

基于高效液相色谱—四级杆—飞行时间质谱技术筛查 渔业水域环境中抗生素残留方法的建立与应用

何欣¹, 李诗言², 王扬², 郑重莺², 张海琪²,
金仁耀¹, 王鼎南², 王林雯², 戴志远^{1*}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035;

2. 浙江省水产技术推广总站, 浙江 杭州 310012)

摘要: 应用高效液相色谱—四级杆—飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)技术建立水中常用的42种抗生素残留快速筛查方法。采用固相萃取富集净化的方法进行样品预处理, 目标药物经液相色谱仪C₁₈反相柱分离, 1%甲酸乙酸铵水溶液—甲醇溶液为流动相梯度洗脱, 利用正离子源全扫描模式进行检测, 并将建立的方法应用于浙江省内主要渔业环境水质样品抗生素残留的筛查工作。渔业水域环境中42种抗生素定量限(LOQ, S/N=10)为0.010~0.120 μg/L。3个水平加标的平均回收率为60.7%~97.1%, 相对标准偏差(RSD)为0.58%~8.01%。该方法快速简便, 灵敏度高, 对抽取的60批次样品进行检测, 共检出磺胺甲噁唑、磺胺间甲氧基嘧啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡嗪、恩诺沙星5种药物, 含量为25.6~106.7 ng/L。本实验建立的渔业水质中抗生素药物的高效液相色谱—四级杆串联飞行质谱分析方法, 灵敏、准确、定性能力强, 可以成功应用于渔业环境水质样品抗生素残留的筛查工作。

关键词: 抗生素残留; 高效液相色谱—四级杆—飞行时间质谱法; 渔业水域环境; 浙江省

中图分类号: X 171.5

文献标志码: A

渔用抗生素主要用于预防和治疗水生动物疾病。在使用过程中, 由于水生动物体内代谢酶系的不同, 极少部分抗生素被吸收, 大部分未被生物吸收而通过动物排泄等途径直接以原药形式排入水体^[1], 这些药物残留除了对水生动物具有急慢性毒性作用外^[2-4], 还将引起诸如耐药菌^[5]、“超级细菌”的产生^[6-7]以及菌群失调^[8]等副作用。目前, 与其相关的潜在生态风险已经引起国内外广泛关注。王敏等^[9]在对福建滨海养殖水体中5类14种抗生素残留的检测中检出了喹诺酮类、氯霉素类和磺胺类的7种抗生素, 浓度为3.54~40.2 ng/L。阮悦斐等^[10]分析了天津近郊养殖水体的表层水中喹诺酮类、四环素类及磺胺类3类共18种抗生素的残留, 500倍浓缩后, 在淡水

养殖水体的表层水中环丙沙星、恩诺沙星和土霉素等检出率较高, 浓度范围为10.5~26.8 μg/L。

目前水体中常用的抗生素含量的检测方法已经有一些报道。Kumar等^[11]采用了酶联免疫法检测水环境中的泰乐菌素和四环素, 2种抗生素的检出限分别为0.10和0.50 μg/L。该方法操作简便且分析快速, 但方法的选择性较高, 难以同时分析多种成分, 对于结构类似化合物的分析容易出现假阳性。李彦文等^[12]采用了液相色谱法对水体中的抗生素进行了残留检测, 5种抗生素在水和土壤中的检出限为0.94~13.2 ng/L。唐才明等^[13]采用了固相萃取(SPE)及液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI MS/MS)技术, 建立了水体中微量磺胺、大环内酯类抗生素、甲氧苄胺嘧啶及氯霉

收稿日期: 2015-11-17 修回日期: 2016-02-02

资助项目: 浙江省农业标准化研究项目(2013); 国家科技支撑计划(2015BAD29B06)

通信作者: 戴志远, E-mail: dzy@mail.zjgsu.edu.cn

素的定量分析方法。海水和城市污水中抗生素的方法定量下限分别为1.1~34.7 ng/L和2.5~57.2 ng/L。液相色谱法和液相色谱-电喷雾串联质谱技术具有灵敏度和准确度高和重现性好等特点,但只能针对某一类目标化合物,在满足多参数同时检测需求上存在局限性。

本实验通过固相萃取法富集渔业水域环境中42种常见抗生素,采用四极杆/飞行时间质谱(Q-TOF/MS)的高分辨率质谱技术,利用其高特异性、高质量准确度及高质量分辨率等优点^[14],建立了同时筛查渔业环境水域中不同种类抗生素的高效液相色谱—四级杆—飞行时间质谱检测方法。通过建立不同种类化合物数据库匹配检索,方便、快速地对目标化合物和未知化合物进行筛查与鉴定。基于渔业水域环境中抗生素残留对健康和生态的潜在风险,利用该项技术开展渔业水域环境抗生素污染分析评估显得十分必要。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

实验中所用的Agilent 1290-6540液相色谱—四级杆飞行时间质谱仪,配有Dual AJS ESI源

(美国Agilent公司)。有机溶剂包括乙腈(色谱纯,美国TEDIA公司);甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司);甲酸(HPLC/色谱纯,美国ROE scientific INC.);维生素C(分析纯,美国Sigma公司)。Oasis HLB固相萃取柱(500 mg/6 mL,美国Waters公司)。

