

不同基质样品中痕量抗生素前处理方法研究进展

王红艳^{1,2}, 徐建^{1*}, 张远¹, 王玉秋²

(1. 中国环境科学研究院, 环境基准与风险评估国家重点实验室, 流域水生态保护技术研究室, 北京 100012; 2. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 系统分析了固体、液体和生物样品中抗生素的液液萃取、固相萃取、自动在线固相萃取、固相微萃取、搅拌棒吸附萃取、超临界流体萃取、加速溶剂萃取、微波辅助萃取、基质固相分散萃取以及免疫亲和色谱法等前处理方法的原理、应用及优缺点, 通过对目前提取和净化方法的比较, 展望未来的发展方向。

关键词: 抗生素; 环境基质; 提取; 净化

中图分类号: X830.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)02-0215-09 **doi:** 10.11654/jaes.2013.02.002

Pretreatment Methods on Trace Antibiotics Analysis in Different Matrix

WANG Hong-yan^{1,2}, XU Jian^{1*}, ZHANG Yuan¹, WANG Yu-qiu²

(1. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Laboratory of Riverine Ecological Conservation and Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing, 100012, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Antibiotics pollution in the environment has drawn much attention recently by both scientific and regulatory communities, mainly due to their intrinsic pharmaceutically activity, spread in environment and maintenance of bacterial resistance. To study their environmental behavior in the ecosystem and assess their potential risks, it is essential to quantitatively determine their occurrence in different environmental matrices. Because of the matrix complexity and trace levels of antibiotics, pretreatment of environmental samples to quantification is critical. In this paper, we reviewed various pretreatment methods including liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, automated online solid phase extraction, solid phase micro-extraction, stir-bar sorptive extraction, supercritical fluid extraction, accelerated solvent extraction, microwave assisted extraction, matrix solid phase dispersion and immunoaffinity chromatography. Their basic principles, application, advantages and disadvantages for pretreating antibiotics in liquid, solid and biological samples were summarized and discussed. Future development directions on antibiotics extraction and purification were proposed.

Keywords: antibiotics; environmental matrix; extraction; purification

抗生素在人和动物疾病防治、食品加工、农业等诸多领域的大量使用造成其不同环境介质中的广泛暴露。目前, 抗生素类污染物在水体、沉积物、大气以及生物样品中均有检出。虽然抗生素在环境中的含量较低, 大多处于 10^{-6} ~ 10^{-9} g 之间, 但由于人类活动持续不断的输入, 使其在环境中形成“持续存在”的现

象。抗生素的过度使用加速了耐药基因在细菌间的传播, 使得耐药菌的数量不断增加, 导致抗生素的治疗效力逐步下降。为防治抗生素污染、抑制细菌耐药性、保障人类和环境健康安全, 必须建立简便、快速的抗生素分析方法。但因环境介质复杂、抗生素浓度水平低, 对其分析检测需要先对环境样品进行提取、净化、浓缩等前处理, 才能保证分析测定的准确性。本文系统阐述了固相萃取、超临界流体萃取、加速溶剂萃取等前处理技术在固体、液体以及生物样品等不同基质中抗生素测定的应用以及各方法的优缺点, 为今后的研究提供方法借鉴。

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51178438, 20977051)

作者简介: 王红艳(1988—), 女, 天津蓟县人, 硕士, 主要从事抗生素污染研究。E-mail: Axia_Wong@163.com

* 通信作者: 徐建 E-mail: xujian@craes.org.cn

1 液体基质中抗生素的前处理方法

抗生素类样品的前处理包括采样后的预处理和提取净化等过程。液体样品的前处理通常包括过滤、加入抑菌剂(甲醇^[1]、甲醛溶液^[2]、 Hg^{2+} ^[3]、 NaN_3 ^[2])、低温冷藏等;液体基质中抗生素的前处理方法主要有液液萃取和搅拌棒吸附萃取等。

1.1 液液萃取(Liquid Liquid Extraction, LLE)

液液萃取是利用待测组分与杂质在互不相溶的两相中溶解性差异进行净化的方法,适用于半极性和非极性分析物。近几年的研究中,利用 LLE 对环境中的抗生素样品的提取应用报道较少,有时需将其与固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)等方法结合起来使用。

权伍英等^[4]以乙酸乙酯为萃取剂用 LLE 提取了蜂蜜中的氯霉素,操作步骤简单,方法准确、可靠、灵敏。Lucchetti 等^[5]采用该法对虹鳟样品进行提取的实验表明 LLE 步骤简单、减少了玻璃器皿的用量。LLE 除可单独用于液体基质的萃取外也适用于与 SPE 相结合对固相生物基质(如蔬菜和鱼)中的抗生素进行萃取, Maia 等^[6]采用该法提取了番茄中的氧四环素,其高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)测定的方法检测限可以低于巴西法律规定的最大残留值 $250 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

LLE 无需特殊装置和材料,但耗时、所需有机溶剂量大,导致成本提高以及对环境的污染,难于从水中提取高水溶性物质,这些都限制了其实际应用。

1.2 搅拌棒吸附萃取(Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE)

