

固相萃取-超高效液相色谱法测定水中四环素类抗生素

方小丹, 柯建明, 陈振贺, 李焯*

(北京市环境保护科学研究院/国家城市环境污染控制工程技术研究中心, 北京 100037)

摘要 本研究建立了测定水中四种四环素类抗生素的超高效液相色谱 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC) 分析方法。采用固相萃取法提取水中的四环素类抗生素, 分别以甲醇和水活化、平衡HLB小柱, 用甲醇进行洗脱。在UPLC条件中采用甲醇、乙腈及0.01mol/L柠檬酸溶液作为流动相进行梯度洗脱, 外标法定量, 分析时间仅为4.5分钟。四种四环素类抗生素的线性关系良好, 线性相关系数大于0.999。低中高三个浓度加标回收率分别为56.0%-86.3%, 68.0%-78.5%, 73.8%-80.4%。土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的方法检出限分别为0.71, 0.36, 0.47, 0.88 $\mu\text{g/L}$, 与HPLC-MS方法相当。该方法重现性较好, 操作简单, 分析时间短, 可用于高通量水体样品中四环素类抗生素的测定。

关键词 水体; 四环素类抗生素; 固相萃取; 超高效液相色谱法

Determination of 4 Tetracycline Antibiotics in Water by SPE-UPLC

Fang Xiao Dan, Ke Jian Ming, Chen Zhen He, Li Ye*

(Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection/National Engineering Research Center for Urban Environmental Pollution Control, Beijing 100037)

Abstract: The determination of 4 tetracycline antibiotics in water by UPLC was investigated in this study. Solid phase extraction was carried out to concentrate and purify the water samples. HLB cartridge was conditioned with methanol and then equilibrated with water. The analytes were finally eluted by methanol. Methanol, acetonitrile, and citric acid solution (0.01 mol/L) were applied in gradient elution in UPLC method. Total running time was only 4.5 minutes. The standard curve of each compound presented a good linearity ($r^2 > 0.999$). The recoveries of three spiked levels of samples were 56.0%-86.3% (Low), 68.0%-78.5% (Middle), 73.8%-80.4% (High), respectively. The method detection limits (MDLs) were 0.71, 0.36, 0.47, 0.88 $\mu\text{g/L}$ for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline, respectively. The method is simple, quick, and reproductive and is suitable for high-throughput analysis of tetracycline antibiotics in water samples.

Key Words: Water; Tetracycline antibiotics; Solid phase extraction; Ultra-high performance liquid chromatography

长期以来, 抗生素被大量地用于人类和动物细菌性感染疾病的治疗, 同时也被作为促生长剂和饲料添加剂以亚治疗剂量添加于动物饲料中, 在集约化畜牧业和养殖业中应用广泛^[1,2]。然而, 绝大部分抗生素不能完全被机体吸收利用, 摄入人体和动物体内未被代谢的抗生素会经不同途径进入环境, 对水体、沉积物和土壤等环境介质造成污染^[3-5]。尽管抗生素的半衰期较短, 可通过水解、光解与微生物降解等途径被分解, 但由于其使用频率高、使用量大, 导致其在环境中仍然表现出“假持久性”现象^[6]。环境中残留的抗生素加速了抗生素抗性菌株的产生与传播^[7], 对人类健康与生态环境

安全造成了极大威胁。近年来, 固相萃取技术被广泛用于水体中四环素类抗生素的预处理过程中^[8], 同时, 高效液相色谱技术的发展也为四环素类抗生素的研究提供了更先进的检测方法^[9]。目前, 环境水体中四环素类抗生素的检测方法主要包括高效液相色谱与紫外联用 (HPLC-UV)^[10]、液相色谱与质谱联用 (LC-MS)^[11]、高效液相色谱与串联质谱联用 (HPLC-MS/MS)^[12]、及超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS)^[13]等。高效液相色谱法分析时间长, 溶剂消耗量大, 质谱法仪器设备昂贵。超高效液相与二极管阵列检测器 (UPLC-DAD), 能够克服高效液相色谱法的缺陷, 同时仪

* 北京市自然科学基金资助项目 (8142020)

作者: 方小丹, 单位名称: 北京市环境保护科学研究院环境分析测试中心; 地址: 北京市西城区北营房中街59号

邮编: 100037; 研究领域: 环境监测领域; Email: fangxiaodan@cee.cn

通讯作者, 李焯, Email: liye@cee.cn

器成本较低。本研究采用固相萃取-超高效液相色谱法测定水中的四环素类抗生素,分析时间短,成本低,是环境水体中四环素类抗生素测定的通用方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

