

# 固相萃取-UPLC-MS/MS法测定环境水体中多种抗生素

秦兴秀, 杨敏娜, 王来梁

(自然资源部国土(耕地)生态监测与修复工程技术创新中心, 江苏省地质调查研究院,  
江苏 南京 210018)

**摘要:**采用固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定环境水样中25种磺胺类和喹诺酮类抗生素,通过优化试验条件,使方法在2.00 μg/L~200 μg/L范围内线性良好,方法检出限为1.01 ng/L~2.85 ng/L,7次测定结果的RSD为2.3%~8.0%。将该方法用于自来水和地表水测定,结果均为未检出,高、低质量浓度水平的加标回收率为61.2%~102%。

**关键词:**磺胺类抗生素;喹诺酮类抗生素;固相萃取;超高效液相色谱串联质谱法;水质

中图分类号:0657.63 文献标志码:B 文章编号:1006-2009(2024)03-0051-04

## Determination of Antibiotics in Environmental Water by Solid Phase Extraction-UPLC-MS/MS

QIN Xingxiu, YANG Minna, WANG Lailiang

(Technology Innovation Center for Ecological Monitoring & Restoration Project on Land(Arable),  
MNR, Geological Survey of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210018, China)

**Abstract:** A method was developed for determining 25 kinds of sulfonamides and quinolones in environmental water by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. By optimizing the experiment conditions, the method had good linearity in the range of 2.00 μg/L~200 μg/L. The method detection limits ranged from 1.01 ng/L to 2.85 ng/L, and the RSDs of 7 measurements ranged from 2.3% to 8.0%. The method was applied in determining tap water and surface water, and the results were not detected. The spiked recoveries with high and low mass concentration levels were 61.2%~102%.

**Key words:** Sulfonamides; Quinolones; Solid phase extraction; Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Water quality

抗生素的滥用致使大量抗生素进入环境中,其在环境中相对稳定、持久性残留,并通过水体、土壤和食物链产生迁移,对生态环境和人类健康产生不可忽视的影响<sup>[1-6]</sup>。目前,水中抗生素的检测方法主要有液相色谱法<sup>[7-9]</sup>,液相色谱串联质谱法<sup>[10-11]</sup>等。由于抗生素在自然水体中的浓度相对较低,且自然水体基体成分复杂,高效液相色谱技术难以满足检测要求,近年来,高效液相色谱串联质谱法被广泛应用<sup>[12]</sup>。固相萃取技术操作快速、简便且重现性好<sup>[13]</sup>,能够对样品有效净化与浓缩,被广泛应用于抗生素的前处理<sup>[14]</sup>。今采用新型固相萃取-高效液相色谱串联质谱法测定环境水样中25种磺胺类和喹诺酮类抗生素,该方法绿色环保,操作简便,能有

效清除基体干扰,测定结果令人满意。

### 1 试验

#### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1290 Infinity UPLC/AB SCIEX Triple Quad 5500型超高效液相色谱/三重四级杆质谱联用仪,美国Agilent公司/美国SCIEX公司;10通道

收稿日期:2023-05-31;修订日期:2024-03-11

基金项目:江苏省自然资源科技基金资助项目(KJXM2021032);自然资源部国土(耕地)生态监测与修复工程技术创新中心开放课题基金资助项目(GTST2021-009);江苏省国土(耕地)生态地质环境监测基金资助项目(苏财建[2018]96号)

作者简介:秦兴秀(1991—),女,江苏南京人,工程师,硕士,从事环境有机污染物研究工作。

固相萃取装置,美国 Agilent 公司; Waters Oasis HLB 固相萃取小柱(500 mg, 6 mL),美国 Waters 公司;水系滤膜(50 mm × 0.45 μm),亲水性 PTFE 针式过滤器(13 mm × 0.22 μm 滤膜),南京泰谱瑞仪器设备有限公司。

磺胺类有证标准混合溶液(溶于乙腈),德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;喹诺酮类有证标准混合溶液(溶于甲醇),内标为磺胺间二甲嘧啶-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>(溶于甲醇),替代物 T1 为盐酸环丙沙星-D<sub>8</sub>、T2 为磺胺二甲氧嘧啶-D<sub>6</sub>(溶于甲醇),北京曼哈格生物科技有限公司;乙腈和甲醇(色谱纯),美国 TEDIA 公司;甲酸(色谱纯),日本 TCI 公司;氢氧化钠、盐酸、EDTA-2Na、氯化钠等(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;试验用水为超纯水。

