

城镇水系统全流程水质监测技术专栏

吴斌, 苏宇亮, 胡克武, 等. 在线固相萃取 UHPLC-MS/MS 法测定水中 15 种抗生素[J]. 净水技术, 2022, 41(8):163-168.

WU B, SU Y L, HU K W, et al. Determination of 15 antibiotics in water by UHPLC-MS/MS with online solid-phase extraction[J].

Water Purification Technology, 2022, 41(8):163-168.



扫我试试?

在线固相萃取 UHPLC-MS/MS 法测定水中 15 种抗生素

吴斌, 苏宇亮, 胡克武, 郝怡菲, 袁汉鸿, 吴杰

(珠海水务环境控股集团有限公司, 广东珠海 519020)

摘要 采用在线固相萃取超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)联用技术,建立了生活饮用水及水源水中 6 类 15 种抗生素同时分析的方法。5 mL 样品经 HLB 萃取小柱在线富集、净化并洗脱后,用 UPLC-MS/MS 进行定量检测。15 种抗生素在 5~200 ng/L 或 5~50 ng/L 时具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.990 0,方法的检出限(3 倍信噪比)为 0.74~3.28 ng/L,加标回收率在 49.6%~130.2%。该方法实现在线固相萃取,具有操作简便、回收率高、分析时间短、节约溶剂等特点。对南方某河流抗生素的检测表明,该方法可实际应用于生活饮用水及水源水中的抗生素残留分析。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法 在线固相萃取 抗生素 节约溶剂 饮用水

中图分类号: X832;O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2022)08-0163-06

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2022.08.023

Determination of 15 Antibiotics in Water by UHPLC-MS/MS with Online Solid-Phase Extraction

WU Bin, SU Yuliang, HU Kewu, HAO Yifei, YUAN Hanhong, WU Jie

(Zhuhai Water Environment Holdings Group Co., Ltd., Zhuhai 519020, China)

Abstract Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was applied to simultaneously determination of 6 classes (15 kinds) antibiotics in drinking water and source water by online solid-phase extraction. 5 mL water sample with antibiotics were enriched by HLB online solid-phase extraction column, and then washed, eluted to quantitative determination by UHPLC-MS/MS. It had a good linearity in 5~200 ng/L or 5~50 ng/L with $R>0.9900$. The detection limit (3 times of signal to noise ratio) was 0.74~3.28 ng/L. The recovery rates were 49.6%~130.2%. The method could realize online solid phase extraction, which had the characteristics of simple operation, high recovery rate, short analysis time and solvent saving. The results of antibiotic test in a river in the South China showed that the method could be applied to the analysis of antibiotics in drinking water and source water.

Keywords ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) online solid-phase extraction antibiotics solvent saving drinking water

近年来,抗生素在水源水中的频繁检出及其对饮用水生物安全的潜在风险备受关注。抗生素

(antibiotics)指由细菌、霉菌或其他微生物在生活过程中所产生,具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物,能干扰或抑制致病微生物的生存,广泛地应用于人类及动物的疾病防治、农业生产、畜牧及水产养殖等领域。抗生素的大量使用必然

[收稿日期] 2021-05-06

[作者简介] 吴斌(1989—),男,工程师,主要从事水质分析和研究工作,E-mail: wubin142611@163.com。

会导致过多的残留物进入到环境中,目前抗生素产生的环境危害愈发突出。因此,抗生素的生态环境效应日益受到广大环境领域学者的关注^[1-2]。研究指出,中国地表水环境中能检测到 6 类共 68 种抗生素^[3]。很多国家和地区如美国、法国、日本^[4-6],以及国内的珠江水系、北京的清河水等都有抗生素检出^[7-8]。

