

固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱同时分析 环境水样中四环素类和喹诺酮类抗生素

孙广大, 苏仲毅, 陈 猛*, 袁东星

(厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:应用固相萃取及超高压液相色谱-质谱联用技术,建立了环境水样中4种四环素类和6种喹诺酮类抗生素的同时分析方法。样品经HLB固相萃取柱富集、净化后用甲醇洗脱,以超高压液相色谱-串联质谱仪多反应监测(MRM)离子模式定性、定量分析。以河水和海水为基质,卡巴氧为替代物进行回收率评价,4种四环素类抗生素在加标质量浓度分别为20.0 ng/L和100.0 ng/L时的回收率为94.0%~117.0%,相对标准偏差为2.0%~9.7% ($n=4$),方法的检出限均为20.0 ng/L;6种喹诺酮类抗生素在加标质量浓度分别为5.0 ng/L和20.0 ng/L时的回收率为63.6%~93.9%,相对标准偏差为1.6%~8.1% ($n=4$),方法的检出限为0.4 ng/L。结果表明,所建立的方法可成功地应用于近岸海域表层环境水样中目标抗生素残留的分析。

关键词:固相萃取;超高压液相色谱-质谱;四环素;喹诺酮;环境水样

中图分类号:O658 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8713(2009)01-0054-05 **栏目类别:**研究论文

Simultaneous determination of tetracycline and quinolone antibiotics in environmental water samples using solid phase extraction-ultra pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

SUN Guangda, SU Zhongyi, CHEN Meng*, YUAN Dongxing

(Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using HLB cartridge for extraction and cleanup, a method for simultaneous determination of 4 tetracycline and 6 quinolone antibiotics in environmental water samples was developed by ultra pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Using river water and sea water as matrices and carbadox as surrogate, the recoveries and relative standard deviations (RSD, $n=4$) were 94.0%–117.0% and 2.0%–9.7% for 4 tetracyclines at 20.0 ng/L and 100.0 ng/L spiking levels and 63.6%–93.9% and 1.6%–8.1% for 6 quinolones at 5.0 ng/L and 20.0 ng/L spiking levels, respectively. The detection limits were 20.0 ng/L for 4 tetracyclines and 0.4 ng/L for 6 quinolones. The method has been successfully applied to the survey of 10 target antibiotic residues in Jiulong River estuary, Fujian.

Key words: solid phase extraction (SPE); ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS); tetracycline; quinolone; environment water samples

随着畜禽、水产养殖业的快速发展,我国抗生素的种类和用量也在日益增加。抗生素在动物性产品中的残留不仅引起了食品安全问题,相当一部分还随动物粪便、医药废物以及饲料投放等进入水环境中,从而增加了环境安全和生态健康风险^[1,2]。抗生素的环境效应,尤其是在水环境中的效应,从20世纪90年代末开始已成为国际上环境领域研究的

热点。

水环境中抗生素残留的灵敏、准确、快速的分析方法是研究其环境行为(分布、迁移转化、降解动态、生物富集)和生态效应的必要手段。但是进入水环境中的抗生素不仅种类繁多,而且水的稀释作用使其多以痕量或超痕量存在^[3,4],加之不同水体中的干扰物质不同,因此水环境中抗生素的分析技

* 通讯联系人: 陈 猛, 副教授, 研究方向为环境化学。Tel: (0592)2183127, E-mail: mengchen@xmu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2006J0140).

收稿日期: 2008-07-02

术已成为其污染效应研究的制约因素。 C_{18} 、HLB 以及混合相固相微萃取(SPE)等固相萃取技术的发展使得同时并高倍浓缩萃取水环境中的多种抗生素成为可能。液相色谱-质谱尤其是串联质谱联用技术,在保证准确性、定量的前提下极大地提高了抗生素检测的灵敏度,因此固相萃取-液相色谱-质谱联用技术已成为当前水环境中痕量抗生素检测的关键技术。在已报道的文献中,刘玉春等^[5]应用该技术测定了河水中的大环内酯类抗生素,Zhu等^[6]测定了湖水中的四环素类抗生素,Xu等^[7]则利用该技术检测了香港维多利亚港附近海水中的氯霉素、2种喹诺酮类抗生素和3种磺胺类抗生素。

