

超高效液相色谱串联质谱法同时检测复杂基质中四环素类抗生素及其代谢产物

吴晓凤^{1,3}, 郑嘉熹¹, 魏源送^{1*}, 赵鑫², 仲维科²

(1.中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2.中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 3.中国环境监测总站, 北京 100012)

摘要:为同时检测复杂基质中(由猪粪和蘑菇渣混合而成的堆肥原料)3种四环素类抗生素(四环素 TC、土霉素 OTC 和金霉素 CTC)及其代谢产物,建立了超高效液相色谱串联质谱检测方法(UPLC-MS/MS)。该方法同时采用 pH 值=4 的 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液和乙腈为提取溶液,经过固相萃取净化后,以乙腈和 0.1% 的甲酸水溶液为流动相,采用超高效液相色谱柱进行分离,在电喷雾正离子模式下,用四极杆串联质谱仪进行定性和定量分析。3 种四环素类抗生素及其代谢产物均在 7 min 内完成分离,总共分析时间为 12 min。在 0~6 mg·kg⁻¹ DW (Dry weight) 浓度范围内,3 种四环素类抗生素及其代谢产物的标准曲线线性良好,线性相关系数 R^2 均大于 0.996 0,重现性也较好($n=11$, 相对标准偏差均小于 15%)。在 3 个加标水平 0.2 mg·kg⁻¹ DW、1 mg·kg⁻¹ DW 和 4 mg·kg⁻¹ DW 下,TC、OTC、CTC 的回收率分别为 71%~89%、66%~94% 和 66%~84%;去甲基金霉素(DMCTC)的回收率为 52%~64%;差向异构产物的回收率在 32%~51%之间;脱水产物以及差向脱水产物的回收率均低于 30%。3 种四环素类抗生素及其代谢产物的检出限和定量限分别在 1.668~17.270 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 5.561~45.918 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内,表明该方法具有较高的灵敏度。对北京市某露天堆肥场中的样品进行测定发现,TC、OTC、CTC 的浓度分别为 0.4、1.6、2.9 mg·kg⁻¹,检测到的代谢产物主要为相应的差向异构体,其中差向金霉素(ECTC)的浓度最高,达到 2.7 mg·kg⁻¹,和母体的含量水平比较接近,其他代谢产物也有不同程度的检出。

关键词:四环素类抗生素;代谢产物;超高效液相色谱串联质谱

中图分类号:X833 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)11-2293-09 doi:10.11654/jaes.2013.11.11.027

Simultaneous Determination of Tetracyclines and Their Degradation Products in Complicated Matrix by Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

WU Xiao-feng^{1,3}, ZHENG Jia-xi¹, WEI Yuan-song^{1*}, ZHAO Xin², ZHONG Wei-ke²

(1. Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 3. China National Environmental Monitoring Centre, Beijing 100012, China)

Abstract: An analytical method was developed to simultaneously determine the three tetracyclines [tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC)] and their degradation products in complicated matrix, which consisted of swine manure and mushroom residues used for composting, using ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Samples were extracted by Na₂EDTA-McIlvaine buffer at pH 4 in combination with acetonitrile and then purified through solid phase extraction. The separation was performed on UPLC column using acetonitrile and 0.1% formic acid as mobile phase. Qualitative and quantitative analysis were carried out by a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source that operated in the positive ionization mode (ESI+). All the three tetracyclines and their degradation products achieved complete separation within 7 min and the total running time was 12 min. Accompanying with a pleasant reproducibility ($n=11$, $RSD<15\%$), the linearity of calibration curve was rather good in the range of 0~6 mg·kg⁻¹ DW (dry weight), with the R^2 all above 0.996 0. The recoveries of TC, OTC and CTC were 71%~89%, 66%~94% and 66%~84%, respectively, at the three spiked levels of 0.2 mg·kg⁻¹ DW, 1 mg·kg⁻¹ DW and 4 mg·kg⁻¹ DW. The recovery of demeclocycline was in the range of 52%~64%, and for the epimers, the recovery varied between 32% and 51% while the anhydro-tetracyclines and their corre-

收稿日期:2013-03-29

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303091);国家自然科学基金项目(21077122)

作者简介:吴晓凤(1986—),女,硕士,主要从事环境污染分析研究。

*通信作者:魏源送 E-mail:yswei@rcees.ac.cn

sponding epimers showed poor recoveries below 30%. The limit of detection and quantitation for the three tetracyclines and their degradation products were in the range of 1.668~17.270 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 5.561~45.918 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, indicating a high sensitivity for this method. Samples taken from an open windrow composting plant located in Beijing were determined by this method and the results presented that the concentrations of TC, OTC and CTC were 0.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 1.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 2.9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The detected degradation products were predominately their epimers, of which epi-chlortetracycline (ECTC) showed a highest concentration of 2.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, closing to its parent compound CTC. Other degradation products were also found at different levels.

