

超高效液相色谱串联质谱法测定水中的磺胺类药物



作者

Xiulan Zhang¹, Chaofei Zhu¹,
Jing Guo¹, Meiling Lu²,
Cuiling Wu², Wei Du²,
Wenlong Yang¹, Liang Dong¹,
Yeru Huang¹

¹ 国家环境分析测试中心
中国北京, 100029

² 安捷伦科技(中国)有限公司
中国北京, 100121

摘要

研究发现环境水体中抗生素污染相当广泛, 包括磺胺类抗生素。本应用简报介绍了一种将固相萃取 (SPE) 与液相色谱-串联四极杆质谱 (LC/MS/MS) 联用来测定水中磺胺类抗生素的可靠方法。所述的 LC/MS/MS 方法在纯水中线性关系良好, 在测试的 0.5–100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, 19 种磺胺类化合物的线性回归系数均高于 0.996。这些化合物的方法定量限 (LOQ) 值 ($S/N = 10$) 均处于 2 ng/L 或以下的水平。纯水中浓度为 20、200 和 400 ng/L 的加标回收率测试表明, 大多数化合物的回收率值在 70.5%–96.4% 的范围内, RSD ($n = 6$) 低于 15%。以地表水为基质, 在 20 ng/L 的浓度水平进行加标回收测试, 所有分析物的加标回收率均在 80.2%–89.5% 的范围内, RSD 低于 20%。这些结果表明, 所开发的方法灵敏、准确、可靠, 可以用于实际环境地表水的分析。

前言

据估计，全球每年人类和牲畜使用的抗生素超过 100000 吨，且由于大多数抗生素未经有效处理就排入环境，这些物质在环境中的归趋受到日益密切的关注^[1]。研究发现，在一些亚洲国家的水体中，某些特定抗生素的含量甚至高达 450 µg/L^[1]。此类污染可能引起抗生素耐药性，破坏微环境的平衡，并进一步影响生态系统。许多调查表明，磺胺类药物是中国水体中存在的主要抗生素类别之一^[2,3]。但是目前还没有一种稳定可靠的方法用于水体中这组抗生素的常规监测。美国 EPA 1694 方法中针对第 1 组分析物描述了一种包括 10 种磺胺类药物及其共生物在内的分析方法^[4]。在中国，磺胺类药物的用量大，涉及的种类多，在环境水基质中的存在经常见诸报道^[2,3]，常规监测方法仍然倾向于针对单一类别物质。本研究展示了一种使用 SPE 小柱净化富集和 LC/MS/MS 结合的方法同时测定水中 18 种常见的磺胺类药物和 1 种共生物的可靠方法。

实验部分

化学品与试剂

方法中共选择 19 种化合物进行监测，其中包括 18 种磺胺类药物和 1 种磺胺类共生物（甲氧苄啶）。此外，还包括四种同位素标记的内标 (IS1-IS4)，其中三种内标 (IS1-IS3) 作为回收内标，在样品

前处理前添加以用于内标法定量；剩余一种内标 (IS4) 作为进样内标，在样品前处理的最后一步加入，用于评估绝对回收率。详细的化合物信息如表 1 所示。采用 LC/MS 级甲醇 (Merck) 和 Milli-Q 水制备流动相。其它试剂（如甲酸、氨水和乙酸铵）均为 HPLC 级，购自 Sigma-Aldrich。