四环素类抗生素和喹诺酮类抗生素是水产养殖中常用的广谱抗菌素,相关研究主要集中于食品残留检验技术方面^[8,9]。而环境水样中这些抗生素的分析方法、环境行为和生态效应方面的报道很少。本研究选择常用的4种四环素类抗生素和6种喹诺酮类抗生素为研究对象,采用HLB固相萃取小柱进行富集、净化,超高压液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)联用技术检测,建立了环境水样中高灵敏的同时分析方法,并将所建立的方法应用于福建九龙江口及厦门近岸海域环境水样中四环素类和喹诺酮类抗生素残留的调查。

1 实验方法

1.1 药品与试剂

甲醇与乙腈均为色谱纯(Tedia Co., USA);盐酸为优级纯(广东汕头市西陇化工厂);甲酸(汕头市达濠精细化学品公司)、乙酸铵(广东汕头市西陇化工厂)和乙二胺四乙酸二钠盐(EDTANa₂)(上海申博化工有限公司)为分析纯。卡巴氧(纯度97.0%)、四环素(纯度97.0%)、土霉素(纯度97.9%)、金霉素(纯度99.0%)、强力霉素(纯度98%)、氧氟沙星(纯度98.0%)、诺氟沙星(纯度99.0%)、环丙沙星(纯度99.5%)、达氟沙星(纯度99.5%)、恩诺沙星(纯度99.0%)和沙拉沙星(纯度98.0%)标准品(Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany)。实验用水为Milli-Q水(Millipore, Bedford, MA, USA)。

分别称取10.0 mg标准品,用乙腈溶解并定容于50 mL棕色容量瓶中,配制成200 mg/L的单标准储备液,置于-20℃冰箱中保存。实验中根据需要配制成相应质量浓度的单标准工作液。

取各单标准储备液适量,用稀释液(用流动相A和流动相B按体积比1:4混合)配制所需浓度的混合标准溶液。

1.2 仪器与设备

超高压液相色谱-质谱联用仪为Waters Acquity™ Ultra Performance LC 串联 Quattro Premier XE MICROMASS(Waters, USA);12管固相萃取装置(Supelco Co., USA);6 mL/500 mg Oasis HLB SPE柱(Waters, USA);GM-0.33型真空泵(天津津腾实验设备有限公司);0.45 μm有机相滤膜(天津津腾实验设备有限公司);SK-1型快速混匀器(金坛市富华仪器有限公司);砂芯漏斗(天津津腾实验设备有限公司)。

1.3 液相色谱条件和质谱条件

色谱条件 色谱柱:Waters Acquity™ BEH C18(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:1 g/L 甲酸乙腈(A)和含5.0 mmol/L 乙酸铵的1 g/L 甲酸水溶液(B),流速为0.2 mL/min;梯度洗脱程序:12% A保持3 min,在3 min内由12% A线性增加至25% A并保持2 min,随后在1 min内再由25% A线性增至90% A并保持5 min,最后在1 min内由90% A线性回落到起始的12% A并保持5 min。进样量5 μL;柱温30℃。

质谱条件 电离源为电喷雾电离源(ESI),检测方式为多反应监测(MRM)离子模式,正离子检测;去溶剂气和锥孔反吹气流速分别为700 L/h和50 L/h,气体均为高纯氮气;碰撞气流速为0.18 mL/min,维持碰撞池压力(collision cell pressure)约为334 Pa(3.34 mbar),气体为氮气;去溶剂辅助加热温度(desolvation temp.)为350℃;源温度(source temp.)为120℃;毛细管电压为3 kV。锥孔电压(cone voltage)、碰撞能(collision energy)及11种抗生素的其他相关质谱条件见表1。

1.4 样品预处理方法

表层河水和海水样品均取自水面下约0.5 m处。在1.0 L水样中加入卡巴氧作为替代物,以0.45 μm滤膜除去悬浮物,并加入约200 μL盐酸调节水样pH为3.0左右,然后以5~8 mL/min流速通过500 mg/6 mL Oasis HLB SPE小柱。HLB小柱上样之前依次用6 mL丙酮、6 mL甲醇和6 mL pH为3.0的5 mmol/L乙酸铵缓冲液淋洗。水样过柱后,先用乙酸铵缓冲液淋洗小柱,再将小柱于氮气保护下干燥10 min,最后用6 mL甲醇洗脱,洗脱液在40℃下用氮气吹干,用稀释液定容为1.0 mL,待上机分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件和质谱条件的优化

