

高效液相色谱法检测海水养殖环境中喹诺酮类药物残留

杨守国^{1,2} 李兆新¹ 王清印^{1*} 郭萌萌¹ 谭志军¹ 邢丽红¹ 姚建华^{1,2}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘要 建立了一种养殖海水中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星3种喹诺酮类抗生素残留量的高效液相色谱-荧光测定方法。水样经稀盐酸调pH后经HLB固相萃取柱富集、净化,用外标法定量。结果表明,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星检出限分别是2、1和1 μg/L,定量限分别是6.6、3.3和3.3 μg/L,添加浓度为10、20和50 μg/L时,3种物质的回收率为71.9%~85.3%,批内变异系数≤10%,批间变异系数≤7%。利用该方法对黄海沿岸部分养殖场及近岸海水(北起36°40.303' N, 121°8.939' E;南至35°39.36' N, 119°52.433' E)进行分析,诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的检出质量浓度分别为6.20~982、55.2和11.6~55.4 μg/L。实验结果表明,该方法灵敏度高,重现性好,适用于养殖海水中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的检测。

关键词 喹诺酮类抗生素 高效液相色谱 固相萃取 海水

中图分类号 O661 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0095-07

Determination of quinolones drug residues in aquacultural seawater using HPLC method

YANG Shou-guo^{1,2} LI Zhao-xin¹ WANG Qing-yin^{1*}

GUO Meng-meng¹ TAN Zhi-jun¹ XING Li-hong¹ YAO Jian-hua^{1,2}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Fisheries and Life Science, Ocean University of Shanghai, 201306)

ABSTRACT A detection method of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence was developed for the determination of residues of three quinolones in seawater. pH of water samples were adjusted with dilute HCl followed by extraction and concentration through hydrophilic-lipophilic balance cartridges, and three antibiotic quinolone compounds were determined using external standard quantification method. The results showed that the detection limits of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin were 2 μg/L, 1 μg/L and 1 μg/L respectively, and the quantitative limits were 6.6 μg/L, 3.3 μg/L and 3.3 μg/L respectively. The recoveries from natural seawater ranged from 71.9% to 85.3% when the three antibiotics were added at the concentration of 10 μg/L, 20 μg/L and 50 μg/L for norfloxacin, cipro-

国家科技支撑计划项目(2007BAD 621305)资助

* 通讯作者。E-mail: wangqy@public.qd.sd.cn

收稿日期:2009-11-06;接受日期:2009-12-01

作者简介:杨守国(1982-),男,硕士研究生,主要从事水产品安全及检测技术研究。E-mail: yangshouguo82@163.com, Tel: 15020021862

floxacin and enrofloxacin, respectively. The coefficients of variation within batches were equal or less than 10%, while that among batches were equal or less than 7%. The method has been successfully applied to the monitoring of the residues in the sea water samples from the Yellow Sea near Qingdao (from 36°40.303'N, 121°8.939' E to 35°39.36'N, 119°52.433' E). Norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin were detected at mass concentrations of 6.20~982 µg/L, 55.2 µg/L and 11.6~55.4 µg/L respectively. The results showed that this method possessed high sensitivity and good reproducibility, and can be used for the detection of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in aquacultural seawater.

KEY WORDS Quinolones High performance liquid chromatography (HPLC)
Solid phase extraction Seawater

喹诺酮类(Quinolones, QNs) 抗生素是一族人工合成的新型杀菌性抗菌药物,具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性以及毒副作用小的特点,主要用于水生动物弧菌病、链球菌病、水霉病和寄生性疾病的防治,其中诺氟沙星(Norfloxacin, NF)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)和恩诺沙星(Enrofloxacin, EN)等被广泛应用于水产养殖中。目前,我国针对这类抗生素的研究主要集中于水产品中检测技术和代谢动力学研究(方星星等 2004;钱云云等 2007;曲晓荣等 2007;王洪艳等 2007;何平等 2008;李娜等 2009)。

