

# 基于高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定沉积物中磺胺类抗生素及其代谢物

闫振华<sup>1,2</sup>, 章夏冬<sup>2</sup>

<sup>1</sup>南通河海大学海洋与近海工程研究院, 江苏 南通

<sup>2</sup>河海大学环境学院, 江苏 南京

收稿日期: 2022年5月11日; 录用日期: 2022年6月15日; 发布日期: 2022年6月22日

## 摘要

建立了一种同时快速提取并检测沉积物中多种磺胺类抗生素及其典型代谢产物的方法, 沉积物样品经冷冻干燥后, 经萃取液(纯水, 乙腈)萃取、净化盐(硫酸镁, C18)净化后, 利用高效液相色谱 - 串联质谱仪(LC-MS/MS)进行测定。和常用的加速溶剂萃取法相比, 该方法使用的有机溶剂量降低了57%, 提取时间减少了40%。此外, 该方法在低浓度下的回收率都相对较高, 范围在为80%~121%, 相对标准偏差小于9%。该方法可应用于水体沉积物中磺胺类抗生素及其代谢物的同时检测, 且检测过程相对快速。

## 关键词

磺胺类抗生素, 代谢物, 萃取, 高效液相色谱 - 串联质谱法

# Simultaneous Determination of Sulfonamide Antibiotics and Their Metabolites in Sediments by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Zhenhua Yan<sup>1,2</sup>, Xiadong Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nantong Institute of Ocean and Offshore Engineering, Hohai University, Nantong Jiangsu

<sup>2</sup>College of Environment, Hohai University, Nanjing Jiangsu

Received: May 11<sup>th</sup>, 2022; accepted: Jun. 15<sup>th</sup>, 2022; published: Jun. 22<sup>nd</sup>, 2022

## Abstract

A rapid method was established to simultaneously extract and detect various sulfonamide antibiotics and their typical metabolites in sediments. After freeze-drying, the sediment samples were extracted with extraction solution (pure water, acetonitrile) and purified with purification salt (magnesium sulfate, C18). The target compounds were then measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). Compared with the accelerated solvent extraction method, the used organic solvent in the present method was reduced by 57%, and the extraction time was reduced by 40%. In addition, the recoveries of the method at low concentrations were relatively high, ranging from 80% to 121%, and the relative standard deviations were all less than 9%. It suggests that the method could be applied to simultaneously detect sulfonamide antibiotics and their metabolites in sediments, and the detection process is relatively fast.

## Keywords

Sulfonamide Antibiotic, Metabolite, Extraction, LC-MS/MS

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

磺胺类抗生素是一种人工合成的抗菌类药物, 具有抗菌谱广, 价格便宜等特点, 在医疗业、畜牧和水产养殖业等广泛应用[1] [2] [3]。这类药物在保护生物体免受疾病的同时, 也会通过生物体排泄不断进入水体和沉积物等环境介质, 并通过干扰生物体的抗氧化系统和内分泌功能威胁生物体的个体生长和种群繁衍, 以及促进抗性基因的迁移和耐药菌的传播, 最终影响水生生态系统稳定及人类健康安全[4] [5] [6]。因而, 水环境中磺胺类抗生素的残留是一个备受关注的环境问题, 已经引起了世界范围内的广泛关注。

磺胺类抗生素经人体及动物体内吸收后, 约 50%会以原型药的形式随尿液及粪便排出体外, 还有约 30%部分则以乙酰化代谢物的形式排出体外[7]。此外, 磺胺类抗生素经污水厂处理也能不断转化为代谢物, 并随污水排入地表水[8]。因此, 无论是磺胺类抗生素母体还是其代谢产物都会源源不断进入水环境并产生环境危害。已有研究表明有些代谢物的毒性甚至会比其母体化合物更强, 例如乙酰化的磺胺抗生素一般比其母体溶解度更低, 极易析出结晶, 产生结晶尿, 进而增加肾毒性[9]。因此, 在监测磺胺抗生素环境赋存的同时也迫切需要关注其代谢物。然而, 到目前为止, 大部分研究仍集中在母体化合物, 其代谢物的研究仍十分匮乏, 其提取和分析方法也亟需确定。

