

盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体中的衰减研究

黄金田¹ 丁 涛⁴ 郑 浩² 钱 伟² 熊勇君² 李俊美² 吴林坤³ 吕 富¹

(¹盐城工学院海洋技术系 江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室, 224051)

(²苏州出入境检验检疫局, 215021)

(³江苏省太湖渔业管理委员会, 苏州 215168)

(⁴江苏出入境检验检疫局, 南京 210001)

摘 要 采用超高效液相色谱-质谱串联法, 研究了不同养殖条件下盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的残留消除规律。结果表明, 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内衰减消除较慢, 停药 35d 后各组实验蟹体内的盐酸环丙沙星残留均远高于仪器检测限; 各组实验蟹体内盐酸环丙沙星残留衰减消除速率总体表现为, 28℃ 条件下的衰减消除速率快于 22℃; 五期幼蟹的衰减消除速率快于扣蟹; 室外开放水域中的消除速率快于室内条件。

关键词 盐酸环丙沙星 中华绒螯蟹 消除 超高效液相色谱-质谱串联法
中图分类号 S948 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0066-04

Elimination of ciprofloxacinum in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

HUANG Jin-tian¹ DING Tao⁴ ZHENG Hao² QIAN Wei²
XIONG Yong-jun² LI Jun-mei² WU Lin-kuen³ LÜ Fu¹

(¹Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology,
Jiangsu Key Laboratory of Coastal Pond Aquaculture Ecology, 224051)

(²Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 215021)

(³Taihu Lake Fishery Management Council of Jiangsu Province, Suzhou 215168)

(⁴Jiangsu Exit and Entry Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001)

ABSTRACT The elimination of ciprofloxacinum residue in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* under different culture conditions was studied by using Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS). The results showed that the elimination was so slow that even at 35-day after administration, the levels of ciprofloxacinum residue in all groups of *E. sinensis* were higher than the instrument detection limit. The elimination rate was faster at 28℃ than at 22℃, in the fifth stage larvae than in the button crabs, and in outdoor open water than the indoor environment.

KEY WORDS Ciprofloxacinum *Eriocheir sinensis* Eliminate UPLC-MS

盐酸环丙沙星(Ciprofloxacinum, CIP)又名环丙氟哌酸, 是抗菌活性较强的第 3 代氟喹诺酮类药物, 对人类多种细菌性疾病具有非常好的疗效, 但该药也具有较强毒副作用(陈 辉等 2003), 如能引起一些患者的过

敏性皮炎和痉挛,对精神病和癫痫病患者有诱发作用等。因其价格低廉,在国内外该药也曾广泛应用于水产动物细菌性疾病的防治(汪开毓 1997)。考虑到该药可能在水产动物体内残留,随食物链进入人体影响人类的健康,并诱导人类致病菌对该药产生耐药性,造成该药应用于人类疾病治疗的失败,我国《无公害食品渔用药物使用准则》(NY5071-2002)中已明确将其列为禁用药。中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 养殖是我国水产养殖业中的重要支柱产业,在养殖中曾广泛使用盐酸环丙沙星,目前盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内衰减消除规律的研究还未见报道,本文以中华绒螯蟹为受试对象,研究了两种规格(扣蟹和五期幼蟹)的中华绒螯蟹在开放性水域及室内 $22\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $28\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时盐酸环丙沙星的衰减消除规律,为食品安全的监管提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:扣蟹,购自上海崇明岛,规格 $68\pm 3.12\text{ g}$,粗脂肪含量 1.392% ;五期幼蟹,购自江苏省盐城市射阳县海明峰育苗场,规格 $1.25\pm 0.22\text{ g}$,粗脂肪含量 0.994% 。

试剂:盐酸环丙沙星(纯度 $\geq 98\%$)、诺氟沙星 D5(内标纯度 $\geq 90\%$)购自 Sigma 公司。甲醇、甲酸为色谱纯,乙腈、高氯酸、氯化钠均为分析纯。

仪器:串联四级杆液质联用仪 Thermo Ultra AM(配备 ESI 源和 APCI 源);Surveyor 液相色谱系统(其中自动进样器 Auto sampler 1.3,质谱泵 MS Pump 2.0);软件使用 Xcalibur 2.56 版。

