

# 在线富集HTLC/ MS / MS分析环境水资源中多种抗生素

## 简介

人们日益关注环境水资源中抗生素的存在情况。这迫使环境和政府实验室开发新的液相色谱/质谱 (LC/MS) 方法, 以监测水资源中抗生素的存在状况<sup>1-4</sup>。然而, 环境水资源中含有的抗生素的通常是很微量的, 往往需要大量的水样进行富集和净化。在液相色谱/质谱 (LC/MS) 分析之前, 需要对大约100-1000mL水样进行富集和清理, 以达到被测物质的检测限。即使样本量很多, 该提取过程也是耗时耗力的, 实现高通量检测非常困难。本研究提出的方法, 使用了可以对样品进行在线浓缩和净化的Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra三重四极杆质谱仪, 不仅大大缩短了样品处理的时间, 而且在高选择反应监测 (H-SRM) 模式下, 可以进行痕量浓度 (pg/mL) 抗生素检测分析。

## 目标

通过使用配有在线样品浓缩和净化的LC/MS/MS仪器, 开发进行地表水中抗生素分析检测的方法。

## 实验条件

此检测方法中所用到的抗生素标准品 (详情请见表1) 购自Sigma公司 (St. Louis, MO), 无需进一步净化可以直接使用。用甲醇配制1.0 mg/mL的标准储存液, 置于褐色聚丙烯样品瓶, -20°C保存备用。水样在进行高通量HPLC (HTLC/MS/MS) 分析之前, 为了防止四环素黏附在玻璃容器表面, 或是与溶剂中的金属离子结合<sup>1</sup>, 按照2 µg/mL的浓度加入Na<sub>2</sub>EDTA。选用Thermo Scientific Aria TLX-2仪器分析系统, 直接将1mL水样注入TurboFlow®色谱柱, 不需要任何更进一步的样品制备过程。目标抗生素经过turbulent-flow色谱柱被浓缩富集, 然后进入到分析柱。经过一个反向梯度洗脱, 待测物便被成功分离, 然后进入TSQ Quantum Ultra系统, 在高选择反应监测 (H-SRM) 模式下进行待测物的检测分析。仪器操作的相关参数如下:

### 1. 在线Turbo Flow

仪器: Thermo Scientific Aria TLX-2  
色谱柱: 0.5×50 mm Cyclone® MAX  
自动进样器: CTC PAL (Leap Technologies)

进样量: 1.0mL

流动相: A 10 mM碳酸氢铵,  
B 0.5%醋酸+0.04%三氟乙酸  
C 乙腈+0.1%甲酸  
流速: 2.0 mL/min

### 2. LC 色谱条件

分析柱: Thermo Scientific HypersilGOLD™ 4.6×100 mm, 3 µm  
流速: 1.2 mL/min  
流动相: A 0.5%醋酸+0.04%三氟乙酸  
B 乙腈+0.5%醋酸+0.04%三氟乙酸  
进样量: 1.0mL  
分流: 柱后, 0.5 mL/min到ESI源

### 3. MS条件

TSQ Quantum Ultra  
离子化模式: 阴离子ESI  
离子传输管温度: 375°C

### 4. SRM参数

碰撞气压力: 1.5 mTorr 氩气  
SRM: 请见表1  
SRM扫描时间: 40 ms/transition  
Q1分辨率: 0.7 Da FWHM, H-SRM (0.15 Da FWHM)  
Q3分辨率: 0.7 Da FWHM

表1 各种抗生素名称、HTLC/MS/MS分析中选定的母/子离子和离子监测模式

药物名称	母离子M/Z	子离子M/Z	分辨率
磺胺甲基异恶唑	254	108, 156	H-SRM
磺胺甲基嘧啶	265	156, 172	H-SRM
磺胺甲二唑	271	108, 156	H-SRM
磺胺二甲嘧啶	279	156, 186	H-SRM
林可霉素	407	126, 359	H-SRM
四环素	445	154, 410	H-SRM
强力霉素	445	321, 428	H-SRM
金霉素	479	444, 462	H-SRM
脱氢红霉素	716	158, 558	H-SRM
红霉素	734	158, 576	Unit H-SRM
罗红霉素	837	158, 679	Unit H-SRM
泰乐菌素	916	174, 772	Unit H-SRM