样品的前处理是检测抗生素及其代谢物环境残留的重要步骤, 包括加速溶剂萃取、超声提取等[10] [11]。但是现有的前处理大部分只关注磺胺类抗生素母体自身, 且具有相对效率低, 时间消耗长, 有机试剂消耗量大, 成本较高等特点。建立一种快速高效检测磺胺类抗生素及其代谢物的方法是掌握磺胺类抗生素及其代谢物环境残留的重要前提。因此, 本研究拟建立一种检测沉积物中 8 种磺胺类抗生素及其代谢物的快速提取和分析方法, 通过对比分析时间和有机试剂消耗等内容, 并优化分析方法, 进而通过实际沉积物样品检测验证方法的可行性。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 试剂

目标化合物的基本参数见表 1, 其中磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ), 磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SM1), 磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine, SM2)和磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)等母体化合物购自于百灵威公司(上海), 纯度均 > 99%; 其乙酰化(acetylation, Ac)代谢物 Ac-SMX、Ac-SM1、Ac-SM2 和 Ac-SDZ 购自于 TRC 公司(加拿大), 纯度均 > 98.5%; 1 种内标化合物 13 C-SMZ 购自 Dr. Ehrenstorfer 公司(德国), 纯度在 97% 以上。HPLC 级的乙腈、甲醇等购自 Merck 公司(德国), 硫酸镁、氯化钠和 C18 等购自于上海阿拉丁试剂公司, 均为分析纯。超纯水由 Milli-Q 系统(美国)提供。

**Table 1.** Basic parameters of target compounds

**表 1.** 目标物质的基本参数

中文名	英文简写	CAS 号	分子量	logKow
磺胺甲恶唑	SMX	723-46-6	253.28	0.89
乙酰磺胺甲恶唑★	Ac-SMX	21312-10-7	295.32	1.21
磺胺甲基嘧啶	SM1	127-79-7	264.30	0.21
乙酰磺胺甲基嘧啶★	Ac-SM1	127-73-1	306.34	0.933
磺胺二甲基嘧啶	SM2	57-68-1	278.32	0.757
乙酰磺胺二甲基嘧啶★	Ac-SM2	100-90-3	320.37	1.481
磺胺嘧啶	SDZ	68-35-9	250.28	-0.1
乙酰磺胺嘧啶★	Ac-SDZ	127-74-2	292.31	-0.61

注: ★表示该物质为其上物质的代谢产物。

标准物质的储备液采用甲醇进行配制, 浓度为 10 mg/mL, 均保存在-20℃冰箱。测试用工作曲线为混标, 采用甲醇逐级稀释的方法获得, 均现配现用。

### 2.2. 仪器

高速冷冻离心机为上海安亭 TGL-20bR, 涡旋振荡器购自 Thermo 公司(美国), 氮吹仪为上海安谱的 EFAA-D12 型, 超高效液相色谱串联质谱联用仪为 Waters 公司(美国)的 ACQUITY UPLC/Xevo TQ MS, ACQUITY BEH C18 色谱柱购自 Waters 公司(1.7 μm; 2.1 mm × 100 mm)。

### 2.3. 样品采集

本研究选择南通市某水产养殖区域外排沟渠为研究对象, 使用彼得逊采泥器收集表层沉积物, 放入聚丙烯塑料袋并迅速运回实验室。在-20℃预冷冻后, 沉积物样品在-60℃进行冷冻干燥处理, 过 100 目孔径筛后存放于-80℃冰箱, 用于后续的萃取工作。

### 2.4. 前处理步骤

准确称取冷冻干燥后的沉积物样品 5.0 g 于 50 mL 聚丙烯材质圆底离心管中, 依次加入提取液超纯水 10 mL 和含 5% 体积氨水的乙腈萃取液 15 mL, 分别涡旋 30 s, 加入第一净化盐氯化钠 1 g 和硫酸镁 4 g, 手动摇匀, 涡旋 1 min, 使萃取液净化盐和沉积物充分混匀, 4000 r/min 的速度离心 5 min, 取上清液。

