

RP-HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留

孟 勇^{1,2}, 吴光红², 朱晓华², 薛 辉², 黄 成¹

(1. 南京大学 生命科学院, 江苏 南京 210008; 2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

摘要:应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立测定中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝脏中诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)和恩诺沙星(ENR)残留量的方法。考察了3种喹诺酮类药物残留的分离与流动相组成、pH值及乙腈含量的关系,优化了色谱条件。中华绒螯蟹肝脏成分复杂,脂肪类化合物含量高,色素等干扰物质多,极易干扰目标物的检测。通过改进前处理过程,采用振荡萃取-浓缩-高速离心萃取的前处理技术,有效减少了干扰物质对检测结果的影响。结果表明,该方法线性关系和重复性良好,样品中3种喹诺酮类药物残留的回收率在73.26%~85.82%,最低检测限为10 µg/kg。用该方法对肌肉注射给药后72 h内中华绒螯蟹肝脏组织进行检测,其体内主要代谢物环丙沙星和恩诺沙星都可以检测到,说明本方法能够满足中华绒螯蟹体内诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量检测的技术要求。

关键词:药物残留;高效液相色谱法;中华绒螯蟹;诺氟沙星;环丙沙星;恩诺沙星;肝脏

中图分类号:X836 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0772-07

诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)和恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)是吡啶酸衍生物(pyridonecarboxylic acid, PCAs),均属于喹诺酮类药物(quinolones, QNs)。喹诺酮类药物能通过与DNA回旋酶亚基A结合,抑制酶的切割与连接功能,使DNA、RNA及蛋白质的合成受干扰,从而起到杀菌作用^[1]。这3种药物具有广谱、高效、低毒等特点,因而广泛用作人类和动物的抗菌剂^[2]。由于这类药易诱发细菌耐药性,故对生产食品动物使用的管理方式越来越严,欧盟和北美等国家只批准恩诺沙星为动物专用的抗菌药,诺氟沙星和环丙沙星已禁止在水产养殖业中使用^[3]。为提高动物源性食品的安全性,对其残留量的检测越来越受到关注。

Intorre等^[4]和谢君等^[5]报道,恩诺沙星在黑鲈和黄牛体内的药代动力学表明其主要代谢物为环丙沙星和恩诺沙星原型,主要滞留在肌肉、肝脏和肾脏中,所以对于这3种喹诺酮类药物残留的同时测定是很有必要的。本研究旨在探索并测定中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量的方法,为了解恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的分布、代谢产物以及消除规律的研究奠定基础。

以往有关水产动物体内喹诺酮类药物残留测定的研究大部分集中于鱼类,仅少数涉及到虾类、中华鳖等其他水产动物^[4-10],尚未见关于中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的残留检测方法的报道。中华绒螯蟹的肝脏组织中脂肪类化合物的含有率在动物食品中较高,而且其成分复杂,极易干扰目标物的检测。上述已报道的方法应用在检测中华绒螯蟹肝脏中药物残留时,其回收率和分离度均不能达到检测要求。本研究通过对流动相组成、pH值和乙腈含量的选择,以及前处理过程的优化,旨在保证回收率的同时,使干扰物质与药物达到合适的分离度,从而建立高效液相色谱法同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留量的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中华绒螯蟹由溧阳水产养殖公司提供。活体雌、雄蟹各200只,体重分别为(97.1±7.6)g和(123.6±8.9)g。在水泥池(4.0 m×3.0 m×1.0 m)中饲养1周,水温(17±2)℃,剔除死亡或不健康样品。实验动物解剖后提取肝脏组织,10 000 r/min

收稿日期:2005-03-07; 修订日期:2005-05-09.

基金项目:江苏省公益项目(BM2003704).

作者简介:孟 勇(1980-),男,硕士研究生,主要从事水产品中药物残留检测的研究.