安捷伦1290 Infinity 超高效液相色谱仪,配有DAD检测器;安捷伦Elipse Plus C18 RRHD色谱柱(1.8 μm, 2.1×50 mm);十二位固相萃取装置(美国Supelco公司);氮吹仪(北京帅恩科技有限责任公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher公司);超纯水(电阻率≥18.2 MΩ·cm);四环素、金霉素、土霉素和强力霉素固体标准物质(Dr. Ehrenstorfer GmbH);一水合柠檬酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、乙二胺四乙酸二钠(分析纯, 天津光复科技发展有限公司)。采用减重法称量四种四环素类抗生素标准物质,用甲醇(含0.1%甲酸)配制成1000 mg/L的标准储备液,置于棕色瓶内保存于-20。

1.3 实验方法

水样的富集:使空白水样通过0.45 μm水系滤膜(上海安谱科学仪器有限公司),滤去杂质,以免阻塞固相萃取小柱。准确量取过滤后水样500 mL,加入四环素类抗生素的标准溶液,同时加入0.2 g乙二胺四乙酸二钠,去除干扰离子。HLB小柱(6 mL/500 mg, Waters公司)预先用6 mL甲醇活化,6 mL超纯水平衡,使水样以不大于10 mL/min的速率通过HLB小柱。水样富集完成后,以6 mL超纯水洗去残留离子。减压抽干5分钟,以6 mL甲醇洗脱目标物,氮吹至近干,用初始流动相比例的溶液定容至1 mL。

色谱条件:采用梯度洗脱程序(表1),A相为0.01 mol/L柠檬酸溶液,B相为乙腈,C相为甲醇。流速为0.4 mL/min,柱温28。DAD检测器的吸收波长为350 nm,进样量为10 μL。

表1 UPLC梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of UPLC

时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	80	10	10
2.5	70	18	12
4.5	70	18	12

2 实验结果与讨论

2.1 色谱条件优化

首先,选用Agilent C18反相色谱柱,选用文献报道含0.1%甲酸的水溶液和乙腈作为流动相^[14],对四种四环素类抗生素进行分离,金霉素和强力霉素的色谱峰重叠;改变流动

相的梯度,仍不能使二者分离(图1-a)。然后,改用柠檬酸水溶液(0.01 mol/L)和乙腈作为流动相时,二者的分离度明显提高。同时,初始流动相比例对于土霉素和四环素的分离有很大影响:当柠檬酸溶液以90%比例起始时,四种抗生素出峰时间在3 min之后,土霉素出现肩峰,金霉素和强力霉素的峰有前沿趋势;当柠檬酸溶液以78%比例起始时,土霉素和四环素之间的分离度下降(图1-b);当柠檬酸溶液以80%比例起始时,土霉素和四环素的分离度为3.30,基本达到基线分离,能够满足定性定量分析的要求(图1-c)。因此,确定以80%柠檬酸溶液、10%乙腈、10%甲醇的作为流动相的起始比例。通常高效液相色谱的分离时间约在20 min左右^[15],本方法在4.5分钟内可以完成四种四环素类抗生素的分离,分析时间大大缩短。

表2 UPLC方法与常见HPLC方法的比较

Table 2 Comparison of UPLC method developed with traditional HPLC methods

方法	色谱柱	有机溶液消耗量(mL)	分析时间(min)
GB/T 22990-2008	Kromasil 100-5C18 (4.6×150mm, 5μm)	3.22	14
RIGOL应用报告 (LC-AR-0102019TD)	月旭 XB C18 (4.6×250mm, 5μm)	6.00	25
本研究	Elipse Plus C18 RRHD (1.8μm, 2.1×50mm)	0.50	4.5

表2为常用高效液相色谱法与本研究的UPLC方法之间比较。该方法分析时间短、有机溶剂消耗少,可见该方法具有非常高的分析效率。

2.2 工作曲线、方法检出限和测定下限

根据环境水样的含量分布选择合适的标准曲线线性范围,分别设定50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 μg/L浓度制作标准曲线,由表1可以看出,四种四环素类抗生素的标准曲线方程线性关系良好($r^2 > 0.999$)。测定12份浓度为1.0 μg/L的加标水样,并按照公式1计算方法检出限MDL。

$$MDL = ks \frac{c}{\bar{X}} \quad (1)$$

k—置信因子为3; s—峰面积的标准偏差; c—样品浓度(μg/L); \bar{X} —峰面积平均值

表3 四种抗生素的工作曲线、方法检出限及测定下限

Table 3 Calibration curves, method detection and minimum quantitative detection limits

化合物	工作曲线 (x: μg/L)	线性相关系数 (r^2)	方法检出限 (μg/L)	测定下限 (μg/L)
土霉素	y=0.0342x-0.7034	0.9998	0.71	2.38
四环素	y=0.0397x-0.8342	0.9996	0.36	1.20
金霉素	y=0.0183x-0.0270	0.9999	0.47	1.56
强力霉素	y=0.0293x-0.4030	0.9999	0.88	2.95

