

分析与监测

## SPE-HPLC 测定水中 $\beta$ -内酰胺类喹诺酮类磺胺类抗生素

李清雪<sup>1</sup>, 孙王茹<sup>1</sup>, 汪庆<sup>2</sup>

(1. 河北工程大学 能源与环境工程学院, 河北 邯郸 056038; 2. 河北工程大学 河北省污染成因与影响重点实验室<筹> 能源与环境工程学院, 河北 邯郸 056038)

**摘要:** 建立了采用 SPE-HPLC 法同时测定地表水中 3 种 $\beta$ -内酰胺类、4 种喹诺酮类和 3 种磺胺类抗生素(包含磺胺增效剂 TMP)的方法,水样经 HLB 小柱富集浓缩后进行 HPLC 分析,检测波长  $\lambda = 270$  nm,进样量为 30  $\mu$ L,流动相为甲醇/乙腈/0.5% 甲酸水。结果表明,10 种目标抗生素在 0.05 ~ 1  $\mu$ g/mL 范围内线性关系良好,  $R^2 > 0.99$ ,检出限为 5.76 ~ 22.61  $\mu$ g/L,实际水样的加标回收率为 78.6% ~ 101.5%,相对标准偏差(RSD)为 1.77% ~ 7.31%。该方法操作简单,准确度高,可实现地表水中 10 种目标抗生素的种类和质量浓度测定。

**关键词:** 地表水; 固相萃取; 高效液相色谱; 抗生素

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2019)18-0118-05

## Determination of $\beta$ -Lactams, Quinolones and Sulfonamides Antibiotics in Water by SPE-HPLC

LI Qing-xue<sup>1</sup>, SUN Wang-ru<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>2</sup>

(1. College of Energy and Environmental Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China; 2. Hebei Key Laboratory of Air Pollution Cause and Impact <Preparatory>, College of Energy and Environmental Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

**Abstract:** A method for simultaneous determination of three  $\beta$ -lactams, four quinolones and three sulfonamides antibiotic (include sulfonamide synergist TMP) in surface water by solid-phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography (HPLC) was established. The water samples were concentrated through HLB columns and detected by HPLC. The detection wavelength was 270 nm, the injection volume was 30  $\mu$ L, and the mobile phase was methanol/acetonitrile/0.5% formic acid water. The results showed that the linearity range was 0.05 ~ 1  $\mu$ g/mL, the correlation coefficient  $R^2$  was over 0.99, the detection limit of 10 target antibiotics were 5.76 ~ 22.61  $\mu$ g/L, and the recovery rate of the actual water sample were between 78.6% to 101.5%, the relative standard deviation (RSD) was 1.77% ~ 7.31%. The method was simple and had high accuracy, and it could be used for the determination of 10 kinds of target antibiotics in surface water.

**Key words:** surface water; solid-phase extraction (SPE); high performance liquid

chromatography (HPLC); antibiotics

$\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类和磺胺类抗生素因其抗菌谱广、抗菌活性强而被广泛应用于人类医疗和畜牧养殖业<sup>[1-2]</sup>,从而以原型或代谢物的形式<sup>[3]</sup>随医疗废水、城市生活污水、雨水径流等进入城市污水处理厂,未被完全降解的抗生素通过污水处理厂出水进入受纳水体,在水环境中富集<sup>[4-7]</sup>,导致耐药菌及耐药基因的出现,对生态环境和人类健康造成威胁。而城市地表水体周围人口集中,抗生素使用量大,抗生素污染现象更为严重,因此,监测和研究其抗生素的污染状况,对于城市地表水体的污染控制及修复有重要意义。目前痕量抗生素的主要检测方法有高效液相色谱法(HPLC)和超高效液相-串联质谱法等<sup>[8-11]</sup>,但目前对于同时检测不同种类抗生素的方法较少。笔者以3种 $\beta$ -内酰胺类、4种喹诺酮类和3种磺胺类抗生素(包含磺胺增效剂TMP)为研究对象,采用固相萃取小柱对10种目标抗生素进行富集浓缩,建立了同时测定地表水中10种目标抗生素的高效液相色谱分析方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津LC-2030);Agilent固相萃取装置(Agilent公司);Oasis HLB小柱(500 mg/6 mL,Waters公司);紫外分光光度计(DR6000,哈希公司)。

