

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019021304

王娅南, 彭洁, 谢双, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定地表水中 40 种抗生素[J]. 环境化学, 2020, 39(1): 188-196.

WANG Yanan, PENG Jie, XIE Shuang, et al. Determination of 40 antibiotics in surface water by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(1): 188-196.

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法 测定地表水中 40 种抗生素*

王娅南^{1,2,3,4} 彭洁^{1,2,3,4} 谢双^{2,4} 饶竹¹ 战楠¹ 黄心眉¹
黄合田^{1,2,3,4} 郭峰^{1**} 杨鸿波^{2,4**}

(1. 国家地质实验测试中心, 自然资源部生态地球化学重点实验室, 北京, 100037;
2. 贵州省分析测试研究院, 贵阳, 550000; 3. 贵阳市公共卫生救治中心, 贵阳, 550004;
4. 贵州医科大学公共卫生学院, 贵阳, 550025)

摘要 建立了固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法(HLB-HPLC-MS/MS)分析地表水中 15 种磺胺类(SAs)、9 种氟喹诺酮类(QNs)、7 种大环内酯类(MCs)、3 种四环素类(TCs)、2 种氯霉素类(CAPs)和 4 种其他类(Others)共 40 种抗生素的分析方法. 通过重点优化水样不同 pH 值、乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA)加入量、色谱条件和质谱参数等确定了最佳分析条件. 水样经 HLB 固相萃取柱富集净化, 采用 Agilent Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离, 正、负离子模式分别采集, 正离子模式采用 0.2% 甲酸-2 mmol 乙酸铵水溶液和甲醇-乙腈(V/V, 1:1)作流动相梯度洗脱分离 38 种单体; 负离子模式采用纯水和甲醇-乙腈(V/V, 1:1)作流动相梯度分离 2 种单体, 多重反应监测模式分析, 内标法定量. 结果显示: 目标分析物线性范围在 1.00—200 ng·mL⁻¹ 之间, 相关系数 r^2 均大于 0.99, 方法检出限在 0.002—0.270 ng·L⁻¹ 之间, 地表水加标回收率在 61.0%—149% 之间, 相对标准偏差(RSD)在 1.2%—32% 之间. 方法成功应用于贵阳市南明河 12 个地表水分析, 共检出 34 种抗生素, 其中大环内酯类检出浓度最高, 平均浓度为 257 ng·L⁻¹.

关键词 固相萃取, 高效液相色谱串联质谱, 抗生素, 地表水.

Determination of 40 antibiotics in surface water by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Yanan^{1,2,3,4} PENG Jie^{1,2,3,4} XIE Shuang^{2,4} RAO Zhu¹ ZHAN Nan¹
HUANG Xinmei¹ HUANG Hetian^{1,2,3,4} GUO Feng^{1**} YANG Hongbo^{2,4**}

(1. National Research Center for Geoanalysis, Key Laboratory of Eco-Geochemistry, Ministry of Natural Resources, Beijing, 100037, China;
2. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang, 550000, China; 3. Guiyang Public Health Clinical Center, Guiyang, 550004, China;
4. Guizhou Medical University, School of Public Health, Guiyang, 550025, China)

Abstract: A method was developed for the determination of 40 antibiotics including 15 sulfonamides (SAs), 9 fluoroquinolones (QNs), 7 macrolides (MCs), 3 tetracyclines (TCs),

2019 年 2 月 13 日收稿(Received: February 13, 2019).

* 国家自然科学基金(21507017, 21966011), 国家国际科技合作专项(2015DFA41280)和中国地质调查局地质调查项目(DD20189627)资助.

Supported by National Natural Science Foundation of China (21507017, 21966011), National International Science and Technology Cooperation Special Project (2015DFA41280) and China Geological Survey Project of China (DD20189627).

** 通讯联系人, E-mail: fengguo@cags.ac.cn; hbyang@gzata.cn

Corresponding author, E-mail: fengguo@cags.ac.cn; hbyang@gzata.cn

2 chloramphenicols (CAPs) and 4 other classes in surface water by solid phase extraction coupled high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS). The optimum analytical conditions were determined by optimizing the pH value of water samples, the amount of sodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA), chromatographic conditions and mass spectrometry parameters. HLB cartridge was selected to enrich and purify water samples. The analytes were separated on Agilent Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 columns ($2.1\text{ mm} \times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$) and were detected by positive and negative ion modes in multiple reaction monitoring (MRM) modes. In the positive mode, 38 antibiotics were separated by gradient elution with 0.2% formic acid and 2 mmol ammonium acetate in water and methanol-acetonitrile (V/V , 1:1) mixture. In negative mode, 2 antibiotics were separated by gradient elution with pure water and methanol-acetonitrile (V/V , 1:1) mixture. The antibiotics were quantified by internal standard method. The calibration range was from $1.00\text{--}200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ with the correlation coefficients >0.99 . The method limits of detection were in the range of $0.002\text{--}0.270\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. The recoveries of target compounds at three spiked levels ranged from 61.0% to 149% with relative standard deviations of 1.23%—32.0%. The developed method was successfully applied to the analysis of 12 water samples from Nanming River in Guiyang City. In total 34 antibiotics were detected, of which macrolides were the predominant compounds with the average concentration of $257\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords: solid phase extraction, high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, antibiotics, surface water.