## 结果与讨论

### 1. HTLC/MS/MS方法细节

本方法中使用新的混合萃取模式的TurboFlow色谱柱---Cyclone MAX进行样品的浓缩和预处理, 该Cyclone MAX系统兼有反相层析和阴离子交换层析的特性。样品进入TurboFlow色谱柱后, 上样泵以2.0 mL/min的速度冲洗样品以消除基质干扰 (见图1), 阀1开关打开萃取溶剂 (50%乙腈+0.1%甲酸) 进入色谱柱, 萃取溶液的有机相可以溶解抗生素并将之转移到分析柱内。而在进入分析柱之前, 高含水的流动相以1.2 mL/min的速度泵入将分析物稀释。这种混合动力发生在样品进入分析柱之前, 使各种抗生素能够在进行反相分离之前有效地重新进行分配调整。而在液相色谱/质谱/质

谱 (LC/MS/MS) 数据采集过程中, TurboFlow 色谱柱被再生以对下一个样品进行分配。Cyclone MAX 系统的工作原理图请见图1。

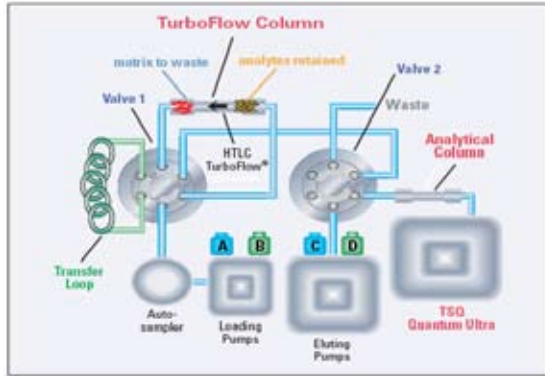


图1 联结TSO Quantum Ultra的Aria TLX-2系统的工作原理图

因为采用TSO Quantum Ultra 的SRM 和H-SRM监测模式, 采集的数据可以分为5个时间段, 每个时间段使用8个SRM事件。每种待测物分别在2个SRM监测模式下被分析检测, 它能够显著提高测试实际样品时定量及定性的灵敏度及准确性。

### 2. HTLC/MS/MS分析的灵敏度和校准数据

图2给出了13种抗生素标准品和脱氢红霉素的HTLC/MS/MS色谱图, 当进样量为1mL时, 各种化合物的定量限 (LOQs) 在0.5-5 pg/mL范围内。用去离子水将 13种抗生素标准品稀释到100 pg/mL作为标准溶液来制作标准曲线。13种抗生素中有11种可以用于校准曲线的线性拟合 (1/X)。使用二次拟合校准曲线, 磺胺甲恶唑和磺胺甲二唑也有好的结果。所有标准品的线性回归方程的 $R_2 \geq 0.990$  (n=4)。

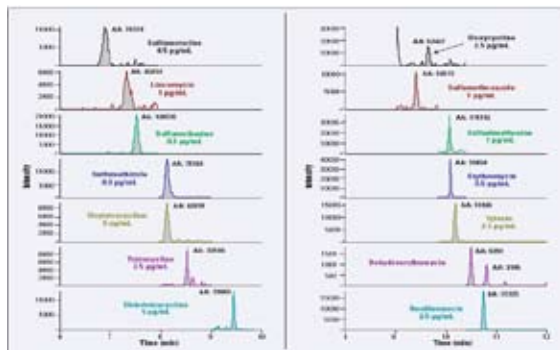


图2 各种抗生素LOQs对应的HTLC/MS/MS色谱图

### 3. 地表水样本中添加抗生素的检测结果

实验之前, 地表水样品用前面描述的方法进行扫描, 没有发现靶抗生素。向不含靶抗生素的地表水中添加抗生素标准品, 其添加浓度为25 pg/mL, 其检测结果请见图3。另外, 图4给出的是浓度为25 pg/mL的各种抗生素纯标准溶液HTLC/MS/MS色谱图。对比图3和图4, 结果发现对磺胺类药物, 在地表水添加样品中有小的

抑制信号, 而此干扰对大环内酯类抗生素的反应略有提高。然而, 对四环素而言, 地表水基质添加样品和标准品的检测结果显示有他们之间有着显著性差异。这种差异可能是由于这些四环素类抗生素结合了水样中残留的金属造成的。