将各抗生素单标准工作液直接进样,先进行全

扫描,找出准确的 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,然后对其进行轰击以获得二次碎裂产生的子离子。将分子离子和2~3个信号强度适宜的子离子组成监测离子对,以MRM模式进行检测,在此基础上重点优化了对灵敏度影响较大的锥孔电压和碰撞能,使选定的母离子和子离子组成的特征离子的丰度和比例达到最佳。优化后的参数见表1。

表1 目标抗生素的串联质谱检测参数
Table 1 Tandem mass spectrometric parameters for target antibiotics

| Antibiotic | Parent ion [M+H] ⁺ (m/z) | Daughter ion (m/z) | Cone voltage/ V | Collision energy/ eV |
|-------------------------|---|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| Carbadox (卡巴氧) | 263.1 | 231.0 | 28 | 13 |
| Oxytetracycline (土霉素) | 461.2 | 426.1* | 24 | 17 |
| | | 443.2 | | |
| Tetracycline (四环素) | 445.2 | 410.1* | 27 | 17 |
| | | 427.1 | | |
| Chlortetracycline (金霉素) | 479.2 | 444.1* | 26 | 19 |
| | | 462.0 | | |
| Doxycycline (强力霉素) | 445.2 | 428.1 | 27 | 18 |
| Oxfloxacin (氧氟沙星) | 362.2 | 261.1 | 35 | 28 |
| | | 318.1* | | 21 |
| Norfloxacin (诺氟沙星) | 320.2 | 276.2* | 33 | 18 |
| | | 302.1 | | 21 |
| Ciprofloxacin (环丙沙星) | 332.2 | 288.1* | 30 | 16 |
| | | 314.1 | | 21 |
| Danofloxacin (达氟沙星) | 358.2 | 283.1 | 32 | 26 |
| | | 314.1* | | 18 |
| | | 340.1 | | 21 |
| Enrofloxacin (恩诺沙星) | 360.2 | 316.1* | 33 | 21 |
| | | 342.1 | | 22 |
| Sarafloxacin (沙拉沙星) | 386.2 | 299.1 | 32 | 26 |
| | | 342.1* | | 20 |
| | | 368.1 | | 22 |

* quantitative ion.

选择1 g/L 甲酸乙腈溶液和含5.0 mmol/L 乙酸铵的1 g/L 甲酸水溶液为流动相,流速为0.2 mL/min,考察并最终确定了上述“1.3”节的梯度洗脱程序。在优化的梯度洗脱程序下,除了氧氟沙星和诺氟沙星无法分离外,其余目标抗生素均能实现较好的分离,MRM谱图见图1,目标抗生素的检测过程耗时仅8 min。

2.2 固相萃取条件的优化

SPE柱类型、洗脱剂和洗脱剂用量、水样过柱体积和流速、pH、盐度等都会影响SPE萃取的效率,本研究以加标回收率为评价依据分别对这些实验条件进行了优化。

2.2.1 柱型、水样过柱体积和流速

为了提高水样中目标抗生素的检测灵敏度,必须适当提高样品的浓缩倍数,但是样品浓缩倍数受

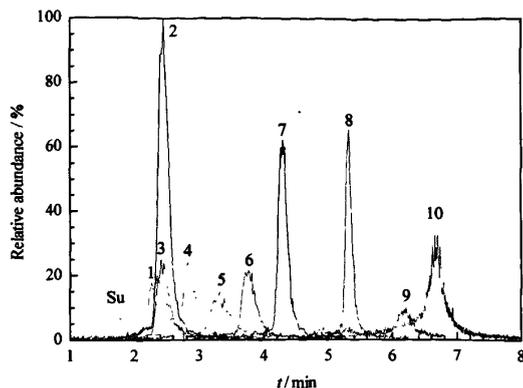


图1 四环素类和喹诺酮类抗生素混合标准样品的MRM谱图
Fig. 1 MRM chromatogram of tetracycline and quinolone standards

1. oxytetracycline; 2. ofloxacin; 3. norfloxacin; 4. ciprofloxacin; 5. tetracycline; 6. danofloxacin; 7. enrofloxacin; 8. sarafloxacin; 9. chlortetracycline; 10. doxycycline. Su: carbadox.

