研究报告

固相萃取液相色谱 - 质谱 /质谱联用测定河水中大环内酯类抗生素

刘玉春[1], 徐维海[1,2], 余莉莉[1], 李向东[3], 张 干[2], 邹世春[1]

(1. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 中科院广州地球化学研究所 有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640; 3. 香港理工大学 土木与结构工程学系, 香港)

摘 要: 应用固相萃取 (SPE)及 LC- MS/MS技术, 建立了水中痕量大环内酯类抗生素即红霉素、脱水红霉素、罗红霉素的分析方法, 优化了固相萃取、液相色谱 - 质谱 /质谱等相关条件。水样经 HLB固相萃取柱富集净化, 以多反应检测方式 (MRM)对待测物进行定性和定量分析。3种抗生素在 10~ 2 000 ng/L范围内具有良好的线性。其定量下限为 5 ng/L(S/N > 10)。加标纯水和实际水样的回收率在 71% ~ 111% 之间, 相对标准偏差 (RSD)在 3.7% ~ 8.6% 之间。该方法灵敏度高、选择性好、准确度高, 适合实际水样中痕量大环内酯类药物的检测。使用该方法测得珠江广州河段某水样中红霉素、脱水红霉素和罗红霉素质量浓度分别为 164、291和 134 ng/L。

关键词: 大环内酯类抗生素; 固相萃取; 液相色谱 - 质谱 /质谱; 河水; 红霉素; 脱水红霉素; 罗红霉素

中图分类号: O657.63; R978.15 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2006)02- 0001- 05

Determination of Trace Macrolides in Water Using Solid-phase Extraction and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

LIU Yu-chun[1], XU Wei-hai[1,2], YU Li-li[1], LI Xiang-dong[3], ZHANG Gan[2], ZOU Shi-chun[1]

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Department of Civil and Structural Engineering, the Hongkong Polytechnic University, Hongkong, China)

Abstract The determination of macrolide antibiotics in water was performed using solid phase extraction (SPE) followed by a combined liquid chromatography (LC) and tandem mass spectrometry (MS/MS) procedure under the multi-reactive model. The experimental results showed that this method was satisfactory for the analysis of several typical antibiotics such as erythromycin (ETM), erythromycin-H_2O (ETM-H_2O) and roxithromycin (RTM) in river water. The linear range was 10- 2 000 ng/L and the detection limit was 5 ng/L for ETM, ETM-H_2O and RTM. The spiking recoveries for these antibiotics ranged from 71% to 111% and their relative standard deviations (RSD) were less than 8.6%. The concentrations of ETM, ETM-H_2O and RTM measured in Pearl River water (urban Guangzhou) were 164, 291 and 134 ng/L, respectively.

Key words Macrolide antibiotics; Solid phase extraction; LC-MS/MS; River water; Erythromycin; Erythromycin-H_2O; Roxithromycin

近年来, 抗生素类药物引发的环境污染问题开始受到关注[1]。然而, 由于环境介质中的抗生素污染物相对分子质量较大、化学结构复杂、含量极低 (多在 10^{-9} ~ 10^{-12}级), 因此分析难度大、分析成本高。这也是环境中抗生素污染研究难以广泛和深入开展的重要原因[2-3]。目前, 国内的一些分析研究报道多集中于药品质量控制、血液和食品等样品中抗生素的残留分析[4-5], 较少涉及有关环境中微量抗生素污染分析的报道。

收稿日期: 2005- 04- 18; 修回日期: 2005- 07- 10

基金项目: 广东省自然科学重点基金资助项目 (04101183); 有机地球化学国家重点实验室开放基金资助项目 (OGL- 200402); 香港理工大学基金资助项目 (PolyU A- PF64)

作者简介: 刘玉春 (1979-), 男, 湖南芷江人, 硕士研究生; 邹世春, 联系人, Tel: 020- 84114134, E-mail: ceszsc@zsu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

环境样品中抗生素分析常用固相萃取柱如 C_{18}和 HLB进行分离和富集[6-7]，然后以气－质联用(GC-MS)或液－质联用(LC-MS)进行检测[8-9]。GC-MS多适于稳定、易气化、相对分子质量较小的非极性化合物的测定；对相对分子质量较大、挥发性低且有一定极性的抗生素，现大多采用 LC-MS测定。