1.2 实验设计

实验蟹购回后在室内暂养 12d 后停食 2d,用盐酸环丙沙星含量为 3 g/kg 的药饵于 06:00 时和 18:00 各 1 次充足投喂 2d,分为 4 组,前 3 组在室内进行。第 1 组将扣蟹放养于 8 只蓝色聚乙烯水槽中(规格: $68\text{ cm}\times 45\text{ cm}\times 50\text{ cm}$),水温 $22\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,水深 20 cm,养殖密度 20 只/桶;第 2 组将扣蟹放养于自动流水养殖系统(大连汇新海洋科技发展有限公司生产,型号:HXLS 5-40R)的 8 只蓄养槽中(规格:直径 80 cm,高 70 cm),水温 $28\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,水深 55 cm,养殖密度 20 只/桶。第 3 组将五期幼蟹放养于 8 只同第 1 组的水槽中,养殖密度 600 只/桶,其他条件同第 1 组。以上饲养用水为经净化和曝气处理的自来水,连续充气,每日饲喂无药饵料两次(06:00,18:00),扣蟹和五期幼蟹投饵率分别为体重的 5% 和 10%,每日换水 1/4,换水时去除残饵和粪便。第 4 组将扣蟹放养到苏州太湖东湖开放性水域 0.033 hm^2 的围网中,实验点水深 2.7~3.1 m,距岸 15 km,6 月平均水温 $30.7\text{ }^{\circ}\text{C}$,7 月平均水温 $30.8\text{ }^{\circ}\text{C}$,投饵同室内扣蟹。分组 24 h 后开始第 1 次取样(作为第 1 天取样),此后于分组的第 3、8、15、25、35 天取样,每次每组随机取蟹 500g 以上。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取一定量的 CIP、D5-NOR 标准品,溶解于适量甲醇中,配制成 1 mg/ml 标准溶液放置于冰箱中,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,将标准溶液用流动相依次稀释成 2、5、10、20、50、100、200 ng/ml 的标准工作溶液。

1.3.2 色谱和质谱条件

色谱条件:色谱柱 Varian Polaris C-18 $150\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}\times 5\text{ }\mu\text{m}$,柱温为室温;流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和甲醇(B),进样梯度见表 1。

1.3.3 标准曲线及最低检测限

进样之前色谱柱需要平衡至少 15 min,重复进标准溶

表 1 流动相梯度

Table 1 The gradient of mobile phase

时间 Time (min)	A (%)	B (%)	流速 Mobile speed(ml/min)
0~1.0	90	10	0.25
1.0~3.5	70	30	0.25
3.5~4.5	70	30	0.25
4.5~8.0	5	95	0.25
8.0~12.0	5	95	0.25
12.0~12.1	90	10	0.25
12.1~14.0	90	10	0.25

质谱条件:电离模式、极性:ESI,正离子模式;毛细管温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$;气体:鞘气(Sheath gas)35,辅助气(Auxiliary gas)5 Q2 (pressure)1.5;喷射电压 4.8KV;数据采集参数:width:0.002; scan time:0.005s, Q1=0.7, Q3=0.7

液,当峰面积变化在 $\pm 10\%$ 以内,保留时间变化在 $\pm 5\%$ 以内,方可正式开始进样。进样系列标准溶液浓度分别为2、5、10、20、50、100、200 ng/ml,所有检测样品相应值应在线性浓度范围以内。该方法检测低限为1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.3.4 样品处理

分别取扣蟹的蟹肉和蟹黄,五期幼蟹的全蟹,绞碎匀浆混匀,准确称取样品 $2.00 \pm 0.01 \text{ g}$ 于50 ml离心管中,加入氘代诺氟沙星100 ng后涡旋;加入15 ml 5%高氯酸溶液,涡旋1 min,超声20 min,8 000 r/min高速离心,将上层清液过滤到干净玻璃离心管中,加入1 mol/L醋酸铵缓冲溶液,调节pH至7.0。加入乙腈10 ml,加入适量氯化钠,涡旋1 min后,低速离心(2 000 r/min)至乙腈和水溶液分层。吸取上层乙腈溶液至干净玻璃离心管中,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至干后,1.0 ml 甲醇+水(30%+70%)定容,经0.45 μm 的滤膜过滤到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