取上清液 12 mL 于 15 mL 聚丙烯材质尖底离心管中, 使其与盛于管中的第二净化盐混合, 涡旋 1 min,

充分混匀, 4000 r/min 的速度离心 5 min, 取上清液。

取 9 mL 上清液于玻璃试管中, 45°C 下氮气吹干, 加入 20 ng 的内标  $^{13}\text{C}$ -SMZ 后用 1 mL 甲醇复溶并定量得到待测液。使用 0.22 微米过滤器过滤待测样品, 并分装于棕色色谱瓶中, 供后续分析。

## 2.5. 色谱分析

目标化合物的分离采用 Waters BEH C18 色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)进行, 柱温箱的温度保持在 40°C, 进样体积设置为 5 μL, 进样流速设定为 0.4 mL/min, 采用梯度洗脱模式, 流动相包括 A: 98%水及 2%甲醇(含 0.05%甲酸)和 B: 乙腈, 流动相梯度按如表 2 所示。

**Table 2.** The composition mobile phase

**表 2.** 流动相组成

时间(min)	流动相组成(%)	
	A	B
0	90	10
0.25	90	10
3	10	90
4	10	90
4.01	90	10
5	90	10

## 2.6. 质谱分析

质谱分析使用 Waters Acquity 三重四级杆质谱仪, 离子源为电喷雾离子源(ESI), 离子源温度为 150°C, 雾化气脱溶剂气和碰撞气分别选择高纯氮和高纯氩, 流速分别为 891 L/Hr 和 0.15 mL/min, 毛细管电压 2.0 kV, 脱溶剂气温度为 500°C, 锥孔反吹气流速为 50 L/Hr。质谱数据的采集方式为多重反应监测模式(MRM)。各种目标物质的质谱参数见表 3。

**Table 3.** The mass spectrometer optimization parameters of target compounds

**表 3.** 目标物质的质谱优化参数

目标物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(eV)	模式
SDZ	251	92	27	ESI+
Ac-SD	293.1	198.0	26	ESI+
		134.0	28	
SMX	254	156	16	ESI+
Ac-SMX	296.2	198.1	26	ESI+
		134.2	28	
SMZ	265.1	156.1	23	ESI+
		172.0	25	
Ac-SMZ	307.3	172.0	33	ESI+
		198.1	31	

Continued

SM2	279.2	186.1	26	ESI+
		123.8	28	
Ac-SM2	321.3	185.9	33	ESI+
		255.3	37	

## 2.7. 方法验证

实验过程中使用  $^{13}\text{C}$ -SMX 作为内标, 结合分析方法的线性、回收率、定量限等验证了该方法的准确性。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 优化提取条件

本研究首先评估了超声辅助提取对目标物回收率的影响, 结果如图 1 所示。正常情况下, 超声作用可提高基质的分散性, 进而增加目标物的回收效果[12]。在本研究中, 超声提取对目标物的提取效果几乎没有影响, 两者都具有较高的回收率。因此, 本研究不再进一步采用超声辅助提取方法, 一方面可以节约大量的前处理时间(涡旋 1 min 和超声 5 min), 另一方面则可有效降低成本和工序。