搅拌棒吸附萃取是水样中有机化合物富集的有效处理技术,其原理与固相微萃取类似,只是萃取相覆盖的是搅拌棒而不是聚合物纤维涂层。最常用的吸附萃取相是聚二甲硅氧烷(PDMS)。SBSE 所用提取相的量是 SPME 用量的 50~250 倍,因而对目标物的回收和萃取量都较高。在过去的几年中,SBSE 由于回收率高、重现性好、精密度高而迅速发展,并且被成功应用于环境和生物样品中目标物的痕量分析,其检测限在 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 级。SBSE 的形式有直接和顶空吸附萃取两种,前者是通过带有萃取涂层的搅拌棒在萃取时完成自身搅拌而避免因磁子搅拌产生竞争吸附的萃取方式,后者是则针对挥发性有机物设计的萃取方式^[7]。

Huang 等^[8]首次将 SBSE 技术用于水样中抗生素类物质的检测,拓展了 SBSE 的应用领域。研究采用自发合成的 SBSE 涂料,通过对 pH、解吸溶剂、样品基质中离子强度、提取及解吸时间在内的参数的考查

发现,在 pH 为 5,解吸溶剂为甲醇:水=80:20(V:V),不加任何盐(盐的阳离子会与氨基竞争结合磺胺基团而影响目标物的提取率)的最佳实验条件下,方法的灵敏度高、线性好、操作简便且成本低。

SBSE 方法最大的优点是灵敏度高,而且线性相关度和重现性好。其不足之处在于可选用的涂层种类少,目前使用最广泛的是 PDMS,作为非极性涂层,它更适于挥发性和半挥发性有机物,而萃取极性有机物时需要进行衍生,效果不理想。但研究者可通过自发合成 SBSE 涂层实现低成本、快速便捷的抗生素前处理过程^[29]。

1.3 其他方法

中空纤维膜液相微萃取(Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HF-LPME)作为液相微萃取的一个子类,以多孔的中空纤维为微萃取溶剂载体,通过有机溶剂在纤维孔中形成的液膜进行传质,在中空纤维腔中进行的萃取方法。该法集采样、提取和浓缩于一体,具有成本低、易与检测装置联用以及突出的样品净化功能。Tao 等^[9]采用中空纤维膜液相微萃取结合高效液相色谱法(HF-LPME-HPLC)检测环境水样中的 5 种磺胺类抗生素,在最佳实验条件下方法检测限在 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围宽($1 \sim 2000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

免疫亲和色谱(Immunoaffinity Chromatography, IAC)是一种基于免疫反应的基本原理利用色谱的差速迁移理论实现样品分离分析的一种方法^[10]。其主要操作步骤为:通过将特异性抗体固定在担体(supporter)上制成免疫亲和担体,填入柱中;分析时样品中的待测组分与柱内吸附剂上的抗体发生特异性结合而被保留在柱上,其他组分则被淋洗;用适当的洗脱剂将待测组分洗脱下来以备下一步分析。抗原抗体的特异性反应决定了免疫亲和色谱的专属性,此外免疫亲和色谱法还具有灵敏度高、样品纯化效能高等突出特点。但由于在免疫分析中时有交叉反应发生,会对 IAC 的选择性产生影响,需要制备较高纯度或具有多个活性位点的抗体才能达到较理想的效果。而且抗体的制备和纯化周期较长,需要生物技术支持,使得 IAC 柱子价格较昂贵。Crabbe 等^[11]用 IAC 法分离尿样中的磺胺二甲嘧啶(SMZ),制备了对 SMZ 和其在尿液中的代谢物都能识别的多克隆抗体,发现 SMZ 和其代谢物的分离和浓缩可直接通过将样品过 IAC 柱来完成,无需提前解离,方法回收率在 92%~100%之间。樊磊^[12]将氧氟沙星与两种载体蛋白偶联合成了两种人工抗原。用合成的免疫原免疫家兔从而制备出高

效价的抗氧氟沙星血清。将其纯化后研制出特异性吸附氧氟沙星的免疫亲和色谱柱,经高效毛细管电泳检测,该柱对加标氧氟沙星标准工作液的平均回收率较高(94.05%)。

2 固体基质和生物样品中抗生素的前处理方法

对于土壤、沉积物等固体样品以及动植物组织等生物样品,目前常用的提取富集方法有加速溶剂萃取、基质固相分散萃取等。

2.1 加速溶剂萃取(Accelerated Solvent Extraction, ASE)

加速溶剂萃取也称加压液体萃取或加压流体萃取(Pressured Liquid Extraction, PLE)。作为一种解决固体、半固体样品前处理的新技术,ASE近年来受到了分析化学界的极大关注,已在环境^[13-15]、食品^[16-17]以及药物和聚合物工业等领域得到广泛应用。ASE是在一定的温度(50~200℃)和压力(10.3~20.6 MPa)下用溶剂对固体或半固体样品进行萃取的方法。其主要过程为:向样品池中加入溶剂;加热和加压;静态萃取;新鲜溶剂冲洗;循环前两步操作;氮气冲洗。影响其萃取效果的主要因素有萃取溶剂的选择、温度、萃取时间和周期等。其中温度在ASE过程中起到促进质量转移和溶解的作用,但温度过高会导致萃取的固相有机质增加而产生基质效应。