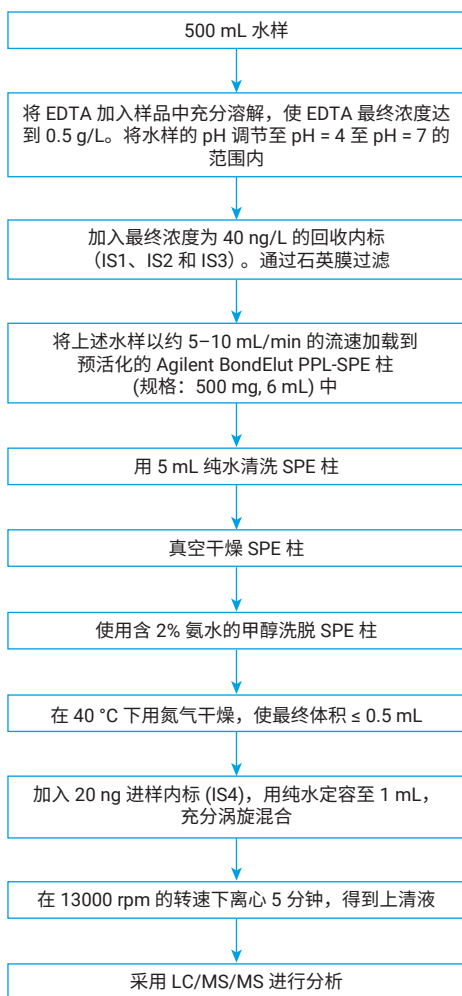
仪器条件

液相色谱条件			
Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统	• 1290 Infinity II 二元泵，内置脱气机 • 1290 Infinity II 自动进样器，具有针座反冲功能 • 柱温箱		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm		
流动相	A) 0.2% 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			
质谱仪	Agilent 6470 LC/MS/MS 和 Agilent Ultivo LC/MS/MS		
离子源	安捷伦喷射流 (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 (N ₂) 压力	30 psi		
干燥气 (N ₂) 温度	325 °C		
干燥气流速	6 L/min		
鞘气 (N ₂) 温度	350 °C		
鞘气流速	11 L/min		
采集模式	MRM		

方法

样品前处理过程

空白水样为购自当地市场的瓶装纯净水，地表水则采集自当地城市河流。样品体积可在 200–1000 mL 的范围内，在本文所述的方法中，采用 500 mL。根据以下流程图进行样品前处理。



结果与讨论

LC/MS/MS 条件的优化

磺胺类药物都含有一个共同结构 (如图 1A 所示)，在酸性条件下容易发生质子化。因此，使用 Agilent 6470 LC/MS/MS 选择正离子模式和酸性流动相来优化 MS/MS 采集参数，所得参数列于表 1 中。甲醇/酸化水能够使两组异构体获得基线分离，但乙腈/酸化水对异构体磺胺甲氧嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶的分离度较差。因此，选择甲醇/酸化水作为二元流动相。Agilent

Eclipse Plus 和 Poroshell 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。本研究选用 Poroshell 色谱柱，主要是由于其内填键合的薄壳层填料，反压相对较低。进一步调整梯度洗脱，以确保分析物在短时间内从色谱柱上洗脱下来并得到良好分离 (图 1B)。

另外，在高有机相组成下冲洗至少四分钟，以除去残留在色谱柱上的强保留基质组分。在 6470 LC/MS/MS 下优化得到的 MRM 离子对及其它参数也适用于 Agilent Ultivo LC/MS/MS 系统。