抗生素是一类可有效抑制微生物活性的化合物,具有预防和治疗人类和动物疾病、促进生长等作用,被广泛地应用于医疗、农业生产和畜牧养殖业^[1].逐年增长的抗生素产量和销量引发的抗生素滥用现象不容忽视^[2].研究表明抗生素使用后不能完全被机体吸收代谢,约有 60%—90% 随着尿液或粪便进入环境,进而通过迁移转化进入水环境^[3].残留在水环境中的抗生素通过生物放大作用对人的健康和水生生物造成潜在风险^[4-5].抗性基因已经被世界卫生组织列为对公众健康和生态环境造成危害的三大威胁之一^[6].水环境中抗生素的赋存水平、环境归趋、抗性基因及生态风险一直是国内外关注的热点^[7],因此构建高灵敏度、准确可靠、同时测定多种类抗生素检测方法是进行相关研究的首要基础.

目前国内外采用的抗生素分析方法多为液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS 或 HPLC-MS/MS),富集净化方法以固相萃取(SPE)技术为主^[8-9].但是,由于抗生素种类多、单体性质差异大,且环境基质复杂多样,实现高灵敏同时快速分析较困难.目前,国际上已报道的方法分析种类少、灵敏度低、耗时长.Du 等采用 SPE-HPLC-MS/MS 技术在多重反应监测扫描模式(MRM)实现了 6 类 23 种抗生素的分析检测,涉及的抗生素种类较少且耗时较长^[10].Zhou 等实现了水中 7 类共 50 种抗生素同时分析,回收率为 32.0%—292%,方法涉及种类多,但其中 16 种化合物表现出明显的基质增强,且部分物质方法检出限达到 $1.57\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11],灵敏度仍有待提高.因此,需要针对抗生素极性和样品基质特点优化前处理方法和仪器参数寻求最佳实验方案.

本研究结合我国抗生素使用特征,选择环境中检出率高、检出浓度大的化合物,确定 6 类包括 15 种磺胺类(SAs),9 种氟喹诺酮类(QNs),7 种大环内酯类(MCs),3 种四环素类(TCs),2 种氯霉素类(CAPs)和 4 种其他类(氯唑西林(CLOX)、林可霉素(LIN)、莫能霉素(MON)、盐霉素(SAL))共 40 种抗生素为目标分析物,采用 SPE-HPLC-MS/MS 技术,通过优化色谱、质谱条件以及前处理方法,建立了测定地表水中 40 种抗生素的分析方法,方法成功地应用于贵阳市南明河地表水中抗生素的分析测定.本方法不仅提高了多种类抗生素分析的准确性和灵敏度,而且缩短了分析时间,为地表水中多种类抗生素同时分析提供了又一可靠的分析方法,具有较强的实用价值.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器:高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪:Agilent 1260-6460C,Masshunter 色谱工作站(美国安

捷伦科技有限公司)、24 孔固相萃取装置(美国 Waters 公司)、TG16W 高速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)、Oasis HLB 固相萃取柱小柱(6 cc/500 mg, 美国 Waters 公司)、Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm, 美国安捷伦科技有限公司)。

试剂:甲醇与乙腈(色谱纯,德国默克公司)、甲酸与氨水(色谱纯,天津科密欧试剂有限公司)、乙酸铵(色谱纯,美国 Fisher 公司)、乙二胺四乙酸二钠盐(Na_2EDTA)(分析纯,国药集团化学试剂公司)。

标准品:磺胺二甲嘧啶(SMZ)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺乙酰胺(SCT)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺甲异恶唑(SMX)、磺胺间二甲氧嘧啶钠(SSS)、磺胺噻唑(ST)、醋酸铵甲恶唑(ASMZ)、磺胺二甲异恶唑(SIZ)、磺胺胍(SG)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺对甲氧嘧啶(SM)、磺胺多辛(SDO)、磺胺甲嘧啶(SMR)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、四环素(TC)、土霉素(OTC)、强力霉素(DC)、马波沙星(MAR)、氟罗沙星(FLE)、甲磺酸培氟沙星(PEF)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、甲磺酸达诺沙星(DAN)、氧氟沙星(OFL)、沙拉沙星盐酸盐(SAR)、恩诺沙星(ENR)、泰乐菌素酒石酸盐(TYL)、罗红霉素(ROX)、脱水红霉素(ERY)、克拉霉素(CTM)、竹桃霉素(ODM)、交沙霉素(LEU-A3)、螺旋霉素(SPI)、林可霉素(LIN)、氯唑西林(CLOX)、莫能霉素(MON)、盐霉素(SAL)、氯霉素(CAP)、氟苯尼考(FF)。除了 TYL 和 ERY 购自美国 Sigma-Aldrich,其他均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH;甲氧嘧啶-D3(THI-d3)、红霉素-13C, D3(ERY-13C, D3)、林可霉素-D3(LIN-D3)、磺胺二甲嘧啶-D4(SMA-D4)、磺胺甲基异恶唑-D4(SMX-D4)、氧氟沙星-D3(OFL-D3)购自美国 Andover,氯霉素-D5(CAP-D5)购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH。标准品纯度均高于 98%,满足定量分析需要。

标准溶液的配制:准确称量标准品 0.004 g,用甲醇制成 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准储备液,于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,使用时用初始流动相逐级稀释。

1.2 样品采集

在 2018 年 1 月,采集了贵阳市南明河地表水样品 12 个,每个采样点采集水面下 0.5 m 的表层水 1 L,装入琥珀色玻璃瓶,避光保存,运至实验室后冷藏保存 1 周内提取并分析。

