

。监测技术。

UPLC—ESI—MS/MS 法同时测定水中 7 种抗生素

张川¹, 胡冠九^{1,2}, 孙成¹

(1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210093

2 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

摘要: 采用超高效液相色谱—电喷雾二级质谱联用技术同时测定水中 7 种抗生素, 优化了试验条件。磺胺甲恶唑、诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、四环素在 1.00 ng/L~1 000 ng/L 范围内线性良好, 定量下限为 1 ng/L; 土霉素、金霉素在 10.0 ng/L~2 000 ng/L 范围内线性良好, 定量下限为 10 ng/L; 去离子水和地表水样加标回收率为 72.1%~112%, RSD 为 0.6%~9.2%。

关键词: 抗生素; 超高效液相色谱; 电喷雾; 二级质谱; 水质

中图分类号: O657.7⁺2 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2009)03-0037-04

Simultaneous Analysis of 7 Antibiotics in Water by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Chuan¹, HU Guanjiu², SUN Cheng¹

(1. The State Key Lab of Pollution Control and Resource Reuse School of the Environment Nanjing University Nanjing Jiangsu 210093 China; 2. Jiangsu Province Environmental Monitoring Centre Nanjing Jiangsu 210036 China)

Abstract An ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) analysis method was established for the simultaneous analysis of 7 antibiotics in water. The experimental conditions were optimized to produce following results: good linearity of sulfamethoxazole, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin and tetracycline in the range from 1.00 ng/L to 1 000 ng/L and the limits of quantification (LOQ) 1 ng/L; the good linearity of terramycin and aureomycin in the range from 10.0 ng/L to 2 000 ng/L and the LOQ 10 ng/L; the recoveries of deionized water and surface water from 72.1% to 112%, and the RSD from 0.6% to 9.2%.

Key words: Antibiotics; Ultra-HPLC; Electrospray Tandem mass spectrometry; Water quality

抗生素是微生物产生的在低浓度下能抑制其他微生物生长的小分子天然有机化合物^[1], 其在环境水体中的出现、迁移及潜在的生态危害已成为国际环境领域研究的热点之一^[2]。目前国外关于环境中抗生素的研究较多^[3-4], 国内也陆续开展了相关工作^[5-6], 但水体中残留抗生素的分析还鲜见报道。磺胺类、大环内酯类、四环素类抗生素作为人畜用药在国内外被大量使用^[7], 而抗生素多属水溶性, 对水体构成了较大的潜在危害^[8]。实际水体中痕量抗生素的分析受基质影响非常明显, 目前国内较推广的高效液相色谱法难以达到其分析

要求。今采用超高效液相色谱—电喷雾二级质谱 (UPLC—ESI—MS/MS) 联用技术检测水体中四环素、土霉素、金霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、磺胺甲恶唑等 7 种抗生素, 获得了满意结果。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

收稿日期: 2008-10-16 修订日期: 2009-02-17

基金项目: 江苏省环境监测科研基金资助项目 (0613)

作者简介: 张川 (1986-), 男, 山东枣庄人, 硕士, 从事环境分析与检测方面的研究。

Water超高效液相色谱 串联质谱仪 (Acquity/Acquity), MassLynx 4.1 工作站, 美国 Waters 公司; 自动固相萃取仪, 美国 Zymark 公司; BP 221 S 型电子天平, 德国塞多利斯公司; N-EVAP 111 型氮吹仪, 美国 Organomation 公司; Molarm 1820 型超纯水机, 上海摩勒生物科技有限公司。

氧氟沙星 (Ofloxacin OF)、诺氟沙星 (Norfloxacin NF)、环丙沙星 (Ciprofloxacin CF) 标准品, 纯度为 99.9%, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 磺胺甲恶唑 (Sulfamethazine SMZ)、四环素 (Tetracycline TC)、土霉素 (Oxytetracycline OTC)、金霉素 (Chlortetracycline CTC) 标准品, 纯度分别为 99.0%、97.5%、98.5%、99.0%, 德国 Dr Ehrenstorfer GmbH 实验室; 1.00 g/L 7 种抗生素标准储备液, 由标准品配制而成; 内标盐酸曲马多, 纯度 >99.0%, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 试验用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 样品前处理