Keywords: tetracycline antibiotics; degradation products; ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

为促进动物的生长及治疗和预防疾病,兽用抗生素广泛用于畜禽养殖业。但由于这些抗生素并没有被动物完全吸收,导致相当大比例的抗生素随着动物粪便和尿液的排出而进入环境。例如,40%~90%^[1-4]的抗生素将以原药或代谢产物的形式从动物的排泄物中排入环境,带来了严重的抗生素残留问题,并由此导致环境中细菌耐药性的提高,进而危害生态环境安全和人类健康。

四环素类抗生素是我国畜牧业中生产量和使用量最多的一种抗生素^[5]。由于四环素类抗生素的分子结构中含有多个可离解的官能团,如三羰基酰胺、酚-二酮以及二甲氨基等,其化学性质并不稳定,在酸碱等条件下均易发生变性反应,可通过差向异构、脱水以及差向脱水等形式形成相应的代谢产物。多数代谢产物的抗菌活性将会减弱或消失,但某些代谢产物甚至比母体的毒性还大^[6]。目前关于残留四环素类抗生素的检测方法报道的主要有酶联免疫法^[7]、薄层色谱法^[8]、液相色谱法^[9-12]以及液相色谱串联质谱法^[13-17]等。因具有高效、高灵敏度和高选择性等特点,液质联用法应用更为广泛。近年来,一种新的超高效液相色谱 UPLC 技术逐渐兴起。该技术采用亚 2 μm 的小颗粒作为色谱柱的填料,不仅能够在高压下(可耐压力 103 MPa)实现多种化合物的有效分离,显著提高柱效,还能实现多种化合物的快速分离,大大缩短分析时间,具有在较短时间内达到多种化合物快速并且高效分离的优势。

然而,当前国内外的研究多集中于四环素类抗生素母体的检测,而关于四环素类抗生素代谢产物的检测方法以及母体与代谢产物的同时检测还鲜见报道。多数的研究也仅限于土壤^[13,18]、水体^[14-16]以及动物粪便^[11-12,19]等基质较为单一的样品,而对于更为复杂的基质如畜禽粪便堆肥场的混合样品等研究的较少,这种混合样品通常由畜禽粪便与调理剂(如秸秆、木屑、蘑菇渣等)按照一定的比例混合而成,含有粗蛋

白、粗脂肪、纤维素、木质素、半纤维素以及氮、磷、钾等微量元素。

畜禽粪便与调理剂混合后进行堆肥处理,是一种应用广泛的畜禽粪便资源化处理方式。由于猪粪在我国畜禽粪便中所占的比例最大,本文以猪粪和蘑菇渣混合而成的堆肥物料这一复杂基质为代表,选择三种四环素类抗生素四环素(TC)、土霉素(OTC)和金霉素(CTC)及其代谢产物为研究对象,通过优化样品的预处理方法,并采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)技术,以期建立一种同时检测复杂基质中四环素类抗生素及其代谢产物的方法,为畜禽粪便堆肥场检测四环素类抗生素及其代谢产物提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:超高效液相色谱-四极杆串联质谱仪(UPLC-QqQ, Waters Micromass Quattro Premier XE, USA);十二孔固相萃取装置(Supelco, USA);旋转蒸发器(N-1100, EYELA, Japan);离心机(Avanti J-25, Beckman Coulter, USA);振荡器(SA31, Yamato Scientific Co., Japan);氮气浓缩仪(TurboVap LV, Caliper Life Sciences, USA);冷冻干燥机(ALPHA 1-2LD PLUS, Christ, Germany)。

标准品:四环素盐酸盐(Tetracycline hydrochloride 97.5%, CAS no. 64-75-5)、土霉素盐酸盐(Oxytetracycline hydrochloride 98.5%, CAS no. 2058-46-0)和金霉素盐酸盐(Chlortetracycline hydrochloride 99.0%, CAS no. 64-72-2)购于德国 Dr. Ehrestorfer 公司;差向四环素(4-epitetracycline hydrochloride, CAS no. 23301-80-6)、脱水四环素(Anhydrotetracycline hydrochloride, CAS no. 13803-65-1)、差向脱水四环素(4-epi-anhydrotetracycline hydrochloride 97%, CAS no. 4465-65-0)、差向土霉素(4-epioxytetracycline hydrochloride 97%, CAS no. 14206-58-7)、 α -脱水土霉素(α -apo-

oxytetracycline, CAS no.18695-01-1)、 β -脱水土霉素(β -apo-oxytetracycline, CAS no.18751-99-0)、差向金霉素(4-epichlortetracycline hydrochloride 97%, CAS no.101342-45-4)和差向脱水金霉素(4-epianhydrochlortetracycline hydrochloride, CAS no. 15808-53-2)共 8 种差向、脱水及其差向脱水等产物均购自 Acros Organics 公司(Geel, Belgium);去甲基金霉素(Demeclocycline hydrochloride 98%, CAS no. 64-73-3, TRC, Toronto, Canada);同位素内标代四环素(Tetracycline-d6)购自 TRC 公司(Toronto, Canada)。标准品用甲醇溶解后于-20℃冰箱避光保存。

化学试剂:磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 分析纯,北京化学试剂公司)、柠檬酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)、 Na_2EDTA (分析纯,天津市化学试剂六厂分厂)。实验所用的乙腈、甲醇、乙酸乙酯等有机试剂均为 HPLC 级(J.T. Baker Co., USA)。流动相使用的甲酸(HPLC 级,纯度 88%, CAS no. 64-16-6)购自美国 Mallinckrodt Baker 公司。

Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液的配制:将 1 L 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸溶液和 625 mL 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠混匀,并加入 60.5 g Na_2EDTA 溶解后混合均匀,用 H_3PO_4 或 NaOH 调节 pH 为 4.0 左右。

1.2 样品的采集和预处理

样品采自北京市某露天堆肥场,主要采用猪粪和蘑菇渣作为堆肥原料,混合比例为 1:2(体积比)。采集后的堆肥样品于 2 h 内送至实验室并于-20℃冰箱冷冻保存。经冷冻 24 h 后的样品置于冷冻干燥机中冷干,然后进行机械粉碎并过 100 目尼龙筛网,取筛余物分析测定。