42种抗生素标准品购自德国Dr. Ehrenstorfer公司,纯度均大于95%(表1)。分别称取10 mg上述标准品,置于10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容配制成100 μg/mL的标准储备液,于-20 °C保存备用。实验中再用甲醇稀释上述标准储备液,配制成不同浓度的混合标准使用液待用。

1.2 水样采集

2015年7月至8月在浙江省重要产卵索饵场(钱塘江上游常山开化段鱼类产卵索饵水域)、水产种质资源保护区(东西苕溪水产种质资源保护区)、重要增殖放流水域(桐庐“两江”增殖放流区域)以及重要养殖水域[包括杭州千岛湖(大型水库)养殖区、衢州江山碗窑水库、丽水石塘水库、嘉兴汾湖养殖区、绍兴洋湖泊养殖区、金华金东水库群(山塘)养殖区以及湖州菱湖前口漾养殖区]等四大类型水域10个区域采集水质样

表 1 42种目标化合物的保留时间以及质谱信息

Tab. 1 Retention times and MS parameters for the analysis of 42 target compounds

编号 no.	化合物 compound	分子式 formula	母离子/(m/z) parent ion	保留时间/min retention time	子离子/(m/z) fragmentation
1	磺胺胍 sulfaguanidine	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	215.0600	0.982	156.0116, 108.0449, 92.0496
2	磺胺吡啶 sulfapyridine	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250.0642	3.527	184.0862, 156.0117, 92.0495
3	磺胺嘧啶 sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251.0598	2.957	156.0114, 108.0442, 92.0494
4	磺胺甲噁唑 sulfamethoxazole	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254.0595	5.270	156.0116, 108.0442, 92.0495
5	磺胺噻唑 sulfathiazole	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256.0210	3.352	156.0117, 108.0442, 92.0495
6	恶喹酸 oxolinic acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262.0708	5.717	244.0611, 216.0293, 160.0394
7	磺胺甲噻唑 sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265.0753	3.598	156.0115, 108.0443, 92.0496
8	磺胺二甲异唑 sulfisoxazole	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	268.0750	5.511	156.0117, 113.0710, 92.0496
9	磺胺甲二唑 sulfamethizole	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271.0316	4.079	156.0117, 108.0443, 92.0495
10	磺胺二甲基嘧啶 sulfamethazine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.0911	4.188	186.0337, 156.0116, 124.0873
11	磺胺二甲基异嘧啶 sulfisomidine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.0910	2.710	186.033 4, 156.0116, 124.0871
12	磺胺对甲氧基嘧啶 sulfamer	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0712	4.319	215.0934, 156.0117, 108.0446
13	磺胺间甲氧基嘧啶 sulfamonomethoxine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0712	4.801	215.0933, 156.0117, 108.0446
14	磺胺氯吡嗪 sulfachloropyride	C ₁₀ H ₆ C ₁ N ₄ O ₂ S	285.0201	4.904	156.0116, 108.0444, 92.0494
15	磺胺噻恶啉 sulfachinoxalin	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301.0759	6.233	156.0116, 108.0443, 92.0496

· 续表1 ·

编号 no.	化合物 compound	分子式 formula	母离子/(m/z) parent ion	保留时间/min retention time	子离子/(m/z) fragmentation
16	磺胺邻二甲氧嘧啶 sulfadoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0807	5.209	156.0117, 108.0447, 92.0498
17	磺胺二甲基噻唑 sulfadimethoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0810	6.098	156.0118, 108.0443, 92.0497
18	诺氟沙星 norfloxacin	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320.1405	3.977	302.1404, 276.1504, 233.1083
19	依诺沙星 enoxacin	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	321.1360	3.818	303.1254, 277.1451, 232.0511
20	环丙沙星 ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332.1407	4.103	314.1302, 288.1505, 231.0565
21	培氟沙星 pefloxacin	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	334.1566	3.997	316.1464, 290.1665, 233.1083
22	洛美沙星 lomefloxacin	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	352.1474	4.251	334.1369, 308.1576, 265.1152
23	丹诺沙星 danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	358.1657	4.218	340.1463, 314.1669, 283.1240
24	恩诺沙星 enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360.1721	4.336	342.1617, 316.1824, 245.1088
25	氧氟沙星 ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362.1520	3.961	318.1623, 261.1044
26	氟罗沙星 fleroxacin	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	370.1372	3.802	332.1283, 326.1386
27	沙拉沙星 sarafloxacin	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386.1312	4.724	368.1211, 342.1413, 299.0990
28	司帕沙星 sparfolxacin	C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃	393.1741	4.829	375.1634, 349.1844, 292.1265
29	奥比沙星 orbifloxacin	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	396.1538	4.460	378.1435, 352.1641, 295.1061
30	双氟沙星 difloxacin	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	400.1473	4.802	382.1364, 356.1582, 299.0995
31	青霉素G penicilline G	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	335.1060	6.267	176.0254, 160.0155
32	氨苄西林 ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	350.1174	3.432	160.1544, 106.1548
33	阿莫西林 amoxicillin	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₈ S	366.1123	1.414	207.8113, 113.5746
34	苯唑西林 oxacillin	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	402.1125	7.078	277.0114, 159.7858
35	萘夫西林 nafcillin	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	415.1327	7.841	198.8782, 170.7859
36	头孢氨苄 cefalexin	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	348.1015	3.529	174.0543, 158.0272, 106.0653
37	头孢匹林 cefapirin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	424.0637	2.885	364.0422, 320.0523, 292.0579
38	头孢唑林 cefazolin	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃	455.0371	3.990	323.0561, 295.0611, 156.0112
39	头孢洛宁 cephalonium	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₅ S ₂	459.0792	3.587	337.0320, 152.0161, 123.0556
40	头孢匹罗 cefpirome	C ₂₂ H ₂₂ N ₆ O ₅ S ₂	515.1241	3.149	396.0490, 324.0629, 120.0822
41	头孢喹肟 cefquinome	C ₂₃ H ₂₄ N ₆ O ₅ S ₂	529.1321	3.589	396.0436, 324.0584, 134.0965
42	红霉素 erythromycin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734.4716	6.601	567.3729, 558.3648, 158.1193