近年来我国水产养殖业发展迅速,产量和规模不断增加,但由于环境恶化和养殖模式的改变,水生动物疾病频发。为了预防和治疗水生动物疾病,抗生素被广泛应用在水产养殖中。但研究表明,所使用的抗生素仅20%~30%被鱼类吸收,大部分进入环境中(Samuelsen 1989),而这部分抗生素再次进入食物链,可能导致养殖环境中病菌耐药性的产生,导致二次污染(Hamscher *et al.* 2002)。这不仅影响到水产养殖业的健康发展,而且还威胁着生态环境的安全。因此,需要建立水环境中这类药物的检测方法。

顾洁等(2003)建立了高效液相色谱法测定海水中环丙沙星含量的方法,并测定其衰减度,在0~6 h内环丙沙星衰减很快,但6 h后其浓度基本稳定,同时还发现环丙沙星在海水中衰减程度随盐度的增加而加快。谭建华等(2007)利用高效液相色谱法分析了城市河水中的多种抗生素,水样由稀盐酸调pH至4.2后经HLB固相萃取,用内标法通过HPLC进行定量分析。对海水养殖环境中喹诺酮类残留量的检测研究报道较少。为减少海水养殖环境中盐分、浮游生物及微小颗粒对喹诺酮类测定存在的干扰,本研究采用固相萃取技术对海水中的3种喹诺酮类抗生素进行富集和净化处理,采用高效液相色谱荧光检测器测定,建立了诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星3种喹诺酮类抗生素残留检测方法,并测试了青岛附近黄海海水养殖区(从36°40.303'N, 121°8.939' E至35°39.36'N, 119°52.433' E)海水中的喹诺酮的含量,为海水中药物的生态风险评估提供依据。

1 材料与方 法

1.1 海水样品

海水样品采自黄海近岸海水养殖区,包括5个采样点(图1):山东省海阳市大阎家镇某半滑舌鲷养殖场;山东省即墨市鳌山卫镇某大菱鲆养殖场;青岛市太平角海区;青岛市红岛滩涂养殖区;山东省胶南市琅琊镇某海参养殖场。分别用玻璃取样瓶在每个采样点采集500 ml表层海水,4℃密封保存,经0.45 µm醋酸纤维滤膜水相滤膜过滤后使用。

1.2 仪器和试剂

Waters 2695型高效液相色谱仪,配荧光检测器;Visiprep™-DL型固相萃取装置(Supelco);漩涡混合器(德国IKA仪器公司);KQ-600DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q超纯水器(美国Milli-

pore 公司);Laborota400 型旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);Oasis HLB 固相萃取小柱(3 ml/60mg, Waters 公司)。

标准品和试剂:诺氟沙星标准品(含量 $\geq 99.8\%$)、环丙沙星标准品(含量 $\geq 99.8\%$)、恩诺沙星标准品(含量 $\geq 99.8\%$)(美国 Sigma chemical 公司);甲醇、乙腈为色谱纯;四丁基溴化铵、磷酸为分析纯;实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$):准确称取诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星标准品各 10.0 mg,分别用乙腈溶解并定容至 100 ml 棕色容量瓶中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存(保存期不超过 3 个月)。

混标使用液:分别取适量各标准储备液,用流动相稀释成浓度均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合标准工作使用液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液(0.01 mol/L):精确称取 3.22 g 四丁基溴化铵,用水溶解并定容至 1 000 ml 棕色容量瓶中,用磷酸调 pH 至 3.1。

1.3 方法

1.3.1 提取方法

取水样 60 ml,用稀盐酸调 pH 值至 4.0,通过 HLB 固相萃取柱富集、净化。HLB 柱上样之前依次用 3 ml 甲醇和 3 ml 水活化。水样过柱流速控制在 1 ml/min 以下。样品过柱后,先用 2 ml 水淋洗,减压抽干后用 10 ml 甲醇洗脱至鸡心瓶中,35~40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干。用 1.0 ml 流动相定容,充分涡旋溶解残渣,滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,供高效液相色谱仪测定。

