

超高效液相色谱-串联质谱法测定水中12种抗生素

张晓燕¹, 李志强², 李领川³, 刘艳丽³

(1. 洛阳市环保设计研究所, 洛阳 471000; 2. 洛阳市涧西污水处理厂, 洛阳 471000; 3. 中州大学实验管理中心, 郑州 450044)

摘要:采用超高效液相色谱-串联质谱技术,建立了水中5类共12种抗生素的同时检测方法。分析物包括4种四环素类、3种磺胺类、2种大环内酯类、2种喹诺酮类和1种酰胺醇类抗生素。样品经过0.22 μm滤膜过滤,采用ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离,以0.1% (体积分数)甲酸溶液-甲醇为流动相梯度洗脱,采用电喷雾离子源串联质谱,在正离子模式下采用多反应监测(MRM)模式检测,外标法定量。12种抗生素类药物在0.1~50 μg/L质量浓度范围内线性关系良好(相关系数大于0.99),检出限为0.0002~0.005 μg/L。以实验室纯水为基质,在2.0、10.0 μg/L 2个加标水平的平均回收率为90.9%~113.0%,相对标准偏差(RSD)为1.86%~7.87%。该方法准确可靠、方便快捷,适用于水体中抗生素类药物的定性定量分析。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 抗生素; 水

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 1008-3715(2013)04-0114-05

抗生素(antibiotics)是生物(包括微生物、植物和动物)在其生命活动过程中所产生的、或由其他方法获得的,能在低微浓度下有选择地抑制或影响它种生物功能的有机物质。^[1-2]20世纪70年代以来,抗生素的广泛而大量应用及滥用所导致的细菌耐药性已成为威胁人类的焦点问题^[3]。我国是抗生素的生产和使用大国,抗生素滥用现象尤为严重,医用、畜用、水产养殖及医药工业废水中的抗生素不能得到有效处理使水资源安全利用的巨大挑战。目前,水环境中抗生素的色谱检测技术有高效液相色谱与串联质谱联用(HPLC-MS/MS)技术^[4]、高效液相色谱-紫外吸收(HPLC-UV)检测技术^[5]和高效液相色谱-荧光(HPLC-FD)检测技术^[6]。本文采用超高效液相色谱与串联质谱联用仪(UPLC-MS/MS)测定水体中12种抗生素,取得了良好的效果。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY超高效液相色谱系统,配TQD三重四极杆质谱检测器(美国Waters公司);Milli-Q超纯水器(美国Millipore公司);.022μmPTFE针式过

滤器(上海安普科学仪器有限公司);AS3120B型数控超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

甲醇、甲酸均为色谱纯,购自美国TEDIA;其余试剂为分析纯;实验室用水为Milli-Q制备的超纯水;实际水样采自某地下井水,某污水处理厂进、出口,某医院废水排出口。

1.2 实验条件

1.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取12种抗生素固体标准品,加入适量甲醇超声溶解,配置成质量浓度为10mg/L的标准溶液,储备待用。移取适量10mg/L的标准溶液,用甲醇稀释成0.1mg/L的中间液。用10%甲醇稀释,分别配置质量浓度为0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L的标准工作溶液。再配置质量浓度分别为1.0、10.0 μg/L的质量控制溶液。

1.2.2 UPLC条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm;美国Waters公司);柱温:40℃;进样体积:10 μL;流动相A:甲醇;流动相B:水(含0.1% (v/v)甲酸);流速:0.3 mL/min。梯度程序:0~1 min, 10% A; 1~1.5 min, 10% A~45% A; 1.5~3

收稿日期:2013-05-21

作者简介:张晓燕(1975—),女,河南洛阳人,洛阳市环保设计研究院环保工程师,研究方向:仪器分析、环境监测。

min, 45% A ~ 55% A; 3 ~ 4 min, 55% A ~ 65% A; 4 ~ 5 min, 65% A ~ 95% A; 5 ~ 6 min, 95% A; 6.1 ~ 10 min, 95% A ~ 10% A。