1.3 仪器条件

液相条件:Agilent Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);进样量 $5 \text{ } \mu\text{L}$;流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$;氯霉素类化合物(CAP、FF)在负离子模式下进行分析检测,流动相 A 超纯水,流动相 B 甲醇/乙腈(V/V, 1:1),流动相梯度为:0—2 min, 25%—60% B; 2—4 min, 60%—80% B; 4—5 min, 100% B, 保持 2 min, 7—7.01 min, 100%—25% B, 7.01—9 min, 25% B。其他化合物均在正离子模式下分析,无机相 A 为 0.2%甲酸水含 2 mmol 乙酸铵,有机相 B 甲醇/乙腈(V/V, 1:1),流动相梯度为:0—0.5 min, 5% B; 0.5—5 min, 5%—20% B; 5—10 min, 20%—40% B, 10—14 min, 40%—70% B, 14—17 min, 70%—100% B, 保持 3 min, 20—20.01 min, 100%—5% B, 20.01—23 min, 5% B。

质谱条件:ESI+/ESI-切换;多重反应监测模式(MRM),载气温度: $325 \text{ }^{\circ}\text{C}$,载气流速 $6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,雾化气压力 45 psi,鞘气温度 $370 \text{ }^{\circ}\text{C}$,鞘气流速 $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,毛细管电压 3500 V。其他参数见表 1。

1.4 样品前处理方法

水样静置,取上清液,经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除去悬浮颗粒物,准确量取 500 mL 水样调 pH 值至 5,加入 20 ng 内标指示物(SMA-D4、SMX-D4、LIN-D3、THI-D4、TRI-D3、OFL-D3、SAR-D8、ERY-13C, D3、CAP-D5)摇匀,准确加入 0.25 g Na_2EDTA ,然后用 Oasis HLB 小柱(6 cc/500 mg)进行富集净化。HLB 柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水进行活化,上样流速控制在 $2.0\text{--}5.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 左右;上样后先用 10 mL 超纯水清洗 HLB 小柱,并抽干,然后用 6 mL 氨水-甲醇(V/V, 5:95)溶液作为洗脱液进行洗脱。洗脱液在 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 用 N_2 吹干浓缩至近干,最后用甲醇-水(V/V, 1:9)定容至 0.5 mL, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液上机分析,内标法定量。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 色谱条件的优化

6 类抗生素的化学结构不同其质谱行为也不同, CAPs 类抗生素在多重反应监测负离子模式下

(ESI-) 响应较强,而其他几类抗生素在多重反应监测正离子模式(ESI+) 下响应较强,为了使目标分析物响应最佳,本方法选择正负离子分开监测.

表 1 目标抗生素主要的 MRM 质谱参数
Table 1 MRM MS parameters for the target antibiotics

分析物 Analytes	母离子 Precursor ion (m/z)	子离子 Production (m/z)	碎裂电压 Fragmentor /V	碰撞能量 Collision energy/eV	内标 Internal standard
SG	215.1	92.20 *, 64.90	81	24, 44	SMA-D4
SCT	215.1	156.0 *, 92.20	72	24, 8	SMA-D4
SD	251.1	92.20 *, 156.1	107	24, 16	SMA-D4
ST	256.2	156.1 *, 92.20	106	11, 24	SMA-D4
SPD	250.1	92.30 *, 156.1	100	24, 14	SMA-D4
SMR	265.1	91.90 *, 156.0	91	24, 14	SMA-D4
SM	281.2	91.90 *, 108.1	100	34, 24	SMA-D4
SMZ	279.2	186.3 *, 124.2	106	14, 24	SMA-D4
SCP	285.2	92.20 *, 64.90	81	24, 44	SMA-D4
SMM	281.2	91.90 *, 155.8	121	34, 15	SMA-D4
SMX	254.4	156.0 *, 108.1	90	13, 21	SMX-D4
SIZ	268.2	156.1 *, 113.0	96	8, 14	SMA-D4
ASMZ	296.4	133.9 *, 73.20	106	19, 24	SMA-D4
SDO	311.1	156.3 *, 92.10	103	17, 26	SMA-D4
SSS	311.1	156.3 *, 92.20	112	18, 32	SMA-D4
MAR	363.2	72.20 *, 69.90	114	25, 37	OFL-D3
FLE	370.0	326.2 *, 269.1	145	20, 28	OFL-D3
OFL	362.2	318.5 *, 261.5	114	17, 25	OFL-D3
NOR	320.2	302.2 *, 275.6	123	17, 19	OFL-D3
PEF	334.1	316.1 *, 293.2	131	18, 11	SAR-D8
CIP	332.2	314.0 *, 288.0	124	17, 17	OFL-D3
DAN	358.2	340.0 *, 283.1	165	17, 20	SAR-D8
ENR	360.2	342.4 *, 316.3	119	19, 17	OFL-D3
SAR	386.3	368.3 *, 342.2	120	19, 17	SAR-D8
OTC	461.2	426.5 *, 201.1	119	17, 41	TRI-D3
TC	445.2	410.4 *, 428.6	111	17, 15	TRI-D3
DC	445.2	428.1 *, 154.0	134	17, 25	TRI-D3
SPI	843.6	174.0 *, 144.8	150	41, 36	ERY-13C-D3
TYL	917.1	173.8 *, 100.5	190	41, 57	ERY-13C-D3
ERY	716.5	158.2 *, 558.0	160	25, 25	ERY-13C-D3
CTM	748.9	158.1 *, 590.0	180	24, 16	ERY-13C-D3
ROX	838.1	158.1 *, 680.8	150	23, 19	ERY-13C-D3
LEU-A3	828.6	109.1 *, 174.1	191	44, 36	ERY-13C-D3
ODM	689.4	158.2 *, 545.9	127	34, 14	ERY-13C-D3
FF	356.0	336.1 *, 185.1	-90	-4, -16	CAP-D5
CAP	321.1	152.1 *, 257.0	-100	-13, -56	CAP-D5
MON	693.4	461.6 *, 675.9	170	60, 40	THI-D4
SAL	773.3	431.3 *, 413.4	160	55, 56	THI-D4
LIN	407.5	126.1 *, 70.1	155	32, 72	LIN-D3
CLOX	436.2	178.2 *, 220.3	173	24, 14	THI-D4
SMA-D4	283.1	124.1 *, 186.1	109	24, 16	—
SMX-D4	258.1	160.1 *, 112.0	110	13, 21	—
LIN-D3	410.6	129.1 *, 73.10	170	36, 76	—
THI-D4	206.1	179.1 *, 135.1	130	25, 35	—
TRI-D4	294.4	123.0 *, 230.0	152	21, 21	—
OFL-D3	366.3	322.5 *, 261.6	103	18, 30	—
SAR-D8	394.2	376.5 *, 350.6	111	21, 18	—
ERY-13C, D3	720.6	162.2 *, 562.2	162	25, 20	—
CAP-D5	326.1	157.1 *, 261.8	-110	-14, -6	—