抗生素污染对饮用水水源安全造成了严重的威胁,在饮用水处理工艺中对抗生素的去除研究越来越受关注。张静等^[9]从水厂常规处理工艺、深度处理工艺两部分介绍近几年国内外水厂处理含抗生素原水的方法及效果,此外,还从活性炭池中微生物的抗药性与耐氯性、消毒副产物以及给水管网 3 方面来论述处理含抗生素水体对给水厂的影响。结果表明,在传统工艺中,混凝沉淀是去除抗生素的主要工艺,对喹诺酮类、磺胺类、四环素类抗生素去除率可达到 50%~60%,且可通过调节混凝剂投加量、添加助凝剂 PAM 等方式增强混凝效果;紫外与氯消毒联合使用时对易光解抗生素的去除效率可达到 30%~50%。臭氧氧化和活性炭池等深度处理工艺亦会促进抗生素的去除,但受臭氧投加量、接触时间等因素影响显著,且抗生素会增强炭滤池和管网中微生物的抗药性及耐氯性;在采用 NaClO 作为消毒剂时可能会促进毒性较高的氯代/溴代消毒副产物生成。此外,残留抗生素会消耗管网中的余氯,还会促进机会病原体的出现,增加饮用水安全风险^[9]。张国芳^[10]对比分析了新型处理技术对抗性基因的去除现状,研究总结出超滤膜技术对病原体的去除率高达 90%~100%,多用于取代传统的去除工艺,缺点是不能完全去除游离的抗生素抗性基因(ARGs),且膜结垢和更换需要的成本较高。光(UV、日光)催化技术对抗生素抗性菌(ARB)和 ARGs 在较短时间内的去除效率也较高,可降低 ARB 的抗生素耐受性,缺点是会引入新的污染物,如较难去除的纳米材料等。联合技术可有效灭活 ARB 和去除 ARGs,可完全去除 ARGs,有效控制水平基因转移风险,缺点是需较高的消毒剂投加量,UV 灯管的更换带来高额成本。

抗生素滥用会带来极大的危害^[11],且水中目标化合物浓度通常为痕量级,因此,迫切要求开发一种快速准确的抗生素检测技术来监测环境水中的抗生素含量。水中抗生素的传统检测方式是微生物

法^[12],而目前测定抗生素常用的方法主要有液相色谱法^[13]和液相色谱-串联质谱法^[14-15]。液相色谱法测定易受杂质干扰,灵敏度低;而液相色谱-串联质谱法具有高效分离、灵敏度高、检测快速、定性与定量检测于一体等优点,已成为近年来痕量残留检测技术的主流方向。由于抗生素在地表水中的含量为痕量级别,富集方法也尤为重要,但是一般文献中水样富集使用的固相萃取技术操作比较复杂,需要使用独立的固相萃取仪,萃取后再转移至液相色谱-串联质谱仪检测^[16-17],这种固相萃取具有耗时长、操作复杂、溶剂浪费等缺点。本研究使用在线固相萃取技术,自动进样器取 5 mL 水样在线固相萃取、净化、洗脱后直接进入液相色谱-串联质谱仪检测,无需二次转移,具有操作简便、回收率高、分析时间短、节约溶剂的优点。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

甲醇:色谱纯;乙腈:色谱纯;甲酸:质谱纯;脱溶剂气:高纯氮(99.999%);碰撞气:高纯氩(99.999%)。

抗生素标准品:6 类 15 种抗生素标准样购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,纯度要求大于 97%。分别为磺胺类(磺胺甲恶唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪)、大环内酯类(红霉素、罗红霉素)、四环素类(四环素、金霉素、土霉素、强力霉素)、 β -内酰胺类(青霉素 G)、喹诺酮类(氧氟沙星、恩诺沙星)、氯霉素类(氯霉素)。

1.1.2 仪器

液相色谱-串联三重四极杆质谱仪(Waters 公司 Xevo TQ-S Micro)。离子源:电喷雾离子源(ESI);色谱柱:ACQUITY HSS T3 柱,2.1 mm $\times$ 50 mm,颗粒粒径为 1.8 μ m;针式过滤器:聚偏氟乙烯(PVDF),孔径为 0.22 μ m。

1.2 液相色谱条件

色谱流动相 A 为 0.1%甲酸溶液,流动相 B 为乙腈/甲醇=90/10;柱温为 35 $^{\circ}$ C;进样体积为 5 mL。色谱流动相梯度设置如表 1 所示。

1.3 质谱条件

电离源:电喷雾正离子模式;毛细管电压:1.5 kV;源温度:150 $^{\circ}$ C;脱溶剂气温度:550 $^{\circ}$ C;脱溶剂气

表 1 色谱流动相梯度设置
Tab. 1 Gradient Setting for Chromatographic Flow Phase

时间/min	流量/(mL·min ⁻¹)	流动相 A	流动相 B
—	0.1	95	5
4.0	0.1	95	5
4.1	0.4	95	5
5.0	0.4	95	5
9.5	0.4	5	95
10.5	0.4	5	95
13.0	0.4	95	5

