

大体积进样在线分析系统用于水中抗生素的直接检测

LCMSMS-183

摘要： 本文建立了大体积进样在线分析系统用于水中十种抗生素的直接检测方法。在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.070~0.18% 和 1.82~8.79% 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 0.027~1.0 ng/L 和 0.090~3.4ng/L。对自来水和广州某湖泊水进行检测，自来水中无检测到抗生素，而湖泊水中检出 2.4 ng/L 罗红霉素和 5.3 ng/L 克林霉素。本法允许进样量达到 1 mL 以上，全程自动化运行，灵敏度高、精密度好。

关键词： 抗生素 大体积进样 在线分析 三重四极杆质谱仪

2014 年底，央视记者联合水环境国家模拟重点实验室、北京师范大学的水科院的研究人员对我国部分地表水取样检测时发现：抗生素含量惊人！甚至在南京居民家中的自来水也有抗生素检出。记者在暗访中发现，某制药企业大量偷排抗生素污水，浓度超自然水体 10000 倍。因此建立水中痕量抗生素的快速、高灵敏的分析方法迫在眉睫。

大部分抗生素可以使用 C18 反相色谱结合 ESI-MS 检测器进行分析，但由于水中抗生素含量较低，一般都需要采集较大的样品体积经过固相萃取柱富集、浓缩、重溶后再进样分析，但该过程费时、费力，且容易出现误差。本文使用岛津大体积进样在线分析系统（流路设计见图 1），只需进行过滤处理，即可对 1-2 mL 的水样进行自动分析。

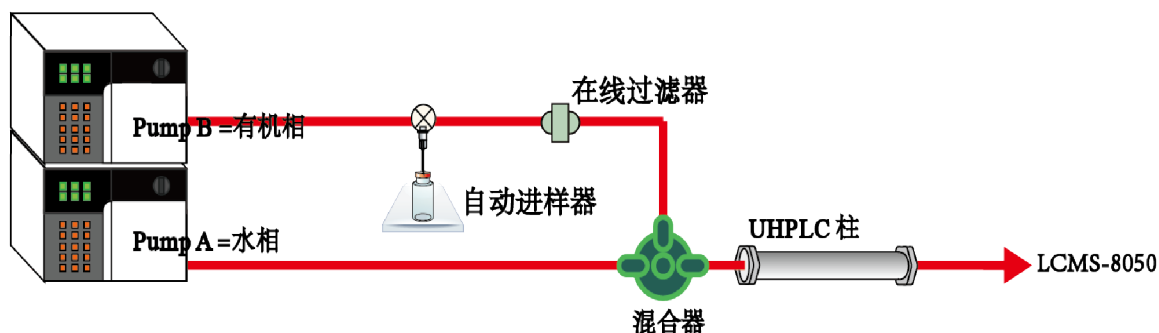


图1 大体积进样在线分析系统的流路设计

实验部分

1.1 仪器配置

本系统由岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 组成。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，180 μ L 混合器，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×50 mm L,
1.6 μ m 粒径

流动相：A= 甲酸 / 水 / 甲醇 (v/v=0.1/90/10)；

B= 甲酸 / 甲醇 (v/v=0.1/100)

流速：0.5 mL/min

进样体积：1 mL

柱温：40°C

自动进样器清洗液：R0=50% 甲醇水；R1=1% 甲酸乙腈；R2= 异丙醇 / 甲醇 / 乙腈 / 水 (v/v=1/1/1/1)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI 正负离子模式同时分析

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 11 ms

MRM 参数: 见表 2

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	95
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.01	Pumps	Pump B Conc.	5
2.80	Pumps	Pump B Conc.	5
3.00	Pumps	Pump B Conc.	50
7.00	Pumps	Pump B Conc.	60
7.50	Pumps	Pump B Conc.	100
9.50	Pumps	Pump B Conc.	100
9.51	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Controller	Stop	

