

# LC-MS/MS法测定沉积物中磺胺类和四环素类抗生素

陈秋兰

(福建省泉州环境监测中心站,福建 泉州 362000)

**摘要:**沉积物样品用乙腈-柠檬酸缓冲溶液提取后经HLB-SPE柱净化,采用LC-MS/MS法在MRM模式下测定17种磺胺类和4种四环素类抗生素,通过优化测定条件,使方法在0.500 μg/kg~100 μg/kg范围内线性良好。方法检出限为0.15 μg/kg~1.2 μg/kg,2个质量比水平的加标回收率为44.1%~125%,试验5次结果的RSD<16.0%。将该方法用于测定厦门近岸海域沉积物中抗生素,共有6种磺胺类和4种四环素类抗生素检出,测定值为0.3 μg/kg~26.2 μg/kg。

**关键词:**磺胺类抗生素;四环素类抗生素;液相色谱-串联质谱法;沉积物

中图分类号:O657.63

文献标志码:B

文章编号:1006-2009(2019)03-0049-04

## Simultaneous Determination of Sulfonamide and Tetracycline Antibiotics Residues in Sediment using LC-MS/MS

CHEN Qiu-lan

(Quanzhou Environmental Monitoring Center Station, Quanzhou, Fujian 362000, China)

**Abstract:** Sediment samples were extracted by acetonitrile citric acid buffer solution and purified by HLB-SPE column. Seventeen sulfonamides and four tetracyclines were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry under multi-reaction monitoring mode (MRM). By optimizing the determination conditions, the linearity of the method was good in the range of 0.500 μg/kg~100 μg/kg. The detection limits were 0.15 μg/kg~1.2 μg/kg. The recoveries of standard addition were in range of 44.1%~125% at two mass ratio levels. The RSD of 5 duplicate measurements was less than 16.0%. The method was applied to determine antibiotics in sediments from Xiamen coastal area in Fujian Province. Six sulfonamides and four tetracyclines were detected and the content ranged in 0.3 μg/kg~26.2 μg/kg.

**Key words:** Sulfonamide antibiotics; Tetracycline antibiotics; LC-MS/MS; Sediment

抗生素作为广谱抗菌药物,被大量应用于人和动物的感染性疾病治疗<sup>[1]</sup>,抗生素进入水环境中易于被颗粒物吸附,通过沉降富集于沉积物或直接吸附于沉积物上<sup>[2]</sup>。其潜在风险主要是对水生生物的毒性效应<sup>[3-4]</sup>,长期滥用也会诱导产生抗性基因<sup>[5]</sup>。抗生素在饮用水源地、河流、河口及养殖区域沉积物中普遍存在<sup>[6-7]</sup>,影响沉积物微生物活性,威胁饮用水安全和水环境生态健康。

沉积物中的抗生素来源广泛,种类复杂,且以μg/kg级甚至ng/kg级存在。磺胺类和四环素类抗生素在畜禽和水产养殖中使用十分普遍<sup>[8]</sup>,其污染程度已引起人们的关注,而目前同时研究其在沉积物中残留的分析方法和污染水平的文献较少,

且现有研究主要针对少数几种抗生素检测方法和残留浓度调查,适用范围窄。今采用超声波辅助萃取-SPE净化-LC-MS/MS同时测定沉积物中17种磺胺类和4种四环素类抗生素,为快速、准确测定沉积物中抗生素提供技术支持。

### 1 试验

#### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 6410型 Triple Quad LC-MS/MS 联用

收稿日期:2018-05-09;修订日期:2019-03-15

基金项目:福建省环保科技计划基金资助项目(2016R004)

作者简介:陈秋兰(1984—),女,福建泉州人,工程师,硕士,主要从事环境监测工作。

仪,配备 Agilent 1260 型液相系统,电喷雾离子源(ESI),美国 Agilent 公司;C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 3 mm, 2.6 μm),美国 Phenomenex 公司;12 通道固相萃取装置,美国 Supelco 公司;Oasis HLB SPE 柱(500 mg, 6 mL),美国 Waters 公司。