1.2.3 MS/MS 条件

采用电喷雾离子源, 正离子多反应检测 (MRM) 模式。毛细管电压为 0.5 kv, 离子源温度为 120 °C, 脱溶剂气 (氮气) 温度为 350 °C, 脱溶剂气流速为 650 L/hr, 碰撞气流速为 50 L/hr。12 种抗生素的检测离子、锥孔电压 (cone voltage) 和碰撞能量 (collision energy) 见表 1。

表 1 12 种抗生素的 UPLC-MS/MS 分析参数
Table 1 UPLC-MS/MS parameters of 12 antibiotics

组分名 Compound	母离子 parent ion	子离子 daughter ion	锥孔电压 cone voltage	碰撞能量 collision energy
Sulfadiazine (磺胺嘧啶)	251.06	156* 92	35	15 28
Oxytetracycline (土霉素)	461.16	426.1* 443.2	30	20 13
Ofloxacin (氧氟沙星)	362.15	318.2* 261.1	40	20 28
SulfadimidineTablets (磺胺二甲嘧啶)	279.09	186* 92	33	17 30
Norfloxacin (诺氟沙星)	320.14	302.2* 276.2	35	20 18
Tetracycline Hydrochloride (盐酸四环素)	445.16	410* 154	30	20 30
Sulfamethoxazole (磺胺甲噁唑)	254.06	156* 92.1	30	15 28
Chloroamphenicol (氯霉素)	321	152* 257.04	35	18 10
Chlortetracycline (盐酸金霉素)	479.12	444.1* 154.1	35	21 30
Doxycycline (强力霉素)	445.2	428.2* 428.2*	35	20 20
Streptomyces erythreus (红霉素)	734.5	576.5* 576.5*	35	20 20
Roxithromycin (罗红霉素)	837.7	158.1* 679.6	40	41 21

* 为定量离子

2 结果与讨论

2.1 UPLC-MS/MS 条件的优化

本实验使用 ACQUITY UPLC BEH C18 柱 (50mm × 2.1 mm, 1.7 μm; 美国 Waters 公司), 待测物质分离良好且峰形对称, 12 种抗生素标准溶液的 MRM 色谱图见图 1。

对 12 种抗生素, 采用调谐的方法确定最佳锥孔电压和碰撞能量。将 10 μg/L 的 12 种抗生素类药物的标准溶液以 10 ul/min 的流速连续注射进入 ESI 离子源中。在正离子检测模式下对 12 种药物进行一级质谱分析 (MS SCAN), 得到母离子 [M + H +]

峰, 逐步改变锥孔电压, 观察质谱响应信号, 分别选择合适的锥孔电压; 再对母离子峰进行二级质谱分析 (MSMS SCAN), 调节优化碰撞能量, 得到碎片离子信息; 选择响应值高、极限噪音低的离子对作为监测离子对 (定性离子对), 最终选择响应值高, 峰形对称的子离子作为定量离子。由于 12 种抗生素出峰较为分散, 因此采用 MRM 模式时, 数据采集采用分段采集模式以便提高灵敏度。通过以上方法确定了 1.2.3 节所述的质谱条件。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系、检出限和定量限

在优化的实验条件下, 对质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L 的标准工作溶液进行测定, 以质量浓度为 (x) 为横坐标, 峰面积 (y) 为纵坐标进行曲线回归, 在 0.1 ~ 50 μg/L 范围内, 12 种抗生素均呈良好的线性关系, 结果见表 2。

表 2 12 种抗生素的线性方程和相关系数

组分名 Compound	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 (μg/L)
Sulfadiazine (磺胺嘧啶)	$y = 1110.48x - 77.20$	0.9982	2.00×10^{-4}
Oxytetracycline (土霉素)	$y = 177.67x - 47.60$	0.9999	3.00×10^{-3}
Ofloxacin (氧氟沙星)	$y = 190.63x - 139.31$	0.9999	2.50×10^{-4}
SulfadimidineTablets (磺胺二甲嘧啶)	$y = 820.14x + 37.01$	0.9996	2.00×10^{-4}
Norfloxacin (诺氟沙星)	$y = 287.83x - 359.17$	0.9999	3.00×10^{-3}
Tetracycline Hydrochloride (盐酸四环素)	$y = 217.36x - 48.70$	0.9998	3.00×10^{-3}
Sulfamethoxazole (磺胺甲噁唑)	$y = 558.37x + 41.07$	0.9999	2.00×10^{-4}
Chloroamphenicol (氯霉素)	$y = 86.87x + 172.55$	0.9996	3.00×10^{-3}
Chlortetracycline (盐酸金霉素)	$y = 66.64x - 17.39$	0.9999	4.00×10^{-3}
Doxycycline (强力霉素)	$y = 117.58x - 21.80$	0.9995	4.00×10^{-3}
Streptomyces erythreus (红霉素)	$y = 28.49x - 22.52$	0.9977	5.00×10^{-3}
Roxithromycin (罗红霉素)	$y = 111.77x - 110.34$	0.9990	3.00×10^{-3}

