

诺氟沙星的氯化反应及其遗传毒性的变化^{*}

朱 舟 胡建英^{**}

(北京大学城市与环境学院, 北京, 100871)

摘 要 分别以诺氟沙星初始浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $25 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 进行氯化消毒实验, 用 HPLC 和 SOS/*umu* 遗传毒性测试方法, 分别测定不同氯化消毒反应时间后残留诺氟沙星的浓度和遗传毒性, 反应速度常数分别为 0.0243min^{-1} 和 0.0226min^{-1} ; 在高浓度反应组, 反应 45 min 后反应液的遗传毒性效应有明显的提高, 其 EC_{50} 为 $131 \text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 低于反应前的 EC_{50} ($181 \text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), 表明在反应过程中生成了遗传毒性高于母体的中间产物。

关键词 诺氟沙星, 氯化反应, SOS/*umu* 测试法, 遗传毒性。

近年来, 在地表水体中检出喹诺酮 (诺氟沙星是检出水平和频率最高的一种), 如 Kolpin 等^[1-3] 在美国和瑞士的河道中检出诺氟沙星 $10-120 \text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$, Xu 等^[4] 在中国的珠江和维多利亚港检出诺氟沙星 $11-166 \text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$. 饮用水源中存在的喹诺酮类抗生素在饮用水处理工艺过程中的行为已经引起了研究者的广泛关注. 氯化消毒是饮用水的一个关键处理单元, Dodd 等^[5] 系统研究了喹诺酮类抗生素环丙沙星和恩诺沙星的氯化消毒反应动力学和反应途径, 并根据物质结构推测消毒副产物保留了原抗生素的抑菌活性. 另外, 喹诺酮类抗生素能够诱导很强的细菌遗传毒性^[6]. 因此, 为了更好的评价饮用水源中存在的喹诺酮类抗生素对人群的健康风险, 有必要对其在氯化消毒反应过程中遗传毒性的变化进行研究。

本文选取诺氟沙星作为研究对象, 在实验室内模拟典型氯化消毒处理工艺, 运用高效液相色谱 (HPLC) 分析不同氯化消毒反应时间诺氟沙星的残留浓度, 研究该物质的氯化反应动力学; 同时利用 Oda 等^[7] 根据 DNA 损伤诱导 SOS 反应而表达 *umuC* 基因这一基本原理建立的 SOS/*umu* 遗传毒性快速测试法, 对氯化反应过程中遗传毒性的变化进行了探讨。

1 实验部分

1.1 氯化消毒实验

用超纯水 (电导率为 $18.1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) 超声洗净棕色硼硅酸盐玻璃瓶, 于 105°C 烘干后, 作为反应容器; 用恒温水浴振荡器维持反应体系温度为 20°C , 转速为 $100 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

用超纯水分别配制 $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (低浓度组) 和 $25 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (高浓度组) 的诺氟沙星溶液 2 L, 用 $0.025 \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液维持反应体系的 $\text{pH} = 6.80$. 各取出 400 ml 作为反应前的样品, 向剩下的溶液中加入次氯酸钠使余氯分别为 $1.75 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $53 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 开始反应并计时. 间隔一定时间各取出 400 ml 水样, 测定余氯, 然后, 加入适量 $1 \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 消除余氯. 依次用 6 ml 丙酮、6 ml 甲醇和 6 ml 超纯水 ($\text{pH} = 3$) 活化 HLB 柱, 然后用 $2 \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_2SO_4 调节低浓度组水样的 $\text{pH} = 3$, 再以 $10 \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进样浓缩水样. 氮气吹干 HLB 柱后, 用 6 ml 甲醇洗脱, 洗脱液平均分为两部分, 均在微弱的氮气流下吹干; 一部分用二甲基亚砜 (DMSO) 定容至 $80 \mu\text{l}$, 供 *umu* 测试, 另一部分用甲醇定容至 $1000 \mu\text{l}$, 供 HPLC 分析. 高浓度组的反应水样不经浓缩, 直接进行 *umu* 测试和 HPLC 分析。

Waters 600E Waters 2487 Dual Absorbance Detector; Waters Symmetry ShieldTM ($4.6 \text{mm} \times 250 \text{mm} \times 5 \mu\text{m}$) 色谱柱; Waters OASIS 500mg HLB 固相萃取柱; 流动相 A 为含 0.2% 甲酸的超纯水, 流动相 B

2007 年 12 月 5 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金委员会国际重大合作项目 (20610103); 科技部国际科技合作项目 (2006DFA91130).