### 1.2 样品采集与保存

样品采集与保存参照《污水监测技术规范》(HJ 91.1—2019)和《地下水环境监测技术规范》(HJ 164—2020)。样品采集于 1 L 棕色玻璃瓶中,水样充满样品瓶,0 °C ~ 4 °C 下避光保存,7 d 内完成测定。

### 1.3 预处理

量取 500 mL 水样,使用 0.45 μm 滤膜除去悬浮物,加入 0.25 g EDTA-2Na,使用 3 mol/L 盐酸溶液调节水样 pH 值为 2.0,加入替代物。HLB 固相萃取小柱上样之前依次用 5 mL 甲醇、5 mL 去离子水和 5 mL EDTA-2Na 水溶液(2.00 g/L, pH 值为 2.0)润洗活化,当萃取柱中还剩余 2 mL EDTA-2Na 溶液时,将其固定在固相萃取装置上,水样以不超过 10 mL/min 的流量全部通过萃取柱。水样完全过柱后,先用 5 mL 去离子水淋洗小柱,再负压抽干 20 min,最后用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液。洗脱液在 40 °C 下用氮气吹至 0.5 mL,加入内标使用液,用体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液定容至 1.0 mL,涡旋混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜后待测。

### 1.4 仪器条件

液相色谱条件: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(1.8 μm, 3 mm × 100 mm),流量 0.2 mL/min,柱温 40 °C,进样体积为 2 μL。流动相 A 是体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液,流动相 B 是乙腈-甲醇溶液(体积比为 1:1,含体积分数 0.1% 的甲酸溶液)。梯度洗脱设定为 0 min ~ 2 min, φ(B) 为 10%; 2 min ~ 6 min, φ(B) 为 10% → 25%; 6 min ~ 10 min, φ(B) 为 25%; 10 min ~ 16 min,

φ(B) 为 25% → 30%; 16 min ~ 20 min, φ(B) 为 30%; 20 min ~ 26 min, φ(B) 为 30% → 60%; 26 min ~ 28 min, φ(B) 为 60%; 28 min ~ 29 min, φ(B) 为 60% → 10%; 29 min ~ 31 min, φ(B) 为 10%。

质谱条件:电喷雾离子源(EI),正离子扫描,多反应监测(MRM),电喷雾电压为 5 500 V,离子源温度为 450 °C,气帘气压力(CUR)为 138 kPa,碰撞气(CAD)为氮气,压力为 48 kPa,雾化气压力为 345 kPa,辅助气压力为 345 kPa,入口电压(EP)为 10 V,出口电压(CXP)为 13 V。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

用甲醇配制 500 μg/L 的混合标准使用液,以 7 μL/min 的流量直接连续注入三重四级杆质谱仪离子源中,进行质谱参数优化。依据待测化合物的化学结构,采用多反应监测(MRM)模式,选择在 ESI 源的正离子模式下离子化,一级质谱分析得到母离子[M+H]<sup>+</sup>峰。调整碰撞电压,确定母离子对应的子离子,再对母离子峰进行二级质谱分析,优化去簇电压和碰撞电压,最终选择响应值高、峰形对称的子离子作为定量离子。质谱参数见表 1。

### 2.2 色谱条件优化

甲醇和乙腈是液相色谱常用的流动相,分别考察在相同仪器条件下不同流动相的分离效果,发现流动相 A 为体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液, B 相为甲醇-乙腈溶液(体积比为 1:1,含体积分数 0.1% 的甲酸)时,28 种目标物(包含 25 种抗生素、2 种替代物、1 种内标物)的响应值、分离度和峰形达到最优。在流动相中加入 0.1% 的甲酸,可有效改善峰形,提高离子化效率。200 μg/L 的混合标准溶液总离子流见图 1。

