验检疫局对出口欧盟的肠衣及肉类产品增加了硝基呋喃(呋喃唑酮AOZ、呋喃西林SEM、呋喃它酮AMOZ、呋喃妥因AHD)代谢物项目的检测,但目前仍未见官方颁布相关的检测标准方法。为此,相关标准技术部门应加紧收集和跟踪国外涉及到禽肉产品的规章和研究方法,加强国际合作与交流,加大兽药残留分析方法的技术研究和引进力度,制订和完善我国

药物残留标准,缩小我国标准与国际标准之间的差距。此外,检验部门应不断完善检验手段和设施,提高检验水平,及时掌握国外先进的检验方法并与国际接轨,使检验后的产品符合欧盟等国家的法规要求,确保国内动物源性食品禽肉、鱼虾等的食用安全性,提高我国农产品的国际市场竞争力,保证我国畜禽产品出口贸易的顺利进行。

参考文献:

- [1] 郭桢,连瑾,吴淑君. 动物源性食品中呋喃唑酮及其代谢物的检测[J]. 广东农业科学, 2005(5): 57-59.
- [2] LEITNER P, ZOLLNER P, LINDNER W. Determination of the metabolites of nitrofurant antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatography A, 2001, 939: 49-58.
- [3] 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.
- [4] 葛宝坤,王云凤,常春艳. 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.
- [5] ALEXANDER L, PETER Z, WOLFGANG L. Determination of the metabolites of nitrofurant antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatography A, 2001, 939: 49-58.
- [6] 徐维海,林黎明,朱校斌. HPLC/MS法对呋喃唑酮及其代谢物AOZ在罗非鱼体内残留研究[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 35-39.
- [7] MCCracken R J, SPENCE D E, FLOYD S D. Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone(AOZ), in eggs[J]. Food Additives & Contaminants, 2001, 18(11): 954-959.
- [8] CONNEELY A, NUGENT A, KEEFE M O, et al. Isolation of bound residues of nitrofurant drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection[J]. Ana Chim Acta, 2003, 483: 91-98.
- [9] CONNEELY A, NUGENT A, KEEFE M O. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues[J]. Analyst, 2002, 127: 705-709.
- [10] Commission regulation (EC)2002/250 Off[S]. J Europ Communities, 2002, No. L84: 75-81.
- [11] Commission regulation (EC)2002/251 Off[S]. J Europ Communities, 2002, No. L84: 77-86.
- [12] ALEXANDER L, PETER Z, WOLFGANG L. Determination of the metabolites of nitrofurant antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatography A, 2001, 939: 49-58.
- [13] 林黎明,林回春,刘心同. 固相萃取高效液相色谱-质谱法测定动物组织中硝基呋喃代谢产物[J]. 分析化学, 2005, 33(5): 707-710.
- [14] 罗杰,李建. 呋喃唑酮间接竞争ELISA(cELISA)检测法的建立[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2): 213-218.
- [15] MURPHY B J. LC/MS/MS method detects nitrofurant metabolites[J]. Trac-trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(11): 7-8.
- [16] 郭德华,汪国权. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 化学分析计量, 2005, 14(4): 16-18.
- [17] 秦燕,朱柳明. 水解衍生-酶联免疫分析在动物肌肉中呋喃唑酮代谢物残留量检测中的应用[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 685-688.
- [18] 蒋原,丁涛. 液相色谱-电喷雾质谱联用检测蜂蜜中四种硝基呋喃类代谢物[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(3): 12-15.