本工作选择用量大、稳定性较高的红霉素、脱水红霉素以及罗红霉素为研究对象(其结构如图 1所示)，利用以苯乙烯－二乙烯苯共聚物为主体的 HLB固相萃取小柱进行分离富集，液相色谱－质谱/质谱(LC-MS/MS)定量测定河水中上述药物含量，结果令人满意。

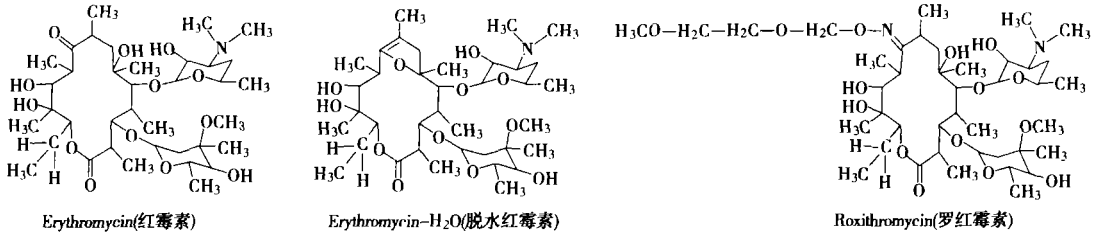

图 1 大环内酯类抗生素的结构

Fig. 1 Molecular structures of the macrolides

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Agilent 1100高效液相色谱仪和 ABI/SCIEX API4000 MS/MS液质联用仪；Oasis HLB柱(Waters，6 mL/500 mg)；快速混匀器(QL-901江苏麒麟医用仪器厂)，真空泵，沙芯漏斗以及过滤膜(0.45 μm，Durapore)等。

1.2 试剂与标准溶液

甲醇与乙腈均为色谱纯(Sigma公司)，其它试剂未做说明均为优级纯；红霉素、罗红霉素标样(99%，Sigma公司)；水为超纯水(经过 Milli-Q超纯水器处理过的纯水)。

分别称取一定量的红霉素和罗红霉素标准品，用乙腈配制成 500 μg/mL储备液。使用时，取适量储备液，以体积比为 1∶1的乙腈－水稀释至所需浓度；用 3.0 mol/L的 H_2SO_4调节红霉素标准溶液的 pH等于 3.0，在室温下保持至少 4 h，即得到对应浓度的脱水红霉素标准溶液。

1.3 实验方法

1.3.1 分离富集步骤 河水样品取自珠江水面下深约 1 m处。水样经静置后，将上层清液通过 0.45 m的滤膜真空抽滤，除去悬浮物。取 1 L水样倾入预先分别经 3 mL甲醇和超纯水淋洗过的 HLB固相萃取柱，开启真空泵，控制流速约为 15 mL/min，完成过柱后，再将柱于 N_2保护下干燥 1 h，最后，以 6 mL甲醇淋洗，洗脱液收集于 10 mL具塞离心管中。在室温下用 N_2吹扫至近干，并用液相色谱流动相定容至 1 mL，待测。

1.3.2 测量条件 色谱条件：色谱柱，ODS-P(4.6 mm×250 mm，DIKMA)；进样量，20 μL；流动相为乙腈(A)和 0.2%甲酸溶液(B)，流速 0.4 mL/min，梯度淋洗程序，40% A保持 8 min，然后在 2 min内将 A线性增加至 60%并保持 15 min，随后在 5 min内降低 A至 40%并保持 5 min。

质谱条件：离子源为 ESI，离子源Ⅰ(GS1)和Ⅱ(GS2)的气体流速分别为 20和 40 mL/min，碰撞气和气帘气流速分别为 6和 15 mL/min，气体均为 N_2；辅助加热气温度，450 ℃；电离电压，5 500 V。去簇电压(declustering potential，DP)、碰撞能(collision energy，CE)及 3种抗生素的其它相关质谱条件见表 1。检测方式为多反应选择监测(MRM)离子模式。