流量: 1 000 L/h。采用质谱多重反应监测模式 (MRM), 质谱质量条件参数如表 2 所示。

1.4 标准系列的配制

标准储备溶液: 分别称取每种待测组分标准品约 0.010 0 g (精确至 0.000 1 g), 用甲醇溶液定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 此标准溶液质量浓度为 1 000 μg/mL, 置于-18 ℃冰箱避光保存。分别吸取 15 种抗生素的标准储备液 100 μL, 用甲醇定容至 100 mL 容量瓶, 配制成质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准储备液。吸取 1 μg/mL 的混合标准储备液 100 μL, 用

表 2 抗生素的质谱参数
Tab. 2 Mass Spectrum Parameters for Antibiotics

序号	中文名称	英文名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV	离子模式
1	磺胺甲恶唑	sulfamethoxazole	254.1	92.0 [*]	30	25	ESI ⁺
				156.0	30	15	
2	磺胺甲基嘧啶	sulfamerazine	265.1	92.0 [*]	35	25	ESI ⁺
				156.0	35	15	
3	磺胺二甲嘧啶	sulfadimidine	279.1	156.0 [*]	35	26	ESI ⁺
				186.0	35	25	
4	磺胺间甲氧嘧啶	sulfamonomethoxine	281.0	92.0 [*]	35	25	ESI ⁺
				156.0	35	16	
5	磺胺氯吡嗪	sulfachloropyridazine	285.1	92.0	32	28	ESI ⁺
				156.0 [*]	32	15	
6	青霉素 G	pennicillin G	335.1	160.0	25	10	ESI ⁺
				176.0 [*]	25	15	
7	恩诺沙星	enrofloxacin	360.3	316.3 [*]	38	19	ESI ⁺
				342.3	38	23	
8	氧氟沙星	ofloxacin	362.1	261.3	25	30	ESI ⁺
				318.3 [*]	25	20	
9	强力霉素	doxycycline	445.1	154.0	30	35	ESI ⁺
				428.0 [*]	30	20	
10	四环素	tetracycline	445.1	410.3 [*]	40	18	ESI ⁺
				427.3	40	12	
11	土霉素	oxytetracycline	461.3	426.3 [*]	20	17	ESI ⁺
				443.3	20	10	
12	金霉素	chlorotetracycline	479.3	444.2 [*]	15	22	ESI ⁺
				462.2	15	18	
13	红霉素	erythromycin	734.5	158.1 [*]	30	30	ESI ⁺
				576.5	30	20	
14	罗红霉素	roxithromycin	837.6	158.0 [*]	43	35	ESI ⁺
				679.5	43	20	
15	氯霉素	chloramphenicol	320.8	151.9 [*]	20	16	ESI ⁻
				257.0	20	10	

注: * 表示定量离子

甲醇定容至 10 mL 容量瓶,配制成质量浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

分别取 10 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液 25、50、100、250、500、1 000 μL ,加纯水 20 mL 后加甲酸 50 μL 调节 pH,再用纯水定容到 50 mL 的容量瓶,得到 15 种抗生素质量浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/L 的标准系列。

1.5 样品处理

1.5.1 样品采集

用清洗干净并干燥的棕色玻璃瓶或聚四氟乙烯(全氟丙烯)瓶采集水样。采集时应注满容器,上部不留空间。样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光冷藏保存,12 h 内测定。

1.5.2 样品前处理

用玻璃注射器抽取水样,经 PVDF 滤膜过滤,用甲酸调节 pH 值为 2~3。

1.5.3 在线固相萃取

利用在线固相萃取 HLB 小柱富集前处理后的样品,在线固相萃取流动相 A 为 2% NH_4OH 溶液;流动相 B 为 0.5% 甲酸溶液;流动相 C 为乙腈/甲醇=90/10;流动相 D 为甲醇/乙腈/丙酮=1/1/1。在线固相萃取流动相梯度设置如表 3 所示。