^{**} 通讯联系人: hujy@urban.pku.edu.cn

为乙腈. 流动相的设定: 在 25min 内将 B 相从 5% 增加到 50%, 然后在 5min 内提高到 100%; 流速为 $1\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. 进样 $5\mu\text{l}$, 紫外检测波长为 275nm.

1.2 *umu* 测试方法

取 $40\mu\text{l}$ 冷冻的 *S. typhimurium* TA1538/pSK1002 菌液, 先后在 L-B 培养基和 TGA 培养液中培养. 取 $300\mu\text{l}$ 培养后的菌液, 加入 $3\mu\text{l}$ 梯度稀释后的样品溶液 (试验所用阴性对照及样品稀释溶剂与样品溶液所用溶剂相同), 振荡摇匀, 进行培养. 移取 $150\mu\text{l}$ 菌液置于酶标板中, 在 595nm 波长下测定其吸光度值.

另取 $100\mu\text{l}$ 反应菌液加入 1ml Z-buffer 溶液、 $50\mu\text{l}$ $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ SDS (十二烷基磺酸钠) 水溶液和 $10\mu\text{l}$ 三氯甲烷, 振荡摇匀; 加入 $200\mu\text{l}$ 含 $6\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 邻硝基酚 - 半乳糖苷 (ONPG) 的缓冲溶液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置反应 20min, 加入 $500\mu\text{l}$ $1\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液停止反应, 吸取 $150\mu\text{l}$ 上清液置于酶标板中, 分别在 415nm 和 570 nm 波长下测定吸光度值. 计算 半乳糖苷酶诱导活性:

$$\text{半乳糖苷酶诱导活性 (Unit)} = 1000 \times (A_{415} - 1.75 \times A_{570}) / (t \times v \times A_{595})$$

式中, t 为加入 ONPG 到出现黄色的反应时间 (本文中为 20 min); v 为反应菌液在显色过程中的稀释倍数 (本文中为 0.09); A_{595} , A_{415} 和 A_{570} 为吸光度值.

使用 GraphPad Prism 软件计算不同反应时间的反应液的 EC_{50} (各反应液的 半乳糖苷酶诱导活性为诺氟沙星的诱导活性的最大值的 50% 时所对应的浓度).

2 结果与讨论

2.1 诺氟沙星初始浓度为 $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氯化实验

在诺氟沙星初始浓度 $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, 加氯 $1.75\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 6.80$, $T = 20^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 诺氟沙星降解迅速, 反应 30min 后, 诺氟沙星浓度从反应前的 $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 降到 $3.8\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, 待反应进行至 120min 终止后, 没有检出诺氟沙星. 对于整个反应过程, 初始投加的自由氯与诺氟沙星的摩尔浓度比 $> 10:1$, 反应 pH 值和温度保持稳定, 自由氯在反应前后减少 $< 5\%$; 用诺氟沙星残留百分比的自然对数 $[\ln(C/C_0)]$ 对反应时间 (t) 作线性回归, $\ln(C/C_0) = -0.0243t$ ($R^2 = 0.9798$). 发现两者有良好的相关性, 说明反应过程符合一级反应, 其反应速度常数 k_{obs} 为 0.0243min^{-1} .

图 1 是不同反应时间诺氟沙星氯化溶液的遗传毒性效应 *umu* 测试结果. 由图 1(a) 可知, 氯化溶液的遗传毒性随着反应的进行逐渐降低. 反应前 (0 min) 的样品即诺氟沙星显示了很强的遗传毒性, 30 min 的氯化溶液遗传毒性同反应前的溶液相比, 降低了一半, 反应 60 min 和 120 min 后的溶液已经没有明显的阳性效应, 即没有遗传毒性. 为了研究各反应溶液的遗传毒性中诺氟沙星的贡献, 进一步了解消毒副产物是否具有遗传毒性, 从诺氟沙星的残留浓度看, 不同反应时间的剂量-效应曲线非常吻合如图 1(b) 所示, 表明氯化样品的遗传毒性可能主要来自其中残留诺氟沙星的贡献, 反应生成的副产物没有明显的遗传毒性.