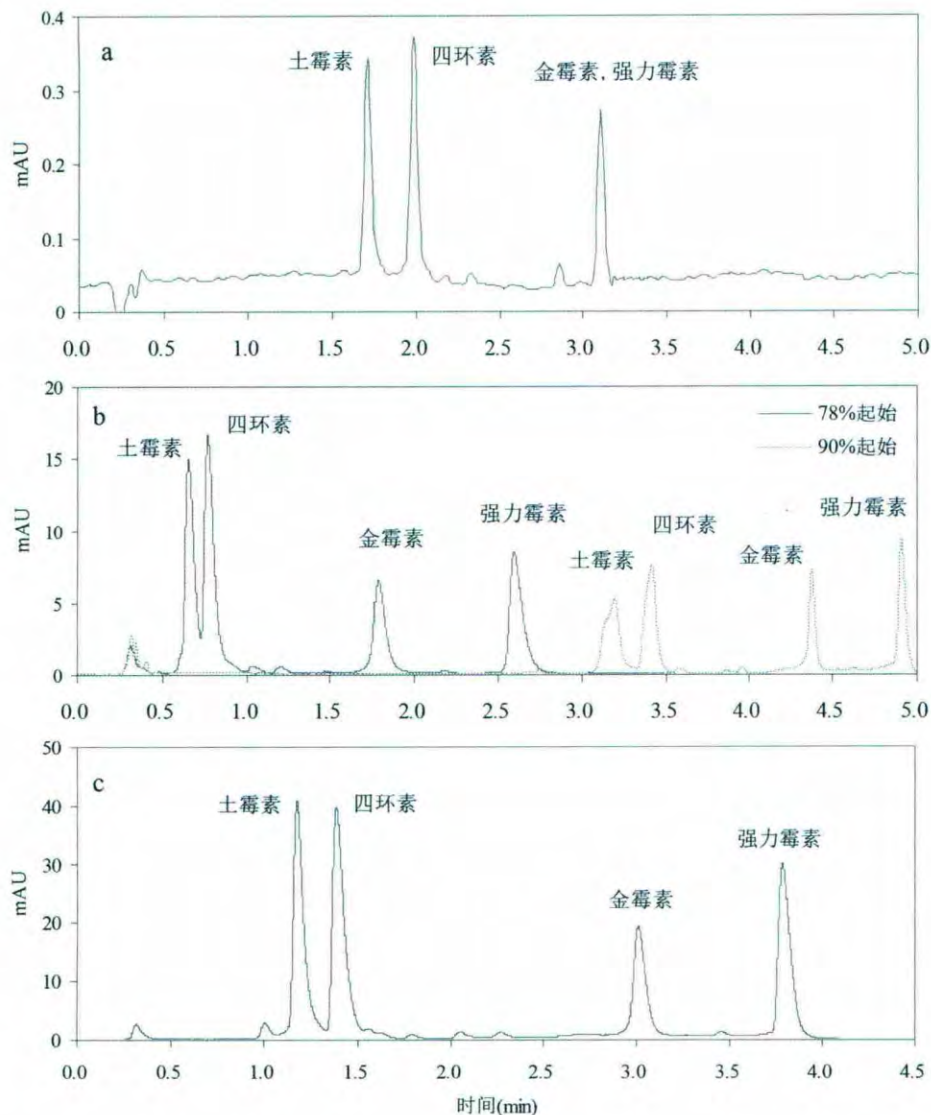


图1 四种四环素类抗生素的色谱图

(a)初始流动相为甲酸水溶液/乙腈；b和c初始流动相为柠檬酸水溶液/乙腈/甲醇)

Figure 1 Chromatograms of 4 tetracycline antibiotics

表4 水中四种四环素类抗生素的回收率 (n=3)

Table 4 Recoveries of 4 tetracycline antibiotics in water samples (n=3)

化合物	加标量 (μg/L)					
	1.0		5.0		9.0	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
土霉素	85.8	15.6	72.9	13.3	73.8	26.4
四环素	86.3	19.9	78.5	5.6	80.4	13.3
金霉素	72.0	34.1	71.6	7.8	76.2	9.5
强力霉素	56.0	24.1	68.0	8.4	78.8	6.5

从表3可看出四种四环素类抗生素的方法检出限在0.36~0.88μg/L之间,与HPLC-MS方法的方法检出限(0.10 μg/L)相当^[4]。以公式1中k取10来计算方法的测定下限^[16],则该方法

的测定下限为1.20~2.95μg/L。

2.3 不同加标水平下四环素类抗生素回收情况

于500 mL空白水样中加入四种四环素抗生素的标准溶液,添加浓度分别为1.0, 5.0, 9.0 μg/L。加标水样按照1.3的方法进行回收实验,结果表明,低、中、高浓度下四种四环素抗生素的回收率分别为56.0%~86.3%、68.0%~78.5%、73.8%~80.4%(表4)。