Göbel等^[18]用对德国市政污水处理厂和瑞士活性污泥样品中的大环内酯类抗生素和三甲氧苄二氢嘧啶的研究发现,相比于大环内酯类抗生素,ASE对磺胺类抗生素的萃取率更高,且该法优于超声萃取法。Stoob等^[19]对老化土壤中5种磺胺类抗生素的分析研究发现目标物的热稳定性使得温度成为影响ASE提取磺胺类抗生素效率的最重要因素。Jelić等^[20]对污泥和沉积物中包括多种抗生素在内的药物研究发现,温度升高会使得溶剂粘度降低,溶剂便能更好地渗入到样品基质中,并显著降低水的介电常数,从而减少或者取消有机溶剂的用量。厉文辉等^[21]使用优化的ASE萃取条件、HLB固相萃取柱净化法对鱼肉中22种抗生素药物的分析也得到了较好的效果(检出限为0.02~0.6 μg·kg⁻¹)。Font等^[16]以热水为萃取剂对猪肉中的磺胺类抗生素进行提取并经Oasis HLB净化后分析得到的线性(R^2 在0.996和0.997之间)、准确度(RSD<14%)和回收率(76%~98%)都令人满意,实现了目标物的环境友好提取。

ASE法的自动化减少了实验者的操作,分析速度快,溶剂用量少,萃取效率高,重复性好,回收率和精密

度极好,费用低;其不足之处在于高温高压的操作条件对仪器设备要求较高,且暂无与ASE联用的技术。

2.2 基质固相分散(Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)

自1989年美国Louisiana州立大学的Staren Barker教授首次提出MSPD技术以来,该法因适用于固体、半固体和生物样品的分散和萃取而在各个领域得到广泛应用^[22]。其主要原理为将样品与涂有脂溶性材料(如C18等)充当分散剂的各种聚合物固相萃取材料一起研磨,并以所得到的半干的混合物作为填料装柱,再用不同的溶液淋洗柱子,从而将各种待测物洗脱^[23]。该法将传统样品前处理中的样品匀化、细胞裂解、提取和净化等过程进行浓缩,减少了被测物的损失,不仅适合于动物组织还适用于植物样品分析。其主要操作步骤为:在研钵中充分搅拌样品与固体吸附材料;将分散均匀的混合物装柱;用洗脱剂冲洗柱子;收集洗脱液。影响MSPD分析的因素主要有固体吸附材料和键合相的性质、样品基质、洗脱剂的性质及添加顺序等。

Bogialli等^[24]用MSPD法以含有白硅石的沙子为固体吸附材料,以热水为萃取剂实现了环保有效地提取牛奶和鸡蛋中的磺胺类抗生素,方法加标回收率(77%~92%)和定量检测限(1~6 ng·g⁻¹)都较好。该课题组又于2006年以Na₂EDTA为固体吸附材料,萃取剂不变的条件下,用MSPD萃取牛肉、猪肉和禽肉组织中四环素类抗生素,并用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)进行测定,方法精确度在88%~109%之间,定量限范围在1~9 ng·g⁻¹之间^[25]。

Yan等^[26]采用分子印记基质固相萃取技术(MIP-MSPD)选择性萃取鸡蛋和猪肉组织中5种氟喹诺酮类抗生素,研究表明以分子印记聚合物(Molecular Imprinted Polymers, MIPs)作为选择性MSPD吸附剂,可以有效地从鸡蛋和猪肉组织等生物基质中萃取目标抗生素,且同时消除基质干扰。Li等^[27]用基质固相分散-毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)法提取并分离了血液样品中的四种氟喹诺酮类抗生素,在最佳实验条件下,目标物能够被较好地分离,并且有较高的回收率。Liu等^[28]用在线基质固相分散快速液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法同时检测了草鱼组织中的13种磺胺类抗生素,方法不仅灵敏可靠而且环境友好,具有广阔的应用前景。

MSPD法经济、快速、重现性好;对实验人员水平要求较低,易于推广。其不足之处在于富集功能差,对痕量组分检测灵敏度较低;有些杂质不能去除,造成

使用局限。

3 固液基质均适用的抗生素前处理方法

3.1 固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)

SPE是在LLE的基础上,依据不同组分在固相填料上作用力的强弱使待测物与其他组分分离的原理建立的一项样品前处理技术。其主要过程为:活化固相萃取柱;加样品;淋洗柱子去除干扰杂质;洗脱目标物。影响SPE效果的因素主要有柱子填料(类型)、洗脱剂、洗脱程序、样品pH等,此外有选择地将柱串联也能提高萃取效率。

柱子填料是决定SPE效果的关键,依据相似相容原理选择与分析物极性最接近的固定相可以得到分析物的最佳保留。Rao等^[29]对活化的Supelco C18、Lichrolut EN、Isolute ENV+和Oasis HLB四种萃取柱提取地表水中氟喹诺酮类、甲氧苄啶、磺胺甲噁唑和头孢类等抗生素效果的比较研究发现,在酸性条件下,亲水亲油平衡(HLB)小柱对所有目标物的回收率最高,达80%以上;而C18柱的回收率最低;HLB柱对极性和非极性化合物的保留和回收率都很好,所以通常用其取代传统的C8、C18和离子交换柱对环境基质中的抗生素进行前处理。