注: * 为定量离子.
Note: The characteristic ions asterisk are used for quantification.

为了改善多种抗生素的分离效果并提高分析效率,对比了超高效 Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)与高效 Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm)和 Zorbax Hilic Plus C18 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm)的分离效果,结果显示在各自最佳匹配色谱条件下,具有亚 2 μm 粒径超高效色谱柱对目标分析物的分离效果最佳,同时 50 mm 短柱有效缩短了分离时间^[12].因此最终选择 Zorbax Rrhd Eclipse Plus C18 色谱柱.

单一的流动相组成未能保证 38 种正离子抗生素的峰型和灵敏度,需进一步优化流动相的组成提高分析的灵敏度和准确性.乙腈洗脱能力强,导致抗生素出现共洗脱现象.虽然甲醇相比于乙腈洗脱能力弱,但其在氢键作用下是强的质子给予体,可以提高目标分析物的灵敏度.因此,在 ESI+模式下,实验对比了甲醇、甲醇/乙腈(V/V, 1/1)和乙腈作为有机相对目标物灵敏度和分离度的影响,结果表明甲醇/乙腈(V/V, 1/1)作为有机相时目标分析物的分离度最好,响应最高,因此选择甲醇/乙腈(V/V, 1/1)作为有机相.此外为解决氟喹诺酮类以及四环素类化合物拖尾问题,考察在水相加入甲酸对抗生素灵敏度以及峰型的影响.结果表明加入 0.2% 甲酸后有效改善化合物拖尾现象同时增加了响应值(以氟喹诺酮类抗生素 MAR 为例,见图 1).这是由于加入甲酸增加了氢离子浓度,促进 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 分子离子峰的形成,提高了离子化效率和灵敏度^[13].最后在流动相中加入 2 mmol 乙酸铵构建弱酸弱碱盐缓冲体系,进一步提高了分析灵敏度,确保分析的稳定性和准确性.最终确定 ESI+模式下,0.2% 甲酸含 2 mmol 乙酸铵作为无机相 A,甲醇/乙腈(V/V, 1/1)作为有机相 B.在 0.2 mL·min⁻¹ 流速条件下,23 min 内实现 38 种正离子目标分析物实现较好分离,色谱图见图 2a.由于在 ESI+模式下 2 种氯霉素类抗生素响应低,因此选择 ESI-模式,无机相 A 为纯水,目标分析物响应增强,甲醇/乙腈(V/V, 1/1)为有机相 B.在 0.2 mL·min⁻¹ 流速条件下,9 min 内实现氯霉素类抗生素较好分离,色谱图见图 2b.

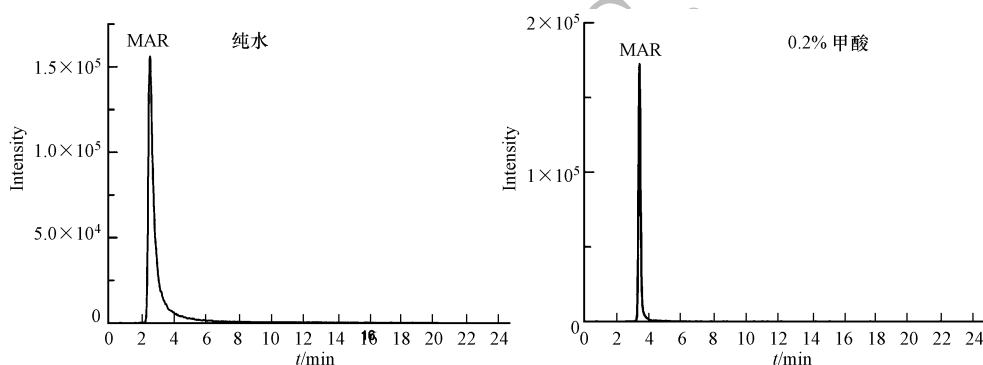


图 1 不加入甲酸和加入 0.2% 甲酸对 MAR 峰型的影响

Fig.1 Effects on peak shapes of MAR with and without 0.2% formic acid

2.2 质谱条件的优化

分别采用 ESI+、ESI-模式对目标分析物进行检测.将目标物和内标分别配成 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准溶液,采用一级质谱进行母离子全扫, $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$ 为准分子离子峰,依次优化碎裂电压(fragmentor)、子离子(production)、碰撞能量(collision energy),选择响应高且稳定的子离子为定量离子,响应较低的为定性离子,进行 MRM 模式监测,化合物离子质核比见表 1.鞘气温度和 EMV 电子倍增管电压对目标分析物的灵敏度影响较大,其值越大,目标物灵敏度越高,经过实验优化最终鞘气温度为 370 $^{\circ}\text{C}$, EMV(+) 和 EMV(-) 分别为 400 V、200 V.

