

分散液液微萃取-高效液相色谱联用 测定水样中的氟喹诺酮类药物

王振忠^{1,2,3} 汤尚文⁴ 樊 靓^{1,2,3,*}

(1.湖北医药学院药学院 湖北十堰 420000;

2.湖北省药用植物综合利用工程技术研究中心 湖北十堰 420000;

3.武当特色中药研究湖北省重点实验室 湖北十堰 420000;

4.湖北文理学院化学与食品科学学院 湖北襄阳 441053)

摘要:建立了一种分散液液微萃取-高效液相色谱联用测定水样中6种氟喹诺酮类药物的方法,采用萃取剂萃取后经氮气吹干再用微量流动相复溶的进样方式,考察了影响萃取效率的因素,包括萃取剂和分散剂的种类、用量、样品pH。结果表明,以500 μL三氯甲烷为萃取剂,800 μL乙腈为分散剂,调节萃取体系pH为7时,6种氟喹诺酮药物的富集倍数最高可达245倍,检出限为0.075~0.34 μg/L。在汉江水、鱼塘水、自来水中的加标回收率为88.6%~109.3%,相对标准偏差不高于5.8%。该方法基质效应小,富集倍数高,并且改善了传统DLLME萃取后的萃取剂直接进样色谱峰变形的缺点。应用于水样中残留氟喹诺酮类药物的检测,灵敏度高、简便、准确。

关键词:氟喹诺酮类药物,高效液相色谱,分散液液微萃取,水样

Determination of fluoroquinolones in water with dispersive liquid-liquid phase microextraction-HPLC

WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, TANG Shang-wen⁴, FAN Jing^{1,2,3,*}

(1. Pharmacy College of Hubei University of Medicine, Shiyan 420000, China;

2. Engineering Research Center for Herbal Utilization of Hubei Province, Shiyan 420000, China;

3. Key Lab of Wudang Characteristic Herbal Study in Hubei Province, Shiyan 420000, China;

4. Chemistry and Food College of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)

Abstract: Dispersive liquid-liquid micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography (DLLME-HPLC) was applied to separate and determine six fluoroquinolones (FQs) in aqueous samples. Before injection into HPLC, the extraction solvent droplet obtained after centrifugation was pulled out, and then dried by nitrogen flow, re-dissolved with dozens of microliters mobile phase at last. Some important parameters, like variety and dosage of extractant and dispersive solvent and pH of extraction solution, which influence the extraction efficiency were investigated. The results showed that after adding 500 μL trichloromethane as extractant solvent, 800 μL acetonitrile as dispersive solvent into extraction system which pH was tuned to 7, enrichment factor of 6 FQs was up to 245 and a good linear relationship was obtained in the range of 0.075~0.34 μg/L. The recoveries of 6 FQs in 3 kinds of water from han river, fishpond and running water fell in the range from 88.6% to 109.3% and the relative standard deviation was less than 5.8%. The method had low matrix effect, high enrichment factor and avoids chromatographic peak deformation when direct injection of extraction solvent droplet in the traditional DLLME. It was proven to be sensitive, simple and accurate in residue analysis of FQs in water.

Key words: fluoroquinolones; HPLC; DLLME; water samples

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)08-0049-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.001

氟喹诺酮类药物(Fluoroquinolones, FQs)是一类人工合成的重要广谱抗菌剂,被广泛用于治疗人类

及动物的多种感染性疾病^[1]。人类和动物摄入的FQs药物通常都会经尿液排泄及农作物施肥进入环

收稿日期: 2016-09-02

作者简介: 王振忠(1982-),男,博士,讲师,研究方向:液相色谱分析方法, E-mail: shilywzz@163.com。

* 通讯作者: 樊靓(1981-),女,博士,讲师,研究方向:新型分析检测方法开发, E-mail: zone125@163.com。

基金项目: 湖北省教育厅项目(B2016142); 十堰市科技局项目(16Y04, 16Y05); 湖北省“三区”人才支持计划; 湖北医药学院创新团队项目(FDFR201602)。