由于本实验中样品基质的复杂性,预处理方法在前期建立的基础上^[20]进行了改进。准确称取 0.5 g 干燥样品于聚四氟乙烯管中,先加入 5 mL pH=4 的 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液,旋振混匀后再加入 10 mL 乙腈,再次旋振 1 min 使混合溶液充分混匀,然后置于振荡器中剧烈振荡 30 min。在 15 000 r·min⁻¹, 4℃下离心 5 min,取上清液转移至 100 mL 梨形瓶中备用。再分别用 5 mL pH=4 的 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液和 10 mL 乙腈反复提取两次,经离心后合并 3 次提取的上清液,于旋转蒸发器中进行旋蒸至体积浓缩为近 15 mL,然后用超纯水稀释至 100 mL,取 10 mL 进行固相萃取。

固相萃取采用 OASIS HLB 小柱(6 mL/150 mg, Waters)。HLB 小柱依次用 5 mL 乙酸乙酯,将甲醇和

pH=4 的 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液活化,上样后分别用 5 mL 超纯水和 5 mL 5%的甲醇溶液进行淋洗,然后用 9 mL 10%的甲醇乙酸乙酯溶液(V:V=1:9)进行洗脱。收集洗脱液并经氮气吹干后,用流动相(乙腈:0.1% 甲酸水=1:9, V:V)作为定容液定容至 1 mL,最后经过 0.22 μm 的尼龙膜过滤,于棕色自动进样瓶中保存以备上机测定。

1.3 色谱及质谱等仪器条件

1.3.1 色谱条件

采用 Waters Acquity UPLC 色谱仪和 Acquity U-PLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)进行分析。柱温 35℃,样品室温度 10℃,进样量为 10 μL 。流动相使用乙腈(A)和 0.1%甲酸水溶液(B),淋洗梯度如下:0~5 min,初始流动相 A 由 5%线性增加到 17%;5~6 min,流动相 A 变为 30%;6~10 min,流动相 A 变为 85%;经 10~11 min,流动相 A 的比例降为 5%并保持 1 min,总共运行 12 min。流速均为 0.3 mL·min⁻¹。

1.3.2 质谱条件

四极杆串联质谱仪 QqQ(Waters Micromass Quattro Premier XE)使用电喷雾解离源,正离子模式。操作参数如下:源温度 120℃,脱溶剂温度 350℃,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 22 V,去溶剂气流 600 L·h⁻¹,反吹气流 50 L·h⁻¹。数据采集使用多反应监测模式 MRM,扫描时间间隔为 0.03 s。优化后的三种四环素类抗生素及其代谢产物的质谱条件参数见表 1。

1.3.3 定性、定量及检出限、定量限

通过 UPLC 实现 12 种目标化合物的分离,并采用串联四极杆质谱仪 QqQ 进行定性和定量。当质谱离子通道中所选择的两组离子的保留时间相一致,且保留时间与离子比均和标准物质的保留时间及离子比相一致时,则予以确认。选择两组离子中响应值较高的离子作为定量离子。分别采用外标法和内标法进行定量计算,但在本研究中,3 种四环素类抗生素中仅有四环素的同位素可供购买,另外两种抗生素的同位素内标不可获得,因而内标法定量计算结果仅供参考。检出限和定量限分别采用信噪比大于 3 和 10 时所能检测出来的最小浓度。

1.4 样品加标回收率试验

在 0.5 g 干燥的空白样品中分别添加 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素类抗生素及其代谢产物的混合标准溶液 20、100、400 μL (对应的添加浓度分别为 0.2、1、4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),旋振混匀后,按照 2.2 中样品的预处理步骤进行相同的处理,然后上机测定。每个加标浓度水平各平行 3

表 1 MRM 条件下三种四环素类抗生素及其代谢产物的质谱优化参数

Table 1 Optimized MS parameters of three tetracyclines and their degradation products in MRM condition

目标分析物 Compounds	保留时间 Retention time/min	母离子 Parent ions[M+H] ⁺ /m·z ⁻¹	子离子 Product ions/m·z ⁻¹	定量离子 Quantitative ions/m·z ⁻¹	锥孔电压 Cone voltage/V	碰撞能 Collision energy/eV	离子通道 Channel
差向脱水四环素(EATC)	6.69	427	410 154	410	31	16 34	2
脱水四环素(ATC)	6.87		410 154		31	16 34	2
α-脱水土霉素(α-apo-OTC)	5.55	443	426 408	426	31	16 25	1
β-脱水土霉素(β-apo-OTC)	6.82		426 408		31	16 25	1
差向四环素(ETC)	4.32	445	410 427	410	28	19 15	2
四环素(TC)	5.08		410 427		28	19 15	2
差向土霉素(EOTC)	4.47	461	444 426	426	22	16 19	2
土霉素(OTC)	4.72		444 426		22	16 19	2
差向脱水金霉素(EACTC)	6.90		444 154	444	22	16 28	2
去甲基金霉素(DMCTC)	5.78	465	448 430	448	34	19 25	1
差向金霉素(ECTC)	5.93	479	444 462	444	34	22 15	1
金霉素(CTC)	6.34		444 462		34	22 15	1
氘代四环素(TC-d6)	5.07	451	416 433	416	28	20 15	2

次实验进行测定,最后分别计算各添加浓度水平下样品的加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理的优化