2.2.2 准确度、精密度实验

以实验室纯水为基质, 采用加标回收法进行回收率和精密度试验, 添加 2.0、10.0 μg/L 2 个水平浓度, 每个水平重复测定 7 次, 平均回收率为 90.9% ~ 113.0%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.86% ~

7.87% (见表3)。

表3 12种抗生素类药物的加标回收率与精密度

组分名	添加浓度			
	2.0 ug/L		10.0 ug/L	
	平均回 收率(%)	RSD (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
Sulfadiazine (磺胺嘧啶)	102.5	4.37	103.0	6.37
Oxytetracycline (土霉素)	104.5	5.08	99.8	4.79
Ofloxacin (氧氟沙星)	94.5	6.46	104.0	1.86
SulfamidineTablets (磺胺二甲嘧啶)	94.5	7.59	100.1	3.62
Norfloxacine (诺氟沙星)	99.0	3.45	106.6	5.01
Tetracycline Hydrochloride (盐酸四环素)	106.5	6.16	105.3	2.79
Sulfamethoxazole (磺胺甲噁唑)	91.5	5.27	102.4	4.11
Chloroamphenicol (氯霉素)	97.5	4.93	103.3	3.96
Chlortetracycline (盐酸金霉素)	97.0	7.87	97.3	7.77
Doxycycline (强力霉素)	111.0	7.71	103.6	3.75
Streptomyces erythreus (红霉素)	113.0	6.34	90.9	4.94
Roxithromycin (罗红霉素)	106.0	5.66	97.8	2.32

2.3 实际样品的分析

采用本方法对某地下水,某污水处理厂进口、出口生活污水,某肛肠医院废水实际水样进行分析,测定效果好,实用性强,完全能满足环境水体中12种抗生素检测要求,测定结果见表4。

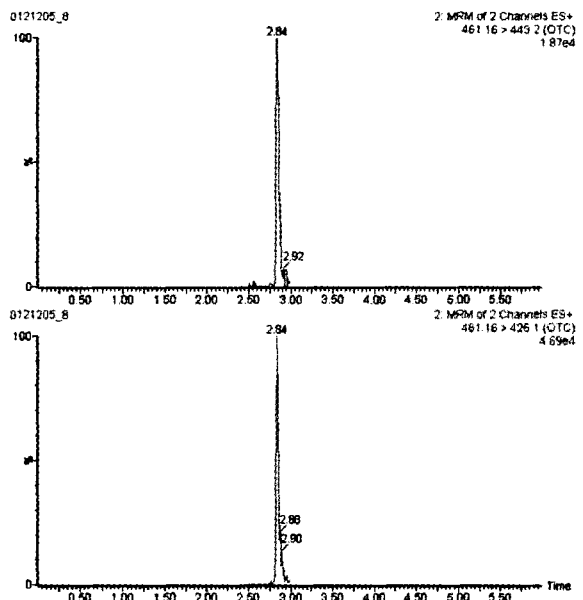
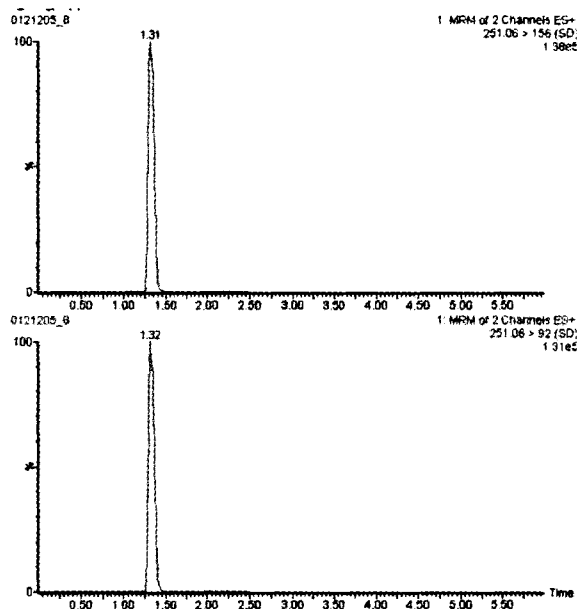
表4 实际水样中12种抗生素测定结果(ug/L)