境水域^[2]。由于 FQs 具有很强的耐微生物降解能力,长期饮用含 FQs 的水会使人的致病菌产生耐药性,对疾病的疗效降低甚至失效^[3-4],故环境水域中的 FQs 对生态系统及人类饮水安全有潜在危害。为了研究水样中的 FQs 对人类健康和环境生态的影响,有必要建立一种水样中 FQs 的测定方法。

水样中的 FQs 多处于痕量水平,基质复杂,需要分离富集后再测定^[5]。分散液液微萃取(Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)是2006年由 Assadi^[6]等提出的一种新型少溶剂的样品前处理技术,是一种极具应用潜力的样品前处理方法,广泛应用于环境分析中^[7-9]。但是该方法萃取后若直接进样,由于选用的萃取剂和流动相的相容性有限,容易导致色谱峰变形,检测灵敏度降低。

本实验应用 DLLME 技术,使用密度比水大的三氯甲烷为萃取剂,在萃取后将萃取剂全部抽出,经 N₂ 吹干后用微量流动相复溶浓缩,和高效液相色谱联用,测定了实际水样中的 6 种 FQs。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

六种氟喹诺酮类药物:司帕沙星(Sparfloxacin, Spa)、氧氟沙星(Ofloxacin, Ofi)、依诺沙星(Enoxacin, Eno)、洛美沙星(Lomfloxacin, Lom)、加替沙星(Gatifloxacin, Gat)、环丙沙星(Ciprofloxacin, Cip) 美国 Sigma 公司,纯度均大于 98%,用 25 mmol/L 磷酸配成 2 mg/mL 标准储备液,所有样品溶液均避光保存于 4 °C 的冰箱中;无水磷酸氢二钠、磷酸、三乙胺、乙醇、甲醇、溴苯、四氯化碳、三氯甲烷、氯化钠 国药集团化学试剂有限公司,分析纯;乙腈 美国 Fisher Scientific 公司,色谱纯。

LC-20AT 高效液相色谱仪 配置紫外可变波长检测器与自动进样器,日本岛津公司;Phenomenex Tc-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 美国菲罗门公司;Millipore Simplicity 185 超纯水机 美国默克密理博公司;XYJ80-1 离心机 金坛恒丰仪器厂;HYQ-2110 涡旋混匀器 南京畅翔仪器设备有限责任公司;100 μL 微量进样器 上海高鸽工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 在 15 mL 具塞玻璃离心管中加入 10.0 mL FQs 混合标准溶液,再加入 1 mL 0.025 mol/L 磷酸氢二钠(pH=7)、800 μL 乙腈(分散剂)、500 μL 三氯甲烷(萃取剂)。振荡 2 min,使管内形成均匀的乳浊液体系,以 3000 r/min 转速离心 3 min,有机相沉降到离心管底部。将离心管底部的萃取剂全部抽取至 0.5 mL 的离心管中,经 N₂ 吹干后,沿管壁加入 25 μL 流动相复溶,涡旋均匀。用微量进样器吸取 20 μL 进样分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:phenomenex Tc-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: V_{乙腈}: V_(0.5% 三乙胺, pH=2.5) = 17:83 (流动相经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤和超声脱气处理); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C。

1.2.3 萃取剂种类的选择 DLLME 使用的萃取剂密度需比水大,以便于后续的离心分相,还需要对分析物有良好的萃取能力。基于上述特点,分别考察二氯化碳、三氯甲烷、四氯化碳、溴苯这四种萃取剂对 FQs 的萃取效果。萃取剂的用量是 200 μL,乙腈做分散剂,用量是 800 μL,萃取体系 pH=7,其它条件同 1.2.1 所示。

1.2.4 萃取剂的用量 以三氯甲烷为萃取剂,分别选择 150、200、250、400、500、700 μL 六种不同体积,考察不同的萃取剂用量对 FQs 萃取效率的影响。乙腈做分散剂,用量是 800 μL,萃取体系 pH=7,其它条件同 1.2.1 所示。

