

# 水中4种四环素和9种大环内脂类 抗生素药物的测定解决方案

## 关键词

水质；大环内脂类抗生素药物；GC/MS；Fotector plus；Auto EVA-60

## 介绍

近年来，在水环境中发现个人护理用品及药物的残留引起了人们的广泛关注。抗生素类药物作为上述药物的一种，随着畜牧业养殖扩大而大肆用药，常以动物代谢产物随着动物的排泄物，屠宰血水或者人们对于废弃药物的不当处理等方式进入地球的水循环体系。另一方面渔业也有大面积使用抗生素的养殖方式，对水体产生非常大的破坏。

四环素类药物（图1）作为广谱抑菌剂，高浓度时具有杀菌作用。大环内酯类（Macrolides）（图2）是由链霉菌产生的一类弱碱性抗生素、因分子中含有一个内酯结构的十四员或十六员大环而得名。然而过多地使用大环内脂类药物会对人体消化道产生极强的副作用，使人恶心，干呕，腹胀腹泻等，严重可致人不可逆的耳聋。

对于上述水环境中，如养殖废水，生活污水及渔业用水等，抗生素含量超标达到纳克每升甚至亚微克每升的污染现状，亟需一种检测手段对水中的抗生素进行检测。固相萃取作为一种富集净化的技术，能够很好将检出限降低至纳克每升，进而让水体中的污染物无所遁形。

## 1. Оборудование и расходные материалы

Fotector Plus Автоматизированная система твердофазной экстракции от Raykol

Raykol Auto EVA-60 Автоматизированная система упаривания в токе азота

Картридж ТФЭ HLB (RayCure HLB, 60 mg/3 mL, кат. RC-204-36473)

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором

Метанол, вода

кондиционирование	метанол
промывка	вода
элюирование	метанол

## 2. Приготовление стандартных растворов

### 2.1 Проведение ТФЭ

Экстрактор ТФЭ	Fotector Plus Автоматизированная система ТФЭ от RayKol
Картридж ТФЭ	HLB (RayCure, 60 mg/3 mL)

### 2.2 Очистка образцов

Кондиционируйте картридж ТФЭ метанолом (10 мл) и водой (10 мл) со скоростью 5,0 мл/мин. Возьмите 200 мл пробы чистой воды, добавьте буферный растворитель EDTA-McIlvaine (pH=4,0, 50 мл, 0,1 моль/л), чтобы отрегулировать значение pH водной среды (отрегулируйте с помощью 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия. Для тилмикозина значение pH необходимо довести до 4,30, а остальные макролиды и тетрациклины выявляются при pH 4,90), пропустите через картридж ТФЭ со скоростью 5-7 мл/мин; 10 мл водного раствора - скорость 10 мл/мин для элюирования оставшегося Na<sub>2</sub>EDTA в картридже ТФЭ; после сушки используйте 10 мл метанола для элюирования со скоростью 1,0 мл/мин. Схема процесса ТФЭ показана на рисунке. Собранные образцы упарьте почти до сухого состояния при 30°C и давлении 5 psi. Раствор для элюирования ацетонитрил-вода (3:7) разбавте до 1,0 мл для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

номер	этап	растворитель	слив	скорость потока (мл/мин)	объем (мл)	время (мин)
1	кондиционирование	СНЗОН	слив-1	10	10	1.6
2	кондиционирование	H <sub>2</sub> O	слив-1	10	10	1.6
3	загрузка образцов большого объема		слив-1	5	250	62.8
4	промывка	H <sub>2</sub> O	слив-1	5	10	2.6
5	продувка		слив-1	40	20	1.8
6	сушка					5
7	очистка шприца	СНЗОН		10	5	0.9
8	элюирование	СНЗОН	сбор	1	10	10.5
9	продувка			20	5	0.8
10	конец программы					

Рис.3 Схема проведения ТФЭ с помощью Fotector Plus

## 3. Проведение анализа

### 3.1 Условия колонки

колонка	Waters XBridge BEH HILIC 2.5мкм ×21 мм × 50мм
скорость потока	0.200 мл/мин
Мобильная фаза	A: 10mM ammonium acetic (0.1% formic acid) , B: Methanol
Температура колонки	35°C
Объем инъекции	10мкл
Детектор	масс-спектрометрический

режим	ESI <sup>+</sup>
поток газа	11 л/мин
температура газа	350°C
напряжение	4000
давление	35psi
градиентное элюирование	Макролиды: 0,0-1,5 мин, 93% подвижной фазы А, 1,5-3,0 мин, 60% подвижной фазы А, 3,0-3,5 мин, 10% подвижной фазы А, выдержка 2 мин, 5,50-6,0 мин, 93% подвижной фазы А; 6,00-10,0 мин, 93% подвижной фазы А. Тетрациклин: 0,0-0,50, 80% подвижной фазы А; 0,50-2,0, 30% подвижной фазы А, выдержать 2 минуты; 4,00-4,10, 90% подвижной фазы А, выдержать 3 минуты.

### 3. 2 MRM параметры

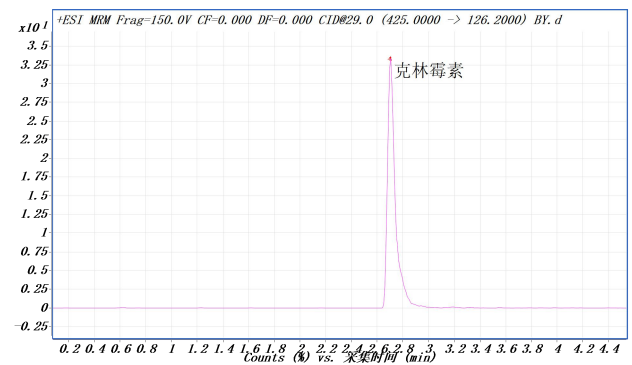
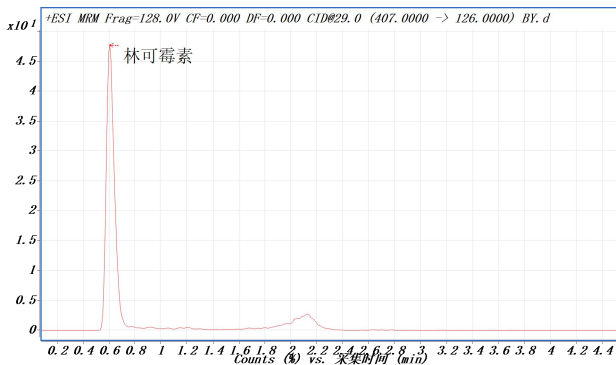
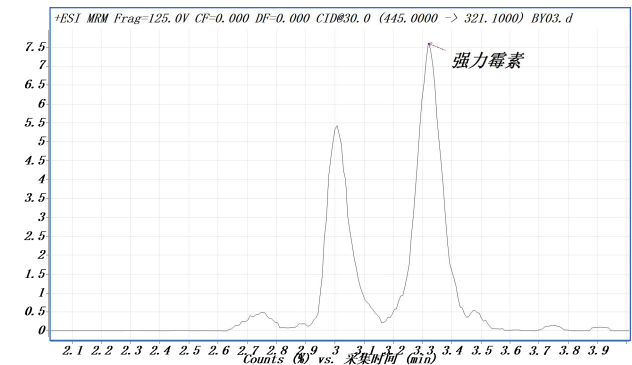