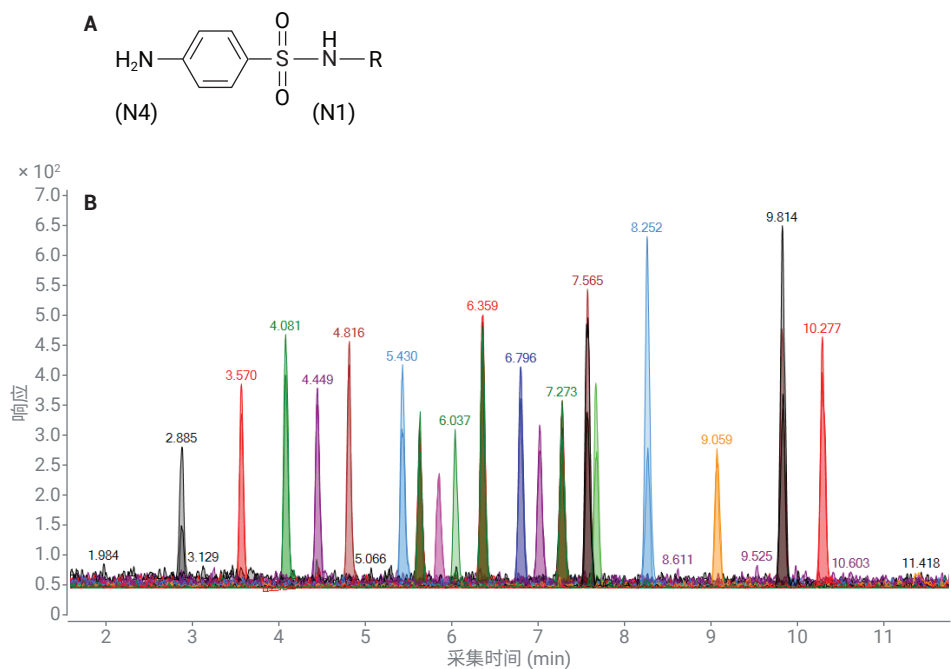


图 1. (A) 磺胺类药物的共同结构。(B) 磺胺类药物的典型叠加 MRM 色谱图。注：a). 各物质浓度均为 0.5 μg/L; b). 所用设备为 Agilent 6470 LC/MS/MS

表 1. 各分析物及内标物的 MRM 采集参数列表

序号	名称	RT (min)	母离子 m/z	碎裂电压 (V)	定量离子		定性离子		IS 标记
					m/z	CE (V)	m/z	CE (V)	
1	磺胺醋酰	2.88	215.2	65	156	7	108	20	IS1
2	磺胺嘧啶	3.57	251.3	100	156	16	92	32	IS1
3	磺胺噻唑	4.081	256	100	156.1	14	65.2	56	IS1
4	磺胺吡啶	4.444	250.3	110	91.9	32	156	16	IS1
5	磺胺甲噁啉	4.811	265.3	110	92	32	65.2	58	IS2
6	甲氧苄啶	5.430	291.3	120	230.1	26	261	28	IS2
7	磺胺甲氧哒嗪	5.629	281.3	100	156	16	92.2	32	IS2
8	磺胺甲二唑	5.844	271.3	90	92.1	28	65.1	56	IS2
9	磺胺二甲噁啉	6.037	279.3	100	65.2	64	92.1	32	IS2
10	磺胺对甲氧噁啉	6.354	281.3	110	156	16	92.2	34	IS2
11	磺胺氯哒嗪	6.796	285	100	156	14	92	36	IS2
12	磺胺甲恶唑	7.017	254.3	100	65.2	54	156	16	IS2
13	磺胺间甲氧噁啉	7.273	281.3	70	156	18	92.2	34	IS2
14	磺胺多辛	7.564	311.4	130	156	18	92	34	IS2
15	磺胺异恶唑	7.666	268.3	100	155.9	12	92.1	30	IS2
16	磺胺苯甲酰胺	8.257	277.2	80	156	12	108	28	IS3
17	磺胺苯吡唑	9.064	315.4	130	65	78	92	43	IS3
18	磺胺地托辛	9.824	311.4	130	156	22	92	38	IS3
19	磺胺喹恶啉	10.277	301.4	110	156.1	16	92.1	36	IS3
IS1	C ₁₃ -磺胺吡啶	4.444	256	110	162	17	-	-	-
IS2	C ₁₃ -甲氧苄啶	5.415	294	120	230	38	-	-	-
IS3	C ₁₃ -磺胺地托辛	9.824	317	130	162	21	-	-	-
IS4	¹³ C ₆ -磺胺甲二唑	5.844	277	90	2	28	-	-	-