本研究中样品的成分除猪粪外(包含大量的有机质如蛋白质、脂肪和纤维素等),还含有相当比例的蘑菇渣等、有机肥料(含有粗蛋白、粗脂肪、纤维素以及氮、磷、钾等微量元素),因而基质非常复杂。为实现样品中四环素类抗生素及其代谢产物的检测而不受杂质的干扰,保证方法的可靠性和准确性,如何有效地提取样品中的目标分析物并实现样品的净化是首要解决的关键问题。对于环境中如土壤^[10-11]、粪便^[11]、蜂蜜^[21-22]等基质中的四环素类抗生素,多数学者均使用Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液。这是因为弱酸性的缓冲溶液更有利于提取目标物,同时在缓冲溶液中加入Na₂EDTA 能够有效地防止四环素类抗生素与金属离子的螯合,从而进一步提高对目标物的提取能力。但在本研究中由于基质成分的复杂性,采用 Na₂EDTA-

McIlvaine 缓冲溶液提取后,难以实现对目标物较为满意的回收。因此,本研究在此基础上,采用在提取液中添加有机溶剂乙腈的方法来考察其对复杂基质中目标物的提取能力,并研究了 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液与乙腈的混合比例不同时的提取效果。经研究表明,上述混合溶液的提取方法能够较好地增强对目标物的提取能力,且当二者的混合比例为 1:2(V:V)时获得的回收率最高。

在样品的富集净化过程中,由于基质过于复杂,为减少杂质的干扰,实现满意的回收率,需要对样品的富集净化过程加以改进。为去除样品中可能会造成干扰的油脂等杂质,在进行固相萃取 SPE 前,使用正己烷对提取后的上清液进行萃取,发现正己烷的萃取净化对目标物的回收率无明显改善作用。提取后的上清液在进行旋转蒸馏的富集浓缩作用的同时,在一定程度上也能够实现对样品的进一步净化。

最后在实验中发现,SPE 洗脱液在氮气吹干后,若使用纯有机溶剂甲醇溶解,目标物经过色谱柱分离后,将有一部分不被色谱柱保留而提前流出,表明作

为溶剂使用的甲醇增加了流动相的极性而不利于色谱柱对样品中目标物的保留,故采用和流动相相同的溶剂来溶解氮吹物较为适宜。

2.2 色谱及质谱条件的优化

2.2.1 色谱条件的优化

四环素类抗生素的代谢产物主要由母体通过差向异构、脱水及差向脱水等途径形成,因此均具有和母体相近的化学结构和理化性质。为实现母体及其产物的同时检测,需要选择高柱效的色谱柱来达到母体及其产物的完全分离。本实验使用直径为 $1.7\ \mu\text{m}$ 颗粒填充的 UPLC BEH C18 柱,能够显著提高目标物的分离效果,极大缩短目标物的分析时间,并且极大地改善峰形。同时为确保三种四环素类抗生素及其代谢产物均能实现较好的分离,采用了梯度淋洗的方式,并优化了流动相的组成比例及变化曲线,最终使得差向异构体之间的保留时间相差不小于 $0.18\ \text{min}$ 。从表 1 可看出,目标分析物的保留时间呈现出一定的规律,如差向异构体较其相对应母体的保留时间靠前,三种四环素类抗生素母体在色谱柱中的保留能力依次为:CTC>TC>OTC。经过色谱条件优化后,所有目标分析物均在 $7\ \text{min}$ 内完成分离,总共运行 $12\ \text{min}$,而普通的 HPLC 分析时间长达 $30\ \text{min}$ ^[13],与之相比,该方法可大大缩短分析时间。

2.2.2 质谱条件的优化

由于目标分析物多达 12 种,故采用 MRM 模式,并以各目标分析物的分子离子和信号强度较高的子离子组成相应的离子对进行监测。为提高串联质谱仪的灵敏度,使用两组离子通道分别扫描,扫描时间间隔为 $0.03\ \text{s}$ 。质谱的锥孔电压和碰撞能对目标物的裂解起着非常重要的作用,极大地影响灵敏度,因此重点优化了锥孔电压和碰撞能。优化后的参数见表 1。

在正离子解离模式下,目标分析物均有较高的灵敏度。除 TC 和 ETC 先裂解丢失一个分子量为 18 的中性分子外($-\text{H}_2\text{O}$),其他化合物均首先丢失分子量为 17 的中性碎片($-\text{NH}_3$),然后再裂解丢失分子量为 35 的中性分子($-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}$)。这些裂解特征和已有的文献报道相一致^[13,23-24],同时还可发现,三种四环素类抗生素母体 TC、OTC 和 CTC 及其差向异构产物的分子离子丢失分子量为 35 的子离子均具有较高的响应强度,三种四环素类抗生素母体 TC、OTC 和 CTC 及其相应的所有代谢产物的定量离子的分子量分别为 410、426 和 444。

对于多种化合物的同时检测,色谱的有效分离

是首要的前提条件,实现这些化合物的色谱分离,需对色谱柱的柱效提出更高的要求,这一般难以实现,但质谱和色谱的联用技术则能够较好地满足这一需求。色谱的分离能力和串联质谱的高选择性,可以同时实现目标物的分离和确认,使得色谱保留能力相近的化合物不需要达到完全分离就可以得到有效的确认。如在所研究的 12 种四环素类抗生素中,ATC、 β -apo-OTC 和 EACTC 的保留时间非常接近,在色谱中很难实现三者的完全分离,但若和质谱联用,无需完全分离即可实现可靠的鉴别和确认,达到分析检测的目的。