通讯作者:吴光红,主要从事水产品质量标准与检测研究 E-mail: wuguangh@jlonline.com

匀浆1 min,放于-20℃冰箱保存备用。

1.2 实验试剂

甲醇(色谱纯,Riedel Hsen公司);乙腈、磷酸、三乙胺(色谱纯,TEDIA公司);诺氟沙星标准品、环丙沙星标准品恩诺沙星标准品均由中国兽医药品监察所提供,含量大于99.7%。流动相用水为Millipore超纯水。

1.3 仪器及色谱条件

(1)Agilent 1100型高效液相色谱仪,配G1315B DAD检测器,Windows NT4.0惠普工作站(Agilent公司);超高速冷冻离心机(BECKMAN公司);超高速分散机(ULTRA TURRAX公司)。

(2)色谱柱:Zorbax SB-C₁₈分析柱(250 mm×4.6 mm i.d.,5 μm);流动相:0.05 mol/L磷酸溶液(以三乙胺调pH至2.4)与乙腈混合液,体积比为87:13。检测条件:DAD检测器,检测波长279 nm,柱温40℃,进样量20 μL,流速1 mL/min。

1.4 实验设计

1.4.1 样品提取与净化 准确称取5.00 g混合均匀的中华绒螯蟹肝脏置于50 mL聚丙烯离心管中,并放置2~3粒玻璃珠,加入25 mL乙腈,漩涡混合2 min,摇床振荡20 min,5 000 r/min离心10 min,将上清液(包括油层)转移至分液漏斗中。往残渣中加入25 mL乙腈,重复上述操作3次,并将上清液合并于分液漏斗中加入30 mL正己烷,振荡5 min,充分静置1 h以上后,将下层乙腈液移入旋转蒸发瓶,并将蒸发瓶置于旋转蒸发仪上,在40℃左右水浴中减压蒸发,蒸发速度控制在每秒1滴。然后准确加入1 mL流动相、2 mL正己烷,漩涡混合,以充分溶解残留物。将混合溶液转移至离心管中,10 000 r/min离心10 min,取下清液经0.22 μm滤膜过滤,滤液备HPLC检测之用。

1.4.2 标准曲线 准确称取NOR、CIP和ENR标准品各50.00 mg,用0.03 mol/L氢氧化钠溶液溶解稀释成浓度为500.0 μg/mL的混合标准品储备液,依次用流动相稀释成0.5 μg/mL、0.2 μg/mL、0.1 μg/mL、0.05 μg/mL、0.02 μg/mL、0.01 μg/mL的混合标准工作液。以HPLC测得的峰面积为Y纵坐标,相应的浓度X为横坐标,通过Windows NT4.0惠普工作站求出回归方程、相关系数。

1.4.3 回收率和精密度 分别向5.0 g肝脏组织空

白样本中加入质量浓度为0.5 μg/mL的混合标准液0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL,添加后最终水平分别为10 μg/kg、20 μg/kg、50 μg/kg($n=6$),漩涡混匀,放置15 min,然后再进行提取、净化及高效液相色谱分析。

1.5 样品分析

对中华绒螯蟹按5 mg/kg肌注ENR,在给药前及给药后0~72 h定时取肝脏,每时间点取5只。样品按实验方法处理,进行HPLC分析。

2 结果与分析

2.1 诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的色谱行为

在本实验选定的色谱条件下NOR、CIP和ENR的保留时间分别为8.84 min、10.25 min、14.92 min左右,本检测方法能同时有效地分离鉴定NOR、CIP和ENR,且目标药物峰峰尖锐、峰形对称(图1)。

2.2 标准曲线

以HPLC测得的峰面积为Y纵坐标,相应的浓度X为横坐标绘制标准曲线,其线性关系和相关系数见表1。结果表明,3种喹诺酮类药物质量浓度在0.01~0.5 μg/mL范围内线性良好,可以满足定量分析的需要。

2.3 回收率、精密度和检测限

表2为在肝脏组织空白样本中加入添加3个浓度水平的3种喹诺酮类药物混合标准溶液进行回收率实验的测定结果。由表2可以看出,NOR、CIP和ENR质量分数在10~50 μg/kg内,回收率为73.26%~85.81%,其多次测定值的相对标准偏差(RSD)为1.768%~9.507%。方法的准确度和精密度均符合残留分析的要求。根据IUPAC的定义,本法的检测限定义为产生相应于3倍背景噪音的标准偏差分析信号的分析物浓度值。据此定义计算出NOR、CIP和ENR的检测限为10 μg/kg。

2.4 样品测定

中华绒螯蟹肌注24 h后肝脏的液相色谱图如图2所示,药-时曲线结果如图3所示。结果表明,对中华绒螯蟹肌注恩诺沙星后,其体内主要代谢物为环丙沙星和恩诺沙星原型,说明本方法对中华绒螯蟹肝脏中3种喹诺酮类药物残留的同时测定是适用的。