采集长江南京河段及部分水厂样品, 置于 1 L 棕色玻璃瓶中。水样经玻璃纤维滤膜过滤去除悬浮颗粒物后, 加入 0.25 g EDTA 用稀硫酸调节至 pH 值 < 3, 分别用 10 mL 甲醇和 10 mL 2 g/L EDTA 溶液, 以 3.0 mL/min 的流量对固相萃取柱 (HLB)^[9] 活化处理。将处理过的水样以 10.0 mL/min 的流量过固相萃取柱, 再用 5 mL 纯水以 5.0 mL/min 的流量过柱以去除 EDTA 氮吹 20 min 以去除水分, 然后用 8 mL 含 0.1% 甲酸的甲醇以 1.0 mL/min 的流量洗脱 (其中 2 mL 先用于浸泡萃取柱)。在洗脱液中准确加入内标 10 mg/L 盐酸曲马多溶液 10 μL 涡旋混匀后, 在氮吹仪上用氮气吹干, 用 1 mL 流动相溶解, 涡旋 30 s 高速离心后, 转移上清液待测。

1.3 仪器工作条件

UPLC 工作条件: Waters 公司的 Acquity UPLCTM BEH C₁₈ 色谱柱; 二元流动相体系分别为含 0.1% 甲酸的水 (A) 和乙腈 (B); 进样体积 10 μL, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 / min	流量 / (mL · min ⁻¹)	φ (A) / %	φ (B) / %
0	0.2	75	25
5	0.2	25	75
6	0.2	75	25

ESI-MS/MS 工作条件: 正离子电离模式; 喷雾电压 4 500 V; 脱溶剂气温度 450 °C; 流量 500 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; CID 碰撞气流量 0.14 mL/min; 每个化合物丰度最大的两个子离子及其最佳碰撞裂解电压见表 2。采用液质注射泵直接进样方式, 使用质谱仪的自动优化功能, 逐一进样确认其响应, 所得结果与文献 [10] 较接近。

表 2 MRM 分析的质谱参数

抗生素	锥孔电压 / V	碰撞能量 / eV	停留时间 / s	质荷比
四环素	30	40	0.1	445.3/154.2
				445.3/410.2 (定量离子)
磺胺甲恶唑	35	35	0.1	254.2/92.20
				254.2/107.6 (定量离子)
诺氟沙星	40	25	0.1	320.2/276.2 (定量离子)
				320.2/302.2
环丙沙星	40	50	0.1	332.2/231.2 (定量离子)
				332.2/314.2
氧氟沙星	40	40	0.1	362.2/261.2 (定量离子)
				362.2/318.2
土霉素	35	30	0.1	479.2/444.0 (定量离子)
				479.2/462.0
金霉素	30	40	0.1	461.2/201.2
				461.2/426.2 (定量离子)

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件选择

实际水体中四环素类化合物的分析受金属离子影响较大, 而 EDTA 与金属离子的较强络合作用能有效减少四环素与金属离子络合所造成的损失。用纯水代替水样作回收率试验^[9], 不加 EDTA 时, 5 种四环素组分的回收率为 34.8% ~ 50.2%, 平行样相对偏差较大; 在水样中添加 EDTA 后, 回收率达到 66.2% ~ 79.7%, 结果相对稳定。该试验在预处理水样和老化 C₁₈ 小柱时均加入 EDTA 以提高四环素类化合物的回收率。

2.2 ESI-MS/MS 条件优化

在定性方面, 质谱选择 MRM 模式, 对 7 种化合物逐一进行母离子及两个子离子确认; 在定量方面, 采用内标法^[11] (母离子与内标物峰面积的比值) 结合标准添加法校正基质效应, 每种化合物选择一个子离子积分。

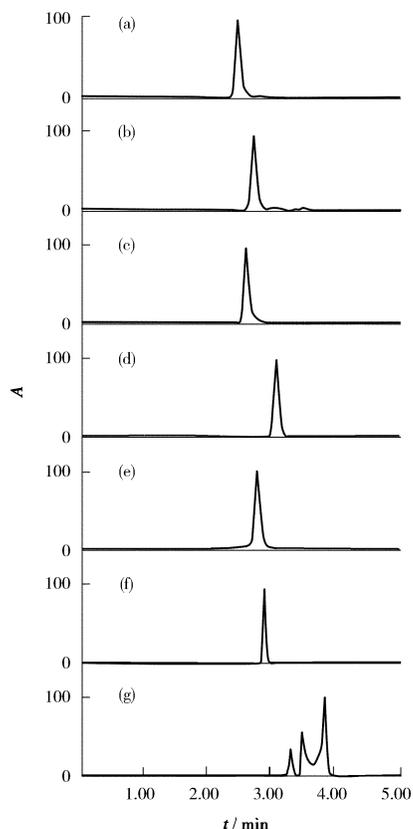
分别对 7 种抗生素进行质谱分析, 以优化分析条件, 获得最佳灵敏度。质谱检测采用正离子模