经优化条件后,三种四环素类抗生素及其代谢产物均能得到有效的分离和确认,其相应的标准溶液质谱图见图 1。

2.3 样品的加标回收率

为评价分析方法的准确性和可靠性,分别考察了三个加标水平 0.2 、 1 、 $4\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下 3 种四环素类抗生素及其代谢产物的回收率,每个加标浓度平行测定 3 次,采用外标法进行定量计算回收率的结果如表 2 所示。由于样品成分过于复杂,基质干扰效应比较强烈,3 种四环素类抗生素及其代谢产物的回收情况不尽相同。3 种四环素类抗生素母体 TC、OTC 和 CTC 的加标回收情况较好,回收率分别为 $71\%\sim 89\%$ 、 $66\%\sim 94\%$ 和 $66\%\sim 84\%$ 。而代谢产物的回收情况相对其母体而言不甚良好,其中 DMCTC 的回收率为 $52\%\sim 64\%$;在差向异构产物中,除 ECTC 的回收率波动变化较为明显外,其余两种差向产物的回收率均在 $32\%\sim 51\%$ 之间;脱水产物除 β -apo-OTC 外,回收率均低于 30% ,差向脱水产物甚至低于 10% ,尤其是 EACTC 基本无回收。以上回收率情况出现较大差异一方面除了可能与样品基质不同程度的干扰效应有关,如基质除对抗生素在提取和净化过程中产生不同程度的影响外,在仪器检测时对不同抗生素的信号抑制作用或增强效应也会存在一定的差异;另一方面由于母体与代谢产物本身理化性质的差异如不同 pH 条件下的稳定性明显不同等,尤其是一些脱水产物是在强酸性条件下(pH 值 <2)形成的,而样品在整个预处理过程中基本保持在弱酸性环境中,难以同时实现母体及其代谢产物较为满意的回收率。因此,本文所建立的分析方法在实际复杂基质样品的检测应用中,具有短时间内同时检测多种物质的优势,能够对 3 种四环素类抗生素母体(TC、OTC 和 CTC)实现较好的回收,但该方法对四环素类抗生素代谢产物的适用性不

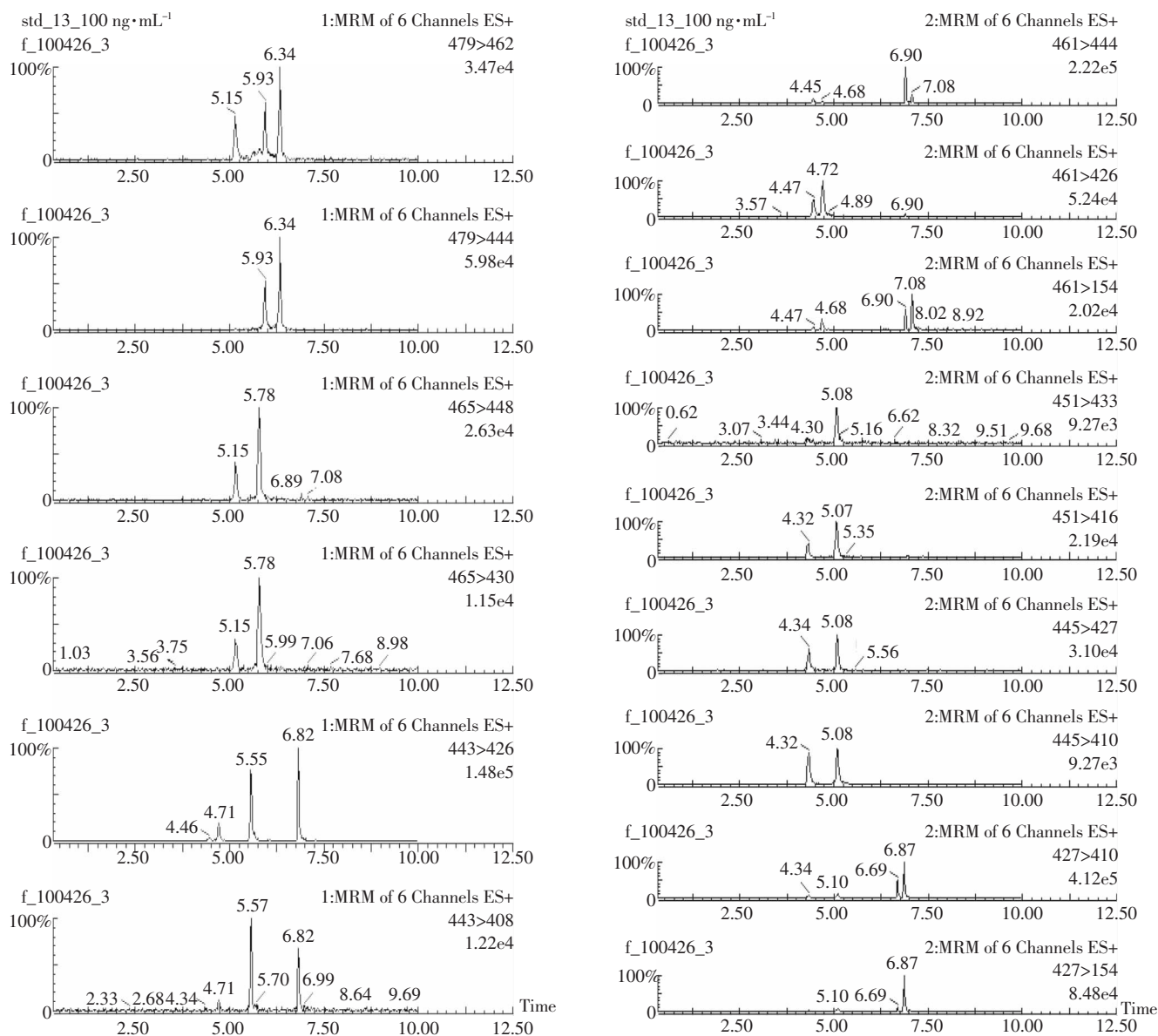


图1 3种四环素类抗生素及其代谢产物的标准溶液质谱图(标准溶液的浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Figure 1 Mass spectrograms of three tetracyclines and their degradation products in standard solution at $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