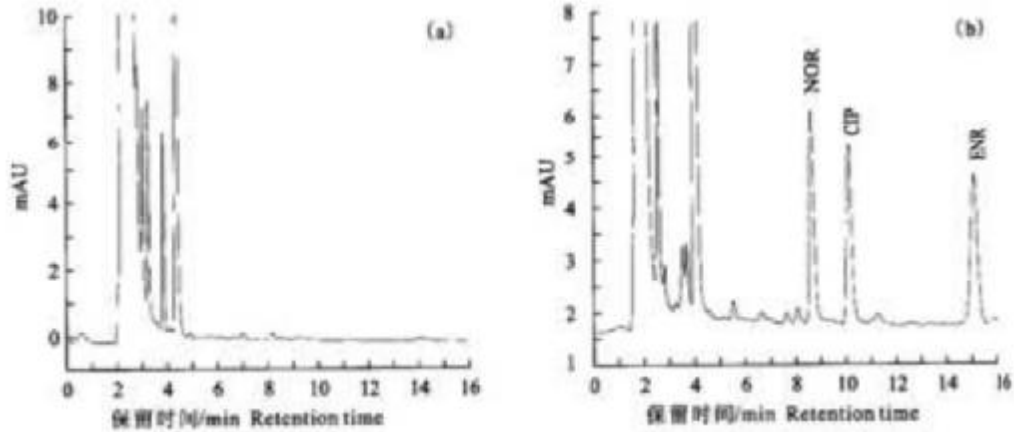


图1 中华绒螯肝中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星液相色谱图

a: 空白肝脏; b: 加标后肝脏(最终水平 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$)Fig.1 Liquid chromatogram of NOR, CIP and ENR in *E. sinensis* livera: Blank liver; b: Liver after standard solution added in (final level $50 \mu\text{g}/\text{kg}$)

表1 诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星质量浓度的回归方程、相关系数和检测限

Tab.1 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of concentrations of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 r
诺氟沙星 Norfloxacin	$Y = 139.130X + 0.199$	0.999 97
环丙沙星 Ciprofloxacin	$Y = 125.032X + 0.452$	0.999 94
恩诺沙星 Enrofloxacin	$Y = 124.254X + 0.161$	0.999 99

表2 中华绒螯肝中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的回收率与相对标准偏差($n=6$)Tab.2 Recoveries and relative standard deviations of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin contents in liver of *Eriocheir sinensis* ($n=6$)

化合物 Compound	加标后水平/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Final content	平均回收率/% Recovery	RSD/%
诺氟沙星 Norfloxacin	10	79.73	5.249
	20	75.23	4.510
	50	73.26	2.207
环丙沙星 Ciprofloxacin	10	82.29	9.507
	20	75.07	6.811
	50	74.32	1.768
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	85.73	7.161
	20	85.81	2.868
	50	82.05	5.021

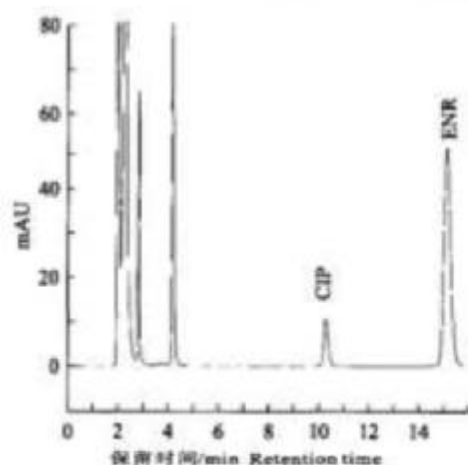


图2 中华绒螯蟹肌注24 h后肝脏的液相色谱图
Fig.2 Liquid chromatogram of liver of *Eriocheir sinensis* 24 h later after intramuscular injection

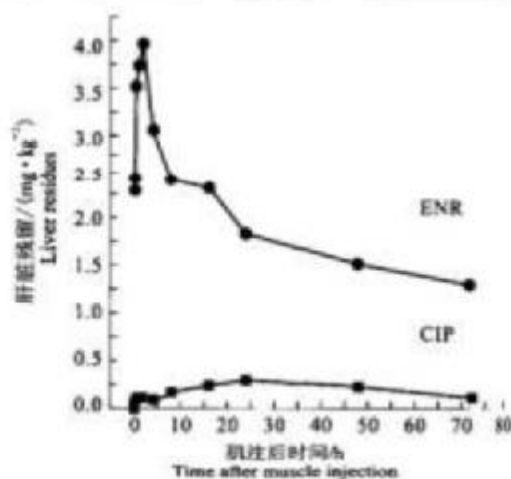


图3 中华绒螯蟹肌注后的药-时曲线图
Fig.3 Drug-time curve of *Eriocheir sinensis* after intramuscular injection

