

使用超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 测定水中的磺胺类 抗生素

作者

张秀蓝, 杨文龙, 杜兵, 董亮, 张烃
国家环境分析测试中心, 中国北京

范红利, 吴翠玲, 吕美玲
安捷伦科技(中国)有限公司, 中国北京

摘要

为快速、同步检测磺胺类抗生素, 有效控制水体中的磺胺类抗生素含量, 本应用简报介绍了一种将 HLB 固相萃取 (SPE) 与超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 联用技术相结合来同时测定水中 18 种磺胺类抗生素和共生物甲氧苄氨嘧啶的可靠方法。在 2.0–100 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内, 所有目标化合物的线性关系良好, R^2 均高于 0.995; 方法检出限在 0.3–1.9 ng/L 之间, 定量限在 1.2–7.6 ng/L 之间; 空白水中浓度为 4、10、100 和 200 ng/L 的目标化合物的加标回收率在 61.0%–118% 的范围内, 其中绝大部分目标化合物的加标回收率在 74.3%–118% 的范围内, 且六次平行测定的回收率相对标准偏差 (RSD) 小于 14%。地表水基质中加标浓度为 100 ng/L 的各目标化合物同样获得了良好的回收率 (73.4%–102%) 和 RSD (0.2%–8.8%)。这些结果表明, 所开发的方法灵敏、准确、可靠, 适用于测定水体中的磺胺类抗生素残留, 并为我国水环境中抗生素类新污染物检测方法标准体系的建设提供了一定参考。

前言

抗生素自 20 世纪被发现以来,广泛应用于动物疾病防治、畜牧及水产养殖和人类医疗等领域。磺胺类抗生素 (sulfonamides, SAs) 是一类以对氨基苯磺酰胺为基本结构的广谱抗生素,主要用于人类和家畜细菌传染病的预防和治疗^[1]。另外,磺胺类抗生素也作为促进动物生长的饲料添加剂被大量使用。随着我国对磺胺类抗生素的消费量日益增长,此类抗生素成为残留于水环境中的主要抗生素类别之一。

目前,有关磺胺类抗生素残留的检测方法研究主要集中在动物源食品中^[2-3],而且尚不存在关于环境介质(例如水、沉积物、土壤)中磺胺类抗生素残留水平的监管规定。现有的磺胺类抗生素检测方法包括微生物抑菌法、薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法、酶联免疫吸附法、毛细管电泳法和液相色谱-串联质谱法等。其中液相色谱-串联质谱法灵敏度高、选择性好,适用于对含量较低的目标化合物进行定性和定量分析,是目前较为常用的检测方法^[4]。环境水样中磺胺类抗生素的提取和净化主要包括固相萃取和基质固相分散萃取,其中固相萃取法是较常用的净化方法。

本研究团队前期基于 Agilent Bond Elut PPL SPE 小柱富集净化技术,开发出一种测定磺胺类抗生素的超高效液相色谱-串联质谱联用的高灵敏检测方法^[5]。该方法需要采用氨水甲醇溶液将所有目标分析物充分从 PPL SPE 小柱洗脱下来,以保证高的回收率。为进一步简化该方法,本研究采用基于 Agilent Bond Elut HLB SPE 小柱的样品前处理方法,仅通过甲醇洗脱即可实现水中磺胺类抗生素的高效回收;然后采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术进行检测,为水环境中磺胺类抗生素残留检测提供了一种灵敏、准确、可靠、便捷的解决方案。

实验部分

试剂和样品

实验用 18 种磺胺类抗生素和 1 种磺胺类共生物(甲氧苄氨嘧啶)以及四种同位素标记的化合物(IS 1-IS3 为内标;IS4 为替代物)均购自阿尔塔科技有限公司(天津),详细的化合物信息如表 1 所列;甲醇为 LC/MS 级,购自 Merck;实验用水为 Milli-Q 水;其他试剂(包括甲酸、氨水和乙酸铵等)均为 HPLC 级,购自 Sigma-Aldrich;空白水样为购自当地市场的瓶装纯净水;地表水样采集自当地河流。

仪器和设备

采用 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 与 Agilent 6470 三重四极杆质谱联用系统,其中 1290 Infinity II UHPLC 配备如下安捷伦模块:内置脱气机的 1290 Infinity II 二元泵(部件号 G7120A)、具有针座反冲功能的 1290 Infinity II 自动进样器(部件号 G7167B)和柱温箱(部件号 G7116B)。

色谱柱选用 Agilent Infinity Poroshell 120 EC C18 (2.1 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号 695575-902)。