2.3 前处理条件的优化

在已报道的固相萃取柱类型、洗脱溶液和洗脱体积等条件^[14]基础上,本实验考虑到目标分析物种类较多,性质差异大,如 CLOX 的 pK_a 为 2.78, NOR 的 pK_a 为 10.6^[12],选取可适用于酸性、碱性以及中性化合物的通用型 Oasis HLB 固相萃取小柱.此外,不同目标抗生素在固相萃取柱上的保留能力与其本身的 pK_a 值和 pH 有关,当 pH 值大于 pK_a 时,大多数分子以亲水离子形式存在,从而不容易被用亲脂性吸收剂填充的 SPE 柱保留^[15];当样品的 pH 值低于目标分析物的 pK_a 时, SPE 回收率会增加^[12].考虑目标分析物的极性和地表水基质差异大,因此重点优化了样品的 pH 值.用甲酸和氨水将水样 pH 值调至 3、

5、7、9 进行加标回收试验,每组 3 个样品,加标浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,结果如图 3 所示.实验结果表明,大部分目标分析物在 pH 5 时,回收率较好,因此综合目标物的响应情况确定样品 pH 值为 5,这与文献中报道的 pH 不同^[10].此外,由于抗生素分子结构的差异,部分抗生素在一定条件下与重金属离子形成络合物,如四环素类抗生素含有羟基以及羰基等官能团,在近中性条件下会与重金属离子形成络合物^[16].金属络合剂 Na_2EDTA 的作用是与金属阳离子结合,防止目标分析物与金属离子结合,从而提高 SPE 富集效率^[12].

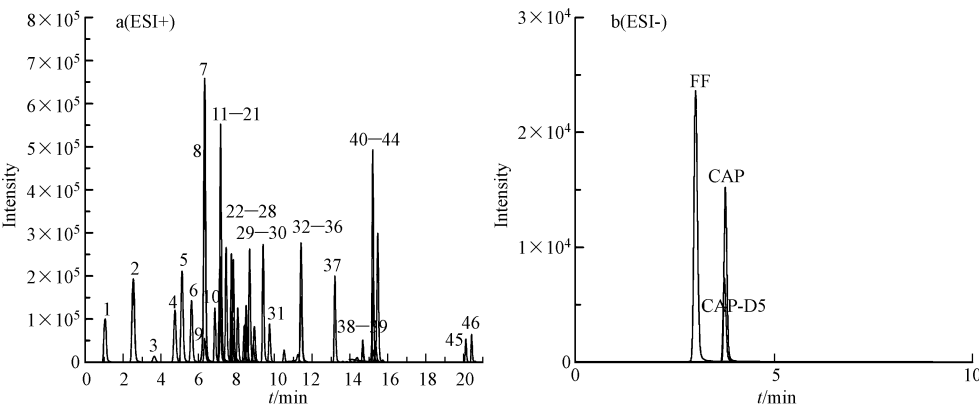


图 2 40 种抗生素标准溶液色谱图($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

1. SCT, 2. SG, 3. SD, 4. ST, 5. SPD, 6. SMR, 7. LIN, 8. LIN-D3, 9. THI-D4, 10. TRI-D3, 11. SAM-D4, 12. SMZ, 15. OFL, 16. OTC, 17. NOR, 18. OFL-D3, 19. TC, 20. PEF, 21. CIP, 22. SMM, 23. SM, 24. SCP, 25. DAN, 26. SMX, 27. SMX-D4, 28. ENR, 29. SAR-D8, 30. SAR, 31. SIZ, 32. ASMZ, 33. SPI, 34. DC, 35. SDO, 36. SSS, 37. ODM, 38. TYL, 39. ERY, 40. CTM, 41. REY, C13-D3, 42. CLOX, 43. ROX, 44. LEU-A3, 45. MON, 46. SAL

Fig.2 Chromatograms of 40 antibiotics detected by HPLC-MS/MS($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

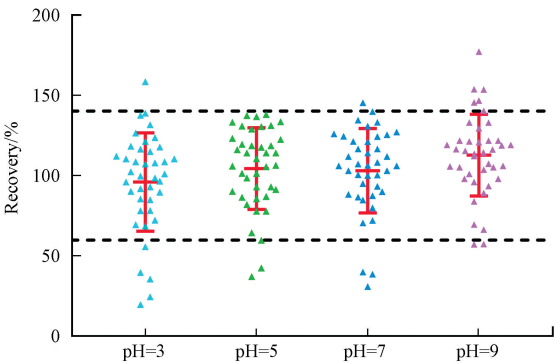


图 3 不同 pH 下 40 种抗生素的平均回收率和相对标准偏差($n=3$)

Fig.3 Average recovery and relative standard deviation of 40 antibiotics at different pH ($n=3$)

本实验考察了在不加 Na_2EDTA 、加入 0.25 g 和 0.5 g Na_2EDTA 条件下对目标回收率的影响.结果表明, Na_2EDTA 对磺胺类抗生素的回收率影响不大,因为磺胺类抗生素与金属阳离子不形成络合物^[17];其他类抗生素随着 Na_2EDTA 加入量增加,回收率增加.当加入量为 0.5 g Na_2EDTA 时,TC 和 DC 回收率分别为 257% 、 197% ,具有明显的基质增强效应,这与 Grujić 等的研究结果一致^[18];而加入 0.25 g Na_2EDTA 时抗生素的回收率在 $61.7\%—147\%$.因此确定 Na_2EDTA 加入量为 0.25 g .