品。水样采集按照《水质采样 样品的保存和管理技术规定(HJ 493-2009)》要求进行。其中水深≤10 m, 只采表层; 水深>10 m, 采表底两层样品。所有样品盛于1 L棕色玻璃瓶内, 常温运输至实验室内4 °C避光冷藏保存, 7天内测定完毕。每个批次采样都准备1个现场空白样品。采样期间的底层水温17.8~22.7 °C, 表层水温23.8~31.1 °C。

1.3 样品前处理

准确称取经过0.45 μm玻璃纤维滤膜抽滤(流

速: 5~10 mL/min)的水样250 mL, 加入0.125 g的抗氧化剂维生素C粉末, 经预先用3 mL甲醇和3 mL水活化的Oasis HLB固相萃取柱富集后, 将固相萃取柱抽真空至填料全干后, 用6 mL乙腈—甲醇(V/V=1:1)洗脱待测物, 收集全部洗脱液于10 mL离心管中, 在40 °C水浴中用氮气吹至近干, 用200 μL乙腈复溶, 涡旋10 s, 再加入800 μL蒸馏水, 涡旋10 s, 经过0.22 μm有机滤膜过滤, 待上机。同批水样分析时均加做试剂空白和加标回

收进行质量控制。

1.4 色谱质谱条件

色谱柱采用Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈, 100 mm×2.1 mm, 3.5 μm。流速0.250 mL/min, 柱温30 °C, 进样量2 μL。流动相A: 添加甲酸的5 mmol乙酸铵水溶液, 甲酸添加体积为乙酸铵水溶液的0.1%; 流动相B: 甲醇。梯度洗脱程序设定: 0~1 min, 5% B; 1~5 min, 5%~30% B; 5~8 min, 30%~50% B; 8~15 min, 50%~98% B; 15~18 min, 98% B。

质谱条件为电喷雾离子源(Dual AJS ESI)源, 正离子模式, MS扫描范围为50~1000 m/z, 毛细管电压设置为4000 V, 鞘气温度和流速分别为320 °C和11.0 L/min; 干燥气温度和流速分别为320 °C和10.0 L/min, 诱导解离电压为130 V。使用C₅H₄N₄参比液(离子精确相对质量为121.050873)实时质量校准。

2 结果

2.1 液相条件优化

实验选取的3种不同的流动相体系分别为加入0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液—甲醇、0.1%甲酸水溶液—甲醇和水溶液—甲醇。结果表明, 0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液—甲醇流动相体系具有较好的洗脱效果。为了增强方法拓展性, 选择了兼容性较好、洗脱时间充足的洗脱程序, 全程时间为18 min, 42种化合物在10 min内实现基本分离。

2.2 筛查数据库的建立和分析

应用Agilent MassHunter Workstation Software (Version B 5.00)软件采集与处理化合物数据, 应用Agilent MassHunter PCDL Manager(B 4.00)软件建立化合物筛查数据库。将42种10 μg/mL的渔药标准物质溶液通过液相色谱—串联四级杆—飞行时间质谱确认化合物的保留时间, 完善一级筛查谱库, 并针对每种化合物分别采集了碰撞能量(collision energy, CE)为10、20和40 eV时的二级质谱图加入谱库, 得到精确质量数和同位素峰度匹配、二级特征离子匹配等信息(表1)。

42种抗生素中含有3对同分异构体, 磺胺二甲基嘧啶—磺胺二甲基异嘧啶、磺胺对甲氧基嘧啶—磺胺间甲氧基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶—磺胺二甲基吡嗪的保留时间分别为4.188和

2.710、4.319和4.801、5.209和6.098 min, 分离效果良好。欧盟2002/657/EC决议中规定1个结构碎片可以获得2个鉴别分数, 二级质谱中的每个子离子获得2.5个分数, 为确定1个化合物需要至少4个鉴别分数, 所以1个具有精确质量数的母离子和1个特征碎片离子即可获得4.5分的鉴定分数, 满足鉴定的要求。本方法中每个化合物已经确证至少1个精确质量数的母离子和其2个特征子离子, 满足欧盟决议的要求。