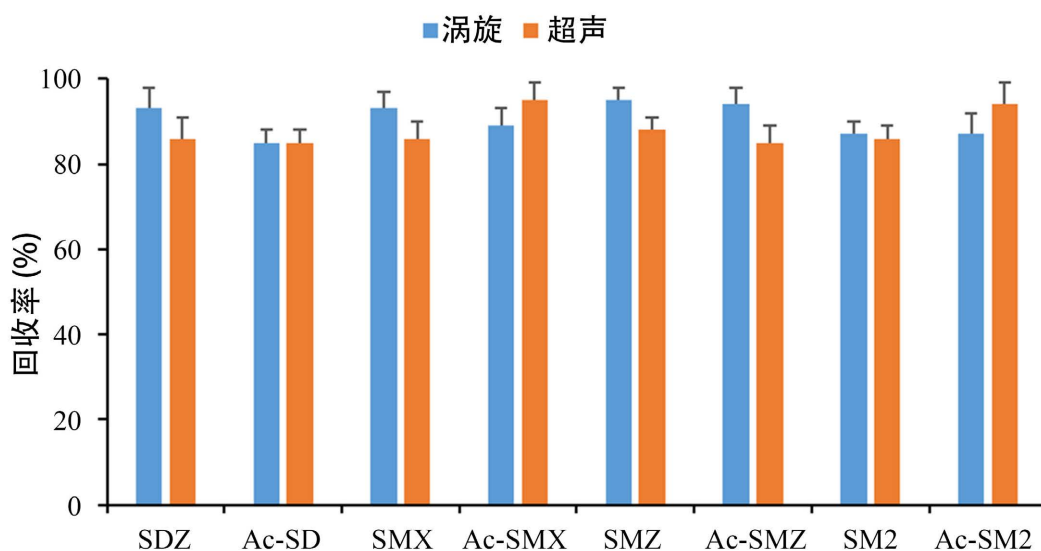


Figure 1. The recoveries of target compounds extracted by vortex and ultrasonic bath

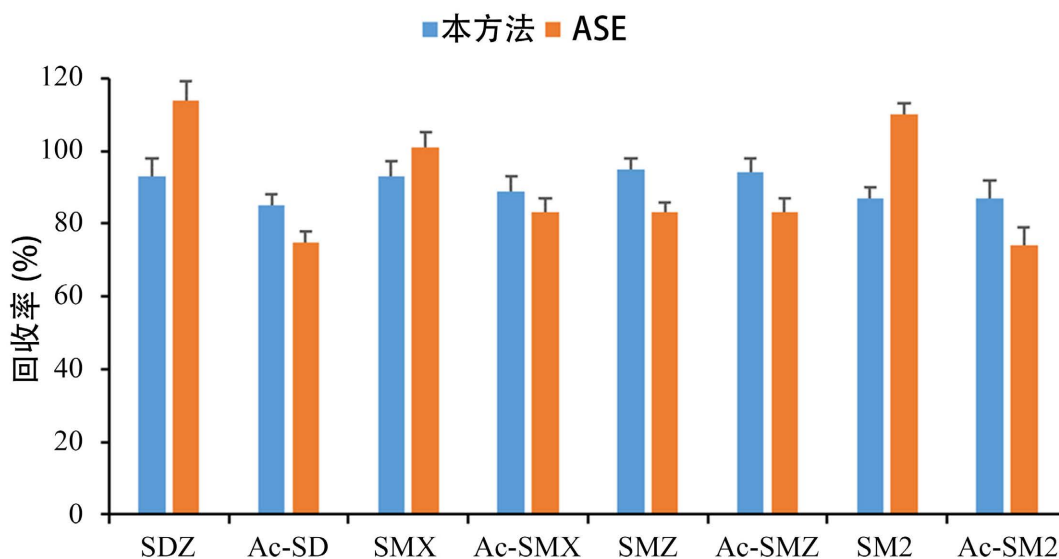
图 1. 涡旋和超声提取目标物的回收率

### 3.2. 与 ASE 相比

将本研究中建立的提取方法和常用的 ASE 提取方法进行对比后发现, 大体上, 本方法获得的药物回收率和 ASE 提取法的结果相近, 都位于 60%~120%之间。但相对而言, 本研究的方法变化幅度较小, 一致性相对较好。

进一步对比本方法和常用 ASE 提取方法的试验过程可以发现(图 2), 本方法消耗的有机溶剂(主要是乙腈)仅为 ASE 方法的 43%, 消耗量大大降低; 此外, 单个样品的前处理时间仅耗时 15 min, 较 ASE 方法的 25 min 大为缩短, 单个样品的处理效率大大提升。此外, 本方法中已经采用 C18 对样品进行了净化

