

液相色谱/串联质谱法测定原水中多种抗生素残留

漆 晴¹, 倪先哲¹, 王 刚¹, 周彩云¹, 桂 波²

(1. 吴江华衍水务有限公司, 江苏 苏州 215200; 2. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092)

摘 要: 采用固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法,检测东太湖水源地三个典型点位原水中8类共31种抗生素的残留量(包括氨基糖苷类1种、林可胺类1种、氯霉素类2种、 β -内酰胺类2种、大环内酯类4种、喹诺酮类4种、四环素类4种、磺胺类13种)。通过固相萃取富集、多反应监测(MRM)定性定量分析,该方法的平均回收率为65.6%~108.8%,相对标准偏差为2.35%~17.1%,准确度及精密度均良好,灵敏度高(最低检出浓度为1.0 ng/L),可快速有效地检测东太湖原水中多种痕量抗生素的残留量。

关键词: 原水; 抗生素; 固相萃取; 超高效液相色谱/串联质谱

中图分类号: TU991 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)01-0128-04

Determination of Multiple Antibiotic Residues in Raw Water by UPLC - MS/MS

QI Qing¹, NI Xian-zhe¹, WANG Gang¹, ZHOU Cai-yun¹, GUI Bo²

(1. *Wujiang Hong Kong & China Co. Ltd., Suzhou 215200, China*; 2. *School of Environmental Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China*)

Abstract: 31 kinds in 8 categories of antibiotic residues (including 1 kind of aminoglycosides, 1 kind of lincomycins, 2 kinds of chloramphenicols, 2 kinds of β -lactams, 4 kinds of macrolides, 4 kinds of quinolones, 4 kinds of tetracyclines and 13 kinds of sulfonamides) in three typical sites of East Taihu Lake water source were determined by UPLC - MS/MS, through enrichment of solid-phase extraction and qualitatively and quantitatively analysis of multiple reaction monitoring. The average recovery rate was 65.6% - 108.8%, and the RSD was 2.35% - 17.1%. Good accuracy and precision with high sensitivity (the minimum detectable concentration was 1.0 ng/L) were achieved, which indicated that the method could be applied to detect multiple trace antibiotic residues in East Taihu Lake raw water rapidly and sensitively.

Key words: raw water; antibiotics; solid-phase extraction; UPLC - MS/MS

大量研究表明,抗生素的广泛使用,不可避免地给自然环境造成了巨大压力,特别是人畜服用的抗生素类药物大多不能被有效吸收,常常未经代谢便通过粪便或者尿液排出体外,直接进入污水或排入环境。然而现有主流污水处理技术难以将抗生素彻底去除^[1],这使得以城市污水处理厂、家畜饲养场、渔业养殖场为代表的点源和面源污染,给地下水和

地表水体造成潜在的威胁^[2]。中国作为抗生素生产和使用大国,抗生素在水环境中的污染比其他国家更为严重,特别是人口密度大、发展迅速的长三角地区,其水环境中的抗生素含量相对较低,多以痕量水平存在,并且种类繁多,因此急需建立一套能够准确富集并精确到 ng/L 级水平的抗生素检测方法。目前,对水环境中抗生素的浓缩富集方法主要有液

液萃取法、固相萃取法、冷冻干燥法等,有研究曾对固相萃取法和冷冻干燥法进行比较,结果显示固相萃取法的检测限比冷冻干燥法至少低一个数量级,且可以随萃取终末体积的减少而进一步降低^[3,4]。检测方面,常用的气相色谱-质谱法、高效液相色谱-紫外/荧光检测法、酶联免疫吸附法等技术均被报道用于抗生素药物残留的检测,但由于适用范围窄、仪器灵敏度低等原因,主要被用于高通量残留抗生素的检测^[5,6]。为此,笔者采用固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定饮用水源地原水中的 31 种痕量抗生素,探索建立一种适用性强、选择性广、精准度高的饮用水原水中抗生素残留物的检测方法,以期检测饮用水及其原水中的痕量抗生素提供技术支持。

1 试验部分

1.1 仪器及工作条件

仪器:美国 Waters 公司的 ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪和 Xevo-TQD 串联三重四级杆质谱仪,美国热电公司的 AT280 全自动固相萃取仪和 TURBO VAP II 自动浓缩仪,美国 Millipore 公司的 Synergy 超纯水器。