2.3 前处理条件选择

实验采用SPE小柱固相萃取富集净化水样, 能在一定程度上减少基质效应^[15]。比较C₁₈和Oasis HLB柱的净化效果, 选择Oasis HLB柱作为本实验的固相萃取SPE小柱。为获得较高回收率, 进一步优化洗脱液种类和洗脱体积, 考察了3种不同洗脱液(分别为甲醇, 乙腈和50%乙腈—甲醇洗脱试剂)和不同洗脱体积(分别采用4、5、6、7、8、9和10 mL进行洗脱)对5 μg/L加标浓度水平下不同种类药物平均回收率的影响。结果显示, 纯乙腈与50%乙腈—甲醇对于这42种抗生素的洗脱能力无显著性的差异, 6 mL即可将所有吸附的抗生素洗脱下来。纯甲醇试剂的洗脱能力较弱, 8 mL方可将所有吸附的抗生素洗脱下来, 并且对于头孢类抗生素的回收率较低, 如比较50%乙腈—甲醇体系和纯甲醇体系洗脱时, 头孢氨苄的回收率分别为70.8%~73.1%和62.8%~69.4%。考虑到乙腈的毒性及纯乙腈过强的洗脱能力带来的杂质, 故采用50%乙腈—甲醇体系作为洗脱液, 洗脱体积为6 mL。

2.4 线性范围和定量限

将42种药物各浓度点系列标准溶液按照色谱质谱条件分析后, 以提取离子色谱图的峰面积(Y)为纵坐标, 化合物质量浓度(X, μg/L)为横坐标绘制校准曲线, 其相关系数(*r*)均大于0.99, 表明各化合物在相应的浓度范围内呈良好的线性关系。采用标准添加法进行测试, 以空白水样提取液稀释标准曲线的最低浓度, 以S/N=10时为分析仪器的定量限(LOQ)(表2)。

2.5 方法学验证

取空白水样, 添加3个不同浓度水平的混合标准溶液, 每个浓度水平做3个平行, 计算平均回收率及相对标准偏差(RSD)。渔业环境水域中42种渔药的平均回收率为60.7%~97.1%, RSD范围为0.58%~8.01%, 满足检测要求(表3)。

2.6 方法应用

应用本方法对实验室采集的浙江省渔业水域环境60批次水质样品进行检测,结果共检出磺胺甲噁唑、磺胺间甲氧基嘧啶、磺胺吡啶、磺胺氯哒嗪、恩诺沙星等两大类5种药物,其中20批次

检出磺胺甲噁唑,含量为22.3~53.6 ng/L; 14批次检出磺胺间甲氧基嘧啶,含量为32.3~76.3 ng/L; 10批次检出磺胺吡啶,含量为18.9~41.9 ng/L; 6批次检出磺胺氯哒嗪,含量为18.8~30.6 ng/L; 4批次检出恩诺沙星,含量为94.2~113.2 ng/L。以

表 2 渔业水域环境中42种抗生素的线性范围、定量限(LOQ)和相关系数(*r*)

Tab. 2 Linear ranges, limits of quantification(LOQ), and correlation coefficients (*r*) of the 42 antibiotics in fishery water

编号 no.	化合物 compound	线性范围/($\mu\text{g/L}$) linear ranges	仪器定量限/($\mu\text{g/L}$) LOQ	相关系数 <i>r</i>
1	磺胺胍 sulfaguanidine	0.020~50	0.020	0.9946
2	磺胺吡啶 sulfapyridine	0.010~20	0.010	0.9952
3	磺胺嘧啶 sulfadiazine	0.020~50	0.020	0.9990
4	磺胺甲噁唑 sulfamethoxazole	0.020~50	0.020	0.9984
5	磺胺噻唑 sulfathiazole	0.020~50	0.020	0.9995
6	恶唑酸 oxolinic acid	0.050~50	0.050	0.9993
7	磺胺甲噻唑 sulfamerazine	0.010~20	0.010	0.9988
8	磺胺二甲异唑 sulfisoxazole	0.050~50	0.050	0.9966
9	磺胺甲二唑 sulfamethizole	0.050~50	0.050	0.9975
10	磺胺二甲基嘧啶 sulfamethazine	0.010~20	0.010	0.9984
11	磺胺二甲基异嘧啶 sulfisomidine	0.020~50	0.020	0.9953
12	磺胺对甲氧基嘧啶 sulfameter	0.010~20	0.010	0.9993
13	磺胺间甲氧基嘧啶 sulfamonomethoxine	0.020~50	0.020	0.9982
14	磺胺氯哒嗪 sulfachloropyride	0.050~50	0.050	0.9994
15	磺胺噻恶啉 sulfachinoxalin	0.025~50	0.025	0.9959
16	磺胺邻二甲氧嘧啶 sulfadoxine	0.010~20	0.010	0.9990
17	磺胺二甲基哒嗪 sulfadimethoxine	0.010~20	0.010	0.9984
18	诺氟沙星 norfloxacin	0.025~50	0.025	0.9955
19	依诺沙星 enoxacin	0.040~50	0.040	0.9974
20	环丙沙星 ciprofloxacin	0.060~50	0.060	0.9960
21	培氟沙星 pefloxacin	0.025~50	0.025	0.9952
22	洛美沙星 lomefloxacin	0.025~50	0.025	0.9981
23	丹诺沙星 danofloxacin	0.040~50	0.040	0.9992
24	恩诺沙星 enrofloxacin	0.020~50	0.020	0.9945
25	氧氟沙星 ofloxacin	0.020~50	0.020	0.9927
26	氟罗沙星 fleroxacin	0.020~50	0.020	0.9954
27	沙拉沙星 sarafloxacin	0.040~50	0.040	0.9963
28	司帕沙星 sparfolxacin	0.020~50	0.020	0.9939
29	奥比沙星 orbifloxacin	0.020~50	0.020	0.9914
30	双氟沙星 difloxacin	0.020~50	0.020	0.9971