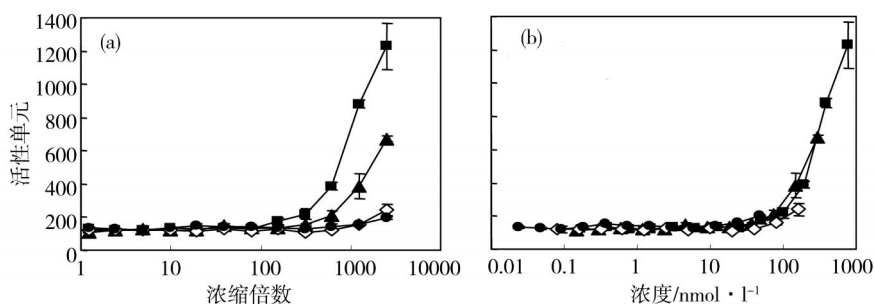


图 1 诺氟沙星初始浓度为 $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 时氯化溶液的遗传毒性剂量-效应曲线

■—0min ▲—30min ◇—60min ●—120min

Fig. 1 Dose-response curves of genotoxicity of chlorinated solutions of Norfloxacin at initial concentration of $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

2.2 诺氟沙星初始浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化实验

考虑到在固相萃取过程中, 诺氟沙星的氯化产物可能会有一定程度的损失, 为了消除这类损失对实验结果的影响, 本文加大诺氟沙星初始反应浓度至 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在反应过程中取样经消除余氯后, 直接进行 *umu* 测试和 HPLC 分析.

在诺氟沙星初始浓度 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 加氯 $53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 6.80$, $T = 20$ 的条件下, 反应 30 min 后, 诺氟沙星浓度从反应前的 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降到 $10.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 待反应进行至 120 min 后, 诺氟沙星仅仅残留 14%. 在反应 0—90 min 内, 自由氯减少 $< 15\%$, 初始投加的自由氯与诺氟沙星的摩尔浓度比 > 10 , 反应 pH 值和温度保持稳定, 用 $\ln(C/C_0)$ 对 t 作线性回归, 发现两者也有良好的相关性, 得到方程: $\ln(C/C_0) = -0.0226 t (R^2 = 0.9253)$. 说明反应过程也符合一级反应, 其反应速度常数 k_{obs} 为 0.0226 min^{-1} , 反应速度略低于低浓度反应体系.

图 2 是该反应条件下, 不同反应时间诺氟沙星氯化溶液的遗传毒性效应 *umu* 测试结果, 坐标为对数刻度. 由图 2 可知, 除反应 45 min 的样品外, 其它反应点的反应液的遗传毒性都在相似的诺氟沙星浓度下显示遗传毒性效应, 表明这些反应溶液的遗传毒性可能主要由诺氟沙星贡献. 值得注意的是 45 min 反应溶液的遗传毒性效应 EC_{50} 为 $131 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于诺氟沙星的 EC_{50} ($181 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 表明 45 min 反应溶液中存在遗传毒性高于母体的中间产物.

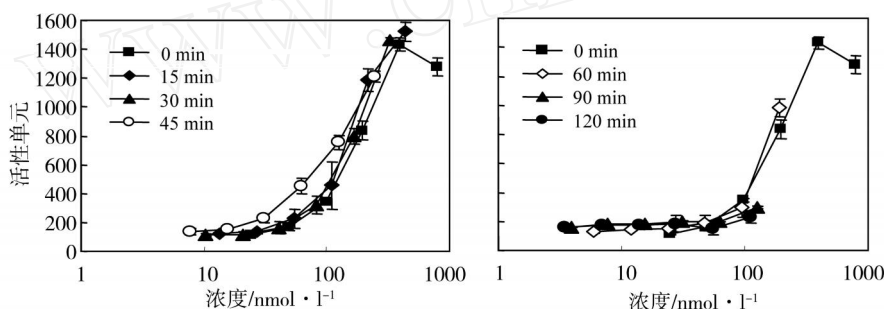
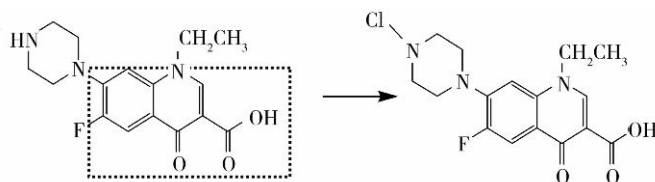


图 2 诺氟沙星初始浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时氯化溶液的遗传毒性剂量-效应曲线