1.3.2 测试方法

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈+0.01 mol/L 四丁基溴化铵(pH 3.1)=5+95(V/V);流速:1.5 ml/min;荧光检测器:激发波长 280 nm,发射波长 450 nm;进样量:20 μl 。

1.3.3 标准曲线的绘制

1.3.3.1 标准工作液

准确量取混标使用液,用流动相配制成浓度为 1、2、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作液。

1.3.3.2 绘制标准工作曲线

将绘制标准曲线所用的系列标准工作液从低浓度到高浓度依次注入液相色谱仪,按 1.3.2 方法进行分析。每一浓度进两针,按其所得峰面积的平均值与对应标准溶液浓度作标准曲线,得出回归方程及相关系数。

1.3.4 检出限和定量限

取加标水样按“1.3.1 和 1.3.2”方法进行处理和分析,以 3 倍信噪比($S/N=3$)对应浓度为分析物的最低检测浓度,以 10 倍信噪比($S/N=10$)对应浓度为分析物的最低定量浓度。

1.3.5 回收率及变异系数的测定

取空白海水样品 60 ml,添加 10、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混标使用液,每个添加水平设 5 个平行,按“1.3.1 和 1.3.2”的方法进行处理和分析,取峰面积值分别计算 3 种喹诺酮类抗生素的含量,以加入量和测定值之比计算回收率。按每个浓度各测定 5 个样品计算批内变异系数;每个浓度各测 3 批,计算批间变异系数。

2 结果与讨论

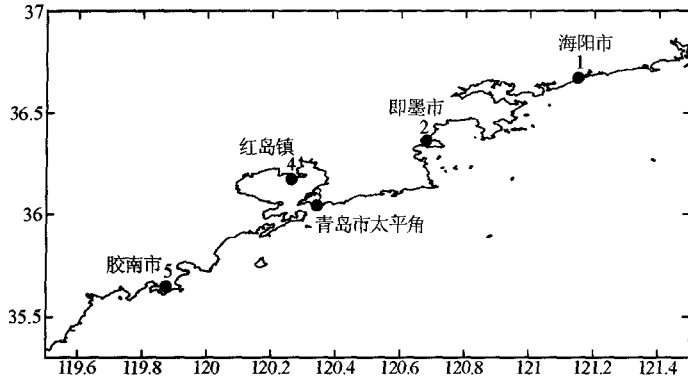
2.1 标准曲线

配制浓度为 1、2、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 3 种喹诺酮类的标准液,测定其峰面积,并做面积与浓度工作曲线(图 2)。结果表明,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的 1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度与其峰面积呈良好的线性关系,其相关参数见表 1。

2.2 检出限和定量限

以 3 倍信噪比($S/N=3$)对应浓度为分析物的最低检测浓度,3 种喹诺酮类抗生素的最低检测限分别为

NF 2 μg/L, CIP 1 μg/L 和 EN 1 μg/L。以 10 倍信噪比(S/N=10)对应浓度为分析物的最低定量浓度, 3 种喹诺酮类抗生素的最低定量限分别为 NF 6.6 μg/L、CIP 3.3 μg/L 和 EN 3.3 μg/L。



北起 36°40.303'N, 121°8.939'E, 南至 (35°39.36'N, 119°52.433'E)
36°40.303'N, 121°8.939'E ~ 35°39.36'N, 119°52.433'E

图 1 黄海沿岸部分养殖场及近岸水域水体样品采集地点分布
Fig. 1 The map of seawater sampling locations at aquaculture farms along the Yellow Sea nearshore waters