21 种标准物质(纯度为 94.4% ~ 99.8%):磺胺甲恶唑(SMZ)、磺胺甲二唑(SMTZ)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺噻唑(STZ)、磺胺喹恶啉(SQA)、磺胺氯吡啶(SCPZ)、磺胺甲基嘧啶(SMZ)、磺胺二甲氧嘧啶(SDMX)、磺胺间甲氧嘧啶(SMMX)、磺胺对甲氧嘧啶(SMT)、磺胺二甲基嘧啶(SMA)、磺胺嘧啶(SDZ)、磺胺二甲基异嘧啶(SMD)、磺胺醋酰(STD)、磺胺二甲异恶唑(SXZ)、磺胺硝苯(SNT)、磺胺邻二甲嘧啶(SMPZ)等 17 种磺胺类抗生素,德国奥格斯堡公司;土霉素(OTC)、金霉素(CTC)、四环素(TCC)、强力霉素(DCC)等 4 种四环素类抗生素,美国 Sigma 公司。Na<sub>2</sub>EDTA、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和柠檬酸(分析纯),上海申博化工有限公司;乙腈(色谱纯),美国 Tedia 公司;甲醇(色谱纯),美国 Tedia 公司;二氯甲烷(色谱纯),美国 Tedia 公司;甲酸(色谱纯),美国 Fluka 公司;试验用水为超纯水。分别称取 10.0 mg 各目标物的标准品于 50 mL 棕色容量瓶中,磺胺类、四环素类抗生素分别以乙腈、Milli-Q 水作为溶剂,配制成 200 mg/L 的单标储备液,置于冰箱中 -20 °C 保存,混标用定容溶剂配制。称取 21.01 g 柠檬酸溶解定容至 1 L,得到柠檬酸溶液,称取 71.63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶解定容至 1 L 即为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液,将 1 L 柠檬酸溶液和 625 mL 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液混合,调节 pH 值至 4.0,得到柠檬酸缓冲溶液。沉积物实际样品为厦门近岸海域表层沉积物。

### 1.2 样品采集与前处理

沉积物样品的采集、贮存和运输参照文献[9]。准确称取沉积物样品 5.00 g 置于 80 mL 离心管中,加入 0.5 g Na<sub>2</sub>EDTA、30 mL 乙腈-柠檬酸缓冲溶液(体积比为 4:3),中速均质 2 min ~ 3 min 后以 3 500 r/min 的转速离心 5 min。取上清液置于 150 mL 旋转烧瓶,残留物加入 20 mL 乙腈-柠檬酸缓冲溶液后超声波提取 10 min,再次离心后合并上清液,旋转蒸发除去乙腈。

依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 超纯水活化 SPE 柱。移取旋蒸后的萃取液上柱,以 4 mL ~ 6 mL 超纯水淋洗旋转烧瓶后上柱,用 6 mL 体积分数为

5% 的甲醇水溶液淋洗,抽干后依次用 8 mL 甲醇和 6 mL 甲醇-二氯甲烷(体积比为 1:1)洗脱,洗脱液在 40 °C 下氮吹浓缩至干,定容至 1.0 mL,经滤膜过滤后待仪器分析。

### 1.3 仪器条件

色谱条件:柱温 30 °C,流量 0.25 mL/min,进样体积为 10 μL;流动相 A 是体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液,流动相 B 是体积分数为 0.1% 的甲酸-乙腈溶液。梯度洗脱程序为:0 min ~ 2 min,φ(B)为 10%;2 min ~ 10 min,φ(B)为 10% ~ 15%;10 min ~ 12 min,φ(B)为 15%;12.01 min ~ 16 min,φ(B)为 25%;16 min ~ 24 min,φ(B)为 25% ~ 80%;24 min ~ 26 min,φ(B)为 80%。

质谱条件:电喷雾电离源(ESI),多反应选择监测模式(MRM);干燥气为普通氮气,温度 350 °C,流量为 10 L/min;碰撞气为高纯氮气;毛细管电压 4 kV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MS 参数的优化