样品前处理程序的优化

本方法选用 Agilent Bond Elut PPL SPE 柱富集和净化水中的磺胺类药物。最初，将未经 pH 调节的纯水加载到 PPL 柱上，然后选择含 2% 氨水的甲醇从柱上洗脱分析物。图 2 显示了经过第一次 2 mL 洗脱和第二次 2 mL 洗脱后收集的分析物的测试结果。除磺胺噻唑的总回收率为 54.3% 外，所有其它分析物的总洗脱回收率均高于 75%。考虑到磺胺噻唑的 pKa 约为 7.0，对样品的 pH 进行考察。如图 3 所示，当上样分析物为 20 ng/L 时，在 pH = 6.0 的条件下，所有磺胺类药物的回收率均高于 80%，而 pH = 9.0 时大部分分析物的回收率均很低。对 pH 的进一步详细考察表明，当 pH 在 4-7 的范围内时，均

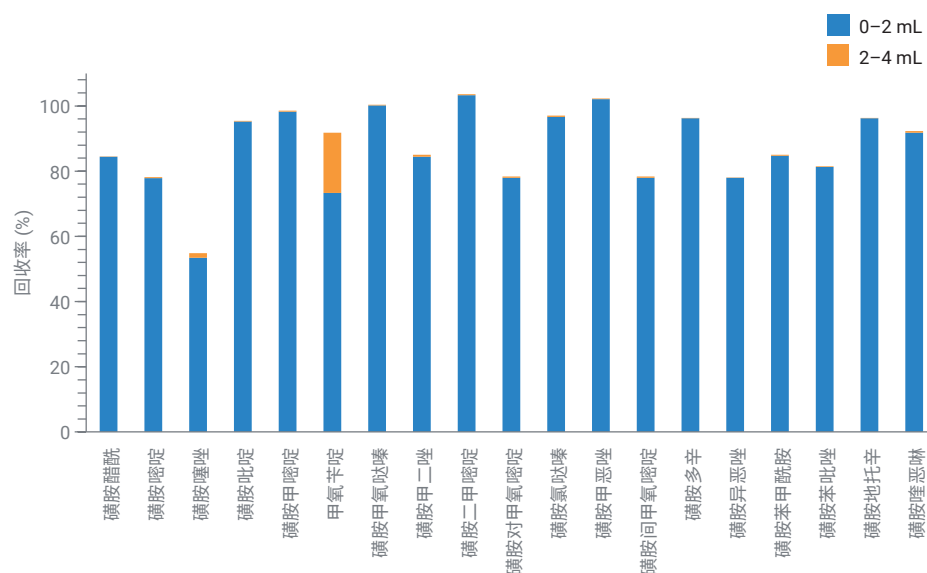


图 2. 在分步洗脱 SPE 柱得到的各分析物的累积回收率

可获得令人满意的回收率。因此，在将水样加载到 SPE 小柱上进行浓缩和净化之前，需要将水样的 pH 调节至 4-7 的范围内。

方法的线性和灵敏度

利用浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的磺胺类药物的甲醇溶液对方法的线性范围进行评估。采用同位素标记的内标法进行校准，以减小由基质干扰效应引起的定量偏差。如图 4 所示，所测试的磺胺类药物均表现出优异的线性，回归系数 (R^2) 都高于 0.996。

基于最低校准浓度 0.5 $\mu\text{g/L}$ 下获得的提取 MRM 色谱图，估算得出每个分析物在该浓度下的信噪比 (S/N)。结果表明，当使用 6470 LC/MS/MS 时，各磺胺类药物的 S/N 均大于 10，范围为 21-101 (图 5)。对于 Ultivo LC/MS/MS，除了四种分析物的 S/N 值略低于 10 外，其它分析物的 S/N 均高于 10，不过与 6470 LC/MS/MS 相比，大多数分析物的 S/N 较低 (图 5)。考虑到富集倍数为 500，经有效富集后，使用 6470 LC/MS/MS 和 Ultivo LC/MS 分别能够可靠地检测 500 mL 水中浓度低至 1 ng/L 和 2 ng/L 的分析物。

