

分析与监测

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.02.021

超高效液相色谱-高分辨质谱法测定水体中青霉素残留

黄思静¹, 汪义杰², 朱斌¹, 王建国²

(1. 华南理工大学 分析测试中心, 广东 广州 510640; 2. 珠江水利委员会珠江水利科学
研究院, 广东 广州 510611)

摘要: 采用超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS)同时测定水体中7种青霉素残留。水样经 Oasis HLB 固相萃取小柱富集和净化后,用反向 C18 色谱柱分离,以 0.1% 的甲酸水溶液和乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾离子源正离子模式进行检测。7 种青霉素类化合物在 1.0~20.0 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围内,相关系数 r 均大于 0.99,检出限为 1~10 ng/L 。实际水样加标回收率为 91.15%~106.36%,相对标准偏差为 2.30%~8.47%,均小于 10%。该方法具有简单快速、准确度高等特点,可以实现水体中 7 种目标青霉素残留的测定。

关键词: 青霉素; 固相萃取; 超高效液相色谱-高分辨质谱

中图分类号: TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2021)02-0112-05

Determination of Penicillin Residues in Water by Ultra High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry

HUANG Si-jing¹, WANG Yi-jie², ZHU Bin¹, WANG Jian-guo²

(1. Analytical and Testing Center of South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. Pearl River Water Resources Research Institute, Pearl River Water Resources Commission, Guangzhou 510611, China)

Abstract: High performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (UPLC – HRMS) was used to determine 7 penicillin residues in water simultaneously. The water samples were enriched and purified by Oasis HLB solid phase extraction column and separated by reverse C18 chromatographic column. Then, gradient elution was implemented with 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile solution as mobile phase. Finally, electrospray ion source positive ion mode was used for detection of penicillin. The correlation coefficient r of 7 penicillin compounds was greater than 0.99 and the detection limit was 1 – 10 ng/L in the linear range of 1.0 – 20.0 $\mu\text{g/L}$. Actual water sample with standard recovery rate was in the range of 91.15% – 106.36%, and the relative standard deviations (RSDs) were 2.30% – 8.47%, all less than 10%. The method was simple, fast and highly accurate, and could realize the determination of 7 target penicillin residues in water.

Key words: penicillin; solid-phase extraction; ultra high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (UPLC – HRMS)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51709291)

通信作者: 王建国 E-mail: wangjianguo1986@163.com

有关青霉素残留的检测涉及很多领域,如食品和医疗卫生方面,邸欣等^[1]利用薄层色谱法优选分离6种青霉素类药物;徐兴志^[2]对青霉素类抗生素的荧光分析法进行了深入研究;王超等^[3-4]采用柱前衍生液相色谱法检测猪肉和牛奶中的青霉素残留;范莹莹等^[5]采用高效液相色谱-质谱联用法检测猪肉中5种青霉素残留量。而有关水体中青霉素残留测定的研究近年来也备受关注,最初水体中青霉素的主要检测方法是液相色谱法^[6],但随着质谱技术的发展,液相色谱-质谱联用技术成为分析水体中青霉素残留的常用方法。Pozo等^[7]采用高效液相色谱-串联电喷雾质谱测定水体中包括青霉素在内的16种抗生素;Liang等^[8]通过超高效液相色谱-串联质谱法测定水中的10种抗生素;Chung等^[9]以固相萃取-液相色谱串联质谱法测定地表水中13种抗生素;Gao等^[10]建立了液相色谱-串联质谱法检测水体中92种抗生素;Tong等^[11]分析测定了水样中的8种青霉素残留情况;聂晓静^[12]基于液相色谱-串联质谱法测定水体中多种 β -内酰胺类抗生素;朱峰等^[13]采用高效液相色谱-质谱联用法同时检测水体中13种 β -内酰胺类药物残留;封梦娟等^[14]采用高效液相色谱-串联质谱法同时测定水体中40种抗生素。