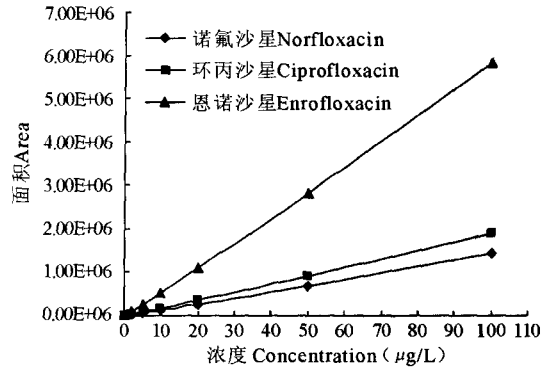


图 2 3 种喹诺酮类抗生素的标准曲线
Fig. 2 Standard curve of three quinolones

表 1 线性方程及相关系数

Table 1 Calibration equations and correlation coefficients

药物 Drug	线性范围 Linear range (μg/L)	线性方程 Calibration equation	线性相关系数 Linear correlation coefficient (R ²)
诺氟沙星 NF	1~100	$Y=5.8 \times 10^4 X - 3.2 \times 10^4$	0.998 9
环丙沙星 CIP	1~100	$Y=1.9 \times 10^4 X - 1.2 \times 10^4$	0.999 3
恩诺沙星 EN	1~100	$Y=1.4 \times 10^4 X - 6.0 \times 10^3$	0.999 5

2.3 回收率及变异系数的测定

取空白海水为试验对象,测定 3 种喹诺酮类的添加浓度在 10~50 μg/L 时的回收率和变异系数(表 2)。回收率均在 71.9%~85.3%之间,批内变异系数均≤10%,批间变异系数≤7%。

2.4 实验色谱图

2.5 固相萃取条件的优化

根据文献报道 (Zhu *et al.* 2001; Lindsey *et al.* 2001), 采用 Waters 公司的 Oasis HLB 小柱 (60 mg/3ml), 流速采用其建议的 1 ml/min 以下。水样过柱体积、pH、洗脱剂和洗脱剂用量等都会影响固相萃取 (SPE) 的效率, 本研究以加标回收率为评价依据分别对这些实验条件进行了优化。最终, 水样过柱体积为 60 ml, pH 为 4.0, 洗脱剂为甲醇, 洗脱剂用量为 10 ml (图 3)。

2.5.1 水样过柱体积

以过滤后的海水为基底, 加入目标喹诺酮类抗生素混合标准溶液, 考察水样的过柱体积, 实验结果如图 4 所示, 诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星三者总的趋势相似, 都是在 60 ml 时达到最大值, 80 ml 之后样品加标回收率≤60%。因此, 本研究最终选择水样过柱体积为 60 ml。

2.5.2 pH

一般海水的 pH 在 7.8~8.7 之间(张志卫等 2009)。不考虑其他干扰因素,以 60 ml 空白海水为基底,分别调整 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,然后加入目标喹诺酮类抗生素混合标准溶液,混匀后参照“1.3.1”提取方法进行处理。结果发现,pH 为 4.0 时目标喹诺酮类抗生素的回收率普遍较高,重现性较好。