2.4 方法评价与质量控制

配制 $1.00—200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合标准溶液,加入 40 ng 内标进行测定,以目标化合物的峰面积与对应的内标峰面积之比对质量浓度作图,得到各目标化合物的标准曲线,所有目标化合物的线性相关系数(r^2)大于 0.99 ,线性范围见表 2,用 3 倍信噪比计算方法检出限 (LOD),方法检出限为 $0.002—0.270\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,部分化合物分析灵敏度比文献报道的方法提高了约 1 个数量级^[11].

表 2 方法检出限、加标回收率、精密度、回归方程及相关系数

Table 2 Detection limits, recoveries, calibration curve and correlation coefficient of the method										
分析物 Analytes	线性范围 Linearity range/ (ng·mL ⁻¹)	检出限 LOD/ (ng·L ⁻¹)	加标浓度和精密度 Spiked concentration and precision						回归方程 Calibration curve	相关系数 <i>r</i> ²
			5 ng·L ⁻¹	RSD/% (<i>n</i> = 3)	50 ng·L ⁻¹	RSD/% (<i>n</i> = 3)	100 ng·L ⁻¹	RSD/% (<i>n</i> = 3)		
SG	0.50—200	0.058	74.5	5.55	72.8	4.09	72.7	3.66	<i>Y</i> =0.496804 <i>X</i> -0.001702	0.998
SCT	0.50—200	0.048	71.5	11.8	62.9	6.60	62.1	3.57	<i>Y</i> =0.603164 <i>X</i> -0.001988	0.998
SD	0.50—200	0.074	100	18.5	73.9	6.31	71.3	5.39	<i>Y</i> =0.46659 <i>X</i> -0.0006870	0.991
ST	0.50—200	0.057	105	25.8	87.5	19.8	109	25.2	<i>Y</i> =0.322985 <i>X</i> -0.002166	0.996
SPD	0.50—200	0.033	80.8	16.9	77.1	0.690	78.2	1.30	<i>Y</i> =0.564652 <i>X</i> +0.001209	0.998
SMR	0.50—200	0.034	85.3	8.80	84.7	4.45	85.5	2.54	<i>Y</i> =0.333182 <i>X</i> +0.000269	0.998
SM	0.50—200	0.042	99.2	1.23	102	20.1	104	1.80	<i>Y</i> =0.527594 <i>X</i> +0.009430	0.990
SMZ	0.50—200	0.024	90.5	9.56	122	0.750	93.2	3.18	<i>Y</i> =0.499592 <i>X</i> +0.003572	0.998
SCP	1.00—200	0.107	90.6	12.9	93.5	2.39	85.4	4.69	<i>Y</i> =0.1694 <i>X</i> -0.000837894	0.998
SMM	0.50—200	0.056	107	18.6	79.9	17.9	127	12.7	<i>Y</i> =0.00538 <i>X</i> +0.094610	0.998
SMX	0.50—200	0.069	120	9.71	93.6	15.0	77.0	6.79	<i>Y</i> =0.175726 <i>X</i> -0.001203	0.997
SIZ	0.50—200	0.080	83.3	15.3	68.5	14.2	68.5	19.1	<i>Y</i> =0.192927 <i>X</i> -0.003782	0.992
ASMZ	1.00—200	0.079	95.6	10.9	68.5	9.67	117	3.69	<i>Y</i> =0.043806 <i>X</i> -0.0005174	0.995
SDO	0.50—200	0.034	69.0	4.24	94.7	3.85	69.0	2.56	<i>Y</i> =1.119341 <i>X</i> +0.009763	0.996
SSS	0.50—200	0.035	68.0	3.36	101	19.0	67.6	2.56	<i>Y</i> =0.014237 <i>X</i> +0.12235	0.999
MAR	1.00—200	0.060	79.0	8.04	99.7	7.62	62.9	10.3	<i>Y</i> =3.806642 <i>X</i> +0.020986	0.993
FLE	1.00—200	0.230	66.2	13.1	82.4	13.1	72.7	6.26	<i>Y</i> =5.094687 <i>X</i> -0.034279	0.999
OFL	0.50—200	0.164	83.4	8.08	96.6	21.3	100	4.57	<i>Y</i> =4.910041 <i>X</i> -0.028751	0.999
NOR	1.00—200	0.143	66.0	9.75	75.8	14.7	80.8	8.30	<i>Y</i> =0.470729 <i>X</i> -0.033099	0.992
PEF	1.00—200	0.250	71.2	2.46	80.3	3.13	149	13.9	<i>Y</i> =4.482062 <i>X</i> -0.033436	0.999
CIP	1.00—200	0.133	64.0	19.4	102	8.54	77.9	2.72	<i>Y</i> =2.828346 <i>X</i> -0.043408	0.994
DAN	1.00—200	0.182	99.3	23.4	75.7	10.2	125	2.28	<i>Y</i> =1.488973 <i>X</i> -0.013613	0.994
ENR	1.00—200	0.160	84.1	5.26	130	6.67	80.3	6.93	<i>Y</i> =5.142616 <i>X</i> -0.057320	0.998
SAR	1.00—200	0.270	88.7	9.87	73.7	5.06	97.4	10.0	<i>Y</i> =5.458254 <i>X</i> -0.069007	0.997
OTC	1.00—200	0.160	61.0	3.15	124	20.3	98.7	7.77	<i>Y</i> =0.029048 <i>X</i> -0.000234	0.994
TC	1.00—200	0.032	77.0	16.1	111	21.8	72.9	14.1	<i>Y</i> =0.040243 <i>X</i> +0.000210	0.992
DC	1.00—200	0.147	96.1	14.9	92.2	2.75	83.6	10.5	<i>Y</i> =0.076058 <i>X</i> -0.0007741	0.995
SPI	1.00—200	0.021	103	14.9	95.1	0.950	83.6	10.5	<i>Y</i> =0.011336 <i>X</i> -0.000160	0.995
TYL	1.00—200	0.007	100	8.34	90.5	0.950	111	16.3	<i>Y</i> =0.042834 <i>X</i> -0.000428	0.999
ERY	1.00—200	0.025	131	13.5	118	18.0	128	9.12	<i>Y</i> =0.062230 <i>X</i> +0.000064	0.998
CTM	1.00—200	0.023	129	21.6	116	20.8	93.0	12.1	<i>Y</i> =1.030182 <i>X</i> +1.322590	0.998
ROX	1.00—200	0.033	119	9.48	109	10.0	67.9	13.9	<i>Y</i> =0.074442 <i>X</i> -0.000179	0.999
LEU-A3	0.50—200	0.008	104	14.2	67.3	28.9	110	12.2	<i>Y</i> =0.768968 <i>X</i> +2.179457	0.998
ODM	0.50—200	0.015	76.7	3.52	120	14.1	86.5	13.4	<i>Y</i> =0.434659 <i>X</i> +0.001054	0.997
FF	0.50—200	0.002	96.7	13.3	90.9	7.45	83.7	6.02	<i>Y</i> =1.664007 <i>X</i> +0.001819	0.999
CAP	0.50—200	0.055	93.1	14.9	83.9	27.0	79.0	2.97	<i>Y</i> =0.867775 <i>X</i> +0.001819	0.999
MON	0.50—200	0.011	94.0	8.30	94.5	10.3	93.3	13.3	<i>Y</i> =0.139559 <i>X</i> +0.0002413	0.999
SAL	1.00—200	0.151	82.2	21.0	74.6	5.53	81.8	8.36	<i>Y</i> =0.153363 <i>X</i> +0.0009286	0.996
LIN	0.50—200	0.018	126	32.0	86.5	5.76	91.7	10.9	<i>Y</i> =0.565537 <i>X</i> -0.0000820	0.999
CLOX	1.00—200	0.134	72.2	19.2	78.3	4.09	81.4	10.8	<i>Y</i> =0.047691 <i>X</i> -0.0000675	0.998