1.2.5 分散剂种类的选择 以三氯甲烷为萃取剂,用量为 500 μL,选择甲醇、丙酮、乙腈、乙醇四种分散剂,考察分散剂种类在 DLLME 中对 FQs 萃取体系的分散效果。分散剂的用量是 800 μL,萃取体系 pH=7。其它条件同 1.2.1 所示。

1.2.6 分散剂的用量 以三氯甲烷为萃取剂,用量为 500 μL,乙腈为分散剂,分别选择 200、400、600、800、1000、1200 μL 六种水平,考察不同的分散剂用量对 FQs 萃取效率的影响。萃取体系 pH=7,其它条件同 1.2.1 所示。

1.2.7 pH 的影响 以三氯甲烷为萃取剂,用量为 500 μL,乙腈为分散剂,用量为 800 μL。以不同 pH 的磷酸氢二钠溶液调节 DLLME 萃取体系的 pH,考察在 pH=6~9 范围内 FQ 的萃取效果。其它条件同 1.2.1 所示。

1.2.8 方法学考察 配制系列标准溶液,考察方法的线性范围;检出限(LOD)按 S/N=3 计算;对 200 μg/L 的 FQs 标准溶液在日内和日间分别平行测定 6 次,考察方法重现性。以分析物被萃取前后色谱峰相对面积之比计算富集倍数。

1.2.9 实际样品测定 汉江水、鱼塘水及自来水经 0.45 μm 滤膜过滤后,各取 10 mL 置于 15 mL 具塞玻璃离心管中,各加入低浓度、高浓度两个水平标准 FQs 溶液,再按 1.2.1 所述方法进行处理,计算加标回收率及 FQs 实际含量。色谱分析数据以汉江水加高浓度水平 FQs 溶液萃取分析为例。

1.2.10 数据处理 考察萃取剂、分散剂的种类与用量、pH 等因素,将萃取后由 HPLC 测得的 6 种 FQs 峰面积及各因素水平导入 Origin 8.5 软件,制作折线图或柱形图,用于直观比较各因素水平对萃取效果的影响。

2 结果与分析

2.1 DLLME 的建立

DLLME 使用的萃取剂需要对分析物有良好的亲和性,且有良好的色谱行为。在对 FQs 萃取条件考察的过程中,发现采用三氯甲烷做萃取剂,萃取完成后直接进液相色谱仪分析,色谱峰严重变形,影响了检测灵敏度。

因此,本实验在 DLLME 后将萃取剂全部抽出,经 N₂ 吹干后用微量流动相复溶浓缩,和 HPLC 联用,测定实际水样中的六种 FQs,较好地改善了色谱峰形,提高了检测灵敏度。

2.2 萃取条件的考察

2.2.1 萃取剂的选择 经初步实验,在选定色谱条件下,二氧化碳与分散剂混合后,液滴损失严重。在同等条件下,萃取完成后将萃取剂全部抽出经 N₂ 吹干加入 25 μL 流动相复溶后,三氯甲烷做萃取剂可以获得最高的萃取效果(图 1)。本实验最后选择三氯甲烷作为萃取剂。

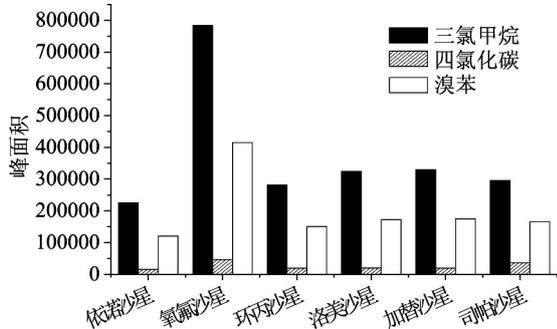


图 1 萃取剂种类的选择
Fig.1 Optimization of the type of extractant

2.2.2 萃取剂用量的影响 在同等条件下,三氯甲烷用量在 150~700 μL 范围内,萃取效率随着萃取剂用量的增加而增加(图 2)。原因是随着三氯甲烷用量的增大,进入有机相的分析物越来越多,但是随着三氯甲烷用量越大, N₂ 吹干耗用时间越长,复溶时流动相沿管壁加入后,涡旋溶解均匀难度增大。综合以上原因,实验选用三氯甲烷用量为 500 μL。