3 讨论

3.1 色谱分离条件的选择

3.1.1 流动相组分的确定 在对3种喹诺酮类药物进行分析中,流动相的选择和优化不仅应考虑使3种药物分离,而且还应考虑药物与干扰物质的分离,因此各组分间必须保持合适的分离度。本实验中研究了不同配比的甲醇-柠檬酸-醋酸铵溶液

(A)和乙腈-三乙胺-磷酸溶液(B)的流动相体系,结果发现,后者的流动相体系基线平稳,色谱峰尖锐,峰形对称,分离效果较好(图4)。NOR、CIP和ENR具有可质子化的氮原子和可解离的羟基,它们在水溶液中通常以离子形式存在,流动相中加入三乙胺,是因为色谱柱中的游离硅醇基与三乙胺上的 $-NH_2$ 生成离子对化合物,从而改变了它们在两相中的分配行为。

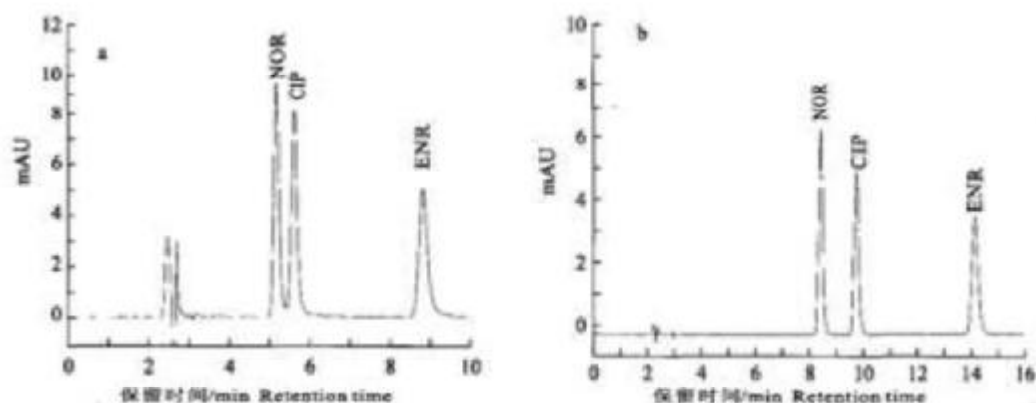


图4 流动相组分对喹诺酮类药物分离的影响
a: 0.05 mol/L 柠檬酸 + 0.01 mol/L 醋酸铵 (pH 4.5) 混合液与甲醇体积比为 75/25
b: 0.05 mol/L 磷酸溶液 (以三乙胺调 pH 至 2.4) 与乙腈体积比为 87/13

Fig.4 Effects of mobile phase composition on the separation of quinolones

3.1.2 pH 值对分离的影响 本实验中用三乙胺调节流动相的 pH 值,考察了流动相 pH 值在 1.8~

5.0 范围内对 3 种目标物保留时间及峰形的影响(图5),pH 值 1.8~3.0 时,3 种目标物的保留时间

基本不变,峰形对称,分离良好。pH值高于3.0时,随着pH值的增大,ENR的保留时间大大延长,而且峰形变钝,峰高变小,有拖尾现象,故流动相pH值调节在1.8~3.0之间。本实验结合相关文献及其他条件,选择pH值为2.4。

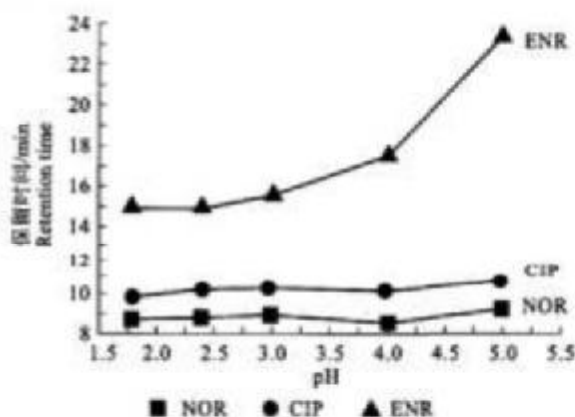


图5 流动相pH值对喹诺酮类药物分离的影响

Fig.5 Effects of pH values of mobile phase on separation of quinolones

3.1.3 流动相中乙腈含量的影响 流动相中乙腈含量对3种目标物保留时间的影响如图6。随着乙腈体积分数的增加,各药物的保留时间均缩短。考虑到各药物的分离效果和检测样品中干扰杂质的出峰时间,故本实验选择乙腈的体积分数为13%。