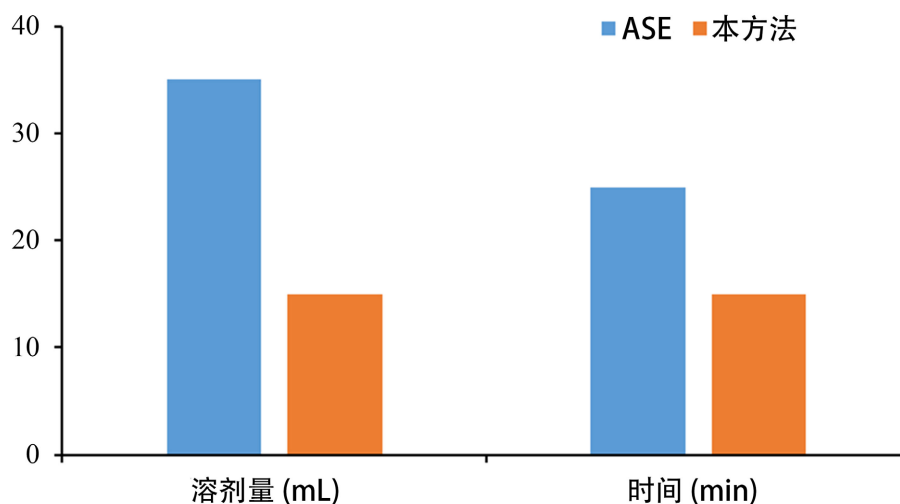
处理, 而 ASE 方法仍需要固相萃取柱进行净化, 在成本上也有了明显降低。



**Figure 2.** The recoveries of target compounds extracted from different pretreatment methods

**图 2.** 不同前处理方法下目标物的回收率

因此, 本研究新建立的前处理方法和常用 ASE 方法相比, 对目标物的回收率没有明显差异性, 但在有机溶剂的使用上明显降低, 更为环保安全, 在时间和成本上也有明显下降, 大大降低了检测的时间成本和金钱成本(图 3)。总之, 对于本研究选定的磺胺类抗生素及其代谢产物, 本研究所确定的方法要优于常用的 ASE 方法。这一结果也得到孟明辉等的认可, 他们发现相较于固相萃取方法, 采用 QuEChERS 方法的成本明显较低[13]。



**Figure 3.** Solvent consumption and treatment time under different pretreatment methods

**图 3.** 不同前处理方法下的溶剂消耗量和处理时长

### 3.3. 方法验证

本研究通过线性方程、回收率和定量限对建立的方法进行了验证。结果发现, 由空白基质配制的标

准工作曲线呈现出良好的线性关系, 相关系数均在 0.994~0.999 之间(表 4)。

**Table 4.** Linear equation, linear range and R<sup>2</sup> of different compounds

**表 4.** 目标物的线性方程、线性范围和相关系数

目标物	线性方程	相关系数(R <sup>2</sup> )	线性范围(ng/g)
SMX	$y = 253.909x - 0.871568$	0.999	1~200
Ac-SMX	$y = 50.2362x - 8.41563$	0.996	1~200
SM1	$y = 299.956x - 24.1756$	0.999	1~200
Ac-SM1	$y = 2180.38x + 213.544$	0.998	1~200
SM2	$y = 1120.25x - 125.305$	0.996	1~200
Ac-SM2	$y = 725.914x - 83.9108$	0.997	1~200
SDZ	$y = 66.0317x - 11.0783$	0.994	1~200
Ac-SDZ	$y = 22.1723x - 3.08082$	0.994	1~200

在 5 g 沉积物空白样品中分别加入 0.5, 1 和 2 ng/g 的磺胺类抗生素及其乙酰化代谢产物的混合标准溶液后, 按照本研究建立的方法进行前处理, 并采用外标法和内标法相结合对目标物进行定量, 重复 6 次。所有目标物的回收率和标准偏差见表 5。结果显示, 该方法下得到的沉积物中不同浓度下目标物的回收率为 79%~121%, 相对标准偏差在 3.1%~8.8%。一般情况下, 前处理方法的回收率在 60%~120%之间, 相对标准偏差小于 20%为合适的处理方法, 本研究中总体上满足方法学的要求。定量限的取值为可接受回收率(60%~120%)和相对标准偏差(小于 20.0%)时的最低浓度, 本研究中各个目标物的定量限都低于 0.5 ng/g, 明显低于王大鹏等所报道的抗生素及其代谢产物在污泥中的值低[14], 说明本研究所建立的方法在方法学上是可行的。