### 2.3 固相萃取条件优化

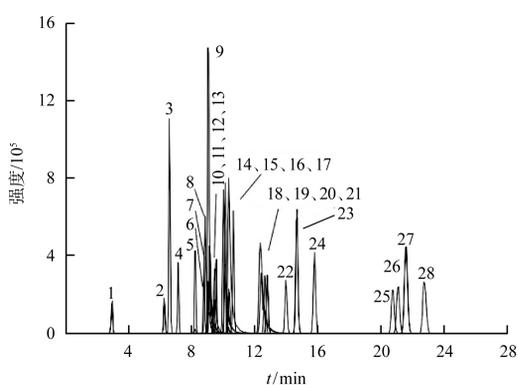
环境水样基体复杂,须先用 0.45 μm 微孔滤膜除去悬浮物,以免堵塞固相萃取小柱。水样中金属离子与抗生素的螯合作用对抗生素的萃取效率影响较大,在水样中提前加入 EDTA-2Na(0.50 g/L),其与金属离子产生的络合作用强于抗生素,可有效提高抗生素的萃取效率<sup>[15]</sup>。

Oasis HLB 固相萃取小柱填充的是亲水-亲脂双相平衡的反相吸附剂,萃取前用 5 mL 甲醇、5 mL 去离子水和 5 mL EDTA-2Na 水溶液(2.00 g/L, pH 值为 2.0)对 HLB 固相萃取小柱润洗活化。极性

表 1 质谱参数与方法效能验证结果

Table 1 Mass spectrum parameters and method effectiveness verification results

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子(定量) <i>m/z</i>	去簇电压 <i>U/V</i>	碰撞电压 <i>U/V</i>	回归方程	检出限 $\rho$ $/(ng \cdot L^{-1})$	RSD $/\%$
磺胺咪(SGN)	215	92(156)	50	31(17)	$y = 5.31 \times 10^3 x + 6.05 \times 10^3$	2.33	6.3
磺胺醋酰(SAA)	215	92(156)	50	31(17)	$y = 7.03 \times 10^3 x + 5.67 \times 10^3$	2.62	5.2
磺胺二甲异噁啉(SIM)	279	186(124)	50	22(28)	$y = 2.42 \times 10^4 x + 1.54 \times 10^5$	1.62	3.2
磺胺嘧啶(SDZ)	251	108(156)	50	32(21)	$y = 1.14 \times 10^4 x + 507$	2.85	7.2
磺胺吡啶(SPD)	250	108(156)	50	31(22)	$y = 1.36 \times 10^4 x - 445$	1.99	5.9
磺胺甲基噁啉(SMR)	265	108(156)	50	32(23)	$y = 1.11 \times 10^4 x + 5.80 \times 10^3$	1.72	6.5
依诺沙星(ENO)	321	232(303)	50	46(28)	$y = 2.83 \times 10^4 x - 1.77 \times 10^4$	1.64	7.2
马波沙星(MBF)	363	262(319)	50	36(26)	$y = 9.76 \times 10^3 x - 1.08 \times 10^4$	1.63	5.6
氧氟沙星(OFL)	362	261(318)	50	36(26)	$y = 5.05 \times 10^4 x - 3.79 \times 10^4$	1.35	5.0
诺氟沙星(NOR)	320	276(302)	50	24(27)	$y = 1.33 \times 10^4 x + 1.10 \times 10^4$	1.54	6.7
培氟沙星(PEF)	334	290(316)	50	26(28)	$y = 2.10 \times 10^4 x - 3.12 \times 10^3$	1.92	7.1
盐酸环丙沙星-D <sub>8</sub> (T1)	340	296(322)	50	25(30)			
环丙沙星(CIP)	332	288(314)	50	24(28)	$y = 1.49 \times 10^4 x - 1.67 \times 10^4$	1.58	8.0
达诺沙星(DAN)	358	314(340)	50	25(30)	$y = 3.39 \times 10^4 x - 7.75 \times 10^3$	1.55	7.5
洛美沙星(LOM)	352	308(265)	50	23(31)	$y = 3.44 \times 10^4 x - 4.90 \times 10^4$	1.54	7.0
磺胺间二甲噁啉- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> (内标)	285	124(186)	50	30(24)			
恩诺沙星(ENR)	360	342(316)	50	30(27)	$y = 3.42 \times 10^4 x - 3.16 \times 10^4$	1.58	6.2
双氟沙星(DIF)	400	299(356)	50	38(27)	$y = 3.24 \times 10^4 x - 8.11 \times 10^4$	1.33	5.3
沙拉沙星(SAR)	386	368(342)	50	29(24)	$y = 1.80 \times 10^4 x - 5.69 \times 10^3$	1.84	6.0
磺胺间甲噁啉(SMM)	281	108(156)	50	33(24)	$y = 1.22 \times 10^4 x - 8.02 \times 10^3$	1.61	7.2
磺胺氯噻唑(SCP)	285	92(156)	50	36(21)	$y = 1.37 \times 10^4 x - 4.20 \times 10^3$	1.22	2.3
磺胺甲恶唑(SMZ)	254	92(156)	50	35(21)	$y = 1.33 \times 10^4 x - 9.14 \times 10^3$	1.01	3.7
磺胺多辛(SDX)	311	108(156)	50	36(26)	$y = 2.89 \times 10^4 x + 968$	1.55	4.4
磺胺二甲异噁啉(SIZ)	268	113(156)	50	20(18)	$y = 2.08 \times 10^4 x - 1.54 \times 10^4$	1.76	4.7
磺胺苯吡唑(SPP)	315	160(158)	50	29(36)	$y = 1.52 \times 10^4 x - 1.56 \times 10^4$	1.83	5.6
磺胺二甲氧噁啉-D <sub>6</sub> (T2)	317	156(162)	50	27(30)			
磺胺间二甲氧噁啉(SDT)	311	92(156)	50	40(26)	$y = 2.95 \times 10^4 x - 2.07 \times 10^3$	1.92	6.5
磺胺噁啉(SQX)	301	92(156)	50	38(22)	$y = 1.90 \times 10^4 x + 4.99 \times 10^3$	1.77	4.1