式,与负离子模式相比响应更好。试验了不同参数,如干燥气流量(8 L/min~15 L/min)、气体温度(250 °C~450 °C)、毛细管电压(3 000 V~5 500 V)、裂解电压(50 V~150 V)等对测定的影响,确定最佳条件分别为 8 L/min, 450 °C, 4 500 V, 150 V。

上述条件优化后,研究了 7 种抗生素的锥孔电压及 CID 碰撞能量对质谱信号的影响。锥孔电压会影响母离子的响应强度,这 7 种抗生素的锥孔电压变化不大,均在 30 V~40 V 之间。每种抗生素碎片离子的 CID 都不同,一般在某个碰撞电压下,可能一个碎片离子响应最大,而对应的母离子及其他碎片离子响应很小。该试验选择的子离子均响应较强,通过确定这些子离子作定性试验。

2.3 标准质谱峰

7 种抗生素的标准质谱峰见图 1。



(a) 氧氟沙星 (2.51 min); (b) 环丙沙星 (2.75 min);
(c) 诺氟沙星 (2.65 min); (d) 磺胺甲恶唑 (3.11 min);
(e) 四环素 (2.84 min); (f) 金霉素 (2.93 min);
(g) 土霉素 (3.88 min)。

图 1 7 种抗生素的标准质谱峰

2.4 标准曲线与定量下限

以信噪比 $S/N=10$ 计,方法定量下限 (IOQL) 磺胺甲恶唑、诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、四环素为 1 ng/L,土霉素、金霉素为 10 ng/L,基本满足水体中抗生素类化合物的检测要求。

分别配制 0 ng/L, 1.00 ng/L, 10.0 ng/L, 30.0 ng/L, 100 ng/L, 300 ng/L, 1 000 ng/L 磺胺甲恶唑、诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、四环素标准溶液系列,以及 0 ng/L, 10.0 ng/L, 30.0 ng/L, 100 ng/L, 300 ng/L, 1 000 ng/L, 2 000 ng/L 土霉素、金霉素标准溶液系列,用该方法测定,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标绘制标准曲线,结果见表 3。

表 3 标准曲线

抗生素	回归方程	线性范围 $\rho/(ng \cdot L^{-1})$
磺胺甲恶唑	$Y=19.4X-93.1$ $R^2=0.999$	1.00~1 000
诺氟沙星	$Y=23.7X+142$ $R^2=0.999$	1.00~1 000
环丙沙星	$Y=92.4X-302$ $R^2=0.998$	1.00~1 000
氧氟沙星	$Y=30.9X+255$ $R^2=0.998$	1.00~1 000
四环素	$Y=106X+96.8$ $R^2=0.999$	1.00~1 000
土霉素	$Y=61.0X-3.11 \times 10^3$ $R^2=0.998$	10.0~2 000
金霉素	$Y=12.6X-710$ $R^2=0.998$	10.0~2 000

2.5 精密度试验

对去离子水加标样每天重复测定 5 次,连续测定 5 d 考察日内差和日间差,结果见表 4。

表 4 精密度试验结果^①

抗生素	% 精密度						
	磺胺甲恶唑	诺氟沙星	环丙沙星	氧氟沙星	四环素	土霉素	金霉素
日内差	1	4.9	5.9	5.0	3.9	3.2	3.5
	2	8.1	7.3	3.3	2.9	3.5	3.3
	3	0.6	1.8	0.7	1.5	3.5	8.6
日间差	1	4.1	6.5	6.8	9.2	5.9	6.1
	2	4.9	8.7	8.5	8.6	4.9	5.0
	3	3.9	4.1	5.1	5.5	4.6	7.2