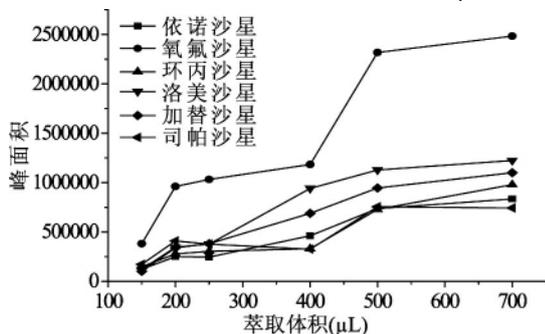


图 2 萃取剂用量的影响
Fig.2 Optimization of the extractant volume

2.2.3 分散剂的选择 分散剂的种类是影响萃取效率的另一关键因素,分散剂的极性应介于水和有机相之间,且能与萃取剂和水互溶。这样可以使萃取剂在水相中分散成细小的液滴,形成水/分散剂/萃取剂的乳浊液体系。结果表明,丙酮的溶剂峰过大,对分析物的干扰严重;甲醇、乙腈、乙醇可以很好地将三氯甲烷分散,色谱行为良好,不干扰测定。如图 3 所示,乙腈做分散剂时,萃取效果最好,且和流动相匹配,故实验选用乙腈做分散剂。

2.2.4 分散剂用量的影响 分散剂用量直接影响乳浊液体系的形成,影响萃取剂在水中的分散程度,从而影响萃取效率(图 4)。分散剂用量过少,不能很好的形成乳浊液,萃取效率低;用量过大,则会降低分析物在萃取剂中的分配系数,降低萃取效率。乙腈用量在 800 μL 时萃取效率最高,故分散剂用量选用 800 μL。

2.2.5 pH 的影响 FQ 结构上有羧基和哌嗪基,溶液

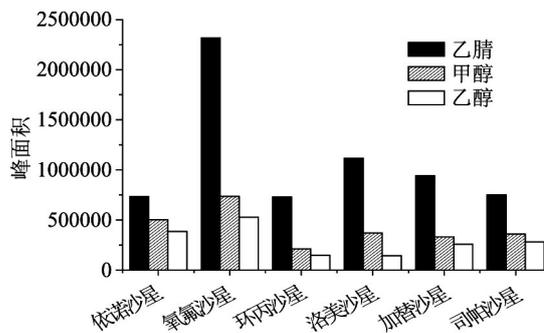


图 3 分散剂种类的选择

Fig.3 Optimization of the type of dispersant

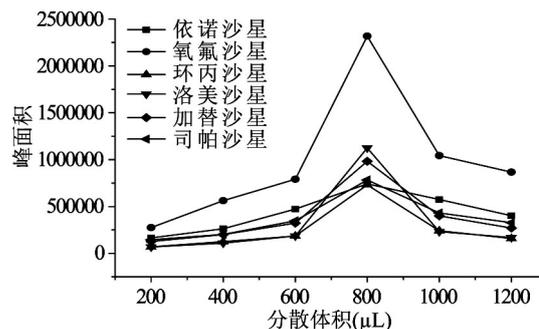


图 4 分散剂用量的影响

Fig.4 Optimization of the dispersant volume

的 pH 不同,其分子中氨基和羧基的带电情况不同,可以成正离子、负离子和中性分子^[10]。当 FQ 以中性分子状态存在时,其在有机相中的分配系数提高,萃取效率增大。显然, pH 对 FQ 的萃取效果有一定的影响。如图 5 所示,当 pH=7 时,大多数的 FQs 以中性分子的形式存在,且与三氯甲烷萃取剂的分配系数最高,从而表现高的萃取效率。实验选用样品溶液的 pH 为 7。