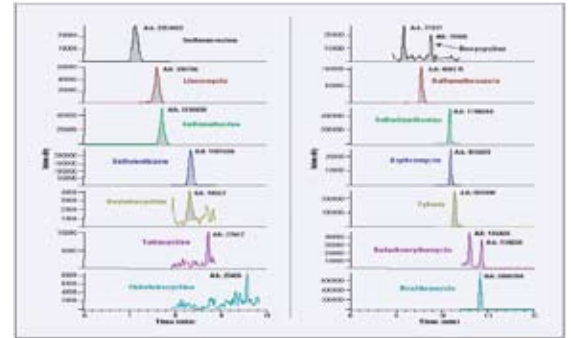


图3 添加有靶抗生素的地表水样本的HTLC/MS/MS色谱图 (添加浓度为25 pg/mL)

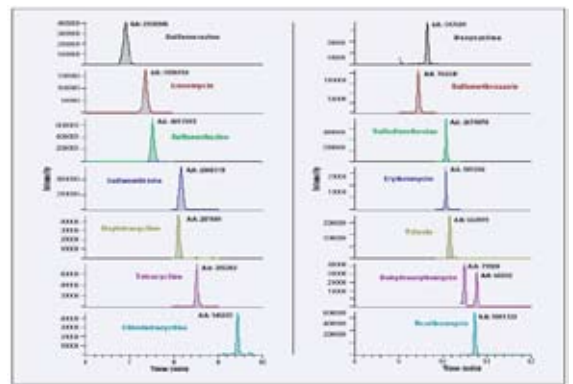


图4 各种抗生素纯标准溶液HTLC/MS/MS色谱图 (浓度为25 pg/mL)

### 4. HTLC/MS/MS对环境水样中抗生素检测结果

使用前文所描述的HTLC/MS/MS方法对来自加利福尼亚州, 佛罗里达州和安大略省多个地方地表水样本进行了检测分析。结果显示, 只有安大略湖水样本中检测到目标抗生素 (详情请见图5)。图5中插入的蓝色框为两个SRM监测到的待测物的色谱图, 它再次确认了抗生素的存在, 并且使得检测结果更加可信。

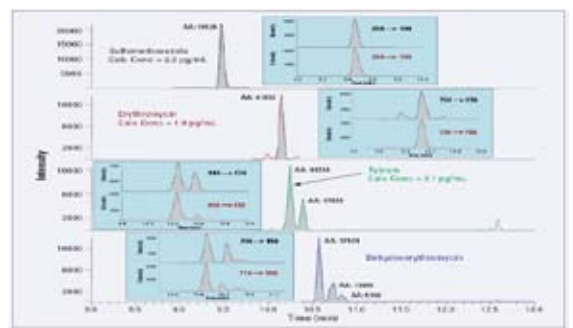


图5 安大略湖水样本中有关靶抗生素的检测结果

## 结论

本研究开发了一种串联在线样品纯化和预浓缩系统的质谱检测方法，可以对水样中痕量 (pg/mL) 抗生素进行检测分析。在线turbulent-flow大样本量 (1mL) 的净化和富集能力，大幅降低了样品分析时间，将几个小时进行的分析缩短到几分钟完成。高选择性反应监测 (H-SRM) 提供了优于SRM进行实际样品定量和定性的灵敏度和准确度。使用HTLC/MS/MS分析方法，可以对地表水样本中低浓度抗生素进行检测和定量。

## 参考文献

1. Lindsey, M.E.; Meyer, M.; Thurman, E.M. Anal Chem., 2001, 73, 4640-4646.
2. Yang, S; Cha, J.; Carlson, K. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2004, 18, 2131-2145.
3. Gobel, A.; McArdell, C.S.; Suter, M.J.-F.; Giger, W. Anal. Chem., 2004, 76, 4756-4764.
4. Shang, D.; Dyck, M.; Jia, X.; DiCicco, A.; Alleyne, C.; Nicolidakis, H.; Mori, B. Proc. 48th ASMS Conf. on Mass Spectrom. and Allied Topics, TPH #264.

*In addition to these offices, Thermo Fisher Scientific maintains a network of representative organizations throughout the world.*

### 赛默飞世尔科技

上海  
上海浦东新金桥路27号6号楼  
电话: 86-21-6865 4588  
传真: 86-21-6445 7830

北京  
北京市东城区安定门东大街28号  
雍和大厦西楼702-715室  
电话: 86-10-8419 3588  
传真: 86-10-8419 3589

广州  
广州东风中路410-412号  
健力宝大厦3003-3004室  
电话: 86-20-8348 7138  
传真: 86-20-8348 6621

服务热线:  
800 810 5118 400 650 5118

[www.thermo.com](http://www.thermo.com)  
[analyze.cn@thermofisher.com](mailto:analyze.cn@thermofisher.com)



Thermo Fisher Scientific,  
San Jose, CA USA is ISO Certified.