乙腈(色谱纯,Merck公司);甲醇(色谱纯,Merck公司);甲酸(色谱纯,Merck公司);Na<sub>2</sub>EDTA(分析纯,天津瑞金特化学品有限公司);头孢克洛(CEC)、头孢克肟(CFM)、头孢唑啉(CZO)( $\beta$ -内酰胺类),磺胺嘧啶(SDZ)、磺胺甲恶唑(SMX)、甲氧苄啶(TMP)(磺胺类),诺氟沙星(NOR)、氟罗沙星(FO)、洛美沙星(LOM)、环丙沙星(CIP)(喹诺酮类)标准品均购自中国药品生物制品鉴定所。

标准溶液的配制:用甲醇将标准品配制成0.1 mg/mL的混标储备液,4℃下避光保存。

### 1.2 液相色谱条件

色谱柱:Shim-pack GIST C18(250 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m);柱温:40℃;流速:0.8 mL/min;进样量:30  $\mu$ L;检测波长:270 nm;流动相:A为0.1%甲酸水,B为甲醇,C为乙腈,流动相梯度洗脱程序如表1所示。

表1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution procedure

时间/min	流动相/%		
	A	B	C
0	80	10	10
6	65	25	10
8	60	30	10
9	50	40	10
10	50	40	10
14	80	10	10

## 1.3 水样采集与预处理

### 1.3.1 水样采集

本次试验选取邯郸城区段滏阳河与其支流沁河作为研究对象,检测其抗生素残留情况。依据《地表水和污水监测技术规范》(HJ/T 91—2002)设置监测断面。滏阳河设置9个监测断面,依次为张庄桥闸、南环桥、陵园路桥、人民桥、丛台桥、亚太滏阳桥、联防桥、果园路桥和苏里桥,编号为F1~F9。其中,张庄桥闸与苏里桥分别为滏阳河进出邯郸市的两个国控断面,南环桥断面有雨水管道的接入,陵园路桥断面为滏阳公园的出口断面,人民桥与丛台桥为龙湖公园的进出断面,亚太滏阳桥断面有邯郸东污水处理厂的二级出水的汇入,联防桥断面为滏阳河与沁河交汇点断面,果园路桥断面位于邯郸热电厂附近,且周围受农业影响。沁河城区段共设置6个监测断面,依次为建设大街沁河桥、浴新大街沁河桥、陵西大街沁河桥、中华大街沁河桥、光明大街沁河桥和亚太沁河桥,编号为Q1~Q6。其中,建设大街沁河桥断面有雨水管道的接入,浴新大街沁河桥断面位于邯钢生活区附近,陵西大街沁河桥与中华大街沁河桥断面附近有邯郸市第一医院,亚太沁河桥断面为沁河入滏阳河的最后断面。2018年8月和12月,在15个监测断面分别采集1 L表层水样(0~50 cm),将采集的样品置于干净的棕色瓶中,冷藏运回实验室,4℃下保存。

### 1.3.2 水样预处理<sup>[12]</sup>

水样经0.45  $\mu$ m滤膜过滤去除悬浮杂质,取过滤后水样加入0.5 g Na<sub>2</sub>EDTA,并用4 mol/L盐酸调节其pH=3,反应0.5 h。依次用5 mL甲醇、5 mL 0.1%的甲酸水活化HLB小柱。以5 min的流速将处理好的水样通过活化好的HLB小柱,待水样富集

结束后,用6 mL 5% 甲醇水淋洗吸附柱,真空干燥20 min。然后用3×2 mL 甲醇淋洗 HLB 小柱,收集洗脱液于干净的小瓶中。将收集的洗脱液置于通风橱里自然风干,用甲醇定容至1 mL,溶液过0.45 μm 的针式过滤器移入样品瓶中保存,待 HPLC 分析。

#### 1.4 标准曲线的建立

采用外标法对目标抗生素进行定量分析,取配制好的0.1 mg/mL 的10种抗生素的混标储备液用甲醇依次配制成质量浓度为1、0.8、0.6、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05 μg/mL 的混标工作液进行 HPLC 测定以绘制标准曲线。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 色谱条件的优化