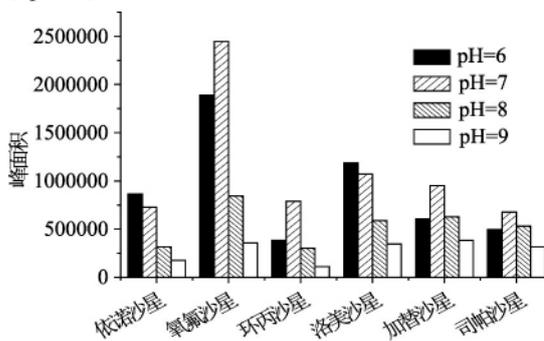


图 5 酸度的影响

Fig.5 Optimization of pH

2.3 线性范围、检出限、精密性、富集倍数

线性范围、检出限、方法重现性(RSD)、富集倍数结果见表 1。与常规的分散液液微萃取法(DLLME)^[5]、聚合物整体柱微萃取(PMME)^[11]、固相萃取法(SPE)^[12]、离子液体液相微萃取法(IL-LLME)^[13]法比较了有关分析灵敏度。由于本方法经过了 N₂ 吹干再复溶浓缩的过程,灵敏度高是其显著优点,尤其是氧氟沙星的检出限为 0.075 μg/L,远低于其他几种方法,司帕沙星虽然有较高的富集倍数,但是由于其出峰时间较晚,峰形展宽较严重,

表1 6种 FQs 的线性方程、检出限、精密度和富集倍数

Table 1 Linear equation, limit of detection, RSD and enrichment factor for six FQs

分析物	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	R^2	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	富集倍数	重现性 RSD(%)		其他方法比较	
					日内	日间	检出限($\mu\text{g/L}$)	
依诺沙星	1~1000	0.9902	0.2	35	1.3	2.6	1.1 ^A	
氧氟沙星	1~1000	0.9883	0.075	190	2.7	3.3	2.6 ^A	0.34 ^B
环丙沙星	1~1000	0.9955	0.22	34	4.4	5.8	1.7 ^A	1 ^D
洛美沙星	1~1000	0.9867	0.18	51	3.7	4.1	0.37 ^B	
加替沙星	1~1000	0.9916	0.28	160	3.5	3.7	0.46 ^C	
司帕沙星	1~1000	0.9976	0.34	245	4.0	4.3	-	

注: A: PMME 法; B: DLLME 法; C: I-LLME 法; D: SPE 法。

表2 样品测定结果

Table 2 Analytical results of samples

分析物	加标量 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(%, $n=5$)			测定值($\mu\text{g/L}$)		
		汉江水	鱼塘水	自来水	汉江水	鱼塘水	自来水
依诺沙星	50	90.8	89.3	103.6			
	200	92.8	93.0	98.4	ND	ND	ND
氧氟沙星	50	90.7	109.3	97.7			
	200	88.6	90.8	102.4	0.25	32.2	ND
环丙沙星	50	103.4	107.2	95.3			
	200	90.2	95.6	93.7	ND	ND	ND
洛美沙星	50	93.2	89.2	95.2			
	200	93.8	108.5	104.7	ND	25.6	ND
加替沙星	25	95.4	95.9	95.2			
	100	105.6	95.1	93.9	ND	ND	ND
司帕沙星	10	93.4	89.4	96.7			
	100	97.4	90.4	105.2	ND	ND	ND