在不含待测组分的 500 mL 南明河地表水中分别添加 2.5、25、50 ng 混合标准溶液,在低、中、高的 3 个添加水平(*n*=3)下考察方法的回收率和精密度.结果表明 40 种目标分析物在低、中和高添加水平下回收率分别为 61.0%—131%、62.9%—130%、62.1%—149%,相对标准偏差(RSD)分别为 1.23%—32%、0.69%—28.9%、1.3%—25.2%,其中 ERY(131%)、ENR(130%)、PEF(149%)回收率较高,可能是由化合物与相应内标的绝对回收率差异引起^[19].

2.5 基质效应

共萃取基质组分通常会造成分析物响应抑制或增强的现象,因此需对基质效应进行评价.本研究将 40 种抗生素标准品用甲醇配制成 100 μg·L⁻¹的标准溶液,用不含待测组分的地表水按照 1.4 节前处理

方法制备的地表水空白基质,用空白基质配制 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,上机测定.用空白基质中目标分析物的峰面积 A 和甲醇中目标分析物的峰面积 B 的比值考察基质效应的大小,基质效应被定义为 $A/B\times 100\%$,基质效应大于 100% 表示基质增强,基质效应小于 100% 表示基质减弱^[11].结果如表 3 所示,基质效应值为 69.0% — 158% .QNs 具有明显的基质增强效应,其中 PEF (158%) 的基质效应最强,其次是 NOR(133%);而 OTC 具有明显的基质抑制效应,其他物质的基质效应较小.

表 3 40 种抗生素在地表水基质中的基质效应($n=3$)
Table 3 Matrix effects of 40 antibiotics in surface water matrix ($n=3$)

分析物 Analytes	基质效应 Matrix effect/%	RSD/%	分析物 Analytes	基质效应 Matrix effect/%	RSD/%
SCT	104	3.35	OFL	106	4.38
SG	116	1.18	MAR	116	9.61
SD	101	0.85	FLE	96.3	4.88
SPD	102	1.35	SAR	103	7.33
SMX	101	4.68	OTC	69.0	9.87
ST	99.3	3.62	TC	100	6.98
SMR	100	8.46	DC	96.7	4.18
SIZ	99.3	7.32	ERY	88.0	0.66
SMZ	96.6	15.6	CTM	98.1	5.82
SM	98.8	2.88	ROX	99.2	1.88
SMM	106	3.32	SPI	106	0.47
SCP	102	1.88	TYL	95.7	3.48
ASMZ	105	7.99	LEU-A3	95.4	5.42
SDO	100	3.66	ODM	94.8	6.88
SSS	99.7	0.88	LIN	107	7.51
NOR	133	18.1	CLOX	88.6	8.42
CIP	127	12.1	MON	100	4.5
PEF	158	7.92	SAL	91.9	7.99
DAN	129	7.65	FF	95.3	0.91
ENR	111	6.51	CAP	98.7	1.53

2.6 实际样品的分析

将建立的分析方法应用于贵阳市南明河 12 个地表水样品中的抗生素分析,12 个采样点均有不同程度检出,以采样点 S12 为例,样品色谱图如图 4.流域内共检出 34 种抗生素,SMR、SM、SDO、SSS、ODM、LEU-A3 等 6 种抗生素未检出.其中大环内酯类检出浓度最高,平均浓度为 $257\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,其次是磺胺类($256\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)、氟喹诺酮类($115\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)、其他类($66.9\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)、四环素类($44.7\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)和氯霉素类($43.6\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).结果表明方法对实际水样中抗生素的分析具有较好的实用价值.