3 结论

本研究采用固相萃取方法对环境水样进行富集和净化,结合超高效液相方法对水样中四种四环素抗生素进行分析,建立了固相萃取-超高效液相色谱法测定水中四环素类抗生素的基本方法。四种抗生素的线性关系良好($r^2 > 0.999$),能够满足水体中抗生素测定的基本要求。低中高三个浓度加标回收率分别为56.0%-86.3%, 68.0%-78.5%, 73.8%-80.4%。土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的检出限分

别为0.71, 0.36, 0.47, 0.88 μg/L,与HPLC-MS方法相当。该方法重现性较好,操作简单,分析时间短,可用于高通量水体样品中四环素类抗生素的测定。

参考文献

- [1] Addison J B. Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots. Residue Reviews, 1984, 92: 1-28.
- [2] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. Chemosphere, 2009, 75(4): 417-434.
- [3] Diaz C M. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(6): 340-351.

(下转P44)

分析检测的一项重要任务和难度的工作。为了让保健食品具有标识的功效,不法生产企业会向产品中添加药用化学成分。为了准确的定性定量,本文采取了液质联用,同时定性定量检测的分析方法,快速高效。基于高通量检测的需要及考虑保健食品生产工艺的基本特点,本文从样品快速制备到准确分析检测整个过程作了有益的尝试,建立的方法符合食品检测法规的技术要求,测定了几批市场上的实际样品,结果准确可靠。

本方法对标识具有抗疲劳功效的保健食品非法添加西地那非类药物的分析检测具有参考意义,对保健食品中非法添加其他化学成份的分析检测提供一定的方法思路借鉴。

参考文献

[1] 陈安珍,王尊文,杨钊,等. UPLC-MS/MS检测补肾壮阳类中成药

及保健品中添加剂的化学药. 中成药, 2009,31(11): 1712-1714.

- [2] 邢俊波,曹红,张炯,等. 高效液相色谱法同时测定补肾壮阳类中成药及保健食品中非法添加7种化药成分. 时珍国医国药, 2014,25(2): 451-453.
- [3] 高咏莉,邬晓鸥,肖丽和,等. HPLC-MS/MS法测定补肾壮阳类药品或保健品中非法添加羟基豪莫西地那非的研究. 中成药, 2009,31(7): 1058-1060.
- [4] 张翠英,李振国,徐金铃. UPLC/MS/MS法检测补肾壮阳类中成药中非法添加枸橼酸西地那非的定性定量研究. 中国卫生检验杂志, 2007,17(10): 1741-1743.
- [5] 来国防,程宾. 补肾壮阳类中药制剂中非法添加化学药物成分的检测. 中国药业, 2010,19(22): 32-34.
- [6] 刘畅,夏晶,胡青,等. LC/MS(n)法检测补肾壮阳类中成药和保健食品中非法添加5种性功能类化学药品. 中成药, 2009,31(9): 1371-1374.

(上接P34)

- [4] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, 2002, 36(6): 1202-1211.
- [5] 徐维海,张干,邹世春,等. 典型抗生素类药物在城市污水处理厂中的含量水平及其行为特征. *环境科学*, 2007, 28(8): 1779-1783.
- [6] 周启星,罗义,王美娥. 抗生素的环境残留,生态毒性及抗性基因污染. *生态毒理学报*, 2007, 2(3): 243-251.
- [7] Hu J, Shi J, Chang H, *et al.* Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environmental science & technology*, 2008, 42(9): 3415-3420.
- [8] 刘文民,徐媛,赵景红,等. 固相微萃取新技术在水分析中的应用. *生命科学仪器*, 2004, 2(5): 12-16.
- [9] 孙英鸿,齐懿鸣,王琛琛,等. 仪器分析方法与分析仪器主要特点及发展现状综述. *生命科学仪器*, 2007, 5: 3-9.
- [10] Yu H, Tao Y F, Chen D M, *et al.* Development of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken, and bovine. *Food Chemistry*, 2011,

124: 1131-1138.

- [11] Andreu V, Vazquez R P, Blasco C, *et al.* Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1329-1339.
- [12] Na G S, Fang X D, Cai Y Q, *et al.* Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 69(1-2): 233-237.
- [13] Shen J Z, Guo L M, Xu F, *et al.* Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides in Chicken Muscle by UPLC-MS-MS. *Chromatographia*, 2010, 71(5-6): 383-388.
- [14] Tylová T, Olšovská J, Novák P, *et al.* High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere*, 2010, 78(4): 353-359.
- [15] GB/T 20764-2006 可食动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱-紫外检测法.
- [16] 田强兵. 分析化学中检出限和测定下限的探讨. *分析化学计算*, 2007, 16(3): 72-73.