·续表2·

编号 no.	化合物 compound	线性范围/($\mu\text{g/L}$) linear ranges	仪器定量限/($\mu\text{g/L}$) LOQ	相关系数 <i>r</i>
31	青霉素G penicilline G	0.050~50	0.050	0.9946
32	氨苄西林 ampicillin	0.110~100	0.110	0.9983
33	阿莫西林 amoxicillin	0.120~100	0.120	0.9975
34	苯唑西林 oxacillin	0.050~50	0.050	0.9988
35	萘夫西林 nafcilin	0.050~50	0.050	0.9990
36	头孢氨苄 cefalexin	0.060~50	0.060	0.9955
37	头孢匹林 cefapirin	0.050~50	0.050	0.9924
38	头孢唑林 cefazolin	0.120~100	0.120	0.9953
39	头孢洛宁 cephalonium	0.120~100	0.120	0.9962
40	头孢匹罗 cefpirome	0.100~100	0.100	0.9947
41	头孢喹肟 cefquinome	0.060~50	0.060	0.9963
42	红霉素 erthromycin	0.050~50	0.050	0.9981

表3 水质中42种抗生素的回收率和相对标准偏差

Tab. 3 Recoverie and relative standard deviation (RSD) of the 42 antibiotics in water

n=3

化合物 compound	加标量/($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%	化合物 compound	加标量 /($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%
磺胺胍 sulfaguanidine	0.1	68.5	2.41	洛美沙星 lomefloxacin	0.1	68.5	2.53
	0.5	76.3	3.98		0.5	85.1	1.92
	5	78.9	3.54		5	87.6	3.48
磺胺吡啶 sulfapyridine	0.1	76.2	5.51	丹诺沙星 danofloxacin	0.1	81.5	2.51
	0.5	81.2	4.14		0.5	85.6	1.31
	5	85.5	3.22		5	87.6	4.05
磺胺噻唑 sulfadiazine	0.1	67.8	1.08	恩诺沙星 enrofloxacin	0.1	81.5	4.30
	0.5	74.5	2.31		0.5	86.6	2.32
	5	75.9	2.46		5	88.1	4.58
磺胺甲噁唑 sulfamethox -azole	0.1	83.5	1.25	氧氟沙星 ofloxacin	0.1	82.9	2.87
	0.5	91.5	3.58		0.5	87.6	3.32
	5	91.9	5.03		5	89.4	3.31
磺胺噻唑 sulfathiazole	0.1	72.9	1.52	氟罗沙星 fleroxacin	0.1	80.3	2.72
	0.5	84.1	2.73		0.5	85.4	3.73
	5	83.3	4.37		5	86.9	1.94
恶喹酸 oxolinic acid	0.1	63.8	1.90	沙拉沙星 sarafloxacin	0.1	72.5	3.42
	0.5	84.5	2.68		0.5	80.6	4.17
	5	90.4	2.73		5	81.4	2.58

· 续表3 ·

化合物 compound	加标量/($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%	化合物 compound	加标量 /($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%
磺胺甲噁唑 sulfamerazine	0.1	79.8	4.72	司帕沙星 sparfloxacin	0.1	78.9	1.33
	0.5	85.5	2.16		0.5	78.1	4.20
	5	87.5	3.55		5	83.4	1.35
磺胺二甲异唑 sulfisoxazole	0.1	73.4	1.41	奥比沙星 orbifloxacin	0.1	78.5	1.24
	0.5	82.7	5.55		0.5	87.2	4.48
	5	84.5	3.19		5	89.3	2.14
磺胺甲二唑 sulfamethizole	0.1	77.8	0.95	双氟沙星 difloxacin	0.1	82.3	1.16
	0.5	82.5	4.11		0.5	90.4	1.13
	5	83.5	2.82		5	89.4	0.58
磺胺二甲基噁唑 sulfamethazine	0.1	85.5	3.12	青霉素G penicilline G	0.2	70.4	3.01
	0.5	94.2	2.66		1.0	74.3	1.91
	5	91.7	4.50		5	76.9	2.77
磺胺二甲基异噁唑 sulfisomidine	0.1	84.5	1.75	氨苄西林 ampicillin	0.2	70.1	4.05
	0.5	92.9	4.12		1.0	72.9	5.45
	5	94.2	5.57		5	73.4	4.64
磺胺对甲氧基噁唑 sulfamer	0.1	84.5	3.12	阿莫西林 amoxicillin	0.2	61.4	5.66
	0.5	88.7	2.91		1.0	69.9	1.85
	5	89.6	1.34		5	70.7	4.33
磺胺间甲氧基噁唑 sulfamonomethoxine	0.1	84.2	5.21	苯唑西林 oxacillin	0.2	68.8	1.00
	0.5	89.4	3.92		1.0	78.5	3.01
	5	91.5	2.97		5	80.4	3.08
磺胺氯哒嗪 sulfachloropyridine	0.1	78.9	0.95	萘夫西林 nafcillin	0.2	78.4	1.33
	0.5	78.2	2.90		1.0	75.5	2.41
	5	81.5	3.53		5	82.3	1.82
磺胺喹恶啉 sulfachinoxalin	0.1	81.7	3.21	头孢氨苄 cefalexin	0.2	70.8	2.85
	0.5	90.4	1.32		1.0	72.8	2.47
	5	89.3	5.10		5	73.1	3.24
磺胺邻二甲氧噁唑 sulfadoxine	0.1	79.8	3.25	头孢匹林 cefapirin	0.2	69.9	1.98
	0.5	88.8	3.44		1.0	71.5	2.03
	5	94.3	1.71		5	72.4	3.48
磺胺二甲基哒嗪 sulfadimethoprine	0.1	70.4	1.69	头孢唑林 cefazolin	0.2	69.4	1.46
	0.5	81.6	3.44		1.0	70.8	2.72
	5	85.4	1.84		5	73.5	2.26
诺氟沙星 norfloxacin	0.1	79.5	6.25	头孢洛宁 cephalonium	0.2	68.1	3.38
	0.5	95.4	2.10		1.0	68.5	1.42
	5	91.5	4.39		5	71.8	2.79