够,尚具有一定的局限性,有待后续进一步完善。

四环素类抗生素的分析方法是当前研究的热点问题,但多数集中于母体的分析方法上,关于其代谢产物的分析检测涉及较少。Arikan 等^[25]研究发现, α -apo-OTC 和 β -apo-OTC 在牛粪中的回收率分别为 40%和 25%,与之类似的低回收情况也曾被 Fedeniuk 等^[26]报道过。在含有粪便的基质中, α -apo-OTC 的回收率为 18.3%^[27],略高于本文的研究结果。

在本文研究中,唯一可商业购买的氘代四环素同位素被用作内标添加到样品中以同步考查方法的回收率,结果表明四环素同位素内标的绝对回收率为 60%左右,而所研究的 12 种目标化合物的回收率与

之具有较大的差异,因此无法用 12 种目标化合物的内标物来进行内标法计算。

2.4 线性关系、重现性、检出限及定量限

实验结果表明,在 $0\sim 6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DW 浓度范围内,标准曲线的线性良好,其线性相关系数 R^2 均大于 0.996 0。3 种四环素类抗生素母体及其代谢产物的检出限和定量限分别为 $1.668\sim 17.270\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.561\sim 45.918\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (表 3)。Zhao 等^[28]采用高效液相色谱法测定猪粪中的四环素类抗生素时发现,该方法的定量限为 $0.091\sim 0.182\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。胡献刚等^[29]研究了固相萃取-反相高效液相色谱法测定畜牧粪便中残留的 13 种抗生素,其中四环素类抗生素(TC、OTC、CTC 和 DMCTC)

表 2 3 种四环素类抗生素及其代谢产物的加标回收率(%)

Table 2 Recovery of three tetracyclines and their degradation products(%)

目标物 Compounds	回收率 Recovery±RSD(n=3)/%		
	加标浓度 Spiked level 0.2 mg·kg ⁻¹ DW	加标浓度 Spiked level 1 mg·kg ⁻¹ DW	加标浓度 Spiked level 4 mg·kg ⁻¹ DW
TC	71±5.4	89±9.2	88±2.8
ETC	51±11.4	37±15.7	36±7.9
ATC	21±13.8	26±6.6	21±12.7
EATC	3±8.9	6±1.2	6±11.1
OTC	66±25.7	94±17.1	73±7.2
EOTC	32±28.8	35±1.3	46±2.2
α- apo-OTC	4±21.9	8±13.5	3±11.0
β- apo-OTC	50±6.7	43±10.0	24±14.5
CTC	84±1.9	83±7.4	66±4.1
ECTC	224±0.1	102±4.8	48±2.1
DMCTC	53±6.9	64±6.1	52±3.7

的检出限和定量下限分别为 10~20 μg·L⁻¹ 和 33~67 μg·L⁻¹。由此表明该方法具有较高的灵敏度。

配制 20 μg·L⁻¹ 标准溶液,并连续进样 11 次,所得相对标准偏差均小于 15%,表明重现性较好。

2.5 某堆肥场中四环素类抗生素及其代谢产物的检测

在北京市某露天堆肥场中分别采集堆肥过程中高温期和后腐熟期的堆肥产品,样品的主要成分为猪粪和蘑菇渣。3 种四环素类抗生素及其代谢产物的检测结果(图 2 和图 3)表明,堆肥高温期样品中 3 种四环素类抗生素 TC、OTC 和 CTC 的浓度分别为 0.4、1.6、2.9 mg·kg⁻¹,检测到的代谢产物主要为相应的差

表 3 检出限及定量限、重现性和线性相关系数

Table 3 Limit of detection and quantitation, reproducibility and linearity of calibration curve

目标分析物 Compounds	检出限 Limit of detection LOD/μg·kg ⁻¹	定量限 Limit of quantitation LOQ/μg·kg ⁻¹	重现性 Reproducibility (n=11)/%	线性相关系 数 Linearity R ²
TC	3.189	10.630	5.332	0.996 0
ETC	2.947	9.824	5.843	0.999 0
ATC	1.668	5.561	8.376	0.997 0
EATC	1.893	6.309	5.773	0.999 7
OTC	13.775	45.918	6.648	0.998 4
EOTC	4.444	14.814	13.054	0.999 4
α-AOTC	3.791	12.636	4.360	0.997 9
β-AOTC	12.346	41.154	13.326	0.998 7
CTC	6.707	22.357	6.789	0.999 1
ECTC	17.270	57.567	10.742	0.998 9
EACTC	4.904	16.347	9.308	0.996 1
DMCTC	5.768	19.226	7.055	0.999 6

向异构体,其中:ETC 的浓度为 0.25 mg·kg⁻¹,约为母体的一半;EOTC 的浓度为 0.02 mg·kg⁻¹,稍高于检出限;ECTC 则和母体的含量水平比较接近,为 2.7 mg·kg⁻¹;DMCTC 也有检出,其浓度为 0.15 mg·kg⁻¹,而脱水产物等仅有 ATC 被检出。腐熟后的堆肥成品中,3 种四环素类抗生素母体的浓度均大幅降低,分别降至 0.12、0.12、0.74 mg·kg⁻¹,除 ECTC 和 EOTC 还能被检出外,其他产物均未检出。以上结果表明,随着堆肥过程的进行,四环素类抗生素均存在不同程度的降解,在降解过程中产生了相应的代谢产物,并且这些代谢产物在堆肥的过程中也不断地减少。