表 3 在线固相萃取流动相梯度设置

Tab. 3 Gradient Setting for Online Solid-Phase

Extraction Flow Phase					
时间 /min	流量 /($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	流动相 A	流动相 B	流动相 C	流动相 D
—	2.0	0	100	0	0
0.5	2.0	0	100	0	0
3.5	2.0	0	100	0	0
4.5	2.0	0	0	0	100
7.5	2.0	0	100	0	0
13.0	2.0	0	100	0	0

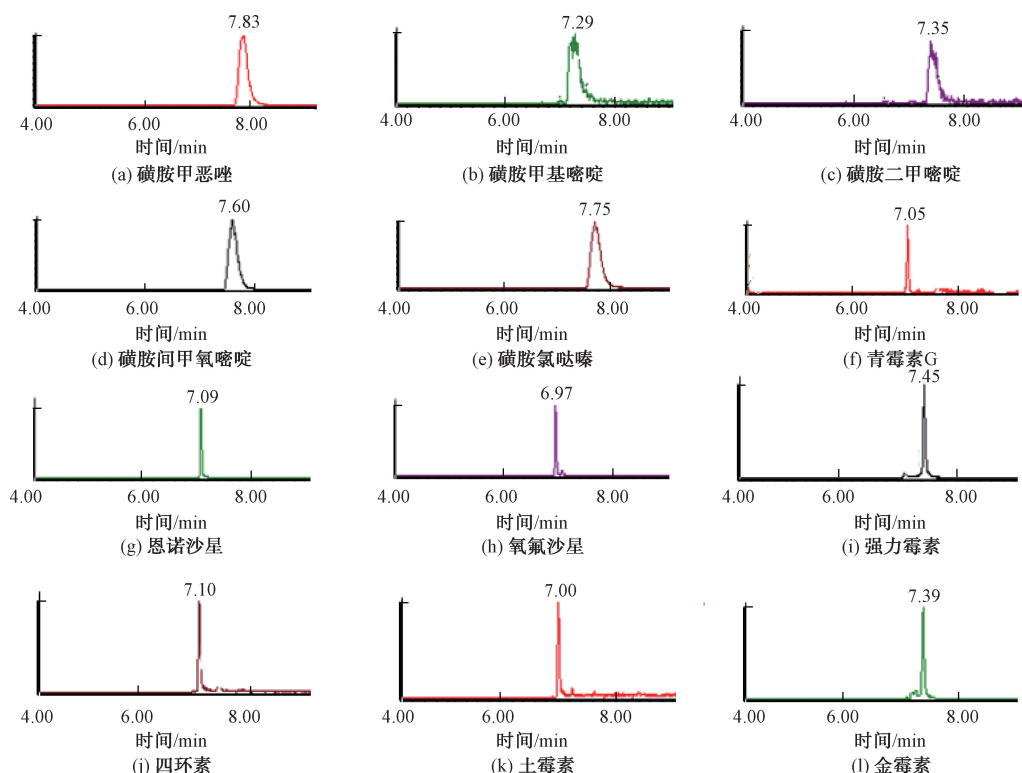
2 结果与讨论

2.1 样品测定及结果

将预处理后的样品采用在线固相萃取,进样量为 5 mL,按照仪器分析条件进行测定,质谱多反应监测(MRM)模式采集。进样质量浓度为 50 ng/L 时的色谱图检测结果图 1 所示。

2.2 标准曲线和检测限

取 6 个 20 mL 进样瓶分别取 1.4 小节中的标准系列,然后在线固相萃取后进样测定,以色谱峰面积进行定量,得到该检测方法的线性回归方程、相关系数及检测限(以 3 倍信噪比计算)等参数(表 4)。



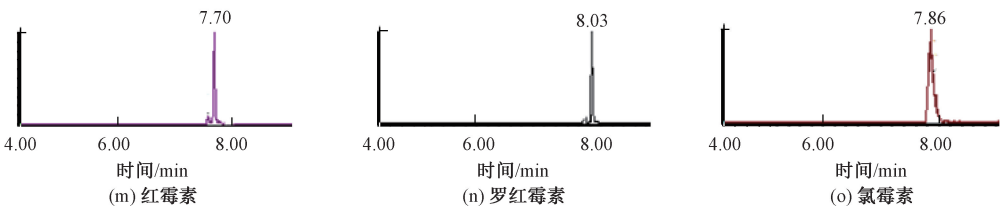


图 1 15 种抗生素 (50 ng/L) 100% 归一化色谱图
Fig. 1 100% Normalized Standard Ion Chromatogram of 15 Antibiotics (50 ng/L)