注: ND: 未检出。

导致其检出限相对其他 FQs 略高。

2.4 实际样品测定

汉江水的加标色谱图见图6。

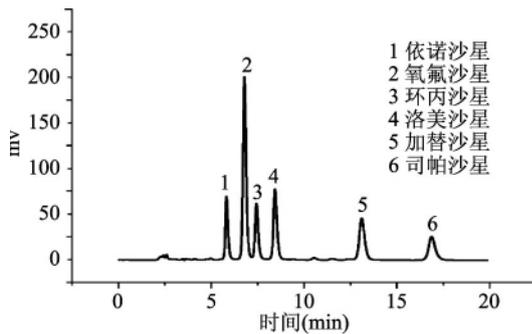


图6 样品测定色谱图

Fig.6 Chromatograms of sample determination

注: 汉江水加标(200 $\mu\text{g/L}$)。

为了考察样品基质对测定的影响,做了两个浓度水平的加标回收实验,结果见表2。实际样品的加标回收率在88.6%~109.3%之间,表明样品基质对分散萃取并无显著影响。鱼塘水中检出2种 FQs 的原因是由于其作为兽药类抗生素在使用,而汉江水中仅检测到一种 FQs 抗生素,且浓度远远低于鱼塘水,说明汉江水系由于流动性强、面积大,有利于稀释进入汉江水系的 FQs。

3 结论

建立了一种 DLLME-HPLC 同时测定水样中6种 FQs 的方法。该方法对6种 FQs 加标回收率可达88.6%~109.3%,检出限可达0.075~0.34 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差不高于5.8%。采用在萃取结束后将萃取剂全部抽出, N_2 吹干后再用微量的流动相复溶浓缩后进行测定,改善了常规 DLLME 萃取剂后直接进样和流动相不相容导致色谱峰变形、灵敏度降低的缺点,具有灵敏度高、简便、准确、环境友好等特点,在水样中 FQs 药物分析中有一定的推广应用价值。

参考文献

- [1] Linder J A, Huang E S, Steinman M A, et al. Fluoroquinolone prescribing in the United States 1995 to 2002 [J]. Am J Med, 2005, 118(3): 259-268.
- [2] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243-251.
- [3] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基(ARGS)-新型环境污染物[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1-7.
- [4] Graham D W, Olivares-Rieumont S, Knapp C W. Antibiotic Resistance Gene Abundances Associated with Waste Discharges to the Almendares River near Havana, Cuba [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(2): 418-424.

(下转第57页)

表9 进口俄罗斯食品中钡的检测结果(mg/L)

Table 9 Detection results of barium in imported Russian foods(mg/L)

名称	检出率(%)	限量值	检出限	平均值	最小值	最大值	超标率(%)
矿泉水	15.1	<0.7	0.00618	0.030	<0.00618	2.39	3.5

表10 进口俄罗斯食品中钡检测结果的t检验

Table 10 t-Test in the results of barium in imported Russian foods

名称	离差值 t	自由度 df	双尾概率 Sig.(双侧)	均值差值	差分 95% 置信区间	
					下限	上限
矿泉水检验值 =0.01	-24.112	85	0.000	-0.6699	-0.7251	-0.6147

的检出批数为13批,检出率为15.1%。其中有3批矿泉水中钡元素的含量超过GB 8537-2008《饮用天然矿泉水》规定的限量值(0.7 mg/L),最大值为2.39 mg/L。进口俄罗斯食品中钡的单样本T检验结果如表10所示。从表10中可以看到矿泉水钡含量的单样本 $p < 0.05$,具有差异显著性,其钡水平均低于其限量值,虽有检出,但未超出污染物限量要求。检出的原因可能跟矿泉水来源地的地质矿藏有关,自然界中钡的主要矿物为重晶石($BaSO_4$)和毒重石($BaCO_3$),因此应密切关注进口俄罗斯矿泉水的钡污染水平变化。

3 结论

本次监测的10类食品是黑龙江省两口岸进口俄罗斯食品量较大的品类,出现了部分样品不同程度的重金属污染,其中红茶粉、咖啡粉中铜的检出率达到了100%,并且超标比较多;扇贝、腌渍马哈鱼中铅、镉均有检出超标比率很高;矿泉水中的砷和钡也出现了超标现象,应该引起相关部门的足够重视,密切关注此类产品的铅、镉、砷以及钡的污染水平变化,建议有关部门设立专项监测计划,对本次监测污染水平较为严重的进口食品,特别是进口量大的产品进行专项监测,从而应对重金属污染水平带来的健康和贸易问题。

参考文献

[1]张鑫,孙慧娟,邱廷华,等.浅谈食品中重金属的危害及应对措施[J].山东化工,2015,44(13):167-168.