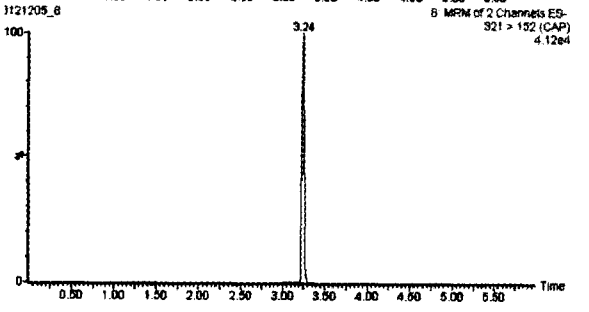
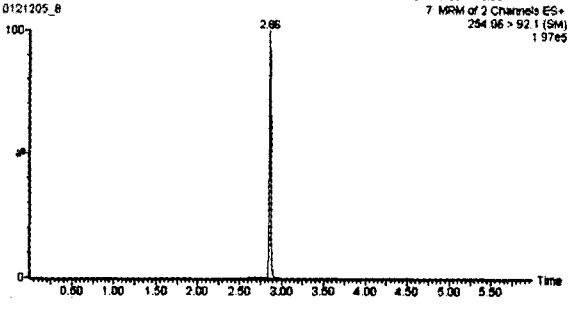
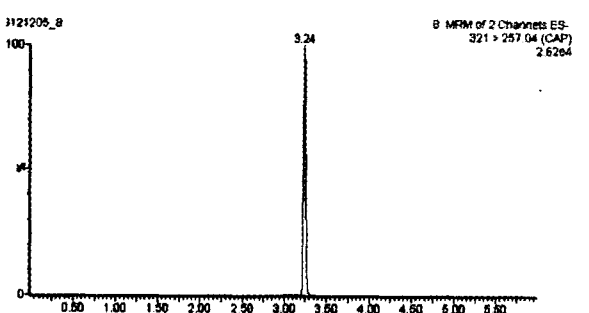
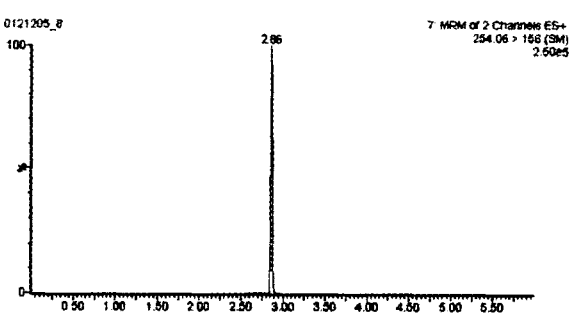
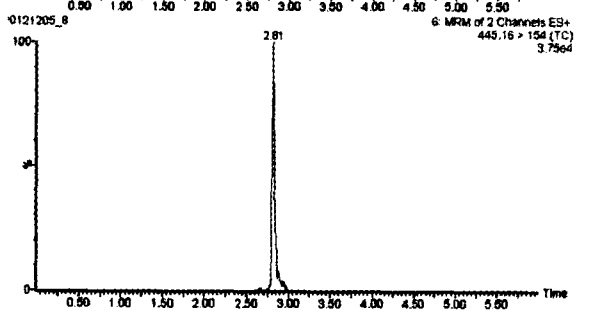
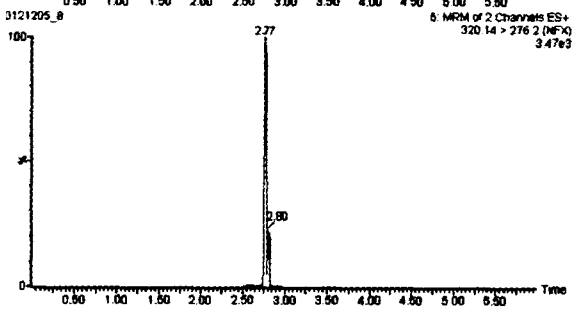
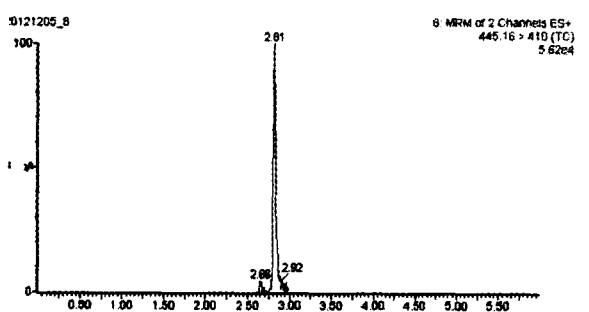
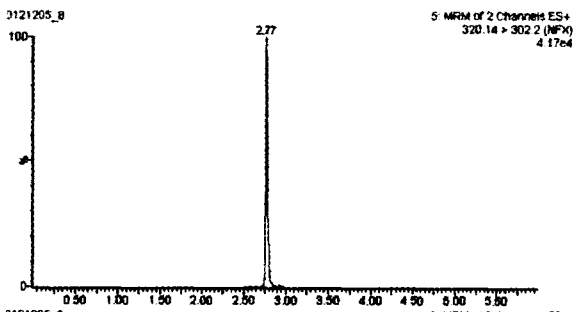
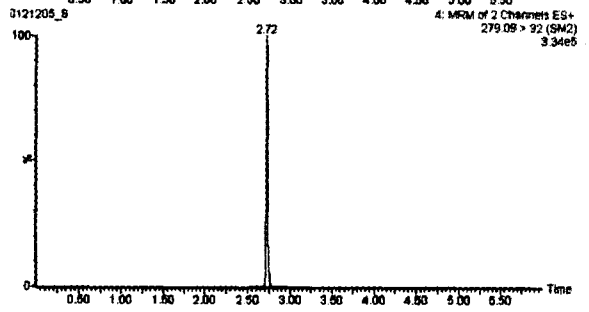
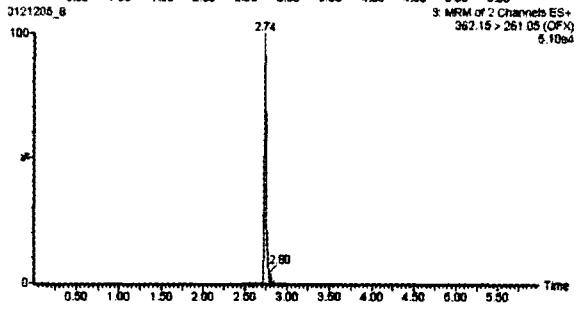
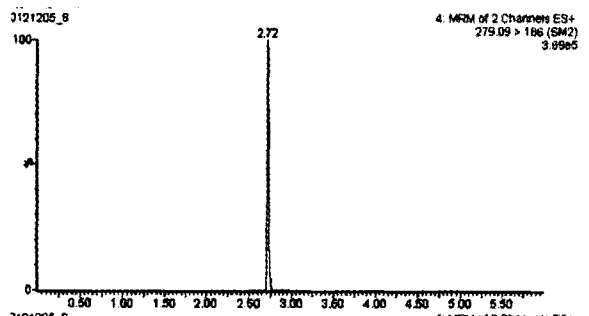
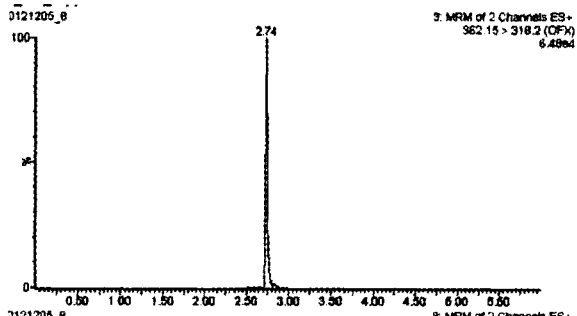
组分名	某医院 废水	某污水 厂进口	某污水 厂出口	某地 下水
Sulfadiazine(磺胺嘧啶)	0.07	0.09	0.07	N
Oxytetracycline(土霉素)	N	0.05	N	N
Ofloxacin(氧氟沙星)	0.76	3.14	0.74	N
SulfamidineTablets(磺胺二甲嘧啶)	N	N	0.06	N
Norfloxacine(诺氟沙星)	1.27	1.81	1.27	N
Tetracycline Hydrochloride(盐酸四环素)	N	0.25	N	N
Sulfamethoxazole(磺胺甲噁唑)	N	0.51	N	N
Chloroamphenicol(氯霉素)	N	N	N	N
Chlortetracycline(盐酸金霉素)	N	0.31	0.28	N
Doxycycline(强力霉素)	0.38	0.30	N	N
Streptomyces erythreus(红霉素)	N	0.77	N	N
Roxithromycin(罗红霉素)	1.01	1.40	N	N