Ben等^[1]通过分别考察单独或联合应用包括环己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮和甲醇在内的洗脱液对萃取抗生素效率的影响,证明以二氯甲烷/丙酮(3:2, V:V)为洗脱液可以达到较高的抗生素回收率,且洗脱下来的基质有机物干扰最少。如前所述,为防止重金属离子竞争性地结合HLB柱上的吸附点位,在样品过柱前需向其中加入络合剂 Na_2EDTA ^[1]或 K_2EDTA ^[30]以提高抗生素的前处理回收率。Tong等^[2]的研究也证实了这一点,其在预实验中发现加入 Na_2EDTA 后四环素类抗生素的回收率提高了近20%,而其他目标物的回收率提高不到10%。

样品的pH通过影响目标抗生素的存在形态来影响其在固相萃取柱上的保留,因此在样品过柱前需调节其pH以期得到更好的回收率。有研究发现,在强酸性条件下(pH=2.0),养猪场废水中氟喹诺酮类和四环素类的回收率(>70%、>60%)明显高于磺胺类(<40%);而在中性条件下(pH=7.0),磺胺类抗生素的回收率(>70%)又明显高于除环丙沙星以外的其他四环素和氟喹诺酮类抗生素(<30%);在弱酸性条件(pH=4.0)下,所有目标物的回收率都在54.2%~98.7%之间,造成这种现象的原因在于目标物所具有的两性

性质^[2]。

为提高SPE对目标抗生素的选择性提取效力,可以将SPE柱进行串联。Karthikeya等^[31]和Jacobsen^[32]将强阴离子交换(SAX)柱与HLB小柱串联起来去除天然有机质以减轻环境基质的强烈干扰作用。Christian等^[31]将SDB-2和Oasis HLB小柱分别活化后将两者串联进行抗生素提取也得到了较好的回收率(70%~106%)。

固相萃取可同时完成样品富集与净化,大大提高检测灵敏度,比液液萃取更快速、更节省溶剂,可自动化批量处理,特异性高、重现性好,是目前抗生素样品应用最为广泛的前处理方法。

3.2 自动在线固相萃取(Automated Online Solid Phase Extraction)

自动在线固相萃取通常与液相色谱联用以实现目标物的全自动分析,近年来该技术在诸多领域得到了应用^[33-35]。该方法因样品处理量大,省去了蒸发、定容等步骤而在省时方面具有优势^[36]。此外,自动在线SPE因直接将总萃取物转移至色谱分析系统而具有所需样品量小、灵敏度高等优点^[37-40]。

Stoob等^[37]采用全自动在线SPE-LC-MS/MS技术定量检测天然水体中低浓度磺胺类抗生素时,通过柱切换技术实现在线固相萃取柱与LC-MS/MS的直接结合。Kantiani等^[38]用在线SPE Symbiosis Pharma系统对牛奶样品进行预浓缩,分析其中的 β -大环内酯类抗生素,方法的定量限在0.99~1.44 ng·mL⁻¹之间。与此相似,García-Galón等^[39]用自动在线SPE样品处理器Prospekt-2TM进行样品预浓缩和净化,实现了不同水样中19种磺胺类抗生素的同时检测。该Prospekt-2TM包括一个自动柱交换模块(automated cartridge exchange, ACE)和一个高压分配器模块(high pressure dispenser, HPD)。ACE含有两个96孔托盘(用于放置固相萃取柱)以及两个接头和两个高压阀。HPD模块可实现柱的预活化、平衡、上样和净化等操作。自动上样后进行萃取,然后转换到洗脱接头将分析物从固相萃取柱直接洗脱到液相色谱柱进行分析。在样品进行LC-MS/MS分析时,可在新柱上同步萃取下一个样品而减少了循环时间。与固相萃取类似,可从吸附材料、溶剂、固相萃取柱的上样量几方面对在线固相萃取过程进行优化。

MIPs作为选择性固相萃取填料可特异性识别具有相似物理化学性质的化合物,且能够不失活性地被重复利用。依据这一特点,Rodríguez等^[40]采用新型水

溶解性单分散 MIPs 微珠来进行饮用水和养殖水中氟喹诺酮类抗生素的在线分子印记 SPE-LC-FLD 检测。研究中以恩诺沙星为模板通过沉淀聚合法制备了单分散 MIPs,再将其与甲醇混合成浆状一起填入不锈钢柱子,通过转换阀将该柱与常规液相色谱分析柱相连。方法回收率在 62%~102%之间,检测限分别为 $1\sim 11\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (饮用水)、 $1\sim 12\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (鱼池水),且准确度较好($\text{RSD}<5\%$)。

根据以上研究成果可以发现,近年来自动在线固相萃取技术已经逐渐在环境领域得到应用且正在不断完善。因其节省时间和溶剂、无需大量人力且节省药品用量而将成为抗生素前处理领域的一个重要发展方向。

3.3 固相微萃取(Solid Phase Microextraction, SPME)