1—SGN; 2—SAA; 3—SIM; 4—SDZ; 5—SPD; 6—SMR;  
7—ENO; 8—MBF; 9—OFL; 10—NOR; 11—PEF; 12—T1;  
13—CIP; 14—DAN; 15—LOM; 16—内标; 17—ENR; 18—  
DIF; 19—SAR; 20—SMM; 21—SCP; 22—SMZ; 23—SDX;  
24—SIZ; 25—SPP; 26—T2; 27—SDT; 28—SQX。

图 1 混合标准溶液的总离子流

Fig. 1 Total ion current of mixed standard solution

有机溶剂甲醇与萃取柱吸附剂表面键合的非极性烷基类作用,能在萃取柱表面形成甲醇薄膜液。该

薄膜液能较好地与水相互溶,再用去离子水对柱子进行平衡,水样在过柱时能与萃取柱的吸附材料充分接触,对抗生素吸附保留。在使用过程中须保持吸附剂湿润,水样经过柱子整个流程保持连续性。若柱子干涸,吸附剂上的薄膜液则会被破坏,造成水相不能与吸附剂充分接触,萃取效率降低。

磺胺类和喹诺酮类药物均为两性化合物<sup>[16]</sup>,在酸性和碱性环境都有良好的溶解性。分别考察当水样 pH 值为 2.0 ~ 9.0 时各目标物的回收率,结果表明,当 pH 值为 2.0 时,大多数抗生素回收率良好,回收率均保持在 50.0% ~ 100% 之间。

甲醇和乙腈是常用的洗脱溶剂<sup>[17]</sup>,考虑到乙腈价格高,优先选择甲醇作为洗脱剂。分别用 4 mL、5 mL、6 mL、8 mL、10 mL 甲醇进行洗脱,结果表明,5 mL 甲醇洗脱即能使抗生素回收率保持在 60.0% 以上,满足试验需求。

实际水样中基质成分复杂,其他成分可能会被固相萃取柱吸附保留,与抗生素产生竞争吸附,大量水样通过固相萃取柱时有可能出现吸附饱和现象<sup>[18-19]</sup>。水样过柱体积较大、流量过小会延长试验周期,流量小也会使有些抗生素发生降解,而流量太大则会使吸附效率降低。综合考虑,选择500 mL作为水样体积,确定流量为10 mL/min。另外,环境水样中含有的有机物质和EDTA-2Na会吸附在萃取柱上,并与目标物一起被洗脱而影响测定。在洗脱前须用5 mL去离子水淋洗萃取柱,减小基质干扰。

#### 2.4 方法效能验证

配制2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L、200 μg/L的混合标准系列,在1.4条件下分别测定,以质量浓度为横坐标,对应的目标物响应值为纵坐标绘制标准曲线,相关系数 $r^2$ 均在0.993以上。根据标准<sup>[20]</sup>配制方法检出限3~5倍的标准样品,按1.3所述处理,在1.4条件下平行测定7次,计算7次测定结果的标准偏差 $S$ ,按照 $MDL = t_{(n-1,0.99)} \times S$ 计算方法检出限,得到25种抗生素类药物的检出限为1.01 ng/L~2.85 ng/L,7次测定结果的RSD为2.3%~8.0%。方法效能验证结果见表1。