N表示未检出

3. 结语

本文所建立的UPLC-MS/MS方法可同时检测地下水、生活污水、医院废水中12种抗生素药物的含量,操作简单、快速,测定结果准确可靠,适用于水中抗生素类药物残留的定性定量分析。





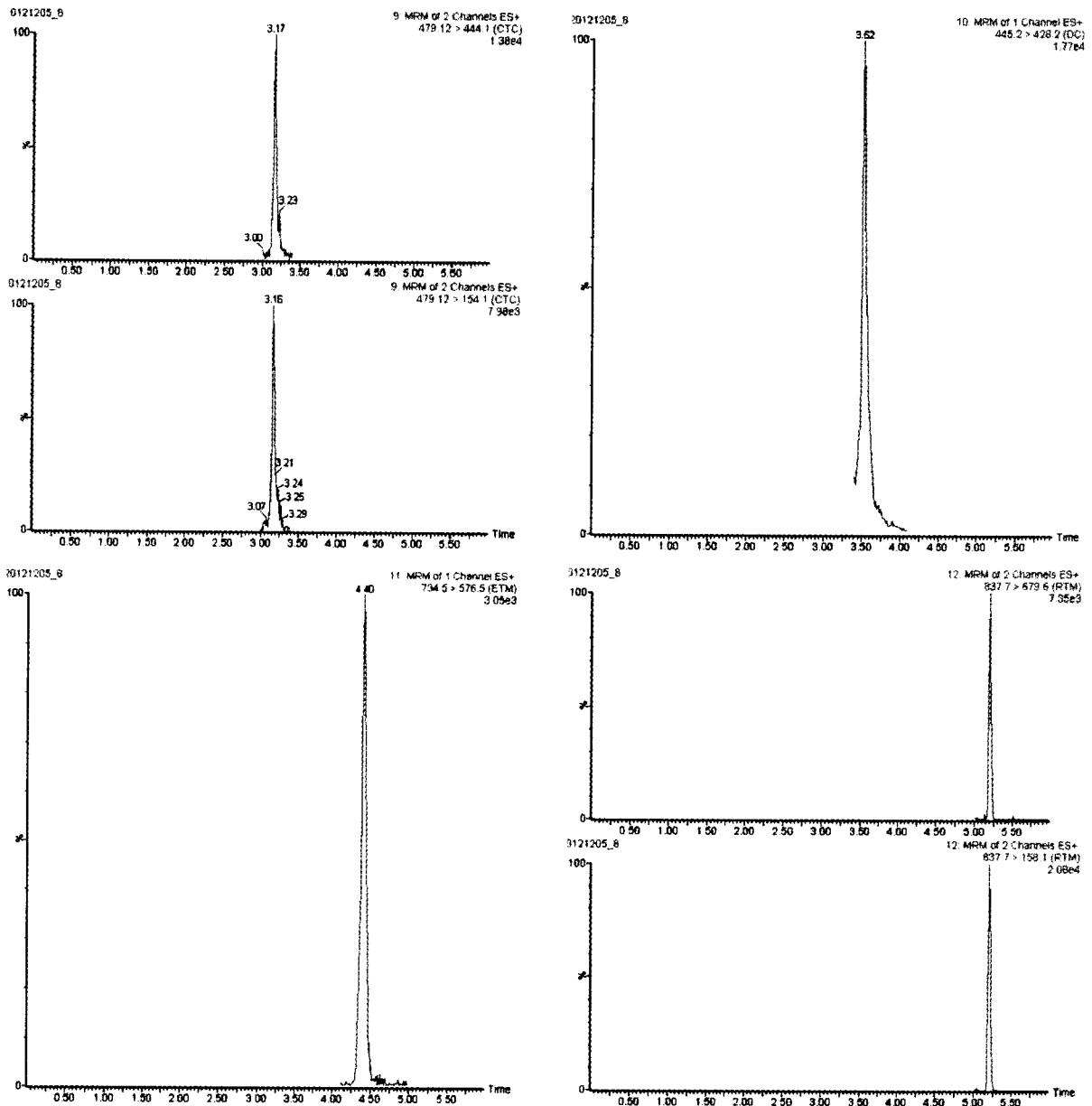


图1 12种抗生素离子流图

注:1.磺胺嘧啶(SD)2.土霉素(OTC)3.氧氟沙星(OFX)4.磺胺二甲嘧啶(SM2)5.诺氟沙星(NFX)6.盐酸四环素(TC)7.磺胺甲恶唑(SM)8.氯霉素(CAP)9.盐酸金霉素(CTC)10.强力霉素(DC)11.红霉素(ETM)12.罗红霉素(RTM)

参考文献:

[1] Wai O W H. A lid - driven elongated annular FLUME (LEAF) for the Determination of Sediment Transport Properties [C]//Gyr A, Kinzelbach W. Sedimentation and Sediment Transport, Proceedings of the Monte Verità Symposium. Switzerland; Kluwer Academic Publishers, 2002; 241 - 244.

[2] Chan W Y, Wai O W H, Li Y S. Critical shear stress for deposition of cohesive sediments in Mai Po [J]. Journal of Hydrodynamics, Ser. B, 2006, 18(3) :300 - 305.

[3] 刘小云, 舒为群. 水中抗生素污染现状及检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(8) :1011 - 1014.

[4] Roman H, Thomas T, Klaus H, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment [J]. Sci Total Environ, 1999, 225:109 - 118.

[5] Esther T, Guy B, Adela RR. Trace enrichment of (fluoro) quinolone antibiotics in surface waters by solid - phase extraction and their determination by liquid chromatography - ultraviolet detection [J]. J. Chromatogr A, 2003, 1008: 145 - 155.