以适当浓度的目标抗生素单标溶液进行 MS 参数优化,全扫描找出准确的[M+H]<sup>+</sup>的分子离子峰,二级质谱[MS-MS]对准分子离子峰轰击,获取二次碎裂产生的子离子,将一级质谱中的母离子即分子离子和二三个信号强度适宜的子离子组成监测离子对,MRM 监测。利用特征离子及离子间的丰度比作定性分析,丰度最高的特征离子作定量分析。在此基础上,以目标定量离子的丰度为指标,优化各目标物的母离子(PI)、源内碎裂电压(FV)、子离子(DI)和碰撞能(CE)等质谱参数,具体结果见表 1。

### 2.2 LC 分离条件的优化

在流量 0.25 mL/min,进样体积为 10 μL 的条件下,通过长程序、慢梯度确定目标物的大致保留时间顺序和分离情况。通过变化不同的梯度洗脱程序,实现各目标物的分离,优化后的各组梯度洗脱程序见 1.3,该条件下 21 种目标物质谱峰见图 1。由图 1 可见,各组目标的分离度良好,21 种目标物可在 23 min 内完成分析。

### 2.3 前处理方法的优化

#### 2.3.1 萃取溶剂的选择

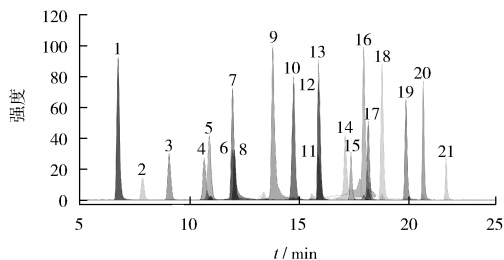
磺胺类和四环素类极性差异较大,且沉积物基质复杂,萃取溶剂在有效萃取目标物的同时应尽量

表 1 方法效能验证结果

Table 1 The results of verification test

化合物	母离子(子离子)质荷比	碎裂电压 $U/V$	碰撞能 $Q/eV$	线性范围 $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	相关系数 $r^2$	加标量 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标量 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
						回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
SMOZ	254.1(156.1 <sup>①</sup> ,160.1)	100	10,15	0.5~100	0.998 6	71.7	5.8	58.8	2.3
SMTZ	271.0(156.0 <sup>①</sup> ,108.1)	100	10,20	0.5~100	0.999 5	66.1	14.5	53.2	6.8
SPD	250.0(156.0 <sup>①</sup> ,184.1)	100	10,15	0.5~100	0.997 5	88.9	6.9	78.2	4.4
STZ	256.0(156.0 <sup>①</sup> ,108.0)	100	10,20	0.5~100	0.999 1	63.9	3.2	56.4	4.9
SQA	301.0(156.0 <sup>①</sup> ,208.0)	120	10,15	0.5~100	0.996 3	70.4	0.8	71.5	8.8
SCPZ	285.0(156.0 <sup>①</sup> ,108.0)	100	10,20	0.5~100	0.997 0	63.0	9.7	64.1	8.6
SMZ	265.1(156.0,172.0 <sup>①</sup> )	110	10,10	0.5~100	0.998 0	50.4	6.9	53.7	3.5
SDMX	311.1(156.0 <sup>①</sup> ,245.1,218.0)	120	18,15,15	0.5~100	0.997 1	62.6	6.4	61.0	7.9
SMMX	281.1(156.0 <sup>①</sup> ,188.0)	120	10,10	0.5~100	0.998 1	89.4	10.4	79.1	8.7
SMT	281.0(156.0 <sup>①</sup> ,215.1)	120	15,15	0.5~100	0.999 0	71.4	5.0	79.7	4.4
SMA	279.1(156.0,186.0 <sup>①</sup> )	120	15,15	0.5~100	0.997 3	63.1	13.7	66.2	3.9
SDZ	251.0(156.0 <sup>①</sup> ,185.1)	100	10,15	0.5~100	0.996 8	61.4	8.3	74.9	9.4
SMD	279.0(124.1 <sup>①</sup> ,186.0)	120	20,10	0.5~100	0.992 1	55.8	10.8	44.1	1.5
STD	215.0(156.0 <sup>①</sup> ,108.0)	80	5,15	0.5~100	0.995 7	57.7	13.2	63.9	1.7
SXZ	268.0(156.0 <sup>①</sup> ,113.0)	100	10,10	0.5~100	0.997 4	66.5	6.7	56.2	8.4
SNT	336.0(156.1 <sup>①</sup> ,294.0)	120	5,5	1~100	0.997 9	89.8	7.4	76.9	2.2
SMPZ	281.0(156.0 <sup>①</sup> ,126.0,108.0)	120	10,15,20	0.5~100	0.996 5	72.2	15.9	61.8	3.7
OTC	461.1(443.1,426.1 <sup>①</sup> )	120	5,15	0.5~100	0.995 9	74.0	6.3	125	0.9
CTC	479.1(462.1,444.1 <sup>①</sup> )	120	10,15	0.5~100	0.996 1	71.2	2.5	73.9	6.5
TCC	445.1(427.1,410.0 <sup>①</sup> )	120	5,15	0.5~100	0.992 9	71.9	6.5	88.3	6.5
DCC	445.1(428.1 <sup>①</sup> ,410.1)	120	15,20	0.5~100	0.995 6	66.0	12.9	82.3	3.1