表2 MRM参数

名称	英文名	CAS NO.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
林可霉素	Lincomycin	154-21-2	407.00	126.05	11	-30	-35
				359.10	11	-30	-21
金霉素	Chlorotetracycline	57-62-5	479.05	443.90	11	-18	-21
				461.95	11	-18	-22
罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	837.35	679.25	11	-32	-23
				158.05	11	-32	-35
克林霉素	Clindamycin	18323-44-9	425.00	126.05	11	-20	-29
				288.80	11	-20	-13
四环素	Tetracycline	60-54-8	445.00	410.05	11	-30	-24
				427.05	11	-30	-14
强力霉素	Oxytetracycline dihydrate	6153-64-6	445.2	428.05	11	-17	-20
				413.15	11	-17	-14
土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	461.15	426.05	11	-17	-21
				443.05	11	-17	-14
美他环素	Methacycline	914-00-1	443.15	426.05	11	-17	-15
				201.00	11	-17	-40
磺胺二甲异恶唑	Sulfadoxine	2447-57-6	268.00	155.95	11	-19	-14
				113.00	11	-19	-16
磺胺硝苯	Sulfanitran	122-16-7	-334.00	135.95	11	15	29
				136.95	11	15	32

*表示定量离子

1.3 样品制备

标样制备：1000 mg/L 浓度母液用甲醇溶解后 -20℃ 保存；以后各级用去离子水稀释，标曲各点浓度为：1 ng/L、2.5 ng/L、10 ng/L、25 ng/L、100 ng/L、250 ng/L 和 1000 ng/L。

样品前处理：自来水采自实验室，湖泊水在广州某湖泊采集得到，0.22 μm 滤膜过滤后进样。

■ 分析结果

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/L 混合标准样品的 MRM 色谱图如图 2 所示。

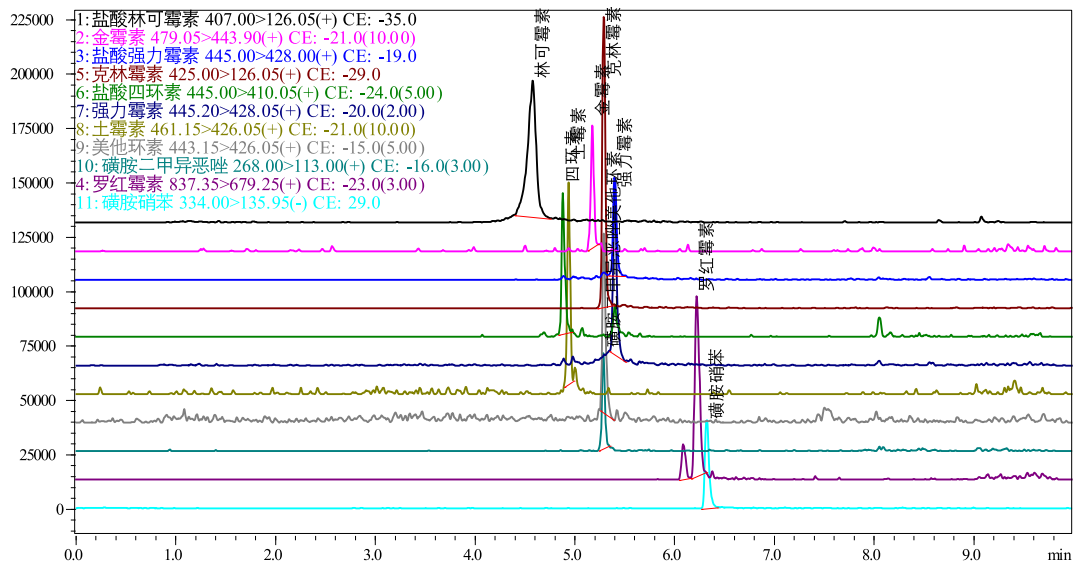


图2 十种抗生素10 ng/L标准样品的MRM色谱图

2.2 标准曲线和检出限

按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法制作校准曲线，如图 3 所示线性良好。线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 3：十种抗生素的线性相关系数均大于 0.9900，检出限介于 0.027~1.0 ng/L，定量限介于 0.090~3.4 ng/L 之间。