·续表3·

化合物 compound	加标量/($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%	化合物 compound	加标量/($\mu\text{g/L}$) spiked	回收率/% recovery	RSD/%
依诺沙星 enoxacin	0.1	68.9	3.99	头孢匹罗 ceftiofame	0.2	60.7	1.88
	0.5	88.5	3.84		1.0	62.1	2.36
	5	94.7	8.01		5	68.4	3.59
环丙沙星 ciprofloxacin	0.1	72.8	3.41	头孢喹肟 cefquinome	0.2	68.9	4.43
	0.5	87.5	2.14		1.0	78.1	2.11
	5	89.9	2.39		5	78.4	2.45
培氟沙星 pefloxacin	0.1	81.5	4.11	红霉素 erthromycin	0.2	89.9	3.95
	0.5	94.6	2.82		1.0	95.5	4.24
	5	95.1	1.55		5	97.1	2.31

上5种药物的检出率分别为33.3%、23.3%、16.7%、10%和6.67%(表4)。

3 讨论

3.1 方法学分析

本研究先对42种抗生素的液相条件进行了优化,0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液—甲醇流动相体系具有较好的洗脱效果。这是因为甲酸可以显著地提高离子化效率,乙酸铵能够降低噪音背景,二者结合可以提高飞行时间质谱的灵敏度,因此本实验采用0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液—甲醇作为流动相。在前处理方法的优化中,首先比较 C_{18} 和Oasis HLB柱的净化效果,

前者提取部分强极性药物有一定的损失率,柱子易被穿透,后者的吸附剂是由亲脂性二乙烯苯和亲水性N-乙基吡咯烷酮2种单体按一定比例聚合成的的大孔共聚物,是用于酸性、中性和碱性化合物的通用型吸附剂,而且即使柱床干涸,回收率也不受影响^[6],适合于水体中42种抗生素残留检测。

苏仲毅^[7]针对养殖业常用的24种抗生素,采用固相萃取—超高压液相色谱—串联质谱检测方法建立了其在河水和海水中的高灵敏的同时分析方法。该方法中,在1000倍稀释的条件下,四环素类抗生素的定量限为10 $\mu\text{g/L}$,其余目标物的仪器检测限均小于0.5 $\mu\text{g/L}$ 。各类抗生素的

表4 渔业环境监测水域中抗生素筛查结果

Tab. 4 Results of antibiotic residue in fishery waters

监测水域类型 type of fishery waters	具体监测区域 area	站位数量 number	筛查出的抗生素种类和含量/(ng/L) type and concentration				
			磺胺甲噁唑 sulfameth-oxazole	磺胺间甲氧基嘧啶 sulfamonom-ethoxine	磺胺吡啶 sulfapyri-dine	磺胺氯吡啶 sulfachloro-pyridine	恩诺沙星 enrofloxacin
重要产卵索饵场水域	钱塘江上游常山、开化段	4	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
水产种质资源保护区	东西苕溪	6	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要增殖放流水域	桐庐“两江”	6	29.4±6.9	41.2±8.9	未检出 ND	24.7±5.9	未检出 ND
重要养殖水域	杭州千岛湖(大型水库)	10	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	衢州江山碗窑水库	6	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	丽水石塘水库	6	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	嘉兴汾湖	6	48.9±4.7	未检出 ND	34.1±7.8	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	绍兴洋湖泊	8	未检出 ND	68.4±7.9	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	金华金东水库(山塘)	4	25.6±5.3	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND	未检出 ND
重要养殖水域	湖州菱湖前口漾	4	35.9±9.1	未检出 ND	26.7±7.8	未检出 ND	103.7±9.5

线性范围分别为氯霉素类0.5~1000.0 $\mu\text{g/L}$ 、四环素类10.0~1000.0 $\mu\text{g/L}$ 、喹诺酮类和磺胺类0.2~1000.0 $\mu\text{g/L}$ ；线性相关系数为0.9982~0.9999，整个仪器分析过程为1 h。Hirsch等^[18]应用HPLC-MS/MS技术，成功地同时检测了河水中包括大环内脂、磺胺、四环素和 β -内酰胺在内的四类18种抗生素，在浓缩100倍条件下，仪器定量限为10~5000 ng/L。高立红等^[19]采用HPLC-MS/MS分析环境水样中22种抗生素类药物，在浓缩200倍条件下，仪器定量限为0.05~0.50 $\mu\text{g/L}$ 。本研究目标物数量为42种，250倍浓缩时，仪器定量限为0.01~0.12 $\mu\text{g/L}$ ，全程时间为18 min。若统一采用100倍浓缩时，苏仲毅^[17]、Hirsch等^[18]、高立红等^[19]和本研究的方法定量限分别为小于5、0.1~50、0.5~5和0.1~1.2 ng/L。因此本方法拥有更为广泛的目标筛查范围，更高的灵敏度及更高效的检测效率。