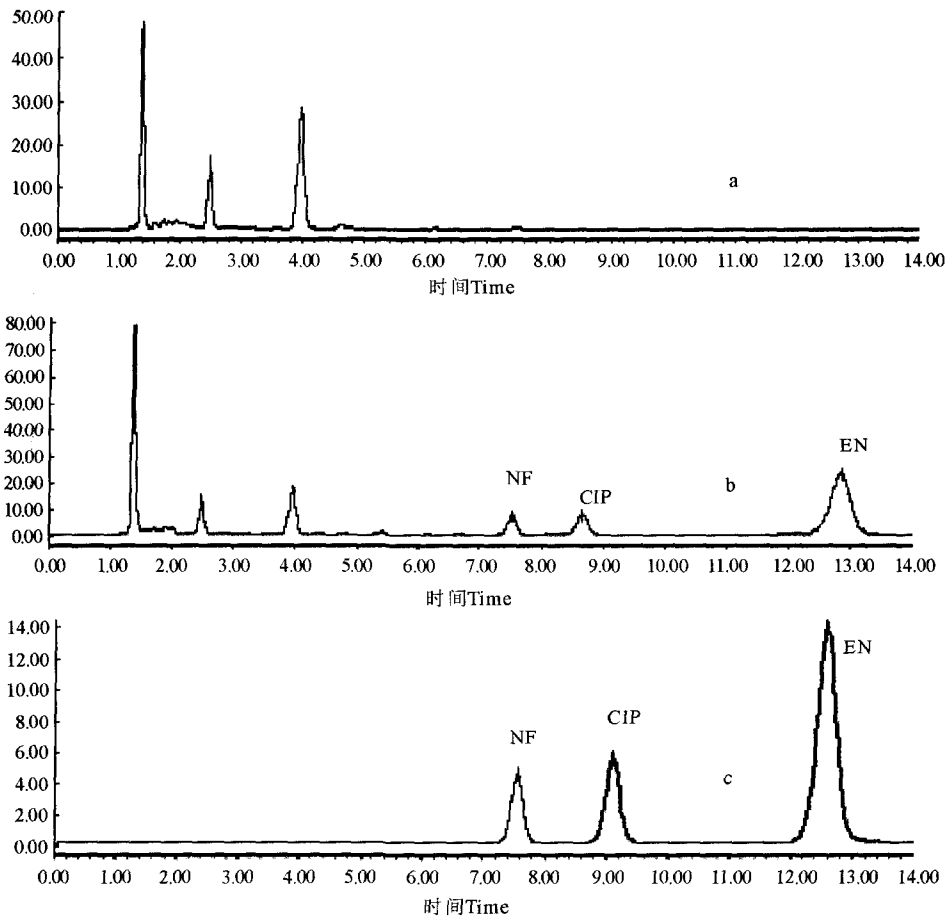
表 2 天然海水中 3 种喹诺酮类抗生素回收率测定结果 ($n=5$)Table 2 Recoveries of three quinolones from seawater ($n=5$)

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g/L}$)	测定批次 Batch	检测结果 Results $\bar{x}\pm S$	回收率 Recovery (%) $\bar{x}\pm S$	批内变异系数 CV(%) within batches	批间变异系数 CV(%) among batches
诺氟沙星 NF	10	1	8.49 \pm 0.36	84.9 \pm 3.63	3.75	3.06
		2	8.43 \pm 0.41	84.3 \pm 4.12	3.25	
		3	8.41 \pm 0.31	84.1 \pm 3.06	2.70	
	20	1	14.83 \pm 0.61	74.2 \pm 3.07	3.07	4.52
		2	15.2 \pm 1.12	76.0 \pm 5.62	5.38	
		3	15.59 \pm 0.71	77.9 \pm 3.57	4.05	
	50	1	37.03 \pm 0.64	74.1 \pm 1.29	1.48	4.56
		2	36.10 \pm 3.81	72.2 \pm 7.61	7.51	
		3	36.23 \pm 1.73	72.5 \pm 3.47	3.24	
环丙沙星 CIP	10	1	8.26 \pm 0.32	82.6 \pm 3.18	3.42	3.83
		2	8.52 \pm 0.49	85.2 \pm 4.88	3.38	
		3	8.19 \pm 0.43	81.9 \pm 4.26	4.10	
	20	1	14.86 \pm 1.99	74.3 \pm 9.98	10.01	6.97
		2	15.37 \pm 1.19	76.9 \pm 5.93	5.66	
		3	15.33 \pm 0.62	76.6 \pm 3.12	3.78	
	50	1	35.94 \pm 2.12	71.9 \pm 4.25	4.68	4.09
		2	36.66 \pm 2.31	73.3 \pm 4.63	4.29	
		3	37.08 \pm 2.24	74.1 \pm 4.47	3.55	
恩诺沙星 EN	10	1	8.08 \pm 0.45	80.8 \pm 4.46	4.49	4.75
		2	8.18 \pm 0.48	81.8 \pm 4.76	3.91	
		3	8.43 \pm 0.70	84.3 \pm 7.02	5.53	
	20	1	15.05 \pm 1.64	75.2 \pm 8.2	9.16	6.55
		2	14.78 \pm 0.72	73.9 \pm 3.61	4.24	
		3	15.76 \pm 0.89	78.8 \pm 4.48	4.63	
	50	1	37.17 \pm 3.51	74.3 \pm 7.02	6.28	5.16
		2	37.36 \pm 2.71	74.7 \pm 5.42	5.28	
		3	36.38 \pm 1.97	72.8 \pm 3.94	4.53	