采用 Agilent Bond Elut HLB 固相萃取小柱(规格:500 mg, 6 mL, 部件号 5610-2147)对水样进行富集与净化。用 Agilent ValueLab 尼龙滤膜(0.2 μm, 部件号:5191-4286)对复溶后的样品进行过滤。

标准曲线的配制

准确移取适量的磺胺类化合物标准储备液(100.0 μg/mL)、替代物储备液(100.0 μg/mL)和内标储备液(100.0 μg/mL),分别用纯甲醇稀释到 10.0 μg/mL、1.0 μg/mL 和 1.0 μg/mL,形成相应的使用液。分别向甲醇水溶液(V:V = 1:1)中添加适量的磺胺类化合物标准使用液、替代物使用液和内标使用液,制备 7 个浓度点的标准系列,使磺胺类化合物的浓度分别为 2.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L 和 200 μg/L(参考浓度),替代物和内标的浓度均为 20.0 μg/L,混匀后测定,然后绘制标准曲线用于定量。可以采用外标法或内标法定量。

样品前处理

取 500 mL 水样,按照图 1 所示的流程进行样品前处理。简言之,在该过程中,取 500 mL 水样,经石英膜过滤后,向其中加入 0.25 g EDTA 二钠盐,并充分溶解;用盐酸将 pH 值调节至 4-7;然后加入 20 ng 同位素替代物(IS4);将水样以约 5-10 mL/min 的流速通过预先活化的 HLB 固相萃取柱(上样前依次使用 6 mL 甲醇和纯水活化 HLB 柱)以富集目标化合物;然后用 6 mL 纯水淋洗 HLB 柱,用真空泵将 HLB 柱干燥 10 min;然后使用 8 mL 甲醇洗脱 HLB 柱,收集洗脱液;将洗脱液在 40 °C 氮气吹扫浓缩近干,然后用 1 mL 50% 甲醇水溶液将其复溶,向其中加入 20 ng 同位素内标(IS1-IS3)并混匀;过 0.2 μm 尼龙滤膜后上机分析。

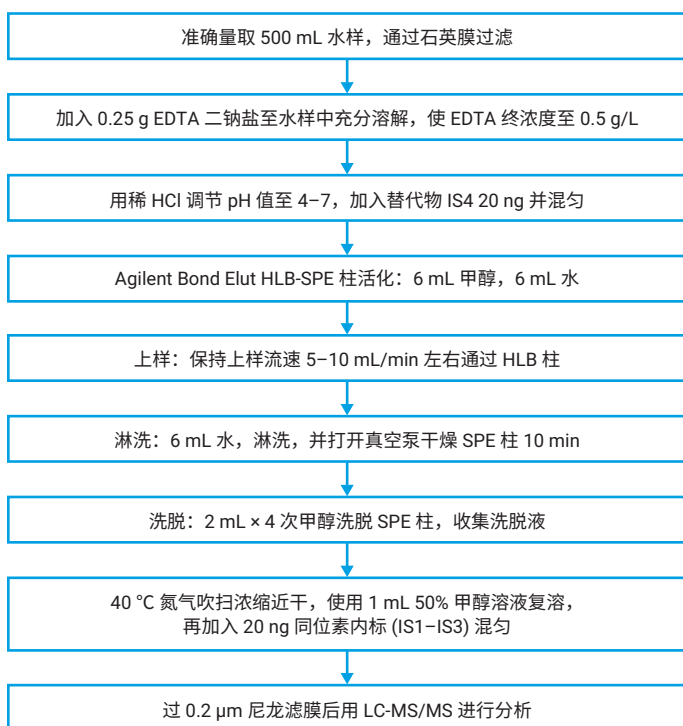


图 1. 样品前处理流程图

液相色谱条件

色谱柱: Infinity Poroshell 120 EC C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm
 流动相: A) 0.1% 乙酸水溶液
 B) 甲醇
 流速: 0.30 mL/min
 柱温: 35 °C
 进样量: 2.0 μL
 后运行时间: 3 min
 梯度:

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
8	60	40
12	35	65
13	5	95
16	5	95

质谱条件

离子源: 安捷伦鞘流电喷雾离子源 (AJS)
 电离模式: 正离子
 毛细管电压: 3500 V
 喷嘴电压: 500 V
 雾化器气体 (N₂) 压力: 30 psi
 干燥气 (N₂) 温度: 325 °C
 干燥气流速: 6 L/min
 鞘气 (N₂) 温度: 350 °C
 鞘气流速: 11 L/min
 采集模式: MRM (各化合物的 MRM 参数详见表 1)