##### 2.1.1 检测波长的选择

不同抗生素在不同检测波长下的吸收值不同,本实验所选磺胺类抗生素检测波长为268~280 nm,β-内酰胺类抗生素检测波长为254~264 nm,喹诺酮类抗生素检测波长为268~287 nm。综上所述,利用紫外分光光度计,对所选10种目标抗生素标准品在250~300 nm 内进行紫外吸收峰扫描,根据10种目标抗生素在不同检测波长下的吸收值,最终确定10种目标抗生素的检测波长为270 nm。

##### 2.1.2 进样量的选择

进样量的大小影响色谱峰响应值的大小及分离度,进样量增加可使色谱峰响应值增加<sup>[8]</sup>,使待测目标物质的检测下限降低,但进样量过大,会导致峰宽增加,目标抗生素之间分离度降低。本次试验研究了在抗生素混标工作液浓度为0.05 μg/mL 时,进样量分别为10、20、30、40 μL 时对色谱峰响应值

及分离度的影响,发现进样量从10 μL 增加到30 μL 时色谱峰响应值增加,且目标抗生素分离度良好,进样量增加到40 μL 时头孢克洛与磺胺嘧啶分离度较小,无法达到最低分离要求。故选择合适的进样量为30 μL。

##### 2.1.3 流动相的选择

分析甲醇/水、甲醇/0.5% 甲酸水、甲醇/乙腈/0.5% 甲酸水等不同流动相体系对10种目标抗生素分离情况,结果表明,相较于甲醇/水体系,甲醇/0.5% 甲酸水作为流动相时,调整流动相洗脱程序,可使除环丙沙星与头孢克肟之外的目标抗生素实现分离,但个别峰峰型拖尾,在流动相体系中加入10% 的乙腈调整流动相洗脱程序使10种目标抗生素实现分离,且峰型较好,无拖尾峰,如图1所示。故最终选择甲醇/乙腈/0.5% 甲酸水作为流动相。

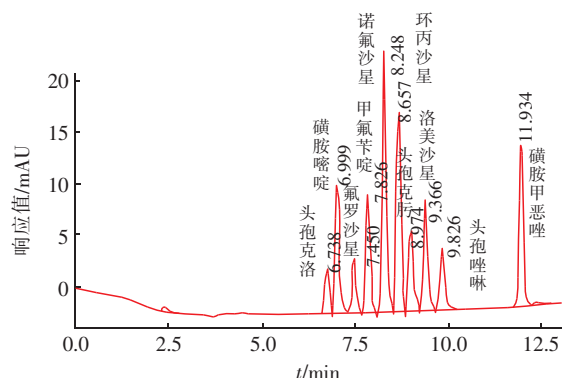


图1 10种目标抗生素色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 10 target antibiotics

#### 2.2 线性范围和检出限

依次配制质量浓度为1、0.8、0.6、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05 μg/mL 的10种抗生素的混标溶液进行 HPLC 测定,并制作标准曲线。测定结果见表2。

表2 10种抗生素的测定结果

Tab. 2 Determine results of 10 antibiotics

项目	保留时间/min	线性方程	线性范围/ (μg · mL <sup>-1</sup> )	相关系数 R <sup>2</sup>	LOD/ (μg · L <sup>-1</sup> )	平均回收率/%	RSD/ %
CEC	6.738	$y = 32.8815x + 221.5060$	0.05 ~ 1	0.9996	22.61	88.5	3.88
SDZ	6.999	$y = 97.5928x + 23.8598$	0.05 ~ 1	0.9998	7.83	92.5	2.07
FO	7.450	$y = 43.6809x - 300.4870$	0.05 ~ 1	0.9995	18.64	86.8	4.96
TMP	7.826	$y = 89.6663x - 6962.28$	0.05 ~ 1	0.9938	12.01	98.7	1.77
NOR	8.248	$y = 196.660x - 17166.0$	0.05 ~ 1	0.9942	5.76	91.7	4.83
CIP	8.657	$y = 139.928x - 11261.5$	0.05 ~ 1	0.9954	7.82	88.3	3.63
CFM	8.974	$y = 72.9461x - 112.668$	0.05 ~ 1	0.9998	13.50	101.5	3.52
LOM	9.366	$y = 88.9590x - 5520.72$	0.05 ~ 1	0.9972	12.10	78.6	7.31
CZO	9.826	$y = 44.2743x + 858.608$	0.05 ~ 1	0.9994	15.91	91.6	4.45
SMX	11.934	$y = 125.553x - 537.797$	0.05 ~ 1	0.9991	6.72	90.7	3.01