此外,在该堆肥场中还采集了组分更为复杂的堆肥产品,除含有猪粪和蘑菇渣外,还掺杂有相当比例的鸡粪、马粪以及木糖渣等其他农业废弃物。采用相同的分析方法对该样品进行测定,发现 TC、OTC 和 CTC 的浓度在 30~256 μg·kg⁻¹ 范围内,唯一检测到的产物为 ECTC,并且在此基质中 3 种四环素类抗生素及其代谢产物的加标回收情况与以上样品的回收基本相近,表明该方法可以适用于基质较为复杂的环境样品中的四环素类抗生素的检测。

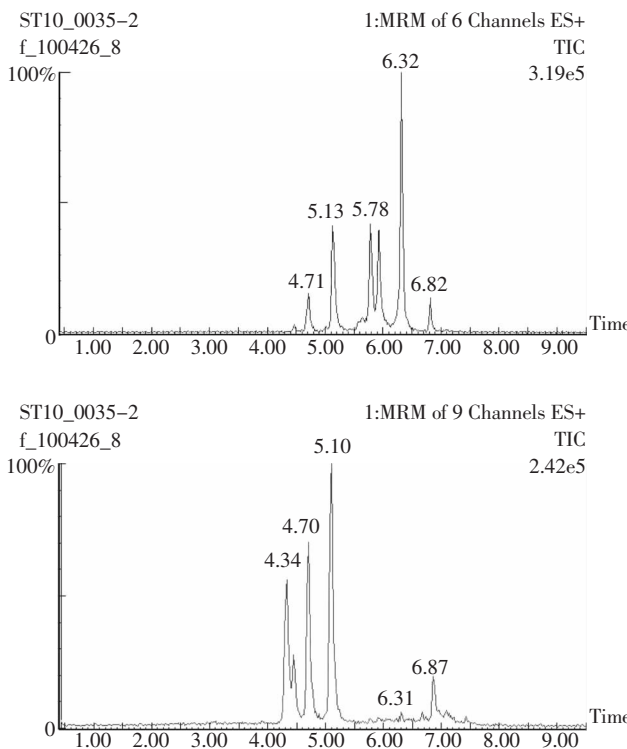


图 2 堆肥高温期样品中 3 种四环素类抗生素及其代谢产物的总离子流图

Figure 2 TIC spectrogram of three tetracyclines and their degradation products in the thermophilic stage sample