①为定量离子。



1—SMA; 2—STD; 3—SDZ; 4—STZ; 5—SPD; 6—SNT; 7—OTC;  
8—SMZ; 9—TCC; 10—SMD; 11—SMMX; 12—SMT; 13—SMTZ;  
14—CTC; 15—SMPZ; 16—DCC; 17—SCPZ; 18—SDMX; 19—SMOZ;  
20—SXZ; 21—SQA。

图 1 21 种目标物质谱峰

Fig. 1 MRM peaks of 21 targets

减少杂质的萃取。以沉积物为基质,分别考察乙腈溶液(溶剂 A)、柠檬酸缓冲溶液(溶剂 B)和乙腈-柠檬酸缓冲溶液(体积比为 4:3)(溶剂 A+B)作为提取溶剂的提取效果。结果表明,3 种溶剂对目标物的萃取回收率分别为 0.6%~43.4%、1.7%~39.1% 和 44.6%~83.1%,3 种提取溶剂均有一定的提取效果,而乙腈-柠檬酸缓冲溶液萃取效果最好。

### 2.3.2 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 添加量的优化

沉积物中的重金属的存在会对萃取效果产生

影响,可在前处理中加入  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  对其络合以降低影响<sup>[10-11]</sup>,然而过量的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  能与四环素类抗生素发生络合反应从而影响其萃取效果。分别考察不加  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  和加入量为 0.5 g、1.0 g 对萃取效果的影响,结果萃取回收率分别为 12.7%~40.9%、50.3%~100.7% 和 30.9%~69.6%,故选择在萃取前加入 0.5 g 的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 。

### 2.3.3 SPE 上样体积的优化

萃取液旋转蒸发并不能完全去除有机溶剂,故萃取液在用 SPE 柱净化之前,需要对其稀释,以确保溶液中的有机溶剂比例低于体积分数 5% 而不影响保留效果<sup>[12]</sup>。若稀释体积过大则会影响过柱时间,并可能产生穿透。分别考察旋蒸残留液在未稀释、稀释 2 倍和 4 倍的 SPE 柱子净化后的回收效果,结果表明其萃取回收率分别为 50.9%~79.6%、10.4%~57.7% 和 8.2%~59.1%,稀释与否无显著区别。

### 2.4 方法效能验证

为减少基质效应的影响,在优化的色谱条件和最佳的预处理条件下,用空白沉积物样品经前处理过程获得基质空白溶液配制一定范围的系列标准溶液(线性范围见表 1),将该基质匹配工作曲线用

于定量分析,各目标物的线性相关系数( $r^2$ )均不低于0.992,见表1。按照文献[13]计算方法检出限(MDL),加标量为 $2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ,得到21种目标物的MDL为 $0.15\ \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1.2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

取5份实际沉积物样品,做2个质量比水平的加标回收试验,按1.2和1.3操作,基质匹配法定量,结果见表1。由表1可知,加标回收率分别为50.4%~89.8%和44.1%~125%,RSD( $n=5$ )分别为0.8%~15.9%和0.9%~9.4%。说明回收率和重现性较好,该方法适合表层沉积物中抗生素的分析。