结果表明,10种目标抗生素在 $0.05 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 范围内其质量浓度( $x$ )与峰面积( $y$ )有良好的线性相关性,线性相关系数 $R^2 > 0.99$ 。以3倍信噪比求得10种抗生素的仪器检出限。

### 2.3 方法加标回收率和精密度

在2个不同水样中分别添加3个不同水平( $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ )的目标抗生素混标工作液,每

个水平重复6次,确定方法的加标回收率和精密度。结果见表2,对实际水样的加标回收率为 $78.6\% \sim 101.5\%$ ,RSD为 $1.77\% \sim 7.31\%$ 。

### 2.4 实际样品分析

采用SPE-HPIC方法对邯郸市城区滏阳河和沁河10种目标抗生素种类和浓度进行了调查,结果如表3所示。

表3 邯郸市城区两条河流中10种目标抗生素平均浓度

Tab.3 Average concentration of 10 target antibiotics in two rivers in Handan

$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

项 目		CEC	SDZ	FO	TMP	NOR	CIP	CFM	LOM	CZO	SMX
丰水期 (8 月)	滏阳河	ND	74.12	ND	66.56	56.88	54.78	ND	37.51	ND	77.89
	沁河	ND	64.16	ND	44.50	46.75	63.24	ND	32.22	ND	66.33
枯水期 (12 月)	滏阳河	ND	122.44	36.2	121.78	91.44	77.44	ND	43.50	33.21	109.44
	沁河	ND	88.16	ND	110.83	82.00	85.80	ND	42.61	30.23	89.83
注： ND 表示浓度低于检出限。											

注: ND表示浓度低于检出限。

由表3可知,邯郸市城区两条河流枯水期检出的目标抗生素种类较丰水期多,且各目标抗生素的检出浓度为枯水期高于丰水期。丰水期滏阳河和沁河均有6种目标抗生素检出,枯水期滏阳河有8种目标抗生素检出,沁河有7种目标抗生素检出。 $\beta$ -内酰胺类抗生素仅有CZO在12月份被检出,且检出浓度低于其他抗生素。FO只在12月份的滏阳河中有检出,检出浓度为 $36.2 \text{ ng/L}$ 。可能是因为夏天抗生素的使用量小于冬天<sup>[13]</sup>,且降水量增多,水流量增大,抗生素浓度得到稀释。

总体来看,滏阳河各目标抗生素的检出浓度均高于沁河,丰水期滏阳河三类抗生素的浓度为磺胺类(包含磺胺增效剂TMP) $218.5 \text{ ng/L}$ ,喹诺酮类 $149.17 \text{ ng/L}$ , $\beta$ -内酰胺类未检出;丰水期沁河三类抗生素的浓度为磺胺类(包含磺胺增效剂TMP) $174.99 \text{ ng/L}$ ,喹诺酮类 $142.21 \text{ ng/L}$ , $\beta$ -内酰胺类未检出。枯水期滏阳河三类抗生素的浓度为磺胺类(包含磺胺增效剂TMP) $353.66 \text{ ng/L}$ ,喹诺酮类 $248.58 \text{ ng/L}$ , $\beta$ -内酰胺类 $33.21 \text{ ng/L}$ ;枯水期沁河三类抗生素的浓度为磺胺类(包含磺胺增效剂TMP) $288.82 \text{ ng/L}$ ,喹诺酮类 $210.41 \text{ ng/L}$ , $\beta$ -内酰胺类 $30.23 \text{ ng/L}$ 。两条河流的抗生素污染状况均为磺胺类(包含磺胺增效剂TMP) $>$ 喹诺酮类 $>$  $\beta$ -内酰胺类,说明滏阳河的抗生素污染较沁河严重,且主要污染物为磺胺类抗生素。