固相微萃取技术是传统固相萃取法的延伸,该法用涂有固定相(如聚甲基硅氧烷或聚丙烯酸酯等高聚物)的熔融石英纤维来吸附、富集样品中的待测物。其操作有三种模式,即直接萃取(适用于气体和洁净水体样品),顶空萃取(适用于基质复杂的液体或固体样品)和膜萃取。通常 SPME 技术需要对固定相^[41~42]、溶液 pH、盐度和平衡时间进行优化^[43]。可根据待测物的分子量和极性差异选择最佳固定相,比如小分子量的挥发性物质通常用 $100\text{ }\mu\text{m}$ 聚二甲硅氧烷(PDMS)萃取头,而极性挥发性样品可选用 $6\text{ }\mu\text{m}$ 聚二甲硅氧烷/二乙烯基苯(PDMS/DVB)萃取头,强极性化合物通常适合 $85\text{ }\mu\text{m}$ 聚酰胺(俗称尼龙,PA)萃取头。固定相涂层越厚,萃取量越大,但其所需萃取和解吸平衡时间也越长。

Balakrishnan 等^[44]采用 SPME 法提取了美国 Burlington 一水处理厂污水中 10 种磺胺类抗生素,将其结果与固相萃取的结果进行比较发现,SPME 法提高了样品前处理速度、减少了溶剂用量。McClure 等^[45]的研究也证实了这一点。研究者优化实验条件后发现,对磺胺类亲和力和最强的纤维涂层是聚乙二醇/模板树脂(CW/TPR);加入 10% KCl 提高溶液的离子强度时,其精确度最高;pH 在 4.5 时,响应最强。此外,温度可以影响 SPME 对污水中大环内酯类、甲氧苄啶和磺胺类抗生素的提取效果,并提出温度升高,提取量发生变化的原因可能在于两种不同的竞争过程,即分析物分散量的增加导致提取量的增加,而分析物在纤维和样品基质间分布系数的降低则导致提取量的减少^[46]。SPME 也适合于固体生物基质如肉类样品中抗生素类物质的提取。Lu 等^[47]以 $65\text{ }\mu\text{m}$ 厚的 PDMS/

DVB 作纤维涂料对肉类产品中 8 种常用磺胺类抗生素进行痕量分析前处理,其检测限在 $16\sim 39\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。

随着分子印记技术在环境领域应用范围的不断扩展,MIPs 以其高选择性、化学稳定、容易制备等特点在 SPME 中也得到了应用。Hu 等^[48]以四环素为模板,用复合共聚法制备了 MIP 的 SPME 纤维涂层。与非印记聚合物纤维涂层相比,该方法不仅能够检测到特异选择的四环素及与其结构类似的氧四环素、脱氧土霉素和氯四环素,还可直接与 HPLC 结合,实现样品处理和分析的一体化。

固相微萃取技术具有集萃取、富集于一体,方便快捷、无需萃取溶剂、样品需要量少、选择性强、重现性好、分析时间短、特别适合现场分析、无二次污染等优点。对浓度相对较低的挥发性和半挥发性化合物,用该法提取比液液萃取法更适合。然而,SPME 检测限较高、灵敏度较差^[44],还有难以克服的缺点,如:萃取用的纤维头昂贵、使用寿命短;纤维头具有记忆效应、存在交叉污染等^[49]。

3.4 超临界流体萃取(Supercritical Fluid Extraction, SFE)

超临界流体萃取技术是以超临界流体作萃取剂,从液体或固体基质中萃取特定成分,以达到分离目标物的一种分离技术。它分为动态和静态两种方式,前者是指超临界流体持续不断的提取,后者则是流量固定的一种提取方式。SFE 省去了溶剂萃取和色谱净化的过程,比较经济环保,尤其适用于脂质和半脂质中氟喹诺酮类抗生素的提取。Shim 等^[50]2003 年首次应用 SFE-HPLC 测定了鸡蛋中的氟喹诺酮类抗生素,得到了较好的回收率(83%~96%)。之后该课题组采用该法提取鸡胸肉中的恩诺沙星,并通过测定控制组(无抗生素)中目标物不同加标水平回收率来验证包括萃取时间、超临界流体的量、调节剂浓度、压力和温度等参数的优化效果。所有实验的回收率值都较高,范围在 101%~104%之间^[51]。2004 年该课题组在用 SFE-HPLC 对鸡胸肉中诺氟沙星和氧氟沙星的研究也证实 SFE 是测定鸡肉中诺氟沙星和氧氟沙星的较好提取方法^[52]。

超临界流体萃取技术不仅适用于固体基质,也适用于液体基质。Ramsey 等^[53]采用 SFE-LC-MS/MS 技术分析了水样中聚醚离子型抗生素,由于离子载体复合物主要分布在水样内部而不具备表面活性,静态 SFE 对于提取水样中低浓度($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)的离子型抗生素的效果不如动态 SFE 效果明显。用 CO_2 为超临界流

体的萃取方法的局限性在于它只对非极性化合物的回收效果好,而对极性物质则不适用。解决这一问题的办法是向超临界流体内加入调节剂如甲醇等改变其极性使得物质分离更有选择性。

与固相萃取和固相微萃取技术相比,超临界流体萃取的优势在于:不需过滤样品去除颗粒物;因减少了样品操作步骤而大大降低了操作误差;能够细调超临界流体的溶剂化能力以进行选择性的提取;样品准备时完全或部分脱离有机溶剂^[3]。此外,超临界流体萃取的优点还有易于和产物分离、操作条件温和、不易破坏有效成分等。然而,由于装置复杂,在高压下操作有一定危险性,且成本较高,限制了 SFE 在实际研究中的广泛应用。

3.5 微波辅助萃取(Microwave Assisted Extraction,MAE)

微波辅助萃取是根据不同物质吸收微波能力的差异使萃取体系中的待测物被选择性加热而从体系中分离进入到微波吸收能力相对较差的萃取剂中,达到提取的目的。影响微波辅助萃取效果的主要因素有温度、萃取周期、辐照时间等。非极性溶剂无法吸收微波能量,因此在微波萃取中不能用 100%非极性溶剂作为萃取溶剂,一般可向其中加入一定比例的极性溶剂来使用。

Raich-Montiu 等^[54]采用 MAE 法对地表水和土壤样品中的磺胺类抗生素进行提取并进行的 HPLC-FLD 分析表明,MAE 法对目标物的萃取效果较好,随着温度升高(80~120℃),目标物并未分解,并在 15

min 后达到最佳萃取效果。Chen 等^[55]开发了一种动态微波辅助萃取(Dynamic Microwave Assisted Extraction, DMAE)在线结合固相萃取的方法对土壤中四种磺胺类抗生素进行检测。先用乙腈在微波作用下萃取四种磺胺类抗生素,然后直接将其引入 SPE 柱进行分析物浓缩和样品基质净化。研究证实,该法不仅能够充分回收分析物,而且能快速、彻底地去除土壤样品中的干扰基质。由于同时进行了萃取和净化,使得前处理过程变得快速。该法减少了样品污染和分析物损失,提高了精密度和准确度,但一次只能处理一个样品。

Sturini 等^[56]用 MAE-HPLC-FLD 法同时检测意大利南伦巴底平原农田土壤中 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度级的 8 种氟喹诺酮类抗生素,萃取时以含有 Mg^{2+} 的水溶液为络合剂减少有机溶剂的消耗。考察了影响萃取的温度、辐照时间、基质湿度和溶剂等因素的最佳条件,多变量实验因子设计结果表明 Mg^{2+} 对目标物萃取量的影响最大,辐照时间对其影响虽然显著但程度较弱,而温度对其影响不显著。Fernandez-Torres 等^[57]用酶促微波辅助萃取(Enzymatic-MAE)和 HPLC-MS 法检测鱼和贻贝样品中的兽药抗生素,研究证实该方法简单、线性好,准确度高,检测限、定量限都令人满意。

MAE 法的优点在于加热均匀、具有选择性、环境友好。与传统的萃取技术相比,其最突出的特点在于受溶剂亲和力的限制小,可供选择的溶剂较多;溶剂用量少、快速、可同时测定多个样品,还有利于萃取热不稳定的物质,设备简单,操作容易。但该法一般适用

表 1 抗生素样品前处理方法比较

Table 1 Advantages and disadvantages of pretreatment methods for antibiotics

方法名称	适用对象	优点	不足	参考文献
液液萃取(LLE)	液体基质	步骤简单、无需特殊装置和材料	耗时、有机溶剂消耗大、污染环境	[4-6]
固相萃取(SPE)	液体基质/固体基质	集样品富集与净化于一体、可自动化批量处理、重现性好	使用进口固相萃取小柱成本较高;需要专业人员协助进行方法开发	[2,7,11-13]
自动在线固相萃取(AOSPE)	液体基质/固体基质	可批量处理、样品需要量小、灵敏度高、省时	仪器设备昂贵	[21-24]
固相微萃取(SPME)	液体基质、生物基质	方便快捷、分析时间短、适合现场分析、无二次污染	萃取的纤维头昂贵、存在记忆效应	[26-34]
搅拌棒吸附萃取(SBSE)	液体基质	回收率高、重现性好、灵敏度高	主要适用对象为疏水化合物	[36-38]
超声萃取-固相萃取联用(UE-SPE)	固体基质	能耗低、适用范围广	不适合大批量实验	[39-40]
超临界流体萃取(SFE)	固体基质、液体基质	经济环保、误差小、不破坏目标物的有效成分	设备复杂、成本高、主要用于非极性有机物	[41-44]
加速溶剂萃取(ASE)	固体基质	省时、节约溶剂	影响因素较多	[47-57]
微波辅助萃取(MAE)	固体基质/液体基质	溶剂用量少、快速、无污染、适用于热不稳定物质	需要极性溶剂	[58-62]
基质固相分散萃取(MSPD)	固体基质、生物基质	经济、快速、重现性好;对实验人员水平要求较低,易于推广	富集功能差,对痕量组分检测灵敏度差;有些杂质不能去除,使用受局限	[65-70]

于热稳定物质,且要求物料有较好的吸水性,其对组分的选择性差。

环境样品以及生物样品中抗生素的前处理方法多样,且各自有其不同的适用范围和优缺点,表1对此进行了归纳。

4 结论与展望

由于环境样品(水、土壤、沉积物)和生物样品(粪便、血清、肌肉组织等)基质复杂,抗生素含量很低(多数为痕量级微污染物),开发更为高效、经济的前处理方法显得极为重要。近年来,随着固相萃取、微波辅助萃取、超临界流体萃取等技术的发展,使得样品前处理技术既环保、高效,又能得到较低的检出限和较高的回收率。由于一些细化的因素如萃取溶剂、萃取时间、萃取周期、pH等共同影响着萃取效果,如何兼顾这些影响因素而总结出一套既能节省时间、减少溶剂使用量又能增加样品处理量且能够实现自动化处理的方法成为实验者们追求的目标。尽管目前市场上已经出现一些集样品采集、提取、净化、浓缩等前处理于一体的技术,但其应用范围的局限性以及费用高昂等都不利于其推广应用。鉴于此,笔者认为今后一段时间抗生素类污染物的前处理主要研究方向应包括以下方面。

(1)拓展分子印迹聚合物在抗生素前处理方法中的应用范围。

(2)降低生物技术与现代分析手段结合的处理及分析费用,使得环境样品中抗生素的分析方法更多样、应用更广泛。

(3)开发更多的样品高效分离、净化与计算机处理及仪器检测联机的智能化自动化装置组合,减少分析误差,提高结果准确性。

参考文献:

- [1] Ben W W, Qiang Z M, Adams C, et al. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1202: 173-180.
- [2] Tong L, Li P, Wang Y X, et al. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS[J]. *Chemosphere*, 2009, 74: 1090-1097.
- [3] Diaz-Cruz M S, de Alda M J L, Barcelo D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge[J]. *Trends Anal Chem*, 2003, 6: 340-351.
- [4] 权伍英, 栾燕, 陈笑艳. 液液萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的氯霉素[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(5): 166-167.
- [5] QUAN Wu-ying, LUAN Yan, CHEN Xiao-yan. Determination of chloramphenicol in honey by liquid-liquid extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2005, 24(5): 166-167.
- [6] Lucchetti D, Fabrizi L, Esposito A, et al. Simple confirmatory method for the determination of erythromycin residues in trout A fast liquid-liquid extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 9689-9694.
- [7] Maia P P, Rath S, Reyes F G. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection[J]. *Food Chem*, 2008, 109: 212-218.
- [8] Demyttenaere J C R, Morña R M, Norbert De Kimpe, et al. Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1027: 147-154.
- [9] Huang X J, Qiu N N, Yuan D X, et al. Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2667-2673.
- [10] Tao Y, Liu J F, Hu X L, et al. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216, 35: 6259-6266.
- [11] 高立勤. 免疫亲和色谱及其在生物样本分析中的应用[J]. *国外医学药学分册*, 2000, 27(2): 107-111.
- [12] GAO Li-qin. Immunoaffinity chromatography and its application in analyzing biological samples [J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Pharmacy)*, 2000, 27(2): 107-111.
- [13] Crabbe P, Peteghem C V, Hassnoot W, et al. Production and characterization of polyclonal antibodies to sulfamethazine and their potential use in immunoaffinity chromatography for urine sample pre-treatment [J]. *Analyst*, 1999, 124: 1569-1575.
- [14] 樊磊. 氧氟沙星免疫亲和色谱柱的研制[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
- [15] FAN Lei. Design and study of a column of ofloxacin immunoaffinity chromatography[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009.
- [16] Nieto A, Borrull F, Marcé R M, et al. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1174: 125-131.
- [17] O'Connor S, Locke J, Aga D S. Addressing the challenges of tetracycline analysis in soil: Extraction, clean-up, and matrix effects in LC-MS[J]. *J Environ Monit*, 2007, 9: 1254-1262.
- [18] Ding Y, Zhang W, Gu C, et al. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 10-16.
- [19] Font G, Juan-García A, Picó Y. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1159: 233-241.
- [20] Yu H, Tao Y, Chen D, et al. Development of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of

- porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction [J]. *Food Chem*, 2011, 124:1131–1138.
- [18] Göbel A, Thomsen A, Mc Ardell C S, et al. Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1085: 179–189.
- [19] Stoob K, Singer H P, Stettler S, et al. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1128:1–9.
- [20] Jelić A, Petrović M, Barceló D. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2009, 80:363–371.
- [21] 厉文辉, 史亚利, 高立红, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时检测鱼肉中喹诺酮、磺胺与大环内酯类抗生素[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(10):987–992.
- LI Wen-hui, SHI Ya-li, GAO Li-hong, et al. Simultaneous determination of quinolones, sulfonamides and macrolides in fish samples using accelerated solvent extraction followed by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(10):987–992.
- [22] Staren A B. Matrix solid-phase dispersion[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 885:115–127.
- [23] 乌日娜, 李建科. 基质固相分散在食品安全分析中的应用[J]. *食品科学*, 2005, 26(6):266–268.
- WU Ri-na, LI Jian-ke. Review on applications of matrix solid-phase dispersion in food safety analysis[J]. *Food Science*, 2005, 26(6):266–268.
- [24] Boglalli S, Curini R, Corica A D, et al. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:4225–4232.
- [25] Boglalli S, Curini R, Corica A D, et al. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: Matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food*, 2006, 54:1564–1570.
- [26] Yan H, Qiao F, Row K H. Molecularly imprinted-matrix solid-phase dispersion for selective extraction of five fluoroquinolones in eggs and tissue[J]. *Anal Chem*, 2007, 79:8242–8248.
- [27] Li D, Yang Q, Wang Z, et al. Determination of fluoroquinolones in blood by matrix solid-phase dispersion extraction and CE[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34:822–829.
- [28] Liu Y B, Shen Q, Dai Z Y, et al. Development of an on-line matrix solid-phase dispersion/fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry system for the rapid and simultaneous determination of 13 sulfonamides in grass carp tissues[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218:929–937.
- [29] Rao R N, Venkateswarlu N, Narsimha R. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1187:151–164.
- [30] Christian T, Schneider R J, Färber H a, et al. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters[J]. *Acta Hydrochim Hydrobiol*, 2003, 3(11):36–44.
- [31] Karthikeyan K G, Meyer M T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA[J]. *Sci Total Environ*, 2006, 361: 196–207.
- [32] Jacobsen A M, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, et al. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1038: 157–170.
- [33] 徐磊, 夏宁. 在线固相萃取/高效液相色谱法测定环境水样中的4种痕量邻苯二甲酸酯 [J]. *分析测试学报*, 2011, 30(5):558–561.
- XU Lei, XIA Ning. Determination of 4 trace phthalates in environmental waters by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2011, 30(5): 558–561.
- [34] 郭坚, 杨新磊, 叶明立. 全自动在线固相萃取-高效液相色谱法测定水体中痕量微囊藻毒素 [J]. *分析化学*, 2011, 39(8):1256–1260.
- GUO Jian, YANG Xin-lei, YE Ming-li. Determination of trace microcystins by fully automatic online solid phase extraction-high performance liquid phase chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(8):1256–1260.
- [35] 李小双, 等. 自动化在线固相萃取 HPLC/MS/MS 法分析比格犬血浆中的葛根素含量[J]. *军事医学科学院院刊*, 2007, 31(3):246–249.
- LI Xiao-shuang, et al. An on-line solid phase extraction column switching liquid chromatography tandem mass spectrometry system to quantification of puerarin in beagle plasma [J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2007, 31(3):246–249.
- [36] Rodríguez-Mozaz S, Lopez de Alda M J, Barcelo D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1152:97–115.
- [37] Stoob, et al. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1097: 138–147.
- [38] Kantiani, et al. Fully automated analysis of β -Lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2009, 81:4285–4295.
- [39] García-Galán, et al. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS)[J]. *Talanta*, 2010, 81:355–366.
- [40] Rodríguez, et al. Multiresidue determination of ultratrace levels of fluoroquinolone antimicrobials in drinking and aquaculture water samples by automated online molecularly imprinted solid phase extraction and

- liquid chromatography[J]. *Anal Chem*, 2011, 83:2046–2055.
- [41] Aresta A, Bianchi D, Calvano C D, et al. Solid phase microextraction—liquid, chromatography (SPME–LC) determination of chloramphenicol in urine and environmental water samples[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53:440–444.
- [42] Buszewski B, Szultka M, Olszowy P, et al. A novel approach to the rapid determination of amoxicillin in human plasma by solid phase microextraction and liquid chromatography[J]. *Analyst*, 2011, 136:2635–2642.
- [43] Monteil–Rivera F, Beaulieu C, Deschamps S, et al. Determination of explosives in environmental water samples by solid–phase microextraction–liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1048:213–221.
- [44] Balalrishnan V K, Terry K A, Toito J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1131:1–10.
- [45] McClure E L, Wong C S. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1169:53–62.
- [46] Fernandes C, Dos Santos Neto A J, Rodrigues J C, et al. Solid–phase microextraction–liquid chromatography (SPME–LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 847:217–223.
- [47] Lu K H, Chen C Y, Lee M R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid–phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2007, 72:1082–1087.
- [48] Hu X G, Pan J L, Hu Y L, et al. Preparation and evaluation of solid–phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1188:97–107.
- [49] 潘文慧. 新型液相微萃取技术在环境污染物中的应用[D]. 武汉:华中师范大学, 2008.
- PAN Wen–hui. Improved liquid–phase microextraction methods and their application to the analysis of environmental pollutants [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2008.
- [50] Shim J H, Lee M H, Kim M R, et al. Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(6):1342–1348.
- [51] Shim J H, Shen J Y, Kim M R, et al. Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:7528–7532.
- [52] Shen J Y, Kim M R, Lee C J, et al. Supercritical fluid extraction of the fluoroquinolones norfloxacin and ofloxacin from orally treated–chicken breast muscles[J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 513:451–455.
- [53] Ramsey E D, Rees A T, Wei G, et al. Direct aqueous supercritical fluid extraction coupled on–line with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of polyether ionophore antibiotics in water [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217:3348–3356.
- [54] Raich–Montiu J, Folch J, Compañó R, et al. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography–fluorescence[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1172:186–193.
- [55] Chen L, Zeng Q, Wang H, et al. On–line coupling of dynamic microwave–assisted extraction to solid–phase extraction for the determination of sulfonamide antibiotics in soil[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 648:200–206.
- [56] Sturini M, Speltini A, Maraschi F, et al. Solvent–free microwave–assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography–fluorescence determination[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217:7316–7322.
- [57] Fernandez–Torres R, Lopez M A B, Consentino M O, et al. Enzymatic–microwave assisted extraction and high–performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54:1146–1156.