结果与讨论

LC-MS/MS 条件的优化

磺胺类抗生素均含有对氨基苯磺酰胺结构 (如图 2A 所示), 其中 -NH₂ 在酸性流动相条件下电喷雾离子化时容易发生质子化。因此, 选择酸性流动相和正离子模式, 并在此条件下优化 MS/MS 采集参数, 最终所得的 MRM 参数列于表 1 中。实验发现, 甲醇/酸化水流动相体系能够使两组异构体 (磺胺甲氧哒嗪 (RT 6.44 min)/磺胺对甲氧嘧啶 (RT 7.23 min)/磺胺间甲氧嘧啶 (RT 8.08 min); 磺胺多辛 (RT 8.62 min)/磺胺地托辛 (RT 11.19 min)) 获得基线分离, 如图 2B 中箭头所示, 而采用乙腈/酸化水时, 异构体磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶难以达到基线分离, 而二者的质谱采集参数相同, 会影响定量的准确度, 因此选择甲醇/酸化水作为二元流动相。实验发现全多孔填料 Agilent Eclipse Plus C18 和薄壳层填料 Poroshell EC-C18 色谱柱在甲醇/酸化水条件下均能使异构体获得基线分离。本研究最终选用 Poroshell EC-C18 色谱柱, 主要是由于其填充有键合薄壳层填料, 反压相对较低。进一步调整梯度洗脱条件, 以确保分析物在短时间内从色谱柱上洗脱并获得良好分离。如图 2B 所示, 除了两组异构体基线分离外, 对于其它化合物之间的分离, 除了甲氧苄氨嘧啶 (RT 6.28 min) 和磺胺甲氧哒嗪 (RT 6.44 min)、磺胺异恶唑 (RT 8.56 min) 和磺胺多辛 (RT 8.62 min) 外, 其它化合物间也完全基线分离, 从而排除了大部分化合物之间可能存在的彼此干扰。实验表明, 适当延长高有机相组成 (95% 甲醇) 下的冲洗时间 (3-4 min), 可以有效去除残留在色谱柱上的强保留基质组分, 并且有利于保持色谱柱的稳定性和使用寿命。

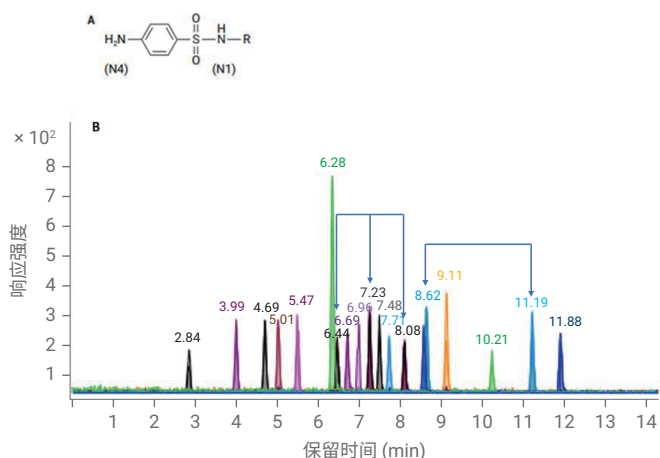


图 2. (A) 磺胺类抗生素的共同结构, (B) 磺胺类抗生素 (2 ng/mL) 的典型叠加 MRM 色谱图

表 1. 19 种分析物及四种同位素标记物质的 MRM 采集参数

序号	名称	母离子 m/z	定量离子			定性离子	
			碎裂电压 (V)	m/z	CE (V)	m/z	CE (V)
1	磺胺醋酰	215.2	65	156	7	108	20
2	磺胺嘧啶	251.3	100	156	16	92	32
3	磺胺噻唑	256	100	156.1	14	65.2	56
4	磺胺吡啶	250.3	110	91.9	32	156	16
5	磺胺甲噁啶	265.3	110	92	32	65.2	58
6	甲氧苄氨嘧啶	291.3	120	230.1	26	261	28
7	磺胺甲氧哒嗪	281.3	100	156	16	92.2	32
8	磺胺甲二唑	271.3	90	92.1	28	65.1	56
9	磺胺二甲噁啶	279.3	100	65.2	64	92.1	32
10	磺胺对甲氧嘧啶	281.3	110	156	16	92.2	34
11	磺胺氯哒嗪	285	100	156	14	92	36
12	磺胺甲恶唑	254.3	100	65.2	54	156	16
13	磺胺间甲氧嘧啶	281.3	70	156	18	92.2	34
14	磺胺异恶唑	268.3	100	155.9	12	92.1	30
15	磺胺多辛	311.4	130	156	18	92	34
16	磺胺苯甲酰胺	277.2	80	156	12	108	28
17	磺胺苯吡唑	315.4	130	65	78	92	43
18	磺胺地托辛	311.4	130	156	22	92	38
19	磺胺噻恶啉	301.4	110	156.1	16	92.1	36
IS1	13C6-磺胺吡啶	256	110	162	17	-	-
IS2	13C3-甲氧苄氨嘧啶	294	120	230	38	-	-
IS3	13C6-磺胺地托辛	317	130	162	21	-	-
IS4	13C6-磺胺甲二唑	277	90	162	28	-	-