限于SPE小柱的类型和容量。本研究根据文献报道^[6,10],采用Waters公司的Oasis HLB小柱(500 mg/6 mL),流速采用其建议的5~8 mL/min。以过滤后的海水为基底,各抗生素的加标质量浓度为100 ng/L,考察水样的过柱体积。结果发现,水样的过柱体积分别为0.5 L和1.0 L时,10种目标抗生素的回收率在63.6%~105.8%之间,体积增大到1.5 L时回收率普遍大幅度下降。因此,实验最终选择水样过柱体积为1.0 L。

2.2.2 洗脱溶剂和洗脱剂用量

SPE柱上的抗生素常用甲醇或乙腈洗脱。实验发现,当采用甲醇为洗脱溶剂且洗脱剂用量大于5.0 mL时,目标抗生素即可被完全洗脱,因此本研究选择洗脱剂用量为6.0 mL。

2.2.3 水样的pH和盐度

一般河水的pH在6~9之间,盐度为0‰;海水样品的pH在7.8~8.3之间,盐度在33.0‰左右。不考虑其他干扰因素,以1.0 L Milli-Q水为基底,分别调整pH为3.0,5.0,7.0和9.0,然后加入目标抗生素混合标准溶液,使其最终质量浓度为100 ng/L,混匀后参照“1.4”节的方法进行处理。结果发现,pH为3.0时目标抗生素的回收率普遍较高,重现性较好。

同样以1.0 L Milli-Q水为基底,配制盐度分别为0.0‰,11.2‰和33.4‰的人工海水,调节pH为3.0,同上处理,考察盐度的影响。结果发现,水样盐度在0‰~33.4‰范围内对目标抗生素的回收率无显著影响。因此,本实验确定水样过柱前用盐酸调节pH至3.0,对盐度不进行调节。

2.3 样品的加标回收率

取厦门近岸海水和九龙江口河水为基底,加标质量浓度分别为 5.0, 20.0 和 100.0 ng/L,按“1.4”节所述方法对样品进行处理,每个质量浓度水平平行测定 4 份,考察方法的总体回收率和重现性。卡巴氧在国内使用较少,且在水样基底中未被检出,因此被作为替代物(surrogate),在分析前加至水样品中以对分析过程进行质量控制。分析结果列于表 2。从表 2 中可以看出:在各加标水平上,九龙江口河水中各抗生素的平均回收率在 87.3% ~ 105.8% 之间,相对标准偏差(RSD)在 1.6% ~ 9.7% 之间;厦门近岸海水中各抗生素的平均回收率在 63.6% ~

117.0% 之间,RSD 在 4.8% ~ 8.6% 之间。由此可知,所建立的方法有着较好的重现性,回收率也完全符合要求。

2.4 工作曲线的线性范围和方法的检出限

采用优化的色谱和质谱条件,喹诺酮类抗生素和四环素类抗生素分别在 0.4 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 和 20 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系;以信噪比(S/N)为 10 对应的浓度为依据估算方法的检出限,结果见表 2。由于预处理过程中加入 EDTA Na_2 ,四环素类抗生素大部分以结合态存在,离子化效率相对较低,因而其灵敏度与喹诺酮类类抗生素有较大的差异。

表 2 河水和海水样品中抗生素的加标回收率($n=4$)、方法的检出限和线性相关系数
Table 2 Matrix-spiked recoveries ($n=4$), detection limits and correlation coefficients of antibiotics