[6] Eva MG, Alfredo CA, Andreas H, et al. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid - phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Anal Chem, 2001, 73: 3632 - 3638.

(责任编辑 赵冰)

超高效液相色谱-串联质谱法测定水中12种抗生素

作者: [张晓燕](#), [李志强](#), [李领川](#), [刘艳丽](#)
作者单位: [张晓燕\(洛阳市环保设计研究所, 洛阳, 471000\)](#), [李志强\(洛阳市涧西污水处理厂, 洛阳, 471000\)](#), [李领川, 刘艳丽\(中州大学实验管理中心, 郑州, 450044\)](#)
刊名: [中州大学学报](#)
英文刊名: [Journal of Zhongzhou University](#)
年, 卷(期): 2013, 30(4)

参考文献(6条)

1. [Wai O W H A lid-driven elongated annular FLUME \(LEAF\) for the Determination of Sediment Transport Properties](#) 2002
2. [Chan W Y;Wai O W H;Li Y S Critical shear stress for deposition of cohesive sediments in Mai Po](#) 2006(03)
3. [刘小云;舒为群 水中抗生素污染现状及检测技术研究进展](#) 2005(08)
4. [Roman H;Thomas T;Klaus H Occurrence of antibiotics in the aquatic environment](#) 1999
5. [Esther T;Guy B;Adela RR Trace enrichment of\(fluoro\)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography ultraviolet detection](#) 2003
6. [Eva MG;Alfredo CA;Andreas H Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection](#) 2001

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhongzdxxb201304031.aspx