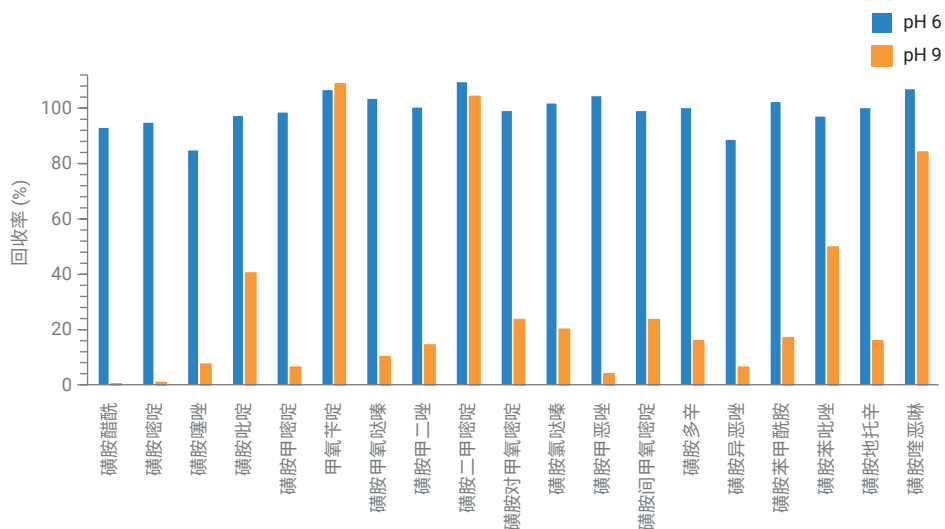


图 3. 不同 pH 水样富集和净化后回收率的比较

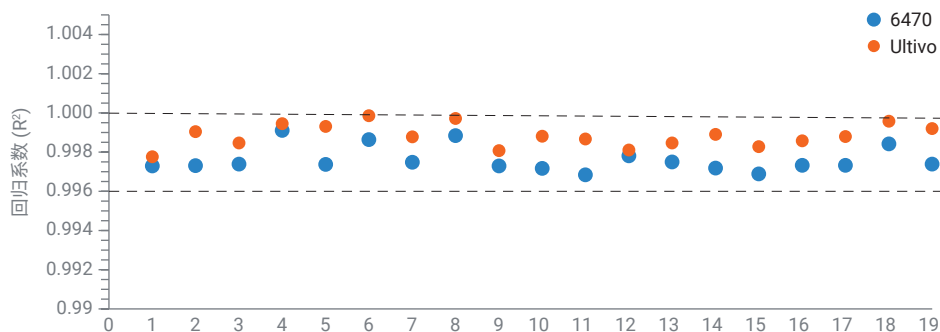


图 4. 应用 6470 LC/MS/MS 和 Ultivo LC/MS/MS 测定水中磺胺类药物的线性比较 (R^2)。注：浓度范围：0.5-200 $\mu\text{g/L}$ ；分析物序号 (X 轴) 同图 1B 的洗脱顺序，相应名称见表 1