## 2.5 实际样品测定

用上述方法测定厦门近岸海域表层沉积物中抗生素(干重),结果见表2。由表2可知,5个监测点位共有6种磺胺类(SMOZ、SPD、SCPZ、SMMX、SMT和SMA)和4种四环素类(OTC、CTC、TCC和DCC)检出,测定值为 $0.3\ \mu\text{g}/\text{kg} \sim 26.2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (干重)。S1至S3监测点位的检出抗生素总质量比随着向入海口靠近呈降低趋势。S1和S2监测点位毗邻河口水产养殖区,有较多的可能引入抗生素污染,在S1和S2监测点位检出抗生素种类较多。S4监测点位毗邻厦大白城污水入海口,生活和医疗废水中的磺胺类等抗生素在沉积物中富集,故有较高浓度的磺胺类抗生素检出。

表2 厦门近岸海域表层沉积物中抗生素测定结果  
Table 2 Detection results of antibiotics in surface layer sediments of Xiamen offshore

点位	坐标		磺胺类抗生素						四环素类抗生素			
	纬度/ $^{\circ}$	经度/ $^{\circ}$	SMOZ	SPD	SCPZ	SMMX	SMT	SMA	OTC	CTC	TCC	DCC
S1	24.432 0	117.932 0	—	—	—	—	—	—	26.2	15.3	23.0	6.8
S2	24.440 6	117.967 1	—	—	—	—	—	1.1	7.5	12.2	6.3	4.0
S3	24.428 1	118.039 0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S4	24.423 1	118.100 0	25.3	14.6	11.8	16.9	11.3	25.0	—	4.8	—	—
S5	24.390 6	118.119 0	0.5	—	—	0.3	—	—	—	—	—	—

## 3 结语

通过优化MS参数、LC分离条件和前处理方法,建立适用于沉积物中21种抗生素残留的同时分析方法,采用基质匹配工作曲线法定量,方法具有较高的灵敏度和准确性。该方法成功应用于厦门近岸海域表层沉积物中多种抗生素的复合污染监测,可为沉积物中多种类抗生素的复合污染、环境行为及风险效应研究提供可靠的分析方法。

### [参考文献]

- [1] 高立红,史亚利,厉文辉,等. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展[J]. 环境化学,2013,32(9):1619-1633.
- [2] 伍婷婷,张瑞杰,王英辉,等. 邕江南宁市区段表层沉积物典型抗生素污染特征[J]. 中国环境科学,2013,33(2):336-344.
- [3] HALLING-SØRENSEN B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming[J]. Chemosphere,2000,40(7):731-739.
- [4] WOLLENBERGER L, HALLING-SØRENSEN B, KUSK K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*[J]. Chemosphere,2000,40(7):723-730.
- [5] WU N, QIAO M, ZHANG B, et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China [J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(18): 6933-6939.
- [6] 梁惜梅,施震,黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征[J]. 生态环境学报,2013,22(2):304-310.
- [7] 任珂君,刘玉,徐建荣,等. 广东一饮用水源地河流沉积物及鱼体中氟喹诺酮类(FQs)抗生素残留特征研究[J]. 环境科学学报,2016,36(3):760-766.
- [8] 刘正才,杨方,余孔捷,等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测鳊鱼中磺胺类、喹诺酮类、四环素族抗生素药物残留[J]. 食品科学,2009,30(14):167-170.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会. GB 17378.3—2007 海洋监测规范第3部分:样品采集、贮存与运输[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [10] USEPA. USEPA Method 1694. Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS[S]. Washinton D. C.:USEPA,2007.
- [11] VAZQUEZ-ROIG P, BLASCO C, PICO Y. Advances in the analysis of legal and illegal drugs in the aquatic environment[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry,2013,50:65-77.
- [12] HUANG Y J, CHENG M M, LI W H, et al. Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method[J]. Analytical Methods,2013,5(15):3721-3731.
- [13] 环境保护部. HJ 168—2010 环境监测 分析方法标准制修订技术导则[S]. 北京:中国环境科学出版社,2010.