表 1 3种抗生素的相关质谱条件

Table 1 The mass spectral conditions for the determination of macrolides

Antibiotics	DP(*V*/V)	CE(*V*/V)	Molecular ion(*m*/*z*)	Fragment ion(*m*/*z*)
Erythromycin(红霉素)	120	25	733.9	576.6
Erythromycin-H_2O(脱水红霉素)	120	25	716.1	558.3
Roxithromycin(罗红霉素)	120	54	837.1	158.2

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果与讨论

2.1　影响 SPE 萃取效率的因素

分别考查了可能会影响 SPE 萃取的几种主要因素，如 pH 值、样品流速和洗脱体积。结果表明，pH 3~9对大环内酯类抗生素影响不大；样品流速在 5~20 mL/min，对抗生素回收率影响不大，但样品流速超过 20 mL/min，回收率则有明显下降，考虑到萃取时间，一般应控制样品流速在 15~20 mL/min之间；当甲醇洗脱体积为 6 mL时，目标物即可被完全洗脱，本实验选择甲醇的洗脱体积为 6 mL。

2.2　大环内酯类抗生素的质谱特征

将 3种抗生素标准溶液进行全扫描，找出准确的 $[M+1]^+$ 峰，然后分别以分子离子峰为母离子进行轰击，找出信号较强的碎片离子，以母离子与子离子组成监测离子对，以多反应检测(MRM)对待测物进行定性和定量分析，优化各种质谱条件。信号最强的离子对往往为定量提供了高灵敏度，而其它离子对则可提供辅助定性信息。因此，在进行 MRM 检测方式时选择信噪比(S/N)最高的离子对进行检测，以提高质谱确证的准确性。实验结果表明质谱的去簇电压(DP)、碰撞能(CE)对 ETM、ETM－H_2O 及 RTM 的裂解有重要影响，特别是 CE 的影响尤为显著。表 2给出了不同 CE 值(25，40和 54)下 3种抗生素裂解产物的差异。

表 2　各抗生素在不同碰撞能条件下的质谱参数

Table 2　MS/MS parameters in various CE values

Antibiotics	CE(碰撞能) V/V		
	25	40	54
Erythromycin (红霉素)	733.9 $[M+H]^+$	733.9	733.9
	576.6 $[M+H-desosamine-H_2O]^+$	158.2	158.2
	158.2 $[desosamine+H]^+$		
Erythromycin－H_2O (脱水红霉素)	716.6 $[M+H]^+$	716.6	716.6
	558.3 $[M+H-desosamine-H_2O]^+$	558.3	158.2
		540.4 $[M+H-desosamine-2H_2O]^+$	
Roxithromycin (罗红霉素)	837.1 $[M+H]^+$	837.1	837.1
	679.6 $[M+H-desosamine]^+$	679.6	158.2
		158.2	

该实验结果显示，当碰撞能为 25 V 时，二级质谱的基峰是分子离子峰，随着碰撞能的不断加大，分子离子峰的强度逐渐下降，碎片增多，且碎片离子强度增大；当碰撞能提高至 54 V，3种抗生素的主要的碎片离子峰均为去氧氨基糖碎片峰(desosamine)，而且这些去氧氨基糖片段很容易形成脱水的带电离子。

2.3　线性范围及检出限

在经过优化的色谱和质谱条件下，ETM、ETM－H_2O 和 RTM 混合标样均可得到良好的响应和分离(图 2)。各化合物在 10~2 000 ng/L范围内具有良好的线性(y为质谱信号响应，x为质量浓度)，见表 3，测量红霉素、脱水红霉素和罗红霉素的定量下限为 5 ng/L(S/N均大于 10)。