| Antibiotic | Spiked level/(ng/L) | River water | | Sea water | | Detection limit/(ng/L) | r^2 |
|-------------------|---------------------|-------------|-------|------------|-------|------------------------|--------|
| | | recovery/% | RSD/% | recovery/% | RSD/% | | |
| Oxytetracycline | 20.0 | 102.3 | 8.4 | 95.9 | 6.0 | 20.0 | 0.9997 |
| | 100.0 | 99.4 | 5.3 | 97.3 | 6.8 | | |
| Tetracycline | 20.0 | 99.4 | 3.2 | 94.0 | 5.0 | 20.0 | 0.9982 |
| | 100.0 | 98.3 | 2.3 | 93.2 | 7.3 | | |
| Chlortetracycline | 20.0 | 101.0 | 3.1 | 117.0 | 5.8 | 20.0 | 0.9999 |
| | 100.0 | 105.8 | 9.7 | 111.8 | 6.5 | | |
| Doxycycline | 20.0 | 99.3 | 5.8 | 96.4 | 4.8 | 20.0 | 0.9999 |
| | 100.0 | 104.3 | 2.0 | 97.7 | 8.6 | | |
| Ofloxacin | 5.0 | 90.3 | 5.3 | 63.6 | 6.6 | 0.4 | 0.9999 |
| | 20.0 | 89.2 | 1.6 | 68.4 | 8.1 | | |
| Norfloxacin | 5.0 | 90.1 | 5.6 | 70.6 | 7.2 | 0.4 | 0.9999 |
| | 20.0 | 93.1 | 3.4 | 75.8 | 5.7 | | |
| Ciprofloxacin | 5.0 | 88.2 | 5.6 | 67.2 | 6.5 | 0.4 | 0.9982 |
| | 20.0 | 89.4 | 1.6 | 73.8 | 6.4 | | |
| Danofloxacin | 5.0 | 91.6 | 3.2 | 80.5 | 5.5 | 0.4 | 0.9999 |
| | 20.0 | 93.9 | 3.2 | 81.2 | 7.9 | | |
| Enrofloxacin | 5.0 | 87.3 | 3.6 | 70.4 | 7.1 | 0.4 | 0.9996 |
| | 20.0 | 91.4 | 2.0 | 76.2 | 5.5 | | |
| Sarafloxacin | 5.0 | 89.2 | 3.9 | 69.3 | 6.0 | 0.4 | 0.9999 |
| | 20.0 | 92.4 | 2.7 | 77.0 | 7.2 | | |

2.5 实际水样中目标抗生素的分析

本实验于 2006 年 12 月采集福建九龙江口和厦门近岸海域 21 个站位的表层河水和海水样品,其中九龙江下游到入海口布设 16 个采样站位,编号为 JL01 ~ JL16;在厦门西海域布设 5 个采样站位,编号为 XH01 ~ XH05。将所建立的分析方法应用于目标抗生素的分析,结果显示,四环素类抗生素在全部站位中均未被检出,喹诺酮类抗生素中的氧氟沙星在九龙江口部分站位和厦门西海域的全部站位均被检出,质量浓度在 0.9 ~ 5.8 ng/L 之间(如图 2 所示)。这两个地区的水域中氧氟沙星的来源及其分布值得进一步研究。

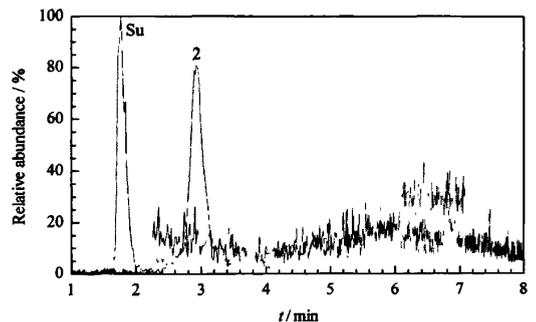


图 2 实际水样中四环素类和喹诺酮类抗生素的 MRM 谱图
Fig. 2 MRM chromatogram of tetracyclines and quinolones in a water sample
For peak identifications, see Fig. 1.

3 结语

本研究采用 SPE 与 LC-MS/MS 联用技术,建立了环境水样中 4 种四环素类抗生素和 6 种喹诺酮类抗生素同时分析的高灵敏方法,并成功地用于福建九龙江口及厦门近岸海域水环境中抗生素残留的调查。结果显示,氧氟沙星检出的质量浓度在 0.9 ~ 5.8 ng/L 之间,其来源和分布值得进一步关注和深入研究。

参考文献:

- [1] Boxall A B A, Kolpin D W, Halling-Sorensen B, et al. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(15): 286A
- [2] Hu Y Y, Wang J Y, Ma D Y. *Marine Environmental Science* (胡莹莹, 王菊英, 马德毅. 海洋环境科学), 2004, 23(4): 77
- [3] Batt A L, Bruce I B, Aga D S. *Environ Pollut*, 2006, 142: 295
- [4] Yang S, Carlson K. *Water Res*, 2003, 37: 4 645
- [5] Liu Y C, Xu W H, Yu L L, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (刘玉春, 徐维海, 余莉莉, 等. 分析测试学报), 2006, 25(2): 1
- [6] Zhu J, Snow D D, Cassada D A, et al. *J Chromatogr A*, 2001, 928: 177
- [7] Xu W H, Zhang G, Zou S C, et al. *Environ Pollut*, 2007, 145: 672
- [8] Guo G H, Pan W, Su D S, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (郭根和, 潘威, 苏德森, 等. 色谱), 2005, 23(4): 401
- [9] Pang G F, Cao Y Z, Zhang J J, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (庞国芳, 曹彦忠, 张进杰, 等. 分析测试学报), 2005, 24(4): 61
- [10] Lindsey M E, Meyer M, Thurman E M. *Anal Chem*, 2001, 73: 4 640

2007 年中国化学类期刊影响因子和总被引频次排序表
(中国科技信息研究所 2008 年 11 月公布)

| 期刊名称 | 影响因子 | | 被引频次 | | 他引率 |
|---|-------|----|------|----|------|
| | 数值 | 排名 | 数值 | 排名 | |
| 分析化学 | 1.131 | 1 | 3666 | 2 | 0.86 |
| 色谱 | 1.005 | 2 | 1420 | 9 | 0.84 |
| 燃料化学学报 | 0.981 | 3 | 983 | 16 | 0.70 |
| 化学学报 | 0.970 | 4 | 2693 | 3 | 0.78 |
| 催化学报 | 0.961 | 5 | 1615 | 6 | 0.86 |
| 物理化学学报 | 0.923 | 6 | 1661 | 5 | 0.83 |
| 高等学校化学学报 | 0.857 | 7 | 4089 | 1 | 0.82 |
| 分析测试学报 | 0.828 | 8 | 1251 | 12 | 0.87 |
| 高分子学报 | 0.816 | 9 | 1452 | 8 | 0.75 |
| 无机化学学报 | 0.794 | 10 | 1729 | 4 | 0.79 |
| 环境化学 | 0.775 | 11 | 1357 | 10 | 0.94 |
| 分子科学学报 | 0.745 | 12 | 253 | 31 | 0.42 |
| 有机化学 | 0.745 | 12 | 1318 | 11 | 0.69 |
| 化学进展 | 0.688 | 14 | 810 | 17 | 0.91 |
| 分析实验室 | 0.647 | 15 | 1236 | 13 | 0.78 |
| 中国科学 B | 0.585 | 16 | 1188 | 14 | 0.97 |
| 分子催化 | 0.581 | 17 | 569 | 22 | 0.69 |
| 化学通报 | 0.561 | 18 | 1091 | 15 | 0.97 |
| 分析科学学报 | 0.558 | 19 | 692 | 19 | 0.91 |
| 结构化学 | 0.551 | 20 | 645 | 20 | 0.37 |
| Chinese Journal of Polymer Science | 0.543 | 21 | 232 | 32 | 0.77 |
| 应用化学 | 0.535 | 22 | 1510 | 7 | 0.90 |
| 煤炭转化 | 0.524 | 23 | 477 | 25 | 0.67 |
| 电化学 | 0.506 | 24 | 369 | 27 | 0.92 |
| 感光科学与光化学 | 0.497 | 25 | 289 | 29 | 0.84 |
| 高分子通报 | 0.473 | 26 | 607 | 21 | 0.90 |
| 化学研究与应用 | 0.378 | 27 | 794 | 18 | 0.86 |
| 化学研究 | 0.324 | 28 | 191 | 33 | 0.89 |
| 化学与生物工程 | 0.289 | 29 | 316 | 28 | 0.93 |
| 化学试剂 | 0.271 | 30 | 559 | 23 | 0.84 |
| 化学与黏合 | 0.246 | 31 | 265 | 30 | 0.89 |
| Chemical Research in Chinese Universities | 0.200 | 32 | 177 | 34 | 0.62 |
| Chinese Chemical Letters | 0.197 | 33 | 529 | 24 | 0.76 |
| 合成化学 | 0.191 | 34 | 370 | 26 | 0.81 |