^① 1, 2, 3 分别为加标 10.0 ng/L, 100 ng/L, 1 000 ng/L 的去离子水样品。

2.6 加标回收试验

分别对去离子水和地表水作加标回收试验,去离子水回收率用内标法标准曲线计算,地表水回收率用标准添加法计算,结果见表 5。

表 5 加标回收试验结果

样品	加标量 $\rho / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 / %						
		磺胺甲恶唑	诺氟沙星	环丙沙星	氧氟沙星	四环素	土霉素	金霉素
去离子水	10.0	86.3	90.9	91.8	90.2	87.4	89.8	92.4
	100	90.0	92.6	91.8	92.1	88.1	92.4	91.3
	1000	88.5	92.6	92.6	91.2	86.8	89.2	92.9
地表水	10.0	90.2	101	89.2	104	72.1	75.4	82.6
	100	87.7	112	94.2	109	75.3	79.6	80.3
	1000	88.9	100	95.4	103	74.7	82.9	86.0

2.7 实际样品测定

用该方法测定南京地区部分江河及自来水厂源水样品, 结果见表 6

表 6 实际样品测定结果 ng/L

样品	四环素	磺胺甲恶唑	诺氟沙星	环丙沙星	氧氟沙星	土霉素	金霉素
1	—	3.03	5.55	2.93	2.58	—	—
2	—	15.7	—	—	1.52	—	—
3	—	4.95	—	3.16	6.46	—	—
4	—	15.3	—	—	1.63	—	—
5	0.950	12.5	—	—	—	—	—
6	—	8.35	—	—	0.680	—	—
7	1.46	6.26	—	—	0.940	—	—
8	32.2	10.9	—	—	6.68	—	—

3 结语

采用 UPLC-ESI-MS/MS法测定水环境中抗生素, 方法线性范围宽, 灵敏度高, 精密度和准确度良好, 基本能够满足地表水中抗生素类化合物的痕量分析要求。

[参考文献]

[1] DEMAN A L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms [J]. *Applied Microbiol Biotechnol* 1999 (52): 455—463

[2] HALLING-SORENSEN B, NIELSEN S N, LANZKY P F et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review [J]. *Chemosphere* 1998: 36

(3): 357.

[3] OKA H, IIO Y, MAQTSLMOTO H. Application of ion exchange cartridge clean up in food analysis. Simultaneous determination of sulfonamide antibiotics in animal liver and kidney using HPLC. Performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography A* 2000 (882): 109—133

[4] ANDERSON C R, RUPP H S, WU W. Complexities in tetracycline analysis—chemistry matrix extraction clean up and liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A* 2005 (1075): 23—32

[5] 丁志刚, 王静, 高红梅. 抗生素残留检测技术的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2005 31(6): 112—116

[6] 秦燕, 张美金, 林海丹. 高效液相色谱—电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的 10 种磺胺 [J]. *色谱*, 2005 23(4): 397.

[7] 沈述庄. 关注对动物使用抗生素与细菌耐药的问题 [J]. *中华儿科杂志*, 2008 40(8): 452—454.

[8] TERNES T A, JOSS A, SEGRIST H. Scrutinizing pharmaceutical and personal care products in wastewater treatment [J]. *Environmental Science and Technology* 2004(38): 392A—399A

[9] 胡冠九, 孙成, 王冰. 高效液相色谱法测定环境水样中 5 种四环素类抗生素残留 [J]. *环境化学*, 2007 26: 106—107

[10] RICHARD L, PER-AKE J, OLSEN B et al. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards [J]. *Chemosphere* 2004 (57): 1479—1488

[11] 邹惠仙, 陶钢. GC/MS内标法测定水中挥发和半挥发有机物的质量控制 [J]. *环境监测管理与技术*, 1999 11(3): 33—36

· 简讯 ·

江苏开展秸秆焚烧卫星遥感监测工作

为监控秸秆焚烧状况, 江苏省环境监测中心于 2008 年着手开展利用遥感手段进行秸秆焚烧火点监测的技术研究, 目前已形成基于 EOS/MODIS 卫星数据的遥感监测火点业务能力。自 2009 年 5 月 13 日起正式开展全省秸秆焚烧卫星遥感监测工作, 每日编发《江苏省秸秆焚烧火点卫星遥感监测报告》并将监测结果及时报送至省环保厅、省环境监察局, 此举对加强江苏各地秸秆禁烧工作起到积极推动作用。

摘自 www.jshb.gov.cn 2009-05-27