表 4 检测标准曲线和检测限
Tab. 4 Detection Standard Curve and Detection Limit

抗生素	保留时间/min	线性范围/(ng·L ⁻¹)	线性方程	检测限/(ng·L ⁻¹)	相关系数 R
磺胺甲恶唑	7.83	5~200	y=45 832.1x-13 189.1	0.95	0.998 2
磺胺甲基嘧啶	7.29	5~50	y=879.86x-4 038.4	0.74	0.995 8
磺胺二甲嘧啶	7.35	5~50	y=759.17x-2 519.9	0.94	0.994 6
磺胺间甲氧嘧啶	7.60	5~200	y=45 161.5x+11 582.8	0.94	0.998 9
磺胺氯哒嗪	7.73	5~200	y=52 800.8x+29 990.6	1.59	0.998 8
青霉素 G	7.05	5~50	y=145.10x-278.17	2.77	0.997 9
恩诺沙星	7.09	5~200	y=5 371.1x+27 094.6	1.53	0.998 2
氧氟沙星	6.97	5~50	y=4 198.1x-9 923.99	1.40	0.997 7
强力霉素	7.45	5~200	y=2 569.7x-3 985.3	1.38	0.998 0
四环素	7.10	5~50	y=3 675.8x-12 089.1	0.98	0.999 3
土霉素	7.00	5~50	y=1 394.1x-4 677.01	3.28	0.998 6
金霉素	7.39	5~200	y=4 837.8x+6 545.7	0.98	0.995 4
红霉素	7.70	5~200	y=449.9x-891.6	2.18	0.997 7
罗红霉素	8.03	5~200	y=3 154.8x-5 692.2	3.24	0.997 7
氯霉素	7.86	5~200	y=72.1x-256.5	1.37	0.999 7

2.3 精密度、实际水样和水样加标回收率的检测

以某地区出厂水、管网水、地表水为实际水样，

50 ng/L 的抗生素混标进行加标回收分析,测定该方法的精密度和加标回收率(重复 7 次),结果如表 5 所示。

表 5 实际水样加标回收率和相对标准偏差 (n=7)
Tab. 5 Recovery Rate and Relative Standard Deviation of Real Samples (n=7)

抗生素	纯水		出厂水		管网水		地表水	
	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD
磺胺甲恶唑	93.3%	6.4%	103.3%	7.4%	92.7%	13.7%	54.0%	0.9%
磺胺甲基嘧啶	94.5%	7.8%	74.5%	8.8%	60.6%	16.2%	64.9%	22.3%
磺胺二甲嘧啶	95.6%	8.7%	75.9%	8.7%	70.5%	29.8%	69.1%	15.0%
磺胺间甲氧嘧啶	101.2%	7.1%	103.2%	15.0%	84.2%	3.3%	84.2%	3.3%
磺胺氯哒嗪	112.5%	1.5%	110.5%	2.5%	98.3%	11.6%	88.5%	39.8%
青霉素 G	88.2%	2.7%	78.2%	6.7%	67.3%	9.5%	74.8%	14.4%
恩诺沙星	104.4%	2.9%	100.4%	3.9%	85.4%	18.5%	82.9%	19.2%
氧氟沙星	92.5%	8.0%	62.5%	12.0%	64.5%	17.4%	49.6%	30.8%
强力霉素	110.2%	3.9%	130.2%	3.6%	109.7%	5.9%	100.8%	7.7%

(续表5)

抗生素	纯水		出厂水		管网水		地表水	
	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD	加标回收率	RSD
四环素	88.9%	5.6%	78.9%	6.6%	74.0%	14.4%	67.5%	17.7%
土霉素	92.0%	5.2%	72.0%	12.2%	70.2%	9.7%	65.7%	5.8%
金霉素	105.2%	4.1%	115.2%	4.0%	86.5%	16.2%	79.7%	7.9%
红霉素	105.1%	7.3%	115.6%	10.3%	124.4%	9.6%	83.0%	21.5%
罗红霉素	115.4%	6.2%	125.4%	18.2%	126.8%	6.3%	96.4%	21.3%
氯霉素	114.8%	3.0%	124.8%	4.0%	98.4%	6.6%	64.1%	10.6%