2.5.3 洗脱溶剂和洗脱剂用量

吸附在 SPE 柱上的抗生素常用甲醇或者乙腈洗脱。本研究比较了乙腈和甲醇作为固相萃取柱洗脱剂的洗脱效果。实验结果显示,用乙腈做洗脱剂时,加标样品诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的回收率 $\leq 60\%$;用甲醇做洗脱剂时,加标样品诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的平均回收率分别为 75.2%、79.5%、74.4%。因此试验选择甲醇作洗脱剂。

对甲醇作为固相萃取柱洗脱剂的洗脱用量逐渐增加,实验结果如图 5 所示。可以看出,当洗脱溶剂甲醇用量达到 9 ml 之后,随着洗脱剂用量的增大,样品加标的回收率逐渐趋于平稳变化。因此试验选择洗脱剂用量为 10 ml。



说明: a 为空白海水样品色谱图; b 为海水样品喹诺酮类加标 50 µg/L 加标回收色谱图; c 为喹诺酮类 50 µg/L 标准溶液色谱图

Note: a, blank seawater; b, seawater spiked at 50 µg/L; c, 50 µg/L standard solution

图 3 实验色谱图

Fig. 3 Chromatograms

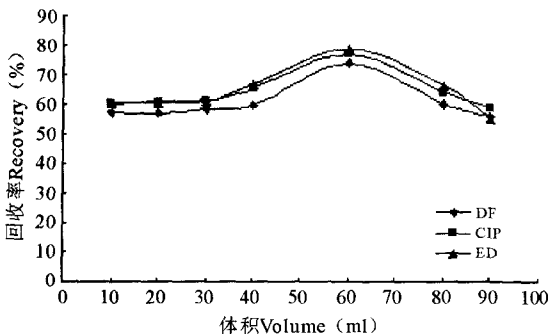


图 4 样品加标回收率与水样的过柱体积的关系

Fig. 4 Relationship between recovery and sample volume

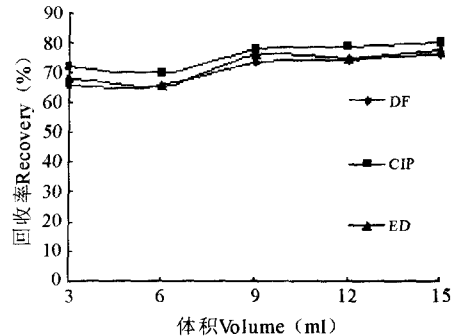


图 5 加标样品回收率与洗脱剂用量的关系

Fig. 5 Relationship between recovery and amount of eluent

2.6 样品测定

分析了 10 份采自不同海域的养殖海水, 结果见表 3。谭建华等(2007)利用固相萃取的方法分析了珠江广州河段的城市河水, 检测到诺氟沙星和环丙沙星的质量浓度范围为 0.197~0.510 µg/L, 说明人们日常生活中也有 3 种喹诺酮类抗生素; 本试验对黄海沿岸部分养殖场及近岸海水分析, 有养殖海水检测到 3 种喹诺酮类抗生素, 而近岸海水未检测到 3 种喹诺酮类抗生素。这说明大水域生态系统由于面积大、范围广, 更有利于稀释、