笔者采用固相萃取结合超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS)同时测定水体中7种青霉素残留。样品经固相萃取富集和净化后,经超高效液相色谱分离,在8 min内完成检测。高分辨质谱结合了ESI和Q-TOF技术,ESI是一种大气压软电离技术,特别适用于极性分子的气化和离子化,适于测定混合物;而Q-TOF具有高分辨、高速度扫描的特点,可以快速得到最终分子式确定所必需的真实同位素峰形,保证目标化合物分子质量的精准。因此,该方法能更加快速准确地测定水体中7种青霉素残留。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290/Bruker maXis impact 超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪,带电喷雾离子源(德国 Bruker 公司);BS 110S 电子天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q Gradient 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。固相萃取仪(天津恒奥公司);固相萃取小柱(美国 Waters 公司,Oasis HLB 小柱,6 mL/500 mg);

N-EVAP 111 氮吹仪(美国 Orgnomation 公司)。乙二胺四乙酸二钠为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);色谱级甲酸(美国 Dikma 公司);色谱级甲醇、乙腈(德国 Merck 公司)。实验用水为 Milli Q 超纯水(电导率 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

7种青霉素标准品:阿莫西林(Amoxicillin, $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$)、氨苄西林(Ampicillin, $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$)、青霉素 V(Penicillin V, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$),纯度 $\geq 96\%$ (百灵威科技有限公司);青霉素 G(Penicillin G, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$)、氯唑西林(Cloxacillin, $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$)、萘夫西林(Nafcillin, $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$)、双氯西林(Dicloxacillin, $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{SCL}_2$),纯度 $\geq 98\%$ (中国计量科学研究院)。

1.2 标准溶液配制

配制浓度为 1.0 g/L 的单标储备液,7种青霉素标准品各称取 10.0 mg (精确至 0.0001 g)分别置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇摇匀,再用甲醇定容至 10 mL , -20°C 下保存,使用时恢复至室温,摇匀使用。

分别准确吸取 $25 \mu\text{L}$ 单标储备液于 25 mL 容量瓶中,配制成浓度为 1.0 mg/L 的混合标准储备液,用甲醇稀释至所需浓度。配制浓度为 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10.0 、 15.0 、 $20.0 \mu\text{g/L}$ 的标准系列溶液,于 4°C 冰箱内保存待用。

1.3 样品前处理

取 1 L 水样,经 $0.45 \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜过滤,加入 1.0 g 乙二胺四乙酸二钠充分混匀,再进行固相萃取,将 Oasis HLB 小柱置于固相萃取仪上,分两次吸取 5 mL 甲醇活化小柱,再用 10 mL 超纯水活化小柱,然后以 4 mL/min 的速度抽滤水样。水样瓶用超纯水清洗3次,合并的滤液以同样的速度抽滤;待所有样品过柱后,再用 5 mL 超纯水淋洗萃取柱;最后用 6 mL 甲醇对小柱进行洗脱,收集洗脱液,氮吹至近干,用甲醇溶液定容至 1.0 mL ,待 UPLC-HRMS 分析。同时做空白实验。

1.4 分析条件

液相条件:使用 Agilent 反向 C18 色谱柱(ZORBAX RRHD SB-C18, $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm} \times 1.8 \mu\text{m}$),流动相 A 是含 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B 是乙腈;流速: 0.2 mL/min ;柱温: 25°C ,样品进样量: $20 \mu\text{L}$ 。梯度洗脱条件见表1。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI)正离子模式;扫描范围为质荷比 $50 \sim 600 \text{ m/z}$;喷雾电压为

3 500 V;干燥气温度为 180 ℃;干燥气流量为 6.0 L/min。

表1 液相色谱梯度洗脱条件

Tab.1 Gradient elution conditions of liquid chromatography

时间/min	A/%	B/%
0.00	90	10
1.00	90	10
2.00	60	40
5.00	60	40
6.00	40	60
6.10	90	10
8.00	90	10