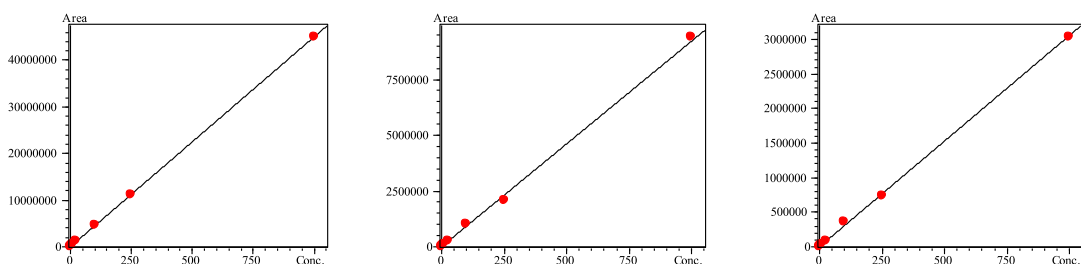


图3 林可霉素、罗红霉素和磺胺二甲异恶唑的标准工作曲线

表3 10种抗生素的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围 (ng/L)	检出限* (ng/L)	定量限 (ng/L)
林可霉素	$Y = (4.46078e+007)X + (-753.985)$	0.9997	1-1000	0.090	0.30
金霉素	$Y = (609652)X + (1072.76)$	0.9942	2.5-1000	0.50	1.6
强力霉素	$Y = (1.05094e+007)X + (5828.27)$	0.9929	1-1000	0.22	0.76
罗红霉素	$Y = (1.07988e+007)X + (3530.51)$	0.9964	1-1000	0.086	0.29
克林霉素	$Y = (2.88827e+007)X + (12292.1)$	0.9998	1-1000	0.027	0.090
四环素	$Y = (844850)X + (6480.51)$	0.9933	10-1000	0.25	0.85
土霉素	$Y = (1.17608e+006)X + (1842.02)$	0.9900	2.5-1000	0.53	1.8
美他环素	$Y = (3.59234e+006)X + (2309.35)$	0.9934	10-1000	1.0	3.4
磺胺二甲异恶唑	$Y = (2.97910e+006)X + (1653.73)$	0.9994	1-1000	0.37	1.2
磺胺硝苯	$Y = (1.02609e+007)X + (7607.23)$	0.9972	1-250	0.14	0.45

*3倍信噪比确定检出限, 10倍信噪比确定定量限。

2.3 精密度实验

对 25 ng/L 和 250 ng/L 两个浓度级别的标样进行分析, 平行进样 6 次。十种抗生素的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07~0.18% 和 1.82~ 8.79% 之间, 仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

目标物	25 ng/L		250 ng/L	
	R.T	Area	R.T	Area
林可霉素	0.15	2.56	0.07	2.03
金霉素	0.15	6.21	0.07	6.59
罗红霉素	0.18	8.79	0.09	3.85
克林霉素	0.16	3.02	0.09	1.82
四环素	0.15	5.71	0.08	4.20
强力霉素	0.17	3.41	0.09	3.90
土霉素	0.16	5.61	0.09	1.84
美他环素	0.16	6.68	0.08	2.74
磺胺二甲异恶唑	0.14	3.07	0.08	3.23
磺胺硝苯	0.14	4.25	0.07	1.02