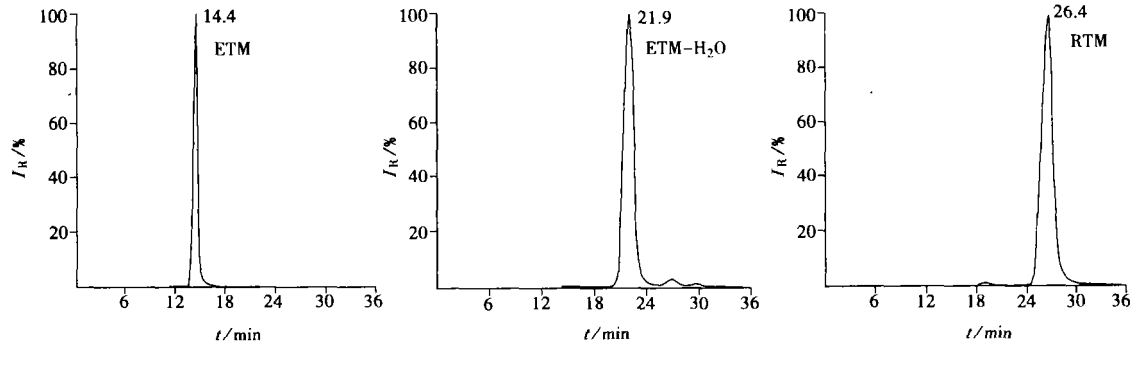

图 2　抗生素混合标样(20 g/L)的选择离子对色谱图

Fig. 2　Selective ion pair chromatograph of the standard(20 g/L)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 线性关系、相关系数(n= 5)

Table 3 Linear equations and correlation coefficients of the macrolides(n= 5)

Antibiotics	Linear equation	Correlation coefficient r
Erythromycin(红霉素)	$y = 1.36\times10^{4}x + 1.03\times10^{5}$	0.999
Erythromycin-H_2O(脱水红霉素)	$y = 6.81\times10^{4}x + 1.05\times10^{6}$	0.997
Roxithromycin(罗红霉素)	$y = 8.89\times10^{4}x + 1.36\times10^{6}$	0.997

2.4 方法回收率及实际样品分析

考虑到目标抗生素在实际样品中的含量水平和范围，分别于 1 L纯水中加入 20及 100 ng 3种大环内酯抗生素标准物，同样，对实际河水样品也进行加标回收实验。由实验结果可以看出，对纯水和实际样品的加标回收率大多在 80% 以上(表 4)，其相对标准偏差(RSD)小于 8.6%，这表明该方法测定河水中微量大环内酯抗生素是可行的。

表 4 3种抗生素的加标回收率(n= 3)

Table 4 Spiking recoveries for three antibiotics in pure and real water samples(n= 3)

Antibiotics	Added m_A/ng	Pure water			River water			
		Found ρ_F/(ng·L^{-1})	Recovery R/%	RSD s_r/%	Original ρ_0/(ng·L^{-1})	Found ρ_F/(ng·L^{-1})	Recovery R/%	RSD s_r/%
Erythromycin	20.0	22.1	111	3.7	164	182	92	8.6
	100.0	95.2	95	4.9		248	84	6.2
Erythromycin-H_2O	20.0	14.3	71	5.6	291	306	73	7.9
	100.0	85.7	86	4.3		371	80	4.4
Roxithromycin	20.0	17.1	86	7.5	134	151	84	8.2
	100.0	101	101	5.8		224	90	5.7

实际河水样品中的色谱图如图 3，河水中红霉素、脱水红霉素和罗红霉素的质量浓度分别为 164，291和 134 ng/L(表 4)。值得注意的是，这些测量值均远高于欧洲易北河(River Elbe)河水中同类抗生素 30~ 70 ng/L的含量水平[10]，表明珠江河流中抗生素污染较为严重。另外，在珠江河水检出未脱水红霉素原药成份(164 ng/L)，说明河水中抗生素除了来源于人或动物服用后的排泄外(脱水红霉素)，还有相当的抗生素污染可能来源于诸如水产养殖过程中的直接投放和制药厂的直接排放。