1.3.5 回收率及方法精密度测定

在空白样品中加入标准溶液,放置至少30 min,使药物渗入组织,相当于盐酸环丙沙星为10、25和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个浓度。按样品处理方法处理后进行检测,所得浓度数值与标准液直接进样测得的浓度数值之比,即为回收率,每个浓度做4个平行,具体数据见表2。

表2 盐酸环丙沙星与D5-诺氟沙星的质谱条件
Table 2 ESI MS/MS conditions of CIP and D5-NOR

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (M/Z)	子离子 Offspring ion (M/Z)	碰撞能量 Collision energy (eV)	定量离子 Quantitative ion
盐酸环丙沙星 CIP	332	231 288	30 16	231
D5-诺氟沙星 D5-NOR	325	281	21	281

2 结果

各实验组中华绒螯蟹体内盐酸环丙沙星残留检测结果见表3。第1次检测时,室内28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下扣蟹体内盐酸环丙沙星的含量最高,其次为室内22 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的扣蟹,太湖围网扣蟹的含量最低。各组实验蟹体内盐酸环丙沙星的残留随时间延长而下降,但衰减消除速率较慢,休药35d后各组实验蟹体内盐酸环丙沙星的残留仍远高于仪器检测限。各组实验蟹体内盐酸环丙沙星残留衰减消除速率总体表现为:开放性大水体中盐酸环丙沙星的衰减消除速率快于室内小水体;28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的衰减消除速率快于22 $^{\circ}\text{C}$;五期幼蟹的衰减消除速率快于扣蟹。

表3 回收率及方法精密度测定结果

Table 3 Results of the recovery and RSD determination

测定次数 Measure time	盐酸环丙沙星 CIP($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	10	25	50
1	8.5	23.84	48.8
2	8.87	23.07	46.38
3	7.74	23.24	48.67
4	8.07	24.87	51.43
平均值 Average	8.30	23.76	48.82
回收率 Recovery (%)	82.95	95.02	97.64
RSD (%)	5.95	3.42	4.23

3 讨论

3.1 药物感染方式和实验温度确定

水产苗种生产中使用盐酸环丙沙星多采用加入饵料或水体中的方法,而大规模养殖生产中为了保证利用效率及环境保护多采用药饵的形式。本实验目的是为了探讨盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的残留衰减规律,与杨先乐等(2003)研究盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学不同,故未采用肌肉注射的方式给药,而是根据生产实际采用药饵的方式进行药物感染。

中华绒螯蟹育苗水温一般在18~26 $^{\circ}\text{C}$ 之间,幼蟹起始生长温度一般在22 $^{\circ}\text{C}$ 以上,生长最快和代谢较旺盛的水温在28~30 $^{\circ}\text{C}$,本研究中室内实验将温度设定为22和28 $^{\circ}\text{C}$,主要依据中华绒螯蟹的正常生长温度而定。

3.2 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的衰减消除规律

杨先乐等(2003)选择从中华绒螯蟹第4步足与体关节膜处肌肉注射给药方法研究盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学,第1次给药剂量雄蟹为 $8.17 \pm 0.56 \text{ mg}/\text{kg}$,雌蟹为 $6.25 \pm 0.85 \text{ mg}/\text{kg}$;第2次给药

剂量雄蟹为 5.99 ± 0.27 mg/kg, 雌蟹为 6.05 ± 0.32 mg/kg, 经 216 h 后, 血淋巴和肌肉组织中盐酸环丙沙星的残留均不能检出。本研究表明, 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的残留消除较慢, 休药 35 d 后各组实验蟹体内盐酸环丙沙星的残留仍远高于仪器检测限。二者研究结果差异可能与取样部位有关。前者只测定血淋巴和肌肉组织中的残留, 本研究测定扣蟹的可食部位和五期幼蟹的全蟹, 包含了性腺和肝胰腺等。