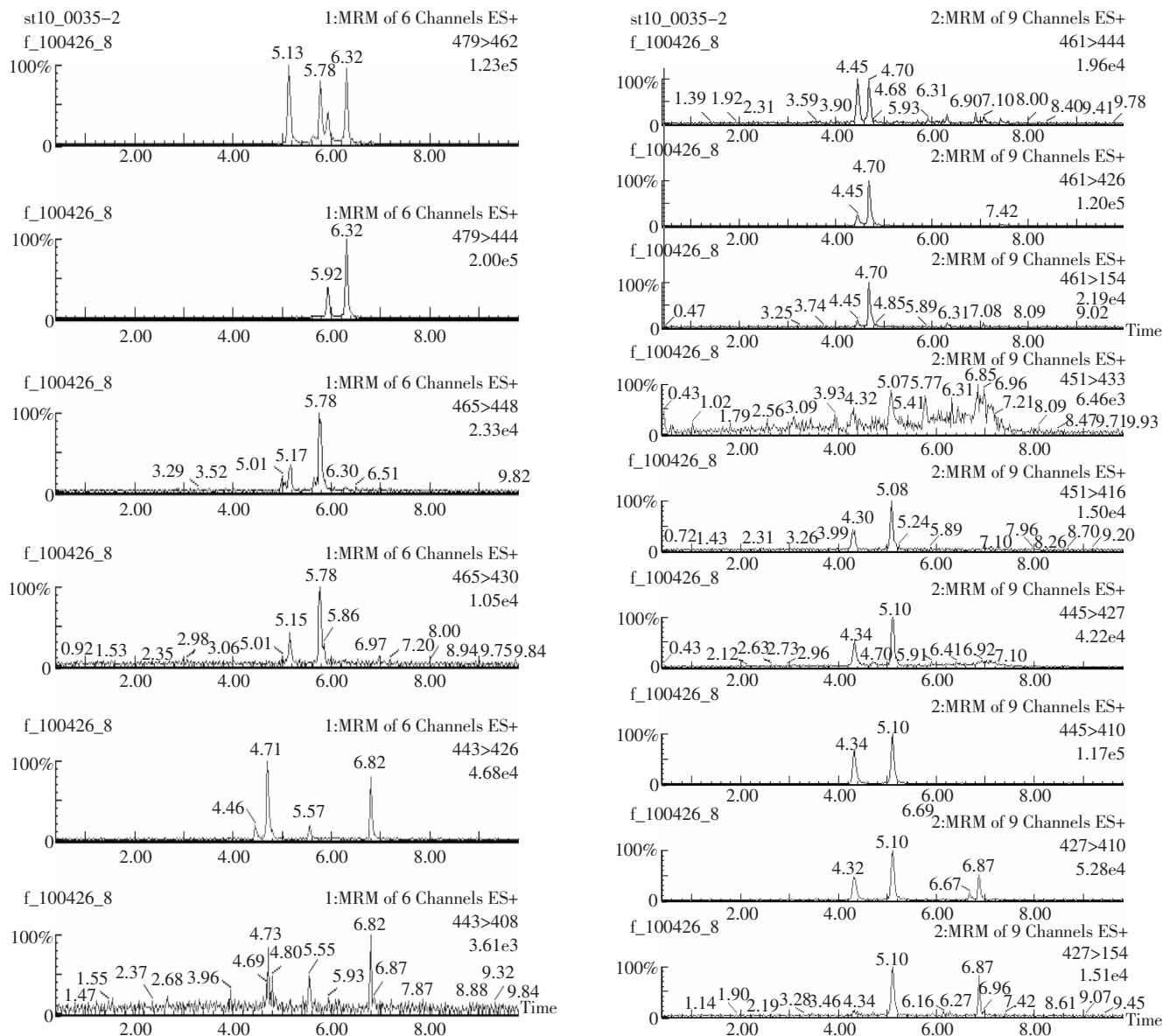


图3 堆肥高温期样品中3种四环素类抗生素及其代谢产物的MRM质谱图

Figure 3 Mass spectrograms of three tetracyclines and their degradation products in the thermophilic stage sample

3 结论

针对复杂基质中(由猪粪和蘑菇渣等混合而成的堆肥原料)3种四环素类抗生素(四环素 TC、土霉素 OTC 和金霉素 CTC)及其代谢产物建立了利用超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)进行同时检测的方法,得到如下结论:

(1)本方法可用于同时检测复杂基质中的3种四环素类抗生素及其代谢产物,除脱水产物及差向脱水产物的回收率较低,其余目标分析物均能有较好的回收率。

(2)3种四环素类抗生素及其代谢产物的检出限

和定量限分别在 $1.668 \sim 17.270 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5.561 \sim 57.567 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内,表明本方法具有较高的灵敏度,且检测时间较普通 HPLC 分析方法明显缩短。

参考文献:

- [1] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: A review[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2):357-393.
- [2] Kumar K, Gupta S C, Chander Y, et al. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment[J]. *Advances in Agronomy*, 2005, 87:1-54.
- [3] Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment[J]. *Ecological Indicators*, 2008, 8(1):1-13.
- [4] Halling-Sørensen B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of

- bacteria in sewage sludge by antibacterial agents[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 40(4):451-460.
- [5] 陈育枝, 张元元, 袁希平, 等. 动物四环素类抗生素现状及前景[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(03):16-17.
- Chen Y Z, Zhang Y Y, Yuan X P, et al. The status and prospects of animals tetracycline antibiotics[J]. *Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives*, 2006, 11(03):16-17.
- [6] Halling-Sørensen B, Sengelov G, Tjornelund J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 42(3):263-271.
- [7] Aga D S, O'Connor S, Ensley S, et al. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18):7165-7171.
- [8] Ikai Y, Oka H, Kawamura N, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics; Systematic simultaneous analysis of tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1987, 411:313-323.
- [9] Blackwell P A, Lützhøft H C H, Ma H P, et al. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1045(1-2):111-117.
- [10] Blackwell P A, Holten Lützhøft H C, Ma H P, et al. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection[J]. *Talanta*, 2004, 64(4):1058-1064.
- [11] Karcı A, Balçoglu I A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey[J]. *Science of The Total Environment*, 2009, 407(16):4652-4664.
- [12] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(5):1069-1075.
- [13] Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, et al. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(7):1509-1518.
- [14] Pailler J Y, Krein A, Pfister L, et al. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(16):4736-4743.
- [15] Tong L, Li P, Wang Y, et al. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(8):1090-1097.
- [16] Gros M, Petrovic M, Barcelo D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(3):898-912.
- [17] Vidal J L M, Aguilera-Luiz M D, Romero-Gonzalez R, et al. Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(5):1760-1767.
- [18] 马丽丽, 郭昌胜, 胡伟, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中氟喹诺酮、四环素和磺胺类抗生素[J]. 分析化学, 2010, 38(1):21-26.
- Ma L L, Guo C S, Hu W, et al. Simultaneous extraction and determination of eighteen fluoroquinolone, tetracycline and sulfonamide antibiotics from soils using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(1):21-26.
- [19] Martinez-Carballo E, Gonzalez-Barreiro C, Scharf S, Gans O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 148(2):570-579.
- [20] 沈颖, 魏源送, 郭睿, 等. 超高效液相色谱串联质谱检测猪粪中残留的四环素类抗生素[J]. 环境化学, 2009, 28(5):747-752.
- Shen Y, Wei Y S, Guo R, et al. Determination of tetracyclines residues in swine manure by UPLC/MS[J]. *Chinese Journal of Environmental Chemistry*, 2009, 28(5):747-752.
- [21] Zhou J H, Xue X F, Li Y, et al. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(3):1074-1080.
- [22] Peres G T, Rath S, Reyes F G R. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey[J]. *Food Control*, 2010, 21(5):620-625.
- [23] Zhu J, Snow D D, Cassada D A, et al. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 928(2):177-186.
- [24] Lindsey M E, Meyer M, Thurman E M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials, in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(19):4640-4646.
- [25] Arikani O A, Sikora L J, Mulbry W, et al. The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7):1637-1643.
- [26] Fedeniuk R W, Ramamurthi S, McCurdy A R. Application of reversed-phase liquid chromatography and prepacked C-18 cartridges for the analysis of oxytetracycline and related compounds[J]. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 1996, 677(2):291-297.
- [27] Loke M L, Jespersen S, Vreeken R, et al. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 783(1):11-23.
- [28] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(5):1069-1075.
- [29] 胡献刚, 罗义, 周启星, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜牧粪便中 13 种抗生素药物残留[J]. 分析化学, 2008, 36(9):1162-1166.
- Hu X G, Luo Y, Zhou Q X, et al. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of analytical Chemistry*, 2008, 36(9):1162-1166.