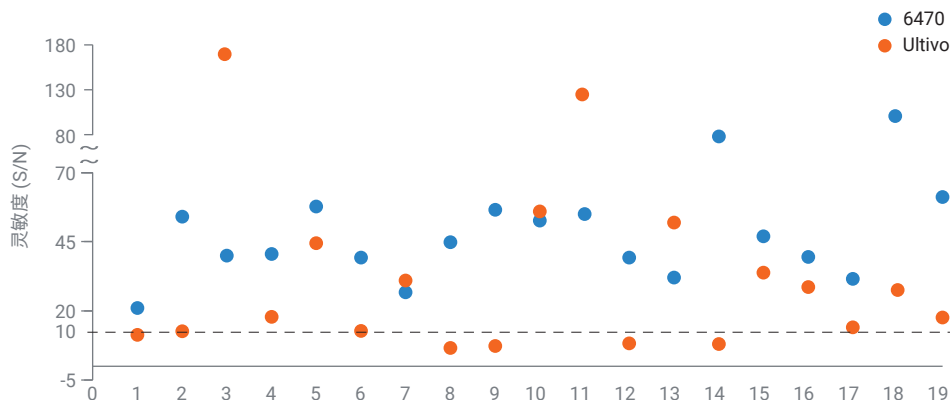


图 5. 最低校准浓度 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 下各种磺胺类药物的灵敏度 (S/N)。注：分析物序号 (X 轴) 同图 1B 的洗脱顺序，相应名称见表 1；色谱峰的噪音 (N) 基于峰峰算法得出

方法准确度与精密度

在 500 mL 水中分别添加 10、100、200 ng 磺胺类药物（相应浓度分别为 20、200、400 ng/L），对方法的准确度和精密度进行评估。图 6 显示，大多数添加回收率在 70.5%–96.4% 的范围内，只有加标浓度为 20 ng/L 的磺胺异恶唑的回收率偏低，略低于 60%，另外三个回收率值在 63.0%–69.7% 的范围内。所有分析物的 RSD 均在 0.3%–12.3% 的范围内。结果表明，该方法具有良好的准确度和可靠性。