样品前处理程序的优化

本研究选用 Agilent Bond Elut HLB SPE 小柱 (500 mg, 6 mL) 富集和净化水中的磺胺类抗生素。HLB 填料由二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮这两种单体按一定比例聚合而成, 对从极性到非极性的各类化合物均有较好的保留性能。当水样 pH 值为 9 左右时, 磺胺醋酰和磺胺嘧啶的富集效果不能满足方法要求。实验结果显示, 适用于富集磺胺类抗生素的最佳 pH 范围为 4-7。进一步而言, 由于 EDTA 钠盐呈弱碱性, 因此向水样加入 EDTA 钠盐后, 需要在加载至 SPE 小柱之前检查水样的 pH 并将其调节至 4-7 的范围内。样品富集后, 使用 3 mL 甲醇可以回收大部分目标化合物, 但磺胺甲二唑和磺胺苯酰需要用 6 mL 甲醇洗脱才可得到较高的回收率。考虑到实际样品的复杂性, 本方法采用 8 mL 甲醇进行洗脱, 以实现对所有目标化合物的有效回收。最终优化得到的样品前处理流程如图 1 所示。

方法的线性和灵敏度

利用浓度 2.0 ng/mL 至 200 ng/mL 的磺胺类抗生素标准品对方法的线性范围进行评估。结果表明, 18 种磺胺抗生素和甲氧苄氨嘧啶在考察的浓度范围内均表现出优异的线性, 各化合物的线性回归决定系数 (R^2) 均高于 0.995。采用校准曲线最低浓度点的信噪比 (S/N) 的 3 倍来计算方法检出限 (LOD), 并按 LOD 的 10 倍来计算方法定量限 (LOQ)。结果显示, 各目标化合物的 LOD 在 0.3-1.9 ng/L 之间, LOQ 在 1.2-7.6 ng/L 之间, 表明该方法灵敏度高, 可以满足环境水体中磺胺类抗生素背景水平的检测, 具体数据详见表 2。