[2]曹秀珍,曾婧.我国食品中铅污染状况及其危害[J].公共卫生与预防医学,2014(6):34-36.
 [3]张娟萍,张喜凤.镉污染对人体危害的初探[J].价值工程,2013,25:282-283.
 [4]潘月华,白利珊.从砷的分布结构特性探讨其作用与危害[J].微量元素与健康研究,2013,13(5):71-73.
 [5]黄简抒,严蓉,宣丹丹,等.职业性钡化合物中毒105例临床分析[J].中国工业医学杂志,2016,13(1):61-63.
 [6]俎志平,贾永强.许昌市2010年食品污染物中重金属检测分析[J].中国卫生检验杂志,2012,22(11):2720-2721.
 [7]杨巍,蒋冬梅,王定勇.重庆市居民重金属膳食摄入水平研究[J].生态毒理学报,2009,4(1):50-56.
 [8]GB 5009.15-2014 食品安全国家标准食品中铜的测定[S].
 [9]GB 5009.12-2010 食品安全国家标准食品中铅的测定[S].
 [10]GB 5009.11-2014 食品安全国家标准食品中总砷及无机砷的测定[S].
 [11]GB/T 5009.13-2003 食品中铜的测定[S].
 [12]GB/T 8538-2008 饮用天然矿泉水检验方法[S].
 [13]GB 2762-2012 食品安全国家标准食品中污染物限量[S].
 [14]GB 7101-2003 固体饮料卫生标准[S].
 [15]GB 7100-2003 饼干卫生标准[S].
 [16]GB 2759.1-2003 冷冻饮品卫生标准[S].
 [17]GB 8537-2008 饮用天然矿泉水[S].

(上接第52页)

[5]Yan H Y, Wang H, Qin X Y. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical waste water[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(1): 53-57.
 [6]Rezaee M, Assadi Y, Milani H M R, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction[J]. J Chromatogr A, 2006, 1116(1-2): 1-9.
 [7]张彦杰,白小红,李利华,等.分散液液微萃取快速测定中药中4种味喃香豆素化合物[J].分析化学,2009,37(12):1805-1809.
 [8]丁宗庆,刘光东.分散液液微萃取-数码比色法测定环境及生物样品中亚硝酸根[J].分析化学,2009,37(1):119-122.
 [9]Chiang J S, Huang S D. Simultaneous derivatization and extraction of anilines in waste water with dispersive liquid-liquid

microextraction followed by gas chromatography - mass spectrometric detection[J]. Talanta, 2008, 75(1): 70-75
 [10]Babić S, Horvat A J M, Pavlović D M, et al. Determination of pK_a values of active pharmaceutical ingredients[J]. TrAC Trends Anal Chem, 2007, 26(11): 1043-1061.
 [11]黄京芳,冯钰琦,林幸华.聚合物整体柱管内固相微萃取-高效液相色谱在线联用测定血浆中的氟喹诺酮类药物[J].中国药理学杂志,2009,44(12):941-945.
 [12]杨守国,李兆新,王清印,等.高效液相色谱法检测海水养殖环境中喹诺酮类药物残留[J].渔业科学进展,2010,31(2):95-101.
 [13]张婧,赵文岩,刘富强,等.超声辅助离子液体液相微萃取高效液相色谱法分析水样中加替沙星或氟罗沙星[J].应用化学,2014,31(6):737-741.