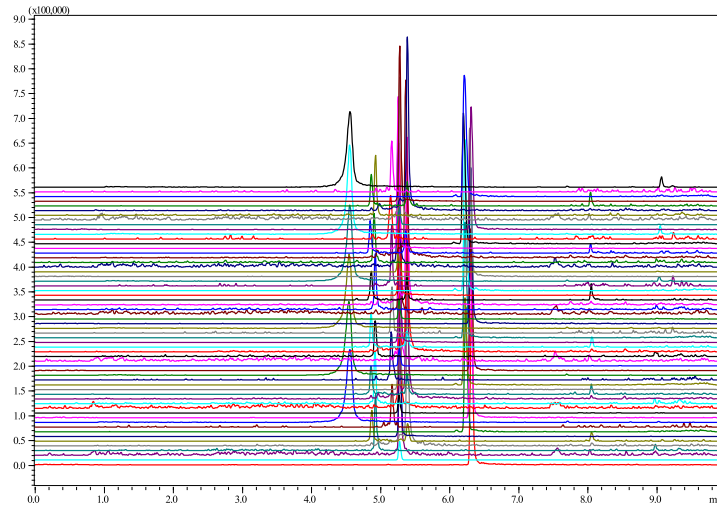


图4 25 ng/L十种抗生素重复性实验色谱图

2.4 自来水和湖泊水分析结果

对自来水和广州某湖泊水进行检测，自来水中无检测到抗生素，而湖泊水中检出 2.4 ng/L 罗红霉素和 5.3 ng/L 克林霉素。

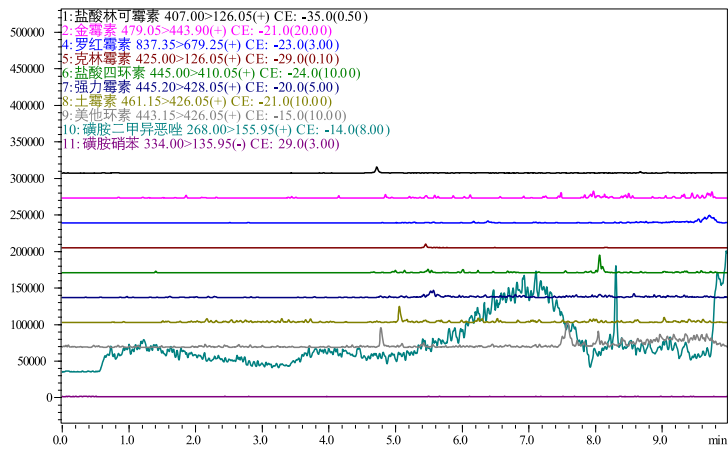


图5 自来水色谱图

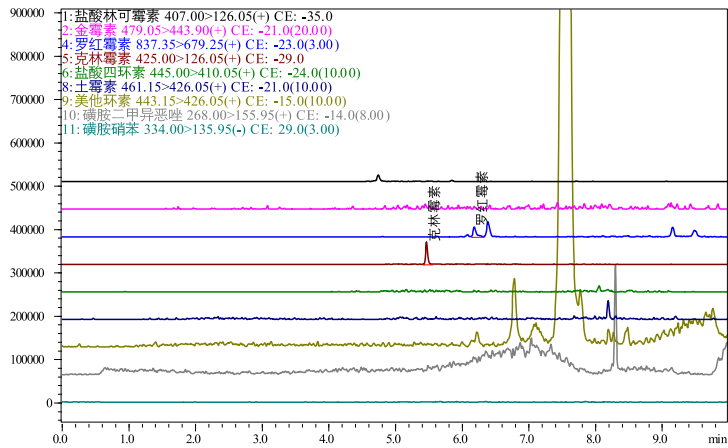


图6 湖泊水色谱图

■ 结论

建立了大体积进样在线分析系统用于水中抗生素的直接检测方法。在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.07~0.18% 和 1.82 ~ 8.79% 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 0.027~1.0 ng/L 和 0.090~3.4 ng/L。对自来水和广州某湖泊水进行检测，自来水中无检测到抗生素，而湖泊水中检出 2.4 ng/L 罗红霉素和 5.3 ng/L 克林霉素。本系统无需增加额外色谱部件即可通过 LC-30A 进行改装升级，使用岛津独有混合器实现柱头聚焦，富集、分离同步完成；允许进样量达到 1 mL 以上，全程自动化运行，灵敏度高、精密度好。