### 3 结论

建立了固相萃取-高效液相色谱法同时检测水

体中10种抗生素的方法,该方法对3种 $\beta$ -内酰胺类、4种喹诺酮类、3种磺胺类抗生素(包含磺胺增效剂TMP)在 $0.05 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, $R^2 > 0.99$ ,检出限范围为 $5.76 \sim 22.61 \mu\text{g/L}$ ,实际水样的加标回收率为 $78.6\% \sim 101.5\%$ 。该方法对10种目标抗生素分离完全,回收率良好,且操作简单、准确率高,可为地表水中10种目标抗生素的测定提供技术支持。

### 参考文献:

- [1] Blaser M J. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome [J]. Science, 2016, 352 (6285): 544-545.
- [2] Riaz L, Mahmood T, Khalid A, et al. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil [J]. Chemosphere, 2018, 191: 704-720.
- [3] Huang C H, Renew J E, Smeby K L. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis [J]. J Contem Water Res Educ, 2011, 120(1): 30-40.
- [4] Zhou L J, Ying G G, Liu S, et al. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China [J]. Sci Total Environ, 2013(452/453): 365-376.
- [5] Wu M H, Que C J, Xu G, et al. Occurrence, fate and interrelation of selected antibiotics in sewage treatment plants and their receiving surface water [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2016, 132: 132-139.



- [6] Leung H W, Minh T B, Murphy M B, *et al.* Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China [J]. *Environ Int*, 2012, 42: 1 – 9.
- [7] Wang Z, Du Y, Yang C, *et al.* Occurrence and ecological hazard assessment of selected antibiotics in the surface waters in and around Lake Honghu, China [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 609: 1423 – 1432.
- [8] 洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 等. 固相萃取 – 高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素 [J]. *环境科学*, 2012, 33(2): 652 – 657.
- Hong Leijie, Shi Lu, Zhang Yalei, *et al.* Simultaneous determination of 10 sulfonamide antibiotics in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(2): 652 – 657 (in Chinese).
- [9] 陶辉, 李文君, 陈卫, 等. SPE – HPLC 法测定水中 4 种头孢类抗生素 [J]. *中国给水排水*, 2014, 30(10): 96 – 99.
- Tao Hui, Li Wenjun, Chen Wei, *et al.* Determination of four cephalosporin antibiotics in water by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *China Water & Wastewater*, 2014, 30(10): 96 – 99 (in Chinese).
- [10] 董恒涛, 姚劲挺, 郝红元, 等. 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定地表水中 14 种喹诺酮类抗生素残留 [J]. *环境化学*, 2018, 37(6): 1436 – 1439.
- Dong Hengtao, Yao Jinting, Hao Hongyuan, *et al.* Determination of 14 quinolones residues in surface water by UHPLC – MS/MS [J]. *Environmental Chemistry*, 2018, 37(6): 1436 – 1439 (in Chinese).
- [11] 赵健, 杨晓凡, 周福来, 等. 固相萃取/高效液相色谱/串联质谱法测定磺胺类抗生素 [J]. *中国给水排水*, 2012, 28(14): 98 – 101.
- Zhao Jian, Yang Xiaofan, Zhou Fulai, *et al.* Determination of sulfa antibiotics in natural water using solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *China Water & Wastewater*, 2012, 28(14): 98 – 101 (in Chinese).
- [12] 李清雪, 王钊, 祁迹. 萃取/液相色谱同时检测污水中 20 种药物活性物质 [J]. *中国给水排水*, 2015, 31(14): 112 – 115.
- Li Qingxue, Wang Zhao, Qi Ji. Simultaneous determination of 20 PhACs in sewage by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *China Water & Wastewater*, 2015, 31(14): 112 – 115 (in Chinese).
- [13] Li W, Shi Y, Gao L, *et al.* Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China [J]. *Chemosphere*, 2013, 92(4): 435 – 444.



**作者简介:**李清雪(1964 – ),女,河北邯郸人,工学博士,教授,主要从事新兴污染物、地表水与地下水相互作用规律、生态水环境模拟等方面研究,主研完成国家自然科学基金面上基金 2 项、全球环境基金项目 1 项、国家科技攻关项目 1 项、省级以上科研项目 12 项,主持完成河北省自然科学基金面上、科技攻关项目各 1 项,作为第一主研人在研水利部公益性行业专项经费项目,获天津市科技进步奖一等奖 1 项,发表论文 50 余篇,主编教材 1 部,撰写专著 1 部。

**E – mail:**liqingxue\_610@126.com

**收稿日期:**2019 – 03 – 16