色谱条件:色谱柱 ACQUITY BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm)。

液相流路: A_1 为 0.1% 的甲酸水, A_2 为纯水,B 为乙腈,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 10 μL 。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI),选取多反应监测模式(MRM),离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$;去溶剂气温度为 350 $^{\circ}\text{C}$,去溶剂气和锥孔反吹气均为氦气,流速分别为 650 和 50 L/h;碰撞气为氩气,流速为 0.15 mL/min。目标化合物通过 Combine 模式引入三重四级杆质谱仪,利用 Targetlynx 软件 Intelstart 功能自动选择子离子和优化锥孔电压、碰撞能量等参数。

1.2 试剂及材料

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)购自德国 Merck 公司,8% 甲酸水溶液(色谱纯)购自山东西亚化学股份有限公司,丙酮(色谱纯)购自国药集团化学试剂有限公司,硫酸(优级纯)购自南京化学试剂有限公司,EDTA 二钠(优级纯)购自阿拉丁公司。

罗红霉素、交沙霉素标准样品购自国家食品药品检定研究院;螺旋霉素、头孢拉定、阿米卡星、克林霉素标准样品购自德国 Dr. Ehrensterfer 公司;其他

标准品均购自农业部环境保护科研监测所。

试验用水为 Synergy 纯水器制备的超纯水。

固相萃取小柱购自美国 Waters 公司,型号为 OASIS HLB 6cc/500mg。

1.3 样品前处理

取 1 L 水样经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤,用稀硫酸调节 pH 值至 3.0 左右,加入 0.5 g EDTA 二钠,振荡混合均匀待测。通过 HLB 小柱萃取富集,HLB 小柱使用前,依次用 9 mL 甲醇、5 mL 纯水、5 mL 的 0.1% 甲酸水溶液淋洗活化,以 5 mL/min 的流速上样,待样品富集完成后,依次使用 4 mL 高纯水和 4 mL 的 10% 甲醇进行清洗,负压抽干 30 min。用 12 mL 含 0.1% 甲酸的甲醇分两次洗脱小柱,洗脱液移至自动浓缩仪内,置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹脱至近干,用含 0.1% 甲酸的甲醇定容至 1 mL,使用 0.22 μm 滤膜过滤后用 UPLC-MS/MS 检测。

1.4 标准曲线绘制

配制 1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 六种浓度的抗生素标准样品使用液,用固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定,绘制峰面积-浓度曲线。

1.5 实际样品测定

取东太湖水源地原水、北部养殖区原水及亭子港水库原水,经预处理后进行检测,并根据外标法计算水体中多种抗生素的残留量。

2 结果与讨论

2.1 试验条件的选择

2.1.1 样品前处理条件选择

固相萃取小柱、洗脱剂及其用量、样品 pH 值和上样流速均影响固相萃取的效率。本研究采用试剂水加标方法对上述条件进行了优化。

SDB 阳离子交换柱因易受金属离子的影响而不适用于高硬度水,C18 柱被认为是富集河水、湖泊水中喹诺酮类抗生素的最佳选择^[7]。其中 ODS 小柱常被用于萃取环境水体中的有机物,但水样中磺胺类抗生素的萃取很多采用 OASIS HLB 小柱^[8]。本研究比较了两种小柱对 50 ng/L 浓度水平空白水加标样品的萃取效率,结果发现,HLB 小柱对不同磺胺类抗生素的富集效率基本相同,且萃取效率明显高于 ODS 小柱,因此本研究采用 HLB 小柱。

另外,本研究比较了 pH 值为 3.0 和 7.0 的空白加标样品在 HLB 小柱中的萃取效率。结果表明,两种 pH 值下的萃取效率无明显差异。考虑到东太

湖水夏季极端情况 pH 值会接近 9.0, 为保证数据的可比性, 将样品 pH 值用稀硫酸调至 3.0 左右。

试验比较了 3 mL 甲醇 + 3 mL 丙酮、6 mL 甲醇 + 3 mL 丙酮的洗脱效果较差, 部分抗生素例如交沙霉素和青霉素的回收率仅为 37% 和 20% 左右。用 6 mL 甲醇洗脱时, 目标抗生素的回收率在 74% ~ 97% 之间, 追加 6 mL 甲醇洗脱后, 回收率仅在 4% 左右。为方便外标法定量并保证目标物完全洗脱, 本研究选用 12 mL 甲醇洗脱, 31 种抗生素的回收率在 65.6% ~ 108.8% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.35% ~ 17.1%。