#### 2.5 实际样品测定

采集实验室自来水和地表水,每个样品中均加入替代物和内标,替代物回收率控制在50.0%~130%之间。结果表明,两种水样中上述25种抗生素均未检出。对两种水样做2个质量浓度水平(25 ng/L和50 ng/L)的加标回收试验,结果表明,水样中25种抗生素加标回收率为61.2%~102%,表明该方法准确度良好。

### 3 结语

建立了固相萃取-UPLC/MS测定环境水体中25种磺胺类抗生素和喹诺酮类抗生素的方法,该方法检出限低,灵敏度高,精密度与准确度良好。将该方法成功应用于实际水样的测定,操作简便,绿色环保,可为国土生态监测与修复工程中水质评价和污染防治提供支撑。

#### [参考文献]

[1] JANG H M, LEE J, CHOI S, et al. Response of antibiotic and heavy metal resistance genes to two different temperature sequ-

ences in anaerobic digestion of waste activated sludge[J]. *Biore-source Technology*, 2018, 18(14): 303-310.

- [2] 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.
- [3] 周爱霞,苏小四,高松,等.高效液相色谱测定地下水、土壤及粪便中4种磺胺类抗生素[J].*分析化学*, 2014, 42(3): 397-402.
- [4] 陆克祥,隋铭皓,高乃云.固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱测定水中19种抗生素[J].*分析测试学报*, 2010, 29(12): 1209-1214.
- [5] HIRSCH R, TERNES T A, HABERER K, et al. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Chromatography A*, 1998, 815(2): 213-223.
- [6] KIM S C, CARLSON K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed[J]. *Water Research*, 2006, 40(13): 2549-2560.
- [7] 谭建华,唐才明,余以义,等.高效液相色谱法同时分析城市河水中的多种抗生素[J].*色谱*, 2007, 25(4): 546-549.
- [8] 李彦文,莫测辉,赵娜,等.高效液相色谱法测定水和土壤中磺胺类抗生素[J].*分析化学*, 2008, 36(7): 954-958.
- [9] 方炳虎,何绮霞,邹潍力,等.牛奶中12种磺胺类药物残留的高效液相色谱测定方法[J].*分析测试学报*, 2007, 26(4): 519-522.
- [10] 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.
- [11] 高振刚,梁延鹏,曾鸿鹄,等.固相萃取-超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定水中15种抗生素残留[J].*分析试验室*, 2021, 40(8): 875-880.
- [12] 张川,胡冠九,孙成. UPLC-ESI-MS/MS法同时测定水中7种抗生素[J].*环境监测管理与技术*, 2009, 21(3): 37-40.
- [13] 秦燕燕,尹魁浩,彭盛华,等.水体中抗生素的检测及去除方法研究综述[J].*环境科学与管理*, 2013, 38(2): 73-77.
- [14] 孙广大,苏仲毅,陈猛,等.固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱同时分析环境水样中四环素类和喹诺酮类抗生素[J].*色谱*, 2009, 27(1): 54-58.
- [15] 陈秋兰. LC-MS/MS法测定沉积物中磺胺类和四环素类抗生素[J].*环境监测管理与技术*, 2019, 31(3): 49-52.
- [16] 王亚军,陈甜. 氟喹诺酮类抗生素在水环境中的去除研究综述[J].*环境监测管理与技术*, 2021, 33(5): 1-5.
- [17] 魏丹,张菊,国明.基于混合吸附剂磁性固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定水中磺胺和喹诺酮类抗生素残留[J].*分析测试学报*, 2022, 41(2): 187-195.
- [18] 闫幸,余卫娟,兰亚琼,等.固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定猪栏废水中10种抗生素[J].*理化检验(化学分册)*, 2014, 50(3): 273-277.
- [19] 甘国强,赵盼,齐超,等.固液萃取-超高效液相-串联质谱法同时测定污水处理厂进出水中14种抗生素[J].*沈阳药科大学学报*, 2016, 33(2): 171-177.
- [20] 生态环境部. 环境监测分析方法标准制订技术导则: HJ 168—2020[S]. 北京: 中国环境出版社, 2020.