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的选择

环境中青霉素的含量较低,需对样品进行适当前处理以消除或降低基体影响,富集目标化合物以提高分析测试的准确性。青霉素检测的前处理方法主要包括液-液萃取、固相萃取和固相微萃取技术。由于固相萃取技术既能富集又能净化目标化合物,操作简便,所以选择采用固相萃取技术。

为方便快速地达到对目标化合物进行富集和净化的目的,实验采用 Oasis HLB 固相萃取小柱对样品进行前处理。该小柱具有亲水亲油平衡的特性,既可以很好地富集目标物,又可以有效去除杂质,利于提高检测的灵敏度和准确度。

2.2 色谱条件优化

实验采用反向 C18 色谱柱,首选甲醇或乙腈作为流动相进行洗脱。考虑到水相中适量添加有机酸可能起到积极作用。因此,比较了不同流动相:水-乙腈、0.1% 甲酸水-乙腈、水-甲醇和 0.1% 甲酸水-甲醇梯度洗脱条件下,7 种青霉素的分离效果。适量的甲酸有效减少了色谱峰拖尾,增加了青霉素类物质的电离效率。最终选用 0.1% 甲酸水-乙腈溶液作为流动相,增强了灵敏度,且目标化合物的分离效果良好。

2.3 质谱条件优化

采用针泵直接进样(速度为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$),对浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的青霉素标准溶液进行质谱全扫描,得到待测目标物的质荷比,同时优化各质谱参数,如喷雾电压、脱气流量、离子源温度等,得到 ESI 正模式下的最佳质谱图,最终确定碰撞能量为 5.0 eV,离子传输时间为 50.0 μs ,氮气喷雾压力为 0.15 MPa,干燥气温度为 180 ℃,干燥气流速为 6.0 mL/min,

喷雾电压为 3 500 V。结果表明,7 种青霉素均在正离子模式下具有丰度较高的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 。

质谱参数优化后,采用 0.1% 甲酸水-乙腈作为流动相进行梯度洗脱,样品洗脱和数据采集完成不超过 8.00 min。同时检测 7 种青霉素混合标准溶液的质谱总离子流图,如图 1 所示。图 1 中 7 种青霉素对应的抽提离子谱图见图 2。图 2 中由上往下 7 个抽提离子峰对应的 $[M + H]^+$ 分别是 366.111 9、350.117 8、335.106 0、351.101 0、436.073 1、415.132 5、470.033 8,7 种标准物质实际测得的分子质量和软件计算的理论分子质量的偏差均小于 0.000 2%,完全匹配。

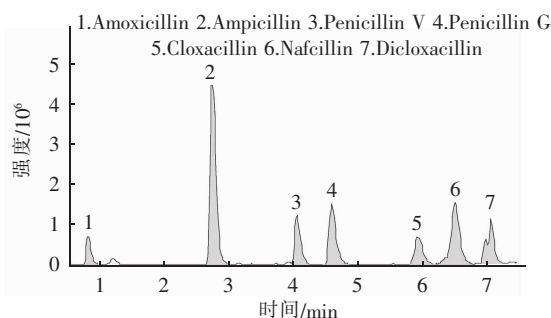


图1 7种青霉素混合标准物质的质谱总离子流图

Fig.1 Mass spectrometry total ion flow diagram of 7 kinds of mixed penicillin standard substance

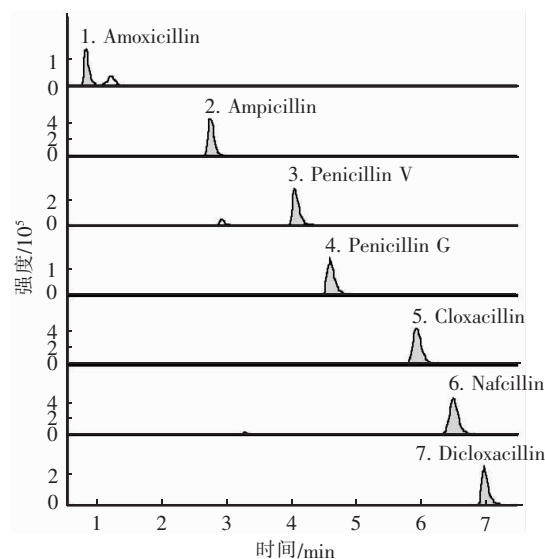


图2 7种青霉素标准物质的抽提离子谱图

Fig.2 Extracted ion spectrogram of 7 kinds of mixed penicillins standard substance