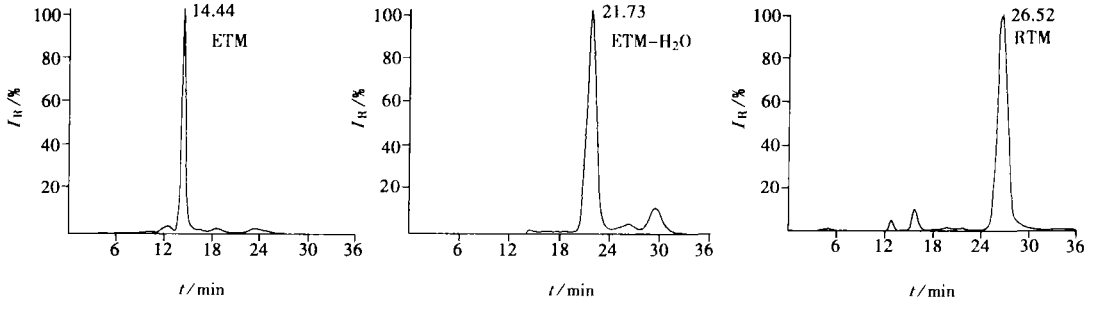

图 3 实际水样的选择离子对色谱图

Fig. 3 Selective ion pair chromatograms of river sample

参考文献:

[1] DAUGHTON C G, TEMES T A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment agents of subtle change [J]. Environmental Health Perspectives(suppl), 1999, 107: 907-938.

[2] VERZEGNASSI L, SAVOY-PERROUD M C, STADLER R H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey[J]. J Chromatogr, A, 2002, 977: 77-87.

[3] CHRISTA S, MCARDEL L, MOLNAR E. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt valley watershed, Switzerland[J]. Environmental Science and Technology, 2003, 37(24): 5479-5486.

[4] 林 峰, 林海丹, 吴映璇, 等. LC-MS-MS测定烤鳗中四种氟喹诺酮药物残留量[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 43-47.

[5] 徐维海, 林黎明, 朱校斌, 等. 水产品中 14种磺胺类药物残留的 HPLC法同时测定[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 122-124.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] HIRSCH R, TERNES T A, HABERER K, et al. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 1998, 815: 213-223.
[7] GOBEL A, MCARDELL C S, SUTER M J-F, et al. Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatgraphy coupled to electrospray tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2004, 76: 4756-4764.
[8] CANNAVAN A, ARMSTRONG HEWITT S, BLANCHFLOWER W J, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative[J]. Analyst, 1996, 121: 1457-1461.
[9] MARTIN J, THOMAS K V J. Determination of selected human pharmaceutical compound in effluent and surface water sample by high-performance liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 1015: 129-141.
[10] WIEGEL S, AULINGER A, BROCKMEYER R, et al. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries[J]. Chemosphere, 2004, 57: 107-126.

关于召开“全国第一届近红外光谱学术会议”的征文通知

中国分析测试协会和中国石油学会石油炼制分会拟于 **2006**年 **11**月 **8~10**日在北京主办全国第一届近红外光谱学术会议。届时将邀请国内经验丰富的近红外光谱分析专家学者和仪器专家作专题报告，并进行近红外光谱分析技术交流。热忱欢迎光谱学界专家教授及广大从事分析测试技术工作的科技人员踊跃撰稿，会议将编辑论文集，并推荐优秀论文在《分析测试学报》及《现代科学仪器》等杂志上发表。会议热烈邀请国内外仪器厂商前来展出近红外光谱仪以及其它各种分析仪器。

征文内容如下：

(1) 近红外光谱基础理论研究；
(2) 近红外光谱分析技术国内外发展综述；
(3) 近红外光谱仪器新设计、新技术；
(4) 化学计量学方法在近红外光谱分析中的应用研究；
(5) 化学计量学软件的研制、校正模型数据库的开发和网络技术；
(6) 近红外光谱校正模型建立规范、技巧与经验；
(7) 近红外光谱在农业、石化、烟草、食品、制药、纺织、医学和矿物等领域的应用；
(8) 近红外光谱分析方法的标准化。

论文截稿日期：**2006**年 **7**月 **25**日；参展厂商报名截止日期：**2006**年 **10**月 **20**日。

论文投寄方式：推荐采用电子邮件方式，磁盘函寄也可。

联系人：褚小立、王艳斌、许育鹏，电话：**010-82368342**。

电子邮件：**nir2006@sina.com**、**nir2006@163.com**(建议向两个邮箱同时发送)。

通讯地址：北京市 **914**信箱第一分箱，邮编：**100083**

会议通知可参见仪器信息网站，网址：**http://www.instrument.com.cn/conference**

中国分析测试协会 中国石油学会石油炼制分会

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net