选取克林霉素、交沙霉素和青霉素三种回收率相对较低的抗生素, 分别对立即洗脱和隔夜洗脱、立即浓缩和加溶剂再浓缩的回收效果进行对比, 结果见表 1。可知, 试验条件下目标保存条件不稳定。

表 1 不同洗脱及浓缩方式对比

Tab. 1 Comparison of different elution and concentration methods %

项 目	隔夜洗脱回收率	立即洗脱回收率	立即浓缩回收率	二次浓缩回收率
克林霉素	6.7	51.2	51.2	68.1
交沙霉素	23.2	60.7	60.7	71.6
青霉素	10.8	56.3	56.3	65.6

上样流速选取 2.5 mL/min 两种进行对比, 结果发现, 空白加标的回收率没有明显差异, 为节约分析时间, 选取上样流速为 5 mL/min。

2.1.2 液相分离条件的选择

试验采用乙腈 - 水体系梯度洗脱分析方法, 在 ESI + 模式的液相分离过程中添加一定浓度甲酸, 能改变流动相 pH 值, 改善色谱分离效果, 有利于形成 $[M + H]^+$ 。水相分别添加 0.05%、0.1%、0.2% 的甲酸, 随着甲酸浓度的增加, 目标化合物的保留时间和响应值逐渐减小; 当甲酸浓度为 0.2% 时磺胺类分离度较差, 而当甲酸浓度为 0.1% 时目标化合物的分离度及灵敏度均较高, 峰型较好, 因此选择乙腈 - 0.1% 甲酸水体系。对于磺胺脒和磺胺醋酰两种具有相同定量离子对的物质, 该液相体系也可有效分离。

当流动相中有甲酸时, 氢离子会抑制氯霉素、甲砒霉素在质谱 ESI - 模式下的响应, 因此选用乙腈

- 纯水体系洗脱分析该类物质, 分离效果满足检测要求。

2.1.3 质谱检测

利用 Targetlynx 软件 Intelstart 功能自动选择离子和优化锥孔电压、碰撞能量等参数, 检测时每种物质采集两组离子对通道, 分别用于定量和定性。

2.2 标准工作曲线及检出限

目标化合物标准品用甲醇 - 0.1% 甲酸水配制 1.5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液系列, 按照上述条件分析, 以定量离子对的响应面积和对应浓度进行线性回归, 在 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 范围内各抗生素均具有良好的线性关系 ($R^2 > 0.9900$); 以 3 倍信噪比对应的浓度为依据估算仪器检出限, 31 种抗生素的检出限范围为 0.03 ~ 0.79 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 实际样品的分析结果

应用固相萃取/超高效液相色谱 - 串联质谱法对东太湖饮用水源地三个典型点位的水样进行检测分析。结果表明, 养殖区附近原水中检出了磺胺甲基异噁唑和磺胺嘧啶两种磺胺类抗生素及少量的恩诺沙星和甲砒霉素, 浓度分别为 37.2、26.3、1.7、1.6 ng/L , 磺胺类抗生素是水产养殖业常用的杀菌药, 故该类抗生素会在养殖区附近原水中有较高浓度的检出; 另外, 东太湖原水中有少量磺胺甲基异噁唑 (5.5 ng/L) 检出。其他均未检出。

3 结论

① 固相萃取/超高效液相色谱 - 串联质谱法可有效检测饮用水原水中多种痕量抗生素类药物残留, 该方法准确性好、灵敏度高, 适用于原水样品中 1 ~ 100 ng/L 范围内的抗生素残留检测。

② 对东太湖水源地原水的检测结果表明, 饮用水源水中磺胺类抗生素的残留应引起重视, 需进一步研究其对生态和人体健康的影响。

参考文献:

- [1] Gros M, Petrovic M, Ginebreda A, et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes [J]. Environ Int, 2010, 36(1): 15 - 26.
- [2] Lin A Y, Yu T H, Lin C F. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan [J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 131 - 141.

(下转第 134 页)