3.2 水体中抗生素残留分析

王丹等^[20]对中国地表水环境中药物分析显示，磺胺类和喹诺酮类在抗生素类检出率中分别占33%和30%，其中磺胺甲噁唑报道率最高。Xu^[21]等在香港维多利亚港附近海域检出2种喹诺酮类抗生素，浓度为10~21 ng/L；在珠江检出氯霉素、2种喹诺酮类抗生素和3种磺胺类抗生素，浓度分别为41~266、11~250和37~336 ng/L。刘虹等^[22]在贵阳市的水库中检出氯霉素和四环素类抗生素，浓度分别为0.2~0.8和0.2~1.4 $\mu\text{g/L}$ 。Golet等^[23]在瑞士的Glatt峡谷和污水处理厂排出的水中检测到了浓度为72 ng/L的环丙沙星和57 ng/L的诺氟沙星。王敏等^[9]对福建滨海养殖水体中5类14种抗生素残留的检测检出了3类7种抗生素，包括浓度分别为3.54 ng/L的诺氟沙星、14.8 ng/L的氧氟沙星，5.36 ng/L的磺胺嘧啶，7.35 ng/L的磺胺二甲嘧啶、18.5 ng/L的磺胺甲恶唑、5.00 ng/L的氟甲砜霉素和40.2 ng/L的甲氧苄氨嘧啶。阮悦斐等^[10]分析了天津近郊养殖水体的表层水中喹诺酮类、四环素类及磺胺类三类共18种抗生素的残留。结果发现，经500倍浓缩后，磺胺类抗生素中有磺胺甲基异噁唑被检出2次，浓度最高达14.31 $\mu\text{g/L}$ 。喹诺酮类抗生素检出相对较多，环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星3种目标物分别被检出3、3、1次，浓度最高达26.80 $\mu\text{g/L}$ 。四环素类抗生素中

土霉素被检出2次，浓度均大于10.00 $\mu\text{g/L}$ ，即未经浓缩之前，水样中的磺胺甲基异噁唑浓度最高达28.62 ng/L，喹诺酮类抗生素的浓度最大达到53.60 ng/L，土霉素的浓度均大于20.00 ng/L。

从本次浙江省渔业水域环境中检出药物种类看，分析结果有相似性，磺胺和喹诺酮类抗生素是最主要的2种水体中残留的抗生素种类，检出的浓度分别为18.8~76.3和94.2~113.2 ng/L。按养殖水域类型分析，产卵索饵场水域(钱塘江上游常山、开化段)和水产种质资源保护区(东西苕溪)10个监测点水样均未检出任何种类的药物残留；重要增殖放流水域(桐庐“两江”)6个监测点水样检出磺胺甲噁唑、磺胺间甲氧基嘧啶和磺胺氯吡啶等3种药物；重点养殖水域中杭州千岛湖、衢州江山碗窑水库、丽水石塘水库等3个区域属于大型水库，为粗养区域，不允许投喂人工饲料，抽取的22批次水样中未检出抗生素残留。嘉兴汾湖、绍兴洋湖泊、金华金东水库(山塘)、湖州菱湖前口漾等4个区域属于小型的湖泊、水库，养殖方式为精养，抽取的22个样品检出5种药物，药物检出率达到该类水域样品的50%。

4 结论

本方法建立并优化了渔业水质中抗生素药物的高效液相色谱—四级杆串联飞行质谱分析方法，渔业环境水域中42种渔药的平均回收率为60.7%~97.1%，RSD范围为0.58%~8.01%，定量限为0.01~0.12 $\mu\text{g/L}$ ，全程时间为18 min。该方法灵敏、准确、定性能力强，成功应用于浙江省渔业环境水质样品抗生素残留筛查工作。从本次浙江省渔业水域环境中检出药物种类看，磺胺和喹诺酮类抗生素检出率最高，建议着重对这2种药物的使用及残留进行监控。

参考文献：

- [1] Boxall A B A, Kolpin D W, Halling-Sørensen B, *et al.* Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks [J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(15): 286-294.
- [2] Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 723-730.