**Table 5.** Recoveries, standard deviation and limit of quantitation of different target compounds

**表 5.** 目标物的回收率、标准偏差和定量限

目标物	0.5 ng/g		1 ng/g		2 ng/g		定量限 LOQ (ng/g)
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	
SDZ	84~113	8.8	79~112	8.2	89~113	3.3	0.17
Ac-SD	85~105	7.6	89~120	3.6	79~105	6.2	0.13
SMX	86~120	6.8	84~110	4.7	83~121	7.4	0.15
Ac-SMX	83~110	6.0	89~115	5.1	81~108	3.3	0.23
SMZ	84~105	4.7	82~98	3.1	87~102	4.2	0.17
Ac-SMZ	80~92	4.4	82~103	6.1	84~112	4.2	0.19
SM2	82~97	3.1	88~105	3.5	86~107	3.8	0.27
Ac-SM2	88~115	3.6	80~110	3.8	88~115	4.3	0.31

### 3.4. 环境因素影响

在 LC-MS/MS 分析中, 环境介质的组成和结构会明显影响和干扰目标物的分析, 形成基质效应(ME)。在本研究中, 采用了样品提取后添加法来评定目标物在沉积物中的基质效应, 其计算公式为:



$$ME = A1/A2*100\%$$

其中, A1 是指标准溶液在样品基质提取液中的信号峰面积, A2 为标准品溶液的信号峰面积。ME 介于 80%~120% 之间代表基质效应不明显。在本研究中, 目标物在沉积物样品中的基质效应全部在 83%~102% 之间, 其基质效应在规定范围之内, 符合要求。

### 3.5. 实际样品测定

基于本研究所建立的前处理和检测方法, 进一步选择南通市某水产养殖区域外排沟渠的沉积物为对象, 分析了 8 种磺胺类抗生素及其乙酰化代谢物的残留水平, 结果如表 6 所示。8 种目标物在沉积物中均有检出, 浓度最高为分布为 28 ng/g 的 SMZ 和 21.6 ng/g 的 Ac-SMZ。四种磺胺类抗生素均属于人畜共用药, 且在水产养殖中也有广泛应用, 其在养殖区域外排沟渠沉积物的赋存表明这几种物质在附近的水厂养殖场有不同程度的应用, 而乙酰化代谢产物的存在则表明磺胺类抗生素在环境中的赋存可以进一步转化为代谢产物形式, 考虑到代谢产物可能具有和母体一样的生物效应和环境危害, 需要对其进行进一步的研究和探讨。

**Table 6.** Detected concentration of target compounds in sediments

**表 6.** 目标物在典型沉积物中的浓度

目标物	沉积物(ng/g)			
	范围	平均值	中值	检出率
SDZ	0.29~19.7	7.12	4.6	100%
Ac-SD	未检出~4.4	1.1	1.0	80%
SMX	未检出~13.1	10.3	7.2	83%
Ac-SMX	0.2~4.6	3.7	1.4	100%
SMZ	1.5~28	21.5	12.1	100%
Ac-SMZ	6.2~21.6	10.2	8.4	100%
SM2	3.6~10.0	6.1	5.8	100%
Ac-SM2	0.82~2.76	1.31	1.05	100%

## 4. 结论

1) 通过对比提取方式、试剂用量、处理时间和价格等, 并结合方法学验证, 初步建立了一种可以基于高效液相色谱-串联质谱法的快速提取和同时检测沉积物中 8 种磺胺类抗生素及其代谢产物的方法。