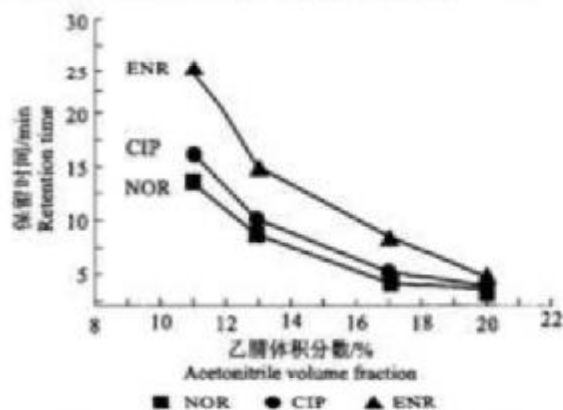


图6 乙腈含量对喹诺酮类药物保留时间的影响

Fig.6 Effects of acetonitrile concentration on retention of quinolones

3.2 前处理条件的优化

3.2.1 提取液的选择 由于NOR、CIP和ENR是水溶性药物,提取方法多采用甲醇、乙腈、磷酸盐和

乙腈的混合溶液或酸性溶液^[5-12]。考虑到实验的后续步骤中需要进行浓缩处理,故不采用水溶性的酸性溶液或其混合溶液;而乙腈对NOR、CIP和ENR的溶解性要优于甲醇,所以采用乙腈作为提取液(表3)。

表3 提取液对回收率和检测限的影响

Tab.3 Effects of extraction solvents on the recovery and limit of detection

提取液 Extraction solvents	回收率/% Recovery	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) LOD
CH_3OH	51.24~60.36	10
CH_3CN	73.26~85.73	10
$\text{CH}_3\text{CN} + \text{H}_3\text{PO}_4$	59.26~77.54	35
H_3PO_4	49.55~62.34	-

注:“-”表示无法浓缩。

Note:“-” means failure in concentration.

3.2.2 净化条件的优化 中华绒螯蟹的肝脏组织中脂肪类化合物的含量较高,而且含有色素等物质干扰目标物的检测。相关文献报道对其他生物样品的前处理过程中往往采用单次振荡萃取^[4,6-7]。本实验先用正己烷振荡萃取干扰物质后,蒸发浓缩,再用正己烷高速离心萃取干扰物质。考察了单次振荡萃取和振荡萃取-浓缩-高速离心萃取的比较实验,发现后者的净化效果要好(图7)。

4 结论

本研究建立了反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的残留。通过考察流动相组成、pH值及乙腈含量对3种喹诺酮类药物分离的影响,确定了0.05 mol/L磷酸溶液(以三乙酸调pH值至2.4)与乙腈以87:13的体积比作为流动相,优化了色谱条件及样品前处理过程,使其达到良好分离。线性范围在0.01~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的相关系数大于0.9999;样品组织中3种药物残留的加标回收率为73.26%~85.81%;相对标准偏差1.768~9.507。该方法具有简便、快捷、精密度和准确性高的特点,能够满足河蟹体内诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星检测的技术要求。