Fig. 2 Dose-response curves of genotoxicity of chlorinated solutions of Norfloxacin at initial concentration of $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

在低浓度组反应体系中没有发现反应后遗传毒性增强的现象, 可能是由于目前的固相萃取方法没有很好的富集或者洗脱出该类物质; 或是由于该类物质很容易进一步和氯反应生成其它低遗传毒性效应的副产物. 从目前关于环丙沙星的氯化消毒反应机理的研究结果来看, 诺氟沙星氯化反应初期主要是在其结构中对二氮己环的氮原子上发生氯原子取代形成一种有机氯胺:



喹诺酮类抗生素药效的主要活性基团是喹诺酮环 (虚线框), 氟原子和对二氮己环的附加都是为了增强抗生素的药效, 由此可以推断, 诺氟沙星氯化生成的这种有机氯胺的抗生素作用活性强于诺氟沙星; 同时, 我们的研究表明, 喹诺酮类抗生素的药效愈强, 其诱导遗传毒性的能力也愈强^[6], 结合本文的实验结果, 我们推测在诺氟沙星氯化反应过程中, 可能产生了这种有机氯胺类副产物, 并且该物质具有遗传毒性.

3 结论

(1) 在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (低浓度) 和 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (高浓度) 两组氯化消毒实验中, 诺氟沙星的降解均比较迅速; 诺氟沙星的降解反应速度常数分别为 0.0243 min^{-1} 和 0.0226 min^{-1} , 低浓度组略高.

(2) 低浓度反应组, 反应溶液的遗传毒性效应主要来源于残留诺氟沙星的贡献, 反应生成的副产物没有明显的遗传毒性; 高浓度反应组, 反应 45min 后反应溶液的遗传毒性效应有明显的提高, 其 EC_{50} 为 $131 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 低于反应前即诺氟沙星的 EC_{50} ($181 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), 表明在反应过程中生成了遗传毒性高于母体的中间产物。

参 考 文 献

- [1] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T et al., Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U. S. Streams, 1999—2000: A National Reconnaissance [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36** (6) 1202—1211
- [2] Golet E M, Alder A C, Giger W, Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36** (17) 3645—3651
- [3] Kolpin D W, Skopec M, Meyer M T et al., Urban Contribution of Pharmaceuticals and Other Organic Wastewater Contaminants to Streams during Differing Flow Conditions [J]. *Sci. Total Environ.*, 2004, **328** (1-3) 119—130
- [4] Xu W H, Zhang G, Zou S C et al., Determination of Selected Antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. *Environ. Pollut.*, 2007, **145** (3) 672—679
- [5] Dodd M C, Shah A D, Gunten U V et al., Interactions of Fluoroquinolone Antibacterial Agents with Aqueous Chlorine: Reaction Kinetics, Mechanisms, and Transformation Pathways [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39** (18) 7065—7076
- [6] Hu J Y, Wang W F, Zhu Z et al., Quantitative Structure - Activity Relationship Model for Prediction of Genotoxic Potential for Quinolone Antibacterials [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41** (13) 4806—4812
- [7] Oda Y, Nakamura S, Oki I et al., Evaluation of the New System (umu - test) for the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens [J]. *Mutation Research*, 1985, **147** 219—229

AQUEOUS CHLORINATION OF NORFLOXACIN AND CORRESPONDING GENOTOXICITY VARIATION

ZHU Zhou HU Jian-ying

(College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing, 100871, China)

ABSTRACT

Aqueous chlorination of Norfloxacin at initial concentration of $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ in clean water at neutral pH conditions were investigated. The Norfloxacin concentrations of aqueous chlorinated solutions during reaction were analyzed using HPLC method to investigate the reaction dynamics. The pseudo-first-order rate constants were determined to be 0.0243 min^{-1} and 0.0226 min^{-1} at initial concentration of $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively. The genotoxicity of aqueous chlorinated solutions were also determined by a SOS/umu test. The genotoxicity induced by the chlorinated solution at 45 min reaction time when initial concentration of norfloxacin was $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ was obviously higher than that before chlorination of which EC_{50} was $131 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, lower than that before chlorination ($181 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), suggesting that some disinfection by-products with higher genotoxicity than the parent were formed during chlorination of norfloxacin.

Keywords: Norfloxacin, chlorination, SOS/umu test, genotoxicity.