2) 本研究所建立的方法在试剂用量、处理时间及处理成本等方面均优于以前常用的 ASE 等方法, 具有快速、环保、价优的特点。

3) 本方法已成功应用于沉积物中多种磺胺类抗生素及其代谢产物赋存水平的检测, 可为抗生素环境监测提供方法学基础。

## 基金项目

本研究得到了南通市科技计划项目(JC2020166)和中央高校基本科研业务费(B200202113)的资助。

## 参考文献

- [1] Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J. and Sobczak, A. (2011) Effects of the Presence of Sulfonamides in the Envi-



- ronment and Their Influence on Human Health. *Journal of Hazardous Materials*, **196**, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.082>
- [2] Nunes, O.C., Manaia, C.M., Kolvenbach, B.A. and Corvini, P.F.X. (2020) Living with Sulfonamides: A Diverse Range of Mechanisms Observed in Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**, 10389-10408.
- [3] Vila-Costa, M., Gioia, R., Aceña, J., Pérez, S., Casamayor, E.O. and Dachs, J. (2017) Degradation of Sulfonamides as a Microbial Resistance Mechanism. *Water Research*, **115**, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.007>
- [4] Hamid, N., Junaid, M. and Pei, D.S. (2020) Individual and Combined Mechanistic Toxicity of Sulfonamides and Their Implications for Ecological Risk Assessment in the Three Gorges Reservoir Area (TGRA), China. *Journal of Hazardous Materials*, **382**, Article ID: 121106. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121106>
- [5] Shimizu, A., Takada, H., Koike, T., Takeshita, A., Saha, M., Nakada, N., *et al.* (2013) Ubiquitous Occurrence of Sulfonamides in Tropical Asian Waters. *Science of the Total Environment*, **452-453**, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.027>
- [6] Chen, Y., Zhou, J.L., Cheng, L., Zheng, Y.Y. and Xu, J. (2017) Sediment and Salinity Effects on the Bioaccumulation of Sulfamethoxazole in Zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, **180**, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.055>
- [7] Cui, J., Fu, L., Tang, B., Bin, L., Li, P., Huang, S. and Fu, F. (2020) Occurrence, Ecotoxicological Risks of Sulfonamides and Their Acetylated Metabolites in the Typical Wastewater Treatment Plants and Receiving Rivers at the Pearl River Delta. *Science of the Total Environment*, **709**, Article ID: 136192. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136192>
- [8] Yuan, S.F., Liu, Z.H., Yin, H., Dang, Z., Wu, P.X., Zhu, N.W. and Lin, Z. (2019) Trace Determination of Sulfonamide Antibiotics and Their Acetylated Metabolites via SPE-LC-MS/MS in Wastewater and Insights from Their Occurrence in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Science of the Total Environment*, **653**, 815-821. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.417>
- [9] Chen, J. and Xie, S. (2018) Overview of Sulfonamide Biodegradation and the Relevant Pathways and Microorganisms. *Science of the Total Environment*, **640-641**, 1465-1477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.016>
- [10] Dmitrienko, S.G., Kochuk, E.V., Apyari, V.V., Tolmacheva, V.V. and Zolotov, Y.A. (2014) Recent Advances in Sample Preparation Techniques and Methods of Sulfonamides Detection—A Review. *Analytica Chimica Acta*, **850**, 6-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.023>
- [11] Ngo, T.H., Van, D.A., Tran, H.L., Nakada, N., Tanaka, H. and Huynh, T.H. (2021) Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products in Cau River, Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**, 12082-12091. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09195-0>
- [12] Llompart, M., Celeiro, M. and Dagnac, T. (2019) Microwave-Assisted Extraction of Pharmaceuticals, Personal Care Products and Industrial Contaminants in the Environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **116**, 136-150. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.029>
- [13] 孟明辉, 贺泽英, 徐亚平, 王璐, 彭祎, 刘潇威. QuEChERS 方法结合高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中 20 种抗生素[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(8): 1672-1679.
- [14] 王大鹏, 张娴, 颜昌宙. 高效液相色谱串联质谱法测定污水污泥中 4 种磺胺类药物及其乙酰化代谢物[J]. 环境化学, 2018, 37(10): 2143-2151.