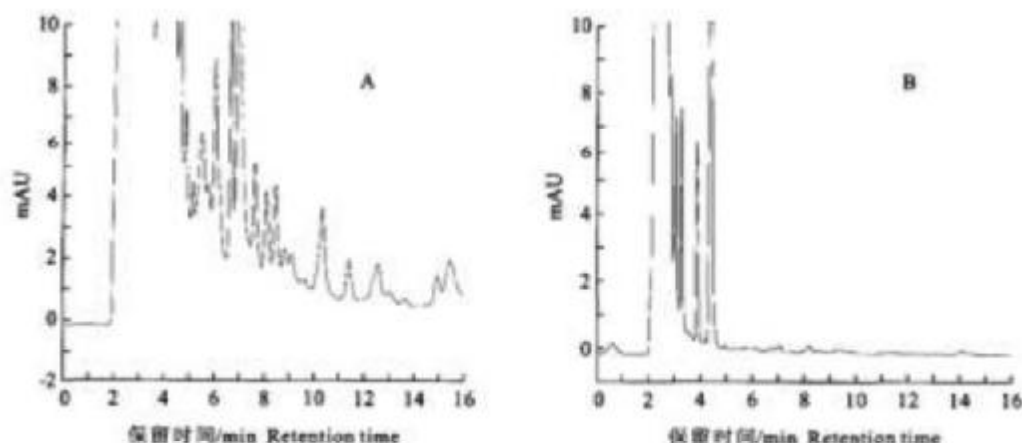


图7 空白样品的液相色谱图

A: 单次正己烷振荡萃取 B: 振荡萃取-浓缩-高速离心萃取

Fig. 7 Chromatogram of drug-free sample

A: By single-time vibration extract with C_6H_{14} ; B: By vibration extract-concentration-high speed centrifugation

参考文献:

- [1] 竺心影. 药理学(第三版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 307-311.
- [2] 孟庆显, 余开康. 鱼虾蟹贝疾病防治和防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 255-281.
- [3] Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, Report of a WHO Meeting, Geneva, Switzerland, 2-5 June, 1998; WHO/EMC/ZDL/98.10.
- [4] Intorre L, Cechini S, Bertini S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the scallop[J]. *Aquaculture*, 2000, 182:49-59.
- [5] 谢 群, 陈 金, 张福华. 反相离子对高效液相色谱法测定动物血浆中的恩诺沙星及其代谢物[J]. *色谱*, 1998, 16: 258-260.
- [6] 徐维海, 林黎明. 恩诺沙星及其代谢产物在吉富罗非鱼、中国对虾体类的残留规律研究[J]. *水产科学*, 2004, 23(7):5-8.
- [7] Yorke J C, Froc P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Chromatography A*, 2000, 882: 63.
- [8] Lesley Johnston, Lindsey Mackay, Meg Croft. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection [J]. *Chromatography A*, 2002, 982: 97-109.
- [9] Marazuela M D, Merino-Hondí M C. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection[J]. *Chromatography A*, 2004, 1034:25-32.
- [10] 陈文银, 管国华. 甲鱼血液中诺氟沙星浓度的反相高效液相色谱测定法[J]. *上海水产大学学报*, 1997, 6(4):301-303.
- [11] 张祚新, 张雅斌, 杨勇胜, 等. 诺氟沙星在鲤鱼体内的药代动力学[J]. *中国兽医学报*, 2000, 20(1):66-69.
- [12] Hernandez-Arteseros J A, Barbosa J, Companso R, et al. Analysis of quinolone residues in edible animal products[J]. *Chromatography A*, 2002, 945:1-24.

Simultaneous determination of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin residues in liver of *Eriocheir sinensis* by RP-HPLC

MENG Yong¹, WU Guang-hong², ZHU Xiao-hua², XUE Hui², HUANG Cheng¹

(1. Department of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2. Aquatic Products Analysis & Testing Center of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China)

Abstract: Quinolones, a family of antibiotics have been used extensively for the treatment of a broad spectrum of bacterial infections occurring in human beings and animals. Recently, quinolones also are used widely in aquaculture to control aquatic animal diseases. Quinolones residues become a serious threat to human health due to its abuse. At present study, a new method by using RP-HPLC was created to detect the residues of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in the liver of *Eriocheir sinensis*. Moreover, the chromatographic conditions including composition of flowing mobile phase and separation phase, pH, as well as the content of acetonitrile were surveyed and optimized for detection of the residues of the three quinolone drugs in crab liver. Detection of quinolone residue in *Eriocheir sinensis* was severely interfered by the complicated compositions, high content of lipid and pigments etc. in crab liver. However, the interference factors could be reduced by modifying the pre-processing course like vibration extract-concentration-high speed centrifugation. Results showed that the new method has good linearity and repeatability. Residues of the three test quinolone drugs were recovered at 73.26% – 85.82% from the liver sample and the minimal detection threshold of this method was 10 µg/kg. The residues of ciprofloxacin and enrofloxacin were able to be detected in the liver of Chinese mitten-handed crab by using this method 72 h after intramuscular injection, which is helpful for the future study on the distribution and metabolism of quinolones in *Eriocheir sinensis*.

Key words: drug residues; high performance liquid chromatography; *Eriocheir sinensis*; norfloxacin; ciprofloxacin; enrofloxacin; liver

Corresponding author: WU Guang-hong. E-mail: wuguangh@jlonline.com