2.4 工作曲线和检出限

取不同浓度的青霉素标准系列溶液进行测定,

绘制相关工作曲线,得到线性回归方程和相关系数。检出限以 3 倍信噪比(S/N)计算,定量限以 10 倍信噪比(S/N)计算,7 种青霉素的检出限(LOD)、定量限(LOQ)、线性方程和相关系数见表 2。

表 2 7 种青霉素化合物的测定结果

Tab. 2 Test results of 7 kinds of penicillins

项 目	LOD/ (ng · L ⁻¹)	LOQ/ (ng · L ⁻¹)	线性方程	<i>r</i>
Amoxicillin	2	5	$y = 163.30x - 95.16$	0.998 7
Ampicillin	5	15	$y = 4\,250.04x - 2\,406.82$	0.999 7
Penicillin G	1	3	$y = 211.22x + 199.54$	0.999 7
Penicillin V	3	10	$y = 85.80x + 352.24$	0.995 2
Cloxacillin	5	15	$y = 247.27x + 734.89$	0.997 2
Nafcillin	8	25	$y = 540.20x + 820.07$	0.999 1
Dicloxacin	10	30	$y = 173.01x - 564.27$	0.995 0

2.5 回收率和精密度

在水样中分别加入 5、10 和 20 ng/L 的青霉素标准溶液,按照前述样品前处理方法进行标准添加实验。处理好后平行测定 8 次,结果如表 3 所示。

表 3 7 种青霉素的平均加标回收率及相对标准偏差($n=8$)

Tab. 3 Average recoveries and relative standard deviation of

7 kinds of penicillins($n=8$)

项 目	标准值/ (ng · L ⁻¹)	测定值/ (ng · L ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
Amoxicillin	5	4.89 ± 0.29	97.82 ± 5.78	5.91
	20	18.86 ± 1.60	94.32 ± 7.99	8.47
Ampicillin	5	5.22 ± 0.17	104.48 ± 3.31	3.17
	20	18.41 ± 0.86	92.07 ± 4.30	4.67
Penicillin G	5	4.56 ± 0.14	91.15 ± 2.82	3.10
	20	19.41 ± 0.82	97.06 ± 4.10	4.23
Penicillin V	5	5.32 ± 0.16	106.36 ± 3.22	3.03
	20	19.01 ± 0.65	95.07 ± 3.26	3.42
Cloxacillin	5	4.85 ± 0.18	97.09 ± 3.59	3.69
	20	18.77 ± 0.86	93.83 ± 4.32	4.60
Nafcillin	10	9.53 ± 0.22	95.31 ± 2.19	2.30
	20	19.31 ± 1.21	96.53 ± 6.06	6.28
Dicloxacin	10	9.37 ± 0.56	93.65 ± 5.55	5.93
	20	20.79 ± 1.13	103.93 ± 5.67	5.46

可见,7 种青霉素化合物的平均加标回收率为 91.15% ~ 106.36%,RSD 为 2.30% ~ 8.47%,均小

于 10%,说明该方法有很好的准确性,满足定量检测要求。

2.6 样品测定

按照实验方法对 8 份水样(2 份水源水、3 份出厂水和 3 份末梢水)进行分析测定,其中 2 份水源水中检出阿莫西林,测定值分别为 5.12、8.36 ng/L,说明该水源水中存在阿莫西林污染,但浓度不高。出厂水和末梢水中均未检出该 7 种青霉素残留。

3 结论

采用超高效液相色谱-高分辨质谱法同时测定水体中 7 种青霉素残留,该方法简便快速,准确灵敏,适用于水体中 7 种青霉素残留的快速筛查和测定。

参考文献:

[1] 邸欣,崔升佐,孙毓庆. 用网格搜索寻优法选择分离 6 种青霉素类药物的薄层色谱溶剂系统[J]. 色谱, 1996,14(3):211-213.
DI Xin, CUI Shengzuo, SUN Yuqing. Optimization of thin-layer chromatography solvent system for the separation of six penicillins by the grid search procedure [J]. Chinese Journal of Chromatography, 1996, 14(3): 211-213(in Chinese).
[2] 徐兴志. 青霉素类抗生素荧光分析方法的研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2011.
XU Xingzhi. Study on the Fluorescence Analysis of Penicillins Antibiotics [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
[3] 王超,王星. 柱前衍生高效液相色谱法测定猪肉中 5 种青霉素残留量[J]. 分析化学,2001,29(7):779-781.
WANG Chao, WANG Xing. Determination of 5 penicillin residues in pork by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2001, 29(7): 779-781(in Chinese).
[4] 王超,李淑娟. 测定牛奶中 5 种青霉素残留量的高效液相色谱柱前衍生法[J]. 分析测试学报,2000,19(6):72-74.
WANG Chao, LI Shujuan. Determination of 5 penicillin in milk by HPLC with pre-column derivatization [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2000, 19(6): 72-74 (in Chinese).

- [5] 范莹莹,其鲁,杨树民. 高效液相色谱-质谱联用法检测猪肉中5种青霉素的残留量[J]. 分析试验室, 2007,26(12):76-79.
FAN Yingying, QI Lu, YANG Shumin. Determination of 5 penicillin residues in pork by HPLC/MS/MS (trap) [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2007, 26 (12):76-79 (in Chinese).
- [6] BABIC S, ASPERGER D, MUTAVDZIC D, *et al.* Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater [J]. Talanta, 2006, 70 (4):732-738.
- [7] POZO O J, GUERRERO C, SANCHO J V, *et al.* Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1103(1):83-93.
- [8] LIANG N, HUANG P, HOU X, *et al.* Solid-phase extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis; the ultra-trace determination of 10 antibiotics in water samples [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(6):1701-1713.
- [9] CHUNG H S, CHOI J, ABD El-Aty A M, *et al.* Simultaneous determination of seven multiclass veterinary antibiotics in surface water samples in the Republic of Korea using liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(24):4688-4699.
- [10] GAO J, CUI Y, TAO Y, *et al.* Multiclass method for the quantification of 92 veterinary antimicrobial drugs in livestock excreta, wastewater, and surface water by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(21):4086-4095.
- [11] TONG L, WANG Y X, PILAR H M, *et al.* Simultaneous determination and toxicological assessment of penicillins in different water matrices [J]. Ecotoxicology, 2014, 23 (10):2005-2013.
- [12] 聂晓静. 基于LC-MS/MS同时测定水体中多种β-内酰胺类抗生素[D]. 大连:大连理工大学, 2017.
NIE Xiaojing. Simultaneous Determination of Multiple β-lactam Antibiotics in Water by LC-MS/MS [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [13] 朱峰, 吉文亮, 阮丽萍, 等. 高效液相色谱-质谱联用法同时检测水体中13种β-内酰胺类药物残留[J]. 色谱, 2016, 34(3):299-305.
ZHU Feng, JI Wenliang, RUAN Liping, *et al.* Simultaneous determination of 13 β-lactam residues in water by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(3):299-305 (in Chinese).
- [14] 封梦娟, 杨正标, 张芹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定表层水体中5类40种抗生素[J]. 色谱, 2019, 37(5):525-532.
FENG Mengjuan, YANG Zhengbiao, ZHANG Qin, *et al.* Simultaneous determination of five types of 40 antibiotics in surface water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(5):525-532 (in Chinese).

作者简介:黄思静(1983-),女,湖南长沙人,硕士,实验师,主要从事环境分析测试技术研究工作。

E-mail:sijinghuang@163.com

收稿日期:2019-09-20

修回日期:2019-12-31

(编辑:孔红春)

为了幸福家园,请节约身边水资源