降解抗生素。养殖海水中检出喹诺酮类抗生素的原因可能是:(1)3种喹诺酮类抗生素药物仍在使用。药物的不规范使用是导致水环境中存在检出药物的重要原因(王朋华等 2008);(2)残留海水中的未代谢药物。水生动物用药后,药物以原形或其代谢物的形式通过粪便和尿液排到体外,继而对海水造成污染;(3)残留海底泥中未代谢的药物。Kümmerer(2001)报道环丙沙星进入水体后,会被沉积物吸附,有65%进入到污泥中。

表3 养殖海水中3种喹诺酮类抗生素的检测结果

Table 3 Determination results of three quinolones in seawater samples

采样点 Sampling location	采样时间 Sampling time	诺氟沙星 NF ($\mu\text{g/L}$)	环丙沙星 CIP ($\mu\text{g/L}$)	恩诺沙星 EN ($\mu\text{g/L}$)
5	2008-11-18	—	—	—
1	2008-11-19	126	—	11.9
1	2008-11-19	982	—	11.6
2	2008-11-20	6.20	—	—
4	2008-11-21	—	—	—
5	2009-02-16	—	—	—
1	2009-02-17	—	55.2	55.4
4	2009-02-18	—	—	—
4	2009-02-18	—	—	—
2	2009-02-20	—	—	—

3 结论

本研究建立了一种简单、快速检测海水中喹诺酮类抗生素的分析方法。该方法对海水样品进行60~150倍的浓缩,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星检出限分别是2、1和1 $\mu\text{g/L}$,定量限分别是6.6、3.3和3.3 $\mu\text{g/L}$,添加浓度为10、20和50 $\mu\text{g/L}$ 时的回收率为71.9%~85.3%,批内变异系数 $\leq 10\%$,批间变异系数 $\leq 7\%$ 。该方法净化效果好、操作简便、精确度高,且重复性好。

参 考 文 献

- 方星星,王群,李健. 2004. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学. 水产学报, 28(增刊): 42~46
- 王洪艳,李兆新,林洪,冷凯良,耿霞,翟毓秀. 2007. HPLC法测定牙鲆肌肉中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星. 海洋水产研究, 28(3): 80~84
- 王朋华,袁涛,谭佑铭, Hu Jianguo. 2008. 水环境中药物污染及迁移转化行为研究进展. 环境科学与技术, 31(9): 57~61
- 曲晓荣,王印庚,李胜忠,李兆新,张正,陈霞. 2007. 诺氟沙星在大菱鲆体内药代动力学及残留消除规律. 海洋水产研究, 28(5): 24~29
- 何平,尹文林,沈锦玉. 2008. 诺氟沙星在淡水青虾体内药物代谢动力学研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 27(2): 135~139
- 李娜,李健,王群. 2009. 恩诺沙星在养殖大菱鲆体内的残留及消除规律. 渔业科学进展, 30(2): 26~33
- 王志卫,丰爱平. 2009. 基于水环境的青岛第一海水浴场旅游适宜性研究. 海岸工程, 28(2): 90~97
- 钱云云,唐俊,郑宗林,杨先乐. 2007. 恩诺沙星在罗氏沼虾体内的药物代谢动力学. 动物学杂志, 42(5): 62~69
- 顾洁,仲齐庆. 2003. 海水中盐酸环丙沙星的测定及衰减度的研究. 中国卫生检验杂志, 13(4): 430~431
- 谭建华,唐才明,余以义,彭先芝. 2007. 高效液相色谱法同时分析城市河水中的多种抗生素. 色谱, 25(4): 546~549
- Hamscher, G., Sczesny, S., Htipper, H. *et al.* 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 1 509~1 518
- Kümmerer, K. 2001. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. *Chemosphere*, 45(5): 957~649
- Lindsey, M. E., Meyer, M., and Thurman, E. M. 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials, in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73: 4 640~4 646
- Samuelsen, O. B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83: 7~16
- Zhu, J., Snow, D. D., Cassada, D. A. *et al.* 2001. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatogr. A*, 928: 177~186