本研究虽未检测用药结束初始时各组实验蟹体内环丙沙星的含量, 但可根据摄食率估算各组实验蟹体内环丙沙星含量的高低。一般而言, 五期幼蟹较同温度条件下扣蟹摄食率高, 适温条件下高温 (28°C) 较低温 (22°C) 时摄食率高, 摄入的药量也就相对高, 因此用药结束初始时, 五期幼蟹较同温度条件下扣蟹环丙沙星的含量高, 28°C 较 22°C 条件下扣蟹环丙沙星的含量高。由表 4 可见, 休药 24 h 后五期幼蟹体内环丙沙星含量均低于同期同温度条件下扣蟹, 说明同温度条件下五期幼蟹对盐酸环丙沙星的衰减消除速率快于扣蟹, 这可能与二者的脂肪含量有关, 盐酸环丙沙星为卤代化合物, 有一定的亲脂性 (Takacs-Novák 等 1993), 故较易蓄积在动物脂肪组织中。经检测本研究中五期幼蟹粗脂肪含量为 0.994%, 扣蟹粗脂肪含量为 1.392%。

研究表明, 水温对盐酸环丙沙星的代谢衰减消除速率有很大影响, 28°C 水温条件下盐酸环丙沙星的代谢衰减消除速率要快于 22°C 水温。水温对盐酸环丙沙星衰减消除速率的影响可能与中华绒螯蟹体内盐酸环丙沙星相关代谢酶的适温条件有关, 28°C 可能比较接近其最适温度, 因此药物消除更快; 另外, 在适宜温度范围内, 较高的温度条件下中华绒螯蟹摄食和代谢加强, 会有更多的粪便和排泄物排出体外, 从而促进盐酸环丙沙星通过粪便和排泄物排出体外; 再者, 28°C 水温条件下扣蟹的生长速度明显快于 22°C 水温, 使得盐酸环丙沙星因体重增加导致相对含量下降。

研究还发现太湖开放性水域中华绒螯蟹体内盐酸环丙沙星的残留消除速度要快于室内条件, 这除了与室外水温较室内水温高有关外, 与开放性水域的水交换和底泥吸附以及生物降解和腐殖酸作用等也有很大关系 (张春艳等 2009)。有研究表明, 一些喹诺酮类抗菌药物如恩诺沙星 (宋红波等 2008) 和氟甲喹 (Palominos *et al.* 2008; Nieto *et al.* 2008) 在光照条件下的降解速度显著加快。因此, 室外光照条件也是促进盐酸环丙沙星衰减消除速率加快的可能原因, 当然这有待于进一步研究证实。

4 小结

本研究可见, 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内衰减消除速率较慢, 休药 35d 后各组实验蟹体内盐酸环丙沙星残留仍远高于仪器检测限。考虑到盐酸环丙沙星对消费者的危害及可能诱导人类致病菌对该药产生耐药性, 因此应杜绝该药在中华绒螯蟹养殖中使用。

参 考 文 献

- 陈 辉, 杨先乐. 2003. 渔用药无公害使用技术. 北京: 中国农业出版社, 151~158
- 汪开毓. 1997. 喹诺酮类抗菌渔药的开发应用. 淡水渔业, 27(2): 22~25
- 杨先乐, 刘至治, 横山雅仁. 2003. 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内药物代谢动力学研究. 水生生物学报, 27(1): 18~22
- Takacs-Novák, K., 郭育红, 苗 华. 1993. 氟喹诺酮类抗菌药物的亲脂性. 国外医药(抗生素分册), 3: 209~212, 217
- 张春艳, 周孝治, 陈菊芳, 聂湘平. 2009. 环丙沙星在模拟水生态系统中的动态研究. 生态与农村环境学报, 25(3): 73~78
- 宋红波, 吴光红, 沈美芳, 葛筱琴. 2008. 恩诺沙星在水产品中残留的风险评估. 渔业现代化, 35(5): 39~42
- Palominos, R., Freer, J., Mondaca, M. A., and Mansilla. H. D. 2008. Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 193:139~145
- Nieto, J., Freer, J., Contreras, D., Candal, R. J., Sileo, E. E., and Mansilla, H. D. 2008. Photocatalyzed degradation of flumequine by doped TiO₂ and simulated solar light. J. Hazardous Materials, 155(1-2): 45~50

表 4 盐酸环丙沙星检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 4 Results of CIP determination ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

实验组别 Experimental group	取样时间 Sampling time					
	1d	3d	8d	15d	25d	35d
1 组	11 100	3 970	62	51	40.8	31.2
2 组	12 402	4 818	54.1	34.5	19	14.2
3 组	7 680	2 260	22	20.8	18.9	11.6
4 组	6 020	1 700	28.3	19.5	13.8	8.2