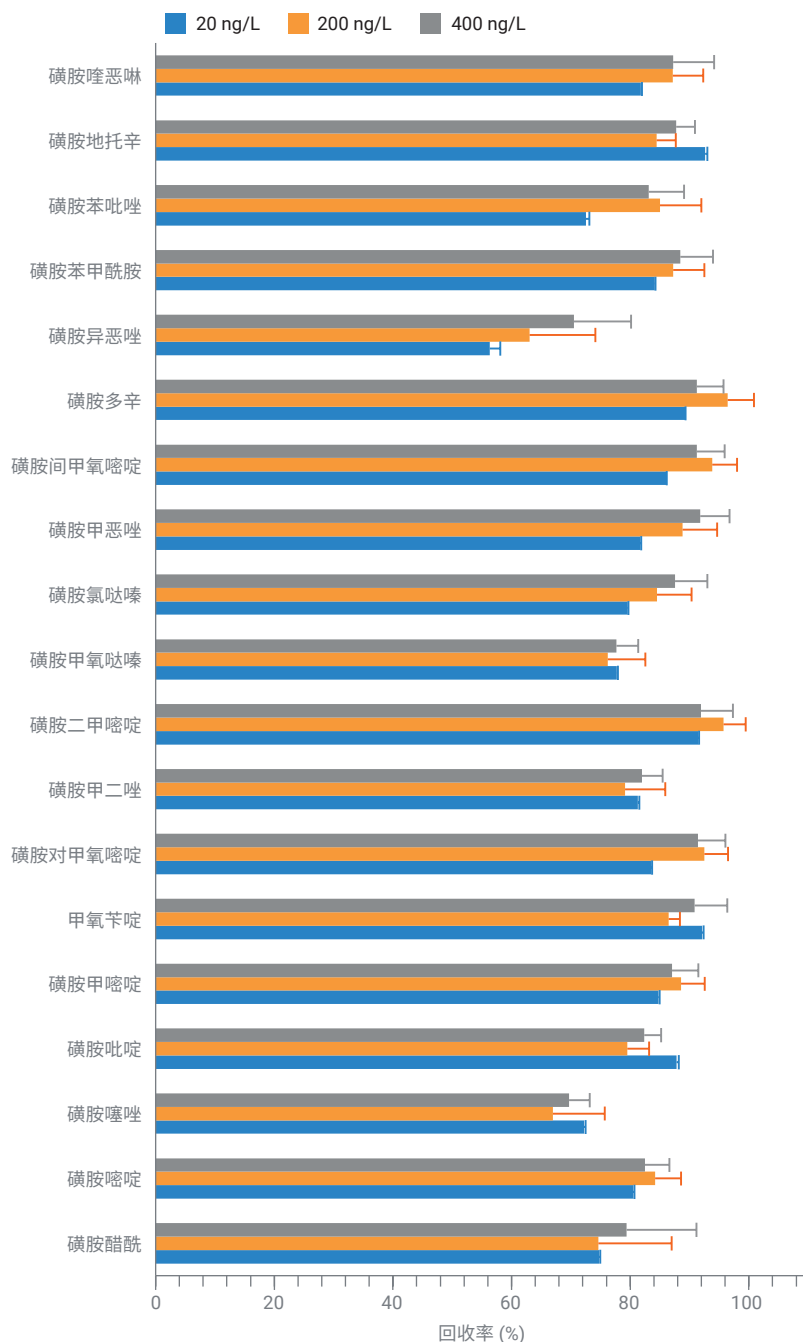


图 6. 纯水中不同加标浓度下磺胺类药物的回收率与精密度

将 10 ng 磺胺类药物加入 500 mL 地表水（采集自当地河流），对应的样品中的加标浓度为 20 ng/L，按照前述方法对加标样品进行前处理，并对回收率和精密度进行评估。表 2 所示，所有 19 种分析物的加标回收率均在 80.2%–89.5% 的范围内，RSD 低于 20% (n = 4)，表明该方法适用于地表水中该类分析物的检测。

结论

本研究展示了一种同时测定水中 19 种痕量磺胺类抗生素的 SPE-UHPLC/MS/MS 方法。无论采用 Agilent 6470 LC/MS/MS 还是 Agilent Ultivo LC/MS/MS，该方法均具有线性关系良好、灵敏度高、准确度和精密度高的特点，并符合中国 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中规定的标准^[5]。采用环境水基质对该方法的进一步评估表明，该方法能够可靠用于地表水中磺胺类药物的常规监测。

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

www.agilent.com

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，2020
2020 年 1 月 17 日，中国出版
5994-1676ZHCN
DE.1882060185

表 2. 地表水基质中加标浓度为 20 ng/L 的分析物的回收率和精密度 (N = 4)

序号	名称	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	磺胺醋酰	83.1	18.9
2	磺胺嘧啶	85.4	15.4
3	磺胺噻唑	85.6	16.4
4	磺胺吡啶	88.1	17.5
5	磺胺甲噁唑	84.5	14.7
6	甲氧苄啶	89.5	16.9
7	磺胺甲氧哒嗪	82.4	15.6
8	磺胺甲二唑	82.9	14.7
9	磺胺二甲噁唑	83.3	16.2
10	磺胺对甲氧嘧啶	81.9	15.5
11	磺胺氯哒嗪	81.7	14.9
12	磺胺甲恶唑	80.2	11.6
13	磺胺间甲氧嘧啶	82.0	14.6
14	磺胺多辛	83.1	15.1
15	磺胺异恶唑	81.8	13.3
16	磺胺苯甲酰胺	81.6	12.9
17	磺胺苯吡唑	80.3	15.4
18	磺胺地托辛	80.8	16.9
19	磺胺喹恶琳	80.7	16.5

参考文献

1. Danner, M.-C. *et al.* Antibiotic Pollution in Surface Fresh Waters: Occurrence and Effects. *Sci. Total Environ.* **2019**, 644, 793–804
2. Zhang, Q.-Q. *et al.* Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and lineage to bacterial resistance. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 6772–82
3. Wang, D. *et al.* Pharmaceutical and Personal Care Products in the Surface Water of China: A Review (in Chinese). *Chin. Sci. Bull. (Chin.)* **2014**, 59, 743–751, doi: 10.1360/972013-370
4. USEPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, **2007**
5. China GB/T 27417-2017: Conformity Assessment-Guidance on Validation and Verification of Chemical Analysis Method, **2017**