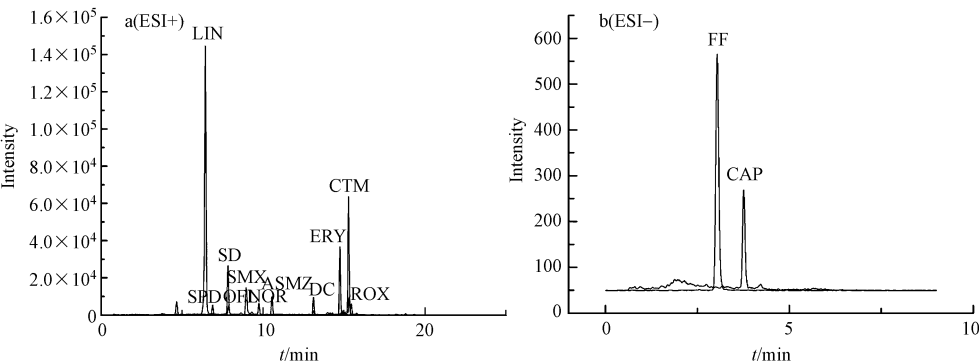


图 4 地表水样品中检出抗生素的 MRM 色谱图(S12)
Fig.4 Chromatography of detected antibiotics in surface water sample(S12)

3 结论 (Conclusion)

本研究采用 SPE-HPLC-MS/MS 技术,通过重点优化目标分析物的色谱、质谱条件、样品的 pH 值以及金属络合剂 Na_2EDTA 加入量等,建立了地表水中 6 类共 40 种抗生素同时分析测定方法,方法检出限在 $0.002\text{--}0.270\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,地表水加标回收率在 $61.0\%\text{--}149\%$ 之间,相对标准偏差 (RSD) 在 $1.2\%\text{--}32\%$ 之间.方法成功地应用于贵阳市南明河地表水中抗生素分析,共检出 34 种抗生素,其中大环内酯类检出浓度最高,平均浓度为 $257\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,其次是磺胺类 ($256\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).结果表明该方法灵敏高、准确度高,为地表水中典型抗生素的分析提供了一种快速、准确可靠的分析方法,具有较强的实用价值.

参考文献 (References)

- [1] KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment; A review-part I [J]. Chemosphere, 2009, 75(4): 417-434.
- [2] KLEIN E Y, BOECKEL T P V, MARTINEZ E M, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(15): 3463-3470.
- [3] LI W, SHI Y, GAO L, et al. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China [J]. Chemosphere, 2012, 89(11): 1307-1315.
- [4] DENG W, LI N, ZHENG H, et al. Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in Hong Kong. [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2015, 125: 121-127.
- [5] 胡讚予. 水环境中抗生素对健康的危害 [J]. 食品与药品, 2015, 17(3): 215-219.
HU X Y. Harm of antibiotics in aquatic environment on health [J]. Food and Drug, 2015, 17(3): 215-219 (in Chinese).
- [6] SKARIYACHAN S, MAHAJANAKATTI A B, GRANDHI N J, et al. Environmental monitoring of bacterial contamination and antibiotic resistance patterns of the fecal coliforms isolated from Cauvery River, a major drinking water source in Karnataka, India [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, 187(5): 279-292.
- [7] VăLITALO P, KRUGLOVA A, MIKOLA A, et al. Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms; A mini-review [J]. International Journal of Hygiene & Environmental Health, 2017, 220(3): 558-569.
- [8] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展 [J]. 环境化学, 2013, 32(9): 1619-1633.
GAO L H, SHI Y L, LI W H, et al. Advances in research on environmental behaviors and environmental effects of antibiotics [J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(9): 1619-1633 (in Chinese).
- [9] KIM C, RYU H D, CHUNG E G, et al. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water; Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 217: 629-645.
- [10] DU J, ZHAO H, LIU S, et al. Antibiotics in the coastal water of the South Yellow Sea in China: Occurrence, distribution and ecological risks [J]. Science of the Total Environment, 2017, 595: 521-527.
- [11] ZHOU L J, YING G G, LIU S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1244(12): 123-138.
- [12] GROS M, RODRIGUEZMOZAZ S, BARCELÓ D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1292(16): 173-188.
- [13] SEIFRTOVÁ M, NOVÁKOVÁ L, LINO C, et al. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 649(2): 158-179.
- [14] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测环境水样中 22 种抗生素类药物 [J]. 色谱, 2010, 28(5): 491-497.
GAO L H, SHI Y L, LI W H, et al. Determination of 22 antibiotics in environmental water samples using high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(5): 491-497 (in Chinese).
- [15] PETROVI M, HERNANDO M D, DÍAZ-CRUZ M S, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1-2): 1-14.
- [16] 罗方园, 潘根兴, 李恋卿, 等. 洪泽湖沉积物中四环素类抗生素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析 [J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(2): 369-375.
LUO F Y, PAN G X, LI L Q, et al. The distribution characteristics and potential risk of tetracycline, oxytetracycline and their corresponding genes pollution in sediment of Hongze Lake [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(2): 369-375 (in Chinese).
- [17] MIAO X S, BISHAY F, CHEN M, et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(13): 3533-3541.
- [18] GRUJIĆ S, VASILJEVIĆ T, LAUSEVIĆ M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(25): 4989-5000.
- [19] TAMTAM F, MERCIER F, EURIN J, et al. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(6-7): 1709-1718.