2.4 实际水样检测

对某地区的出厂水、管网水、地表水进行检测。饮用水中检出金霉素、磺胺二甲嘧啶、强力霉素、四环素,质量浓度为 0.94~2.49 ng/L,对人群健康基本没有风险;地表水中检测出磺胺类(磺胺甲恶唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪)、四环素类(强力霉素、四环素、土霉素、金霉素)及红霉素,质量浓度为 2~27 ng/L,其中河水中检测抗生素的情况显著多于水库。

3 结论

(1)本文采用在线固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法,对水中 15 种抗生素进行痕量分析,15 种抗生素在 5~200 ng/L 或 5~50 ng/L 时具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.990 0,方法的检出限(3 倍信噪比)为 0.74~3.28 ng/L,加标回收率在 49.6%~130.2%。

(2)该方法具有操作简便、灵敏度高、回收率高、分析时间短、节约溶剂等特点,能够满足水中抗生素的监测需要。

(3)本研究采集南方某地区生活饮用水及水源水进行了 15 种抗生素的检测,发现抗生素偶有检出但含量极低,对人群健康基本没有风险。

参考文献

- [1] 金磊,姜巍巍,姜蕾,等. 太浦河水体中抗生素赋存特征及生态风险[J]. 净水技术, 2022, 41(4): 35-40.
- [2] 符明淳,席会平,刘彦钊. 乳、肉制品中抗生素残留现状及监控对策[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(6): 20-22.
- [3] 王丹,隋倩,赵文涛. 中国地表水环境中药物和个人护理品的研究进展[J]. 科学通报, 2014(9): 743-751.
- [4] TAMTAM F, MERCIER F, LE B B, et al. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions [J]. Science of the Total Environment, 2008, 393(1): 84-95. DOI: 10.1016/j.scitotenv. 2007. 12. 009.
- [5] MURATA A, TAKADA H, MUTOH K, et al. Nation wide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(24): 5305-5312. DOI: 10.1016/j.scitotenv. 2011. 09. 014.
- [6] KOLPIN D W, FURLONG E T, MEYER M T, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic waste water contaminants in U. S. Streams, 1999 - 2000: A national reconnaissance [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(6): 1202-1211.
- [7] 叶计鹏,邹世春,张干,等. 典型抗生素类药物在珠江三角洲水体中的污染特征[J]. 生态环境, 2007, 16(2): 384-388.
- [8] 朱琳,张远,渠晓东,等. 北京清水水体及水生生物体内抗生素污染特征[J]. 环境科学研究, 2014, 27(2): 139-146.
- [9] 张静,张晓岚,蔡佳男,等. 抗生素在给水厂中的去除及其对水质的影响研究综述[J]. 净水技术, 2022, 41(1): 23-30.
- [10] 张国芳. 饮用水处理工艺对抗生素抗性基因的去除现状[J]. 净水技术, 2020, 39(s1): 1-6, 105.
- [11] 武英. 全球抗生素市场概况分析[J]. 国外医药(抗生素分册), 2012, 33(3): 119-124.
- [12] 刘兴泉,冯震,姚蕾,等. 采用高通量微生物法和 HPLC 法检测猪肉中四环素和磺胺类抗生素残留[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 194-197.
- [13] 金高娃,蔡友琼,于慧娟,等. 超高效液相色谱法测定水产品中 3 种喹诺酮类药物残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2012, 48(1): 43-45.
- [14] 曹荣玉,汤庆会,余沛芝,等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定水中四环类抗生素[J]. 净水技术, 2019, 38(7): 23-26, 59.
- [15] 邱盼子,郭欣妍,王娜,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定制药废水中 10 种抗生素[J]. 色谱, 2015, 33(7): 722-729.
- [16] 陈小平,邓小娟,李文斌,等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水中 13 种抗生素的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(5): 542-547.
- [17] 王蕴馨,刘思洁,李青,等. 水中 10 种抗生素的全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(1): 75-77.