表 2. 19 种目标化合物的保留时间、线性、检出限、定量限以及在空白水和地表水中的加标回收率和精密度

序号	目标化合物	保留时间 (min)	线性 (R ²)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	空白水 (n = 6)								地表水 (n = 3)	
						4 ng/L		10 ng/L		100 ng/L		200 ng/L		100 ng/L	
						回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1	磺胺醋酰	2.84	0.999	0.29	1.16	93.3	7.1	109.2	6.7	90.3	4.7	101.2	10.4	95.0	3.6
2	磺胺嘧啶	3.99	0.999	0.77	3.08	108.5	6.1	107.4	5.8	107.0	3.1	110.1	5.1	94.4	2.1
3	磺胺噻唑	4.69	0.999	1.09	4.36	113.2	13.2	111.7	6.0	108.3	3.0	117.9	5.4	87.4	0.2
4	磺胺吡啶	5.01	0.999	0.83	3.32	105.2	9.4	101.3	8.8	101.0	2.8	105.1	4.1	85.3	3.4
5	磺胺甲噁啶	5.47	0.999	1.35	5.4	106.3	9.2	103.3	1.2	104.7	3.1	109.4	5.5	91.8	1.2
6	甲氧苄氨嘧啶	6.28	0.999	1.23	4.92	91.0	11.0	79.9	5.5	84.8	4.5	81.6	2.0	102.0	0.9
7	磺胺甲氧哒嗪	6.44	0.999	1.01	4.04	101.7	6.7	95.1	10.6	99.2	2.5	105.3	5.0	89.8	1.2
8	磺胺甲二唑	6.69	0.999	0.28	1.12	97.5	10.1	91.7	2.0	93.7	2.7	98.3	5.5	88.5	2.0
9	磺胺二甲噁啶	6.96	0.999	1.24	4.96	98.5	2.3	94.2	6.0	96.1	4.2	97.2	4.8	84.0	5.4
10	磺胺对甲氧嘧啶	7.24	0.999	1.35	5.4	93.7	8.3	97.2	4.4	93.1	4.0	97.6	4.2	94.6	3.1
11	磺胺氯哒嗪	7.48	0.999	0.86	3.44	97.7	6.3	98.2	3.5	101.3	4.7	107.4	5.9	88.6	4.9
12	磺胺甲恶唑	7.71	0.999	0.98	3.92	90.2	11.9	97.9	0.1	93.8	2.0	101.1	4.0	99.5	2.5
13	磺胺间甲氧嘧啶	8.08	0.999	0.31	1.24	69.0	11.7	80.0	7.1	74.3	3.7	83.4	5.3	94.3	5.3
14	磺胺异恶唑	8.56	0.996	1.51	6.04	61.0	12.1	64.2	0.9	78.2	3.5	97.2	5.7	87.5	4.5
15	磺胺多辛	8.62	0.999	1.24	4.96	91.5	9.5	95.9	0.7	94.9	4.6	101.8	5.9	77.9	6.8
16	磺胺苯甲酰胺	9.11	0.999	1.88	7.52	96.7	2.4	94.9	3.1	96.0	0.8	101.9	4.3	86.8	2.4
17	磺胺苯吡唑	10.21	0.999	0.83	3.32	88.7	2.8	90.6	3.4	95.8	4.4	101.8	4.5	78.4	7.0
18	磺胺地托辛	11.19	0.999	0.93	3.72	89.8	12.0	92.6	0.9	90.3	3.7	97.6	5.5	78.6	8.2
19	磺胺喹恶琳	11.88	0.999	1.26	5.04	91.7	13.1	92.9	5.6	90.1	1.6	97.4	5.5	73.4	8.8

方法准确度与精密度

向 500 mL 空白水样中分别添加 2、5、50、100 ng 磺胺类抗生素，制得加标浓度分别为 4、10、100 和 200 ng/L 的样品，对方法准确度与精密度进行评估。如表 2 显示，大多数目标化合物的加标回收率在 74.3%–118% 的范围内。仅磺胺异恶唑在加标浓度为 4 ng/L 和 10 ng/L 时的回收率偏低，略低于 65%。所有目标化合物 6 次平行添加的回收率相对标准偏差 (RSD) 均在 0.1%–13.2% 的范围内。

使用采集自当地的地表水进行加标回收实验。结果如表 2 所列。在 100 ng/L 的加标浓度下，各目标化合物的回收率在 73.4%–102% 之间，且三次平行测定得到的回收率 RSD 在 0.2%–8.8% 之间，表明该方法具有良好的准确度与精密度。

结论

本研究采用 HLB 固相萃取小柱进行富集净化，建立了一种同时测定水环境中 18 种磺胺类抗生素及其 1 种共生生物甲氧苄氨嘧啶的超高效液相色谱-串联质谱法。该方法在 2.0 ng/mL 至 200 ng/mL 的浓度范围内表现出良好的线性，所有 19 种目标化合物的线性回归决定系数均高于 0.995；并且方法灵敏度高，所有目标化合物的方法检出限在 0.3–1.9 ng/L 之间，定量限在 1.2–7.6 ng/L 之间；空白水样及地表水基质加标回收实验表明，所有目标化合物的加标回收率均为 61%–118% 且相对标准偏差小于 14%，表明该方法具有良好的准确度和精密度。该方法适用于准确测定水体中的磺胺类抗生素残留，并为建立水环境中抗生素类污染物检测方法标准体系提供了一定参考。

参考文献

- JIN L, JIANG L, HAN Q, et al. Distribution characteristics and health risk assessment of thirteen sulfonamides antibiotics in a drinking water source in East China. *Environmental Science*, 2016, 37(7): 2515-2521
- 杨梅, 孙思, 王安波, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中磺胺类药物残留量. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3633-3638
- ZHE M, SHI Z H, LIANG S X, et al. Residues investigation of fluoroquinolones and sulphonamides and their metabolites in bovine milk by quantification and confirmation using ultra-performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2015, 174: 597-605
- 张天, 王仁萍, 王猛, 等. 芬太尼的人体内分析及药动学研究进展. *药学服务与研究*, 2017, 17(3): 167-173
- Xiulan Zhang, Chaofei Zhu, Jing Guo, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定水中的磺胺类药物. 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-1676ZHCN, 2020

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE94742444

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2023
2023年8月28日, 中国出版
5994-6695ZHCN