- [3] Sørensen B H. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming [J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 731-739.
- [4] Holten L H C, Halling-Sørensen B, Jørgensen S E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 36(1): 1-6.
- [5] Nygaard K, Lunestad B T, Hektoen H, *et al.* Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments [J]. *Aquaculture*, 1992, 104(1-2): 31-36.
- [6] Endta H P, Mouton J W, den Hollander J G, *et al.* Comparative *in vitro* activities of Trovafloxacin (CP-99, 219) against 445 gram-positive isolates from patients with endocarditis and those with other bloodstream infections [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(5): 1146-1149.
- [7] Sieradzki K, Roberts R B, Haber S W, *et al.* The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 340(7): 517-523.
- [8] Ladirat S E, Schols H A, Nauta A, *et al.* High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92(3): 387-397.
- [9] 王敏, 俞慎, 洪有为, 等. 5种典型滨海养殖水体中多种类抗生素的残留特性[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(5): 934-939.
Wang M, Yu S, Hong Y W, *et al.* Residual characterization of multi-categorized antibiotics in five typical aquaculture waters [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(5): 934-939 (in Chinese).
- [10] 阮悦斐, 陈继淼, 郭昌胜, 等. 天津近郊地区淡水养殖水体的表层水及沉积物中典型抗生素的残留分析[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(12): 2586-2593.
Ruan Y F, Chen J M, Guo C S, *et al.* Distribution characteristics of typical antibiotics in surface water and sediments from freshwater aquaculture water in Tianjin Suburban Areas, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12): 2586-2593 (in Chinese).
- [11] Kumar K, Thompson A, Singh A K, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples [J]. *Journal of Environment Quality*, 2004, 33(1): 250-256.
- [12] 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.
Li Y W, Mo C H, Zhao N, *et al.* Determination of sulfonamides antibiotics in water and soil using high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(7): 954-958 (in Chinese).
- [13] 唐才明, 黄秋鑫, 余以义, 等. 高效液相色谱—串联质谱法对水环境中微量磺胺、大环内酯类抗生素、甲氧苄胺嘧啶与氯霉素的检测[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(8): 909-913.
Tang C M, Huang Q X, Yu Y Y, *et al.* Simultaneous determination of trace sulfonamides, macrolides, trimethoprim and chloramphenicol in aquatic environment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2009, 28(8): 909-913 (in Chinese).
- [14] Carrasco-Pancorbo A, Casado-Terrones S, Segura-Carretero A, *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1195(1-2): 107-116.
- [15] Hirsch R, Ternes T, Haberer K, *et al.* Occurrence of antibiotics in the aquatic environment [J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 225(1-2): 109-118.
- [16] Dias N C, Poole C F. Mechanistic study of the sorption properties of OASIS® HLB and its use in solid-phase extraction [J]. *Chromatographia*, 2002, 56(5-6): 269-275.
- [17] 苏仲毅. 环境水样中24种抗生素残留的同时分析方法及其应用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008: 40-46.
Su Z Y. Study on determination method for 24 antibiotics in aquatic environmental samples and its application [D]. Xiamen: Xiamen University, 2008: 40-46 (in Chinese).
- [18] Hirsch R, Ternes T A, Haberer K, *et al.* Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray

- tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 815(2): 213-223.
- [19] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 高效液相色谱—电喷雾串联质谱法检测环境水样中22种抗生素类药物[J]. *色谱*, 2010, 28(5): 491-497.
- Gao L H, Shi Y Y, Li W H, *et al.* Determination of 22 antibiotics in environmental water samples using high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(5): 491-497 (in Chinese).
- [20] 王丹, 隋倩, 赵文涛, 等. 中国地表水环境中药物和个人护理品的研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 59(9): 743-751.
- Wang D, Sui Q, Zhao W T, *et al.* Pharmaceutical and personal care products in the surface water of China: a review [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59(9): 743-751 (in Chinese).
- [21] Xu W H, Zhang G, Zou S C, *et al.* Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 145(3): 672-679.
- [22] 刘虹, 张国平, 刘丛强. 固相萃取—色谱测定水、沉积物及土壤中氯霉素和3种四环素类抗生素[J]. *分析化学*, 2007, 35(3): 315-319.
- Liu H, Zhang G P, Liu C Q. Determination of chloramphenicol and three tetracyclines by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(3): 315-319 (in Chinese).
- [23] Golet E M, Alder A C, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt valley watershed, Switzerland [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(17): 3645-3651.

Determination of antibiotic residues in fishery water environment by high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry and its application

HE Xin¹, LI Shiyan², WANG Yang², ZHENG Zhongying², ZHANG Haiqi²,
JIN Renyao¹, WANG Dingnan², WANG Linwen², DAI Zhiyuan^{1*}

(1. College of Food Science and Biotechnology, Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

2. Zhejiang Fishery Technology Extension Center, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Rapid screening method for 42 kinds of commonly used antibiotics residues in fishery water by High performance liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS) has been developed. Targeted antibiotics was extracted from samples on C₁₈ Solid-phase extraction cartridges. Analytical separation was performed on a C₁₈ reverse phase column by liquid chromatography with 1% acetic acid, formic acid, ammonium salt aqueous methanol solution as mobile phase. Positive ion source full scan patterns were used. The result showed that Limit of Quantity (S/N=10, LOQ) of 42 kinds of antibiotics were 0.010 - 0.120 µg/L. The average recovery for antibiotics was 60.7% - 97.1%. The relative standard deviation (RSDs) was 0.58% - 8.01%. The method is rapid and simple with high sensitivity. 60 fishery water samples were determined and sulfamethoxazole, sulfamonomethoxine, sulfapyridine, sulfachlorpyridazine, enrofloxacin were detected with the concentration from 25.6 to 106.7 ng/L. The method is sensitive, accurate and can be applied to the screening of antibiotic residues in fishery water environment.

Key words: antibiotic residues; high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry; fishery water environment; Zhejiang province

Corresponding author: DAI Zhiyuan. E-mail: dzy@mail.zjgsu.edu.cn

Funding projects: Research Project of Agricultural Standardization in Zhejiang Province (2013); National Science and Technology Support Program (2012BAD29B06)