

## LC-MS/MS分析处理前和处理后的污水中的抗感染药物

### 简介

“抗感染药物”是一个通用的术语，指的是几类用于治疗或防止感染的具有生物活性的化合物。例如抗菌剂（合成的）和抗生素（天然或半天然的）都属于抗感染药物类。

在城市中心，抗感染药物已经被广泛使用，而由于这些药物抗生物降解能力较强和污水处理厂对之消除不力，这些抗感染药物在污水处理厂（WWTPs）的出口和地表水中都能被检测到<sup>[1-3]</sup>。在过去几年里，人们开始日益关注这些药物对于环境特别是水生环境的影响<sup>[4,5]</sup>。

第一次关于在水生环境中痕量抗感染药物的报道可以追溯到1983年<sup>[6]</sup>。一个最新的研究<sup>[7]</sup>表明，这些药品主要是通过“特定途径”（如，家庭、医院或诊所服用药物的病人的排泄物）进入水循环的。因此，了解水生环境中这些药物的数量对正确认识它产生的潜在影响并进行评估是非常重要的。

对处理前和处理后的污水中的抗感染药物进行痕量分析（ng/L）需要开发一种灵敏、有效的检测方法。

### 目标

对处理前和处理后污水中几种痕量抗感染药物（ng/L）进行定量。

选择两个特殊的SRM通道和两种监测模式下对应峰面积的以避免假阳性

### 实验方法

分别从蒙特利尔市污水处理厂（魁北克，加拿大）的南北进水口和排水口采集水样，前者为未经处理污水样品，后者为处理24h的污水样品。该污水处理厂的排水量位居北美前列，这里的污水也仅仅经过物理和化学方法的处理。本实验用固相萃取连同液相色谱串联质谱（SPE-LC-MS/MS）对最常用的6种抗感染药物（磺胺甲基异恶唑，甲氧苄啶，环丙沙星，左氧氟沙星，克拉霉素，阿奇霉素）进行了分析（详情请见图1）。

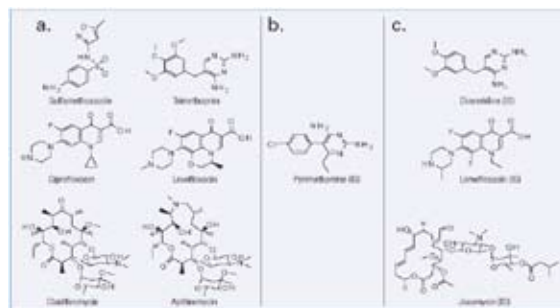


图1 a 为本实验所用的几种抗感染药物的化学结构式，b为代用标准品化学结构式，c为内标物的化学结构式

### 1、样品制备

采集的废水样品先后用1.2 $\mu$ m玻璃纤维过滤器和0.45 $\mu$ m混合纤维素膜进行过滤。然后，每250mL废水样品中加入一定量的甲酸（终浓度为50mM）和1mL5%的Na<sub>2</sub>EDTA（w/v质量体积比）。用1.0 M氢氧化钠调节pH值为3。废水样品处理前加入乙啶啉作为代用标准品，也就是回收率指示剂，其添加浓度为500ng/L。

样品经过一个反相填料SPE固相萃取小柱（200mg）和串联的一个混合填料的SPE固相萃取小柱（200mg）后，被分析物结合在萃取小柱上，然后使用洗脱液淋洗。反相填料SPE固相萃取小柱的洗脱液为2 X 2.5 mL乙腈:甲醇（1:1），混合填料SPE固相萃取小柱的洗脱液为2 X 2.5 mL含有5%氨水的乙腈:甲醇（1:1）溶液。洗脱液收集到相同的锥形离心管中，氮气吹干后复溶于250 $\mu$ L稀释液中（稀释液含0.1%甲酸、90%水、5%甲醇、5%乙腈）。然后向其中加入内标物二氢藜芦啉，罗美沙星和交沙霉素。

### 2、LC-MS/MS条件

本实验使用Thermo Scientific Surveyor HPLC和具有H-SRM功能的TSQ Quantum Ultra MS系统进行待测物的分离和定量。相关的HPLC，MS条件请见表1。每种化合物选定两个特异的SRM通道和两种SRM监测模式，相应峰面积比可以可靠地进行靶抗感染药物的鉴定，最大限度地减少由于介质干扰带来假阳性结果的可能<sup>[9]</sup>。

## 结果与讨论

SRM模式的MS/MS已经被证明具有较高的选择性。虽然，在介质中存在有机或无机的干扰物存在，仪器响应在25-1000ng/L浓度范围内仍然是线性的( $r^2 \geq 0.99$ )，各种物质的检测限在0.3 - 22 ng/L之间（相关数据请见表3）。正如Hernandez[8]所提到的，在该分析方法中两个特异的SRM通道和两种SRM监测模式相对应峰面积比可相辅相成，可以精确地鉴定样品中的抗感染药物

(详情请见图3)。选取的两个SRM通道相对应的峰面积比有较好的重现性，RSD <10%。除了阿奇霉素（AZI）之外（64%），每个分析物中添加标准品的两个SRM通道相对应的峰面积比的差异不超过20%。

表1 HPLC和MS的操作参数

HPLC条件				MS条件	
色谱柱:	ThermoScientific Hypersil GOLDTM C18 (50 X 2.1mm, 3 $\mu$ m)			离子模式:	ESI+
柱温箱温度:	30 $^{\circ}$ C			喷雾电压	3500 V
流动相A:	水 (含0.1% 甲酸)			离子传输毛细管温度	350 $^{\circ}$ C
流动相B:	甲醇 (含0.1% 甲酸) : 乙腈 =1: 1			鞘气气压(N <sub>2</sub> )	21 mTorr
进样量:	20 $\mu$ L			辅助气压(N <sub>2</sub> )	4 mTorr
流速:	20 $\mu$ L/min			碰撞气	1.5 mTorr
梯度:				源内CID	-12V
	时间 (min)	A%	B%		
	0	90	10		
	2	80	20		
	15	75	25		
	17	50	50		
	20	5	95		
	25	5	95		
	30	90	10		

表2 各种药物选定的两个SRM通道

药物名称	SRM#1	CE(V)	SRM#2	CE(V)	聚焦电压		
乙嘧啶	249.10	177.07	40				
磺胺甲基异恶唑†	254.08	92.11	36	254.08	108.10	37	70
二氢藜芦啶	261.15	123.11	34				
甲氧苄氨嘧啶†	291.16	123.10	33	291.16	230.17	34	91
环丙沙星‡	332.16	231.07	49	332.16	288.15	27	82
洛美沙星	352.17	265.13	34				
左氧氟沙星‡	362.17	261.12	35	362.17	221.05	43	92
克拉仙霉素*	748.55	590.36	19	748.55	115.09	35	96
阿奇霉素*	375.33	82.96	25	749.54	158.04	48	74/112
交沙霉素	828.53	108.87	46	828.53	173.96	47	126

注: †标注的是以二氢藜芦啶作为内标定量, ‡是以洛美沙星作为内标定量, \*是以交沙霉素作为内标定量

表3 各种药物对应的 $r^2$ 、检测限、SRM比值和比值差异

药物名称	$r^2$ matrix*	检测限 (ng/L)	标准品SRM比值 $\pm$ SD†	样品SRM比值 $\pm$ SD‡	SRM比值差异 $^{\wedge}$
磺胺甲基异恶唑	0.9995	22	1.53 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.2	-2.6
甲氧苄氨嘧啶	0.9998	7	4.2 $\pm$ 0.1	4.39 $\pm$ 0.07	-3.3
环丙沙星	0.9996	21	5.5 $\pm$ 0.8	6.59 $\pm$ 0.05	-18.9
左氧氟沙星	0.9996	4	3.65 $\pm$ 0.07	3.83 $\pm$ 0.06	-5.0
克拉仙霉素	0.9997	0.3	1.67 $\pm$ 0.04	1.59 $\pm$ 0.09	4.3
阿奇霉素	0.9900	12	1.2 $\pm$ 0.1	0.44 $\pm$ 0.1	6.4

注: \* 表示WWTP处理污水稀释10倍标准曲线的测定系数, \*\*表示基于S/N (信噪比) =3时计算的数据, †表示稀释10倍WWTP处理样品中添加的内标, n=4, ‡表示WWTP处理污水样品, n=3;  $^{\wedge}$ 表示添加标准品与样本SRM比值差异的百分数

使用串联SPE（固相萃取）方法进行未处理污水和处理污水样品的富集和净化可以提高六种待测物的回收率（详情请见图2）。

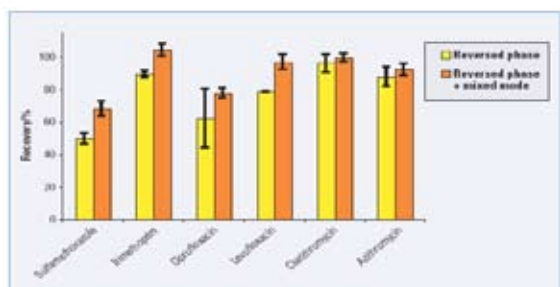


图2 处理污水样品中被分析物的平均百分回收率（代用标准品的添加浓度为500 ng/L, n=2）

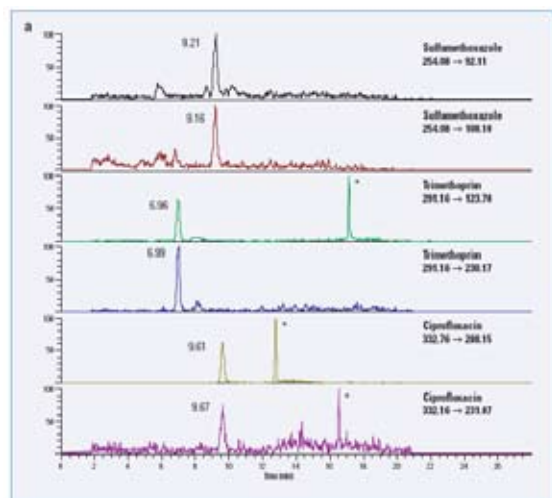
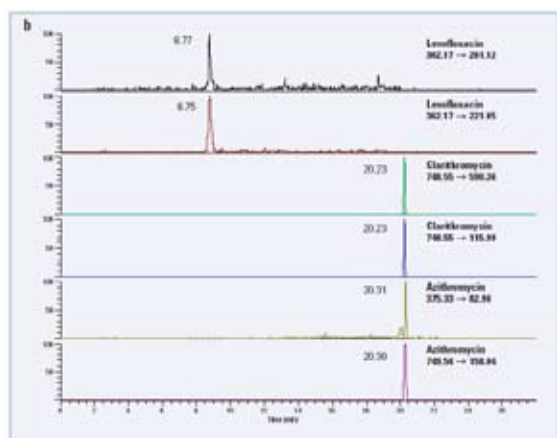


图3 处理废水中待测物两个SRM通道分别对应的色谱图（\*标注的为干扰介质对应的峰）

实验证明反相和离子交换两种色谱分离方法都适合于化合物的提取，两种方法具有不同的化学特性，如pKa和pKow。

在废水样品中检测到的目的物浓度范围为39±1 to 276±7 ng L<sup>-1</sup> (详情请见表4)。

根据圣劳伦斯河当天的采样流量（35 m<sup>3</sup> /s）估计每天有大量的抗感染药物进入（详情请见表4）。这些结果表明，在城市废水中抗感染药物的浓度通常比较低，一般为ng/L级，但每天流入地表水的总量还是很大的。

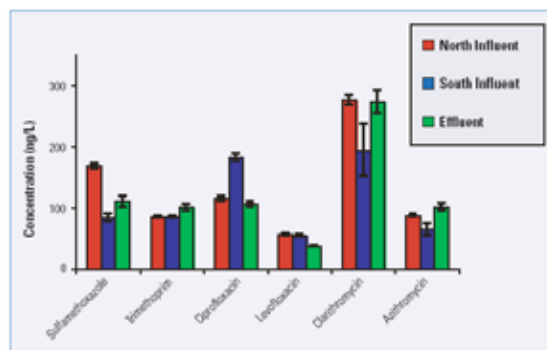


图4 蒙特利尔市污水处理厂南北入口和排出口中含有抗感染药物的浓度（n=3）

表4 蒙特利尔市污水处理厂靶抗感染药物每天的平均排出量

抗感染药物	圣劳伦斯河平均每天的排入量
磺胺甲恶唑	340 ± 30
甲氧苄啶	310 ± 20
盐酸环丙沙星	320 ± 10
左氧氟沙星	118 ± 2
甲基红霉素	830 ± 60
阿奇霉素	310 ± 20

## 结论

本研究开发的新方法可以对未处理污水和处理污水中6种最常见的抗感染药物进行检测，在25-1000 ng/L的浓度范围内，仪器响应呈线性( $r^2 \geq 0.99$ )，各种抗感染药物的检测限在0.3-22ng/L之间。使用两种特异SRM通道和两者峰面积的比值来进行目的物的检测以减少假阳性是非常可靠而有效的。废水中的所有抗感染药物的浓度范围为39-276 ng/L。以上这些研究对阐明这些抗感染药物进入圣劳伦斯河后的去向及他们对水生生物和环境的影响是非常必要的。

## 参考文献

1. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., and Buxton H.T. (2002) *Environmental Science & Technology* 36:1202-1211.
2. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., and Kratz K.L. (1999) *Science of the Total Environment* 225:109-118.
3. Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A., and Hirsch R. (2003) *Environmental Toxicology & Chemistry* 22:2872-2880.
4. Wilson B.A., Smith V.H., Denoyelles F., and Larive C.K. (2003) *Environmental Science & Technology* 37:1713-1719.
5. Richards S.M., Wilson C.J., Johnson D.J., Castle D.M., Lam M., Mabury S.A., Sibley P.K., and Solomon K.R. (2004) *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1035-1042.
6. Watts CD, Crathorne B, Fielding M, and Steel CP (1983) *Analysis of Organic Micropollutants in Water*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht.
7. Richardson M.L. and Bowron J.M. (1985) *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 37:1-12.
8. Hernandez F, Ibanez M., Sancho J.V., and Pozo S.J. (2004) *Analytical Chemistry* 76:4349-4357.

*In addition to these offices, Thermo Fisher Scientific maintains a network of representative organizations throughout the world.*

### 赛默飞世尔科技

上海  
上海浦东新金桥路27号6号楼  
电话: 86-21-6865 4588  
传真: 86-21-6445 7830

北京  
北京市东城区安定门东大街28号  
雍和大厦西楼702-715室  
电话: 86-10-8419 3588  
传真: 86-10-8419 3589

广州  
广州东风中路410-412号  
健力宝大厦3003-3004室  
电话: 86-20-8348 7138  
传真: 86-20-8348 6621

服务热线:  
800 810 5118 400 650 5118

[www.thermo.com](http://www.thermo.com)  
[analyze.cn@thermofisher.com](mailto:analyze.cn@thermofisher.com)



Thermo Fisher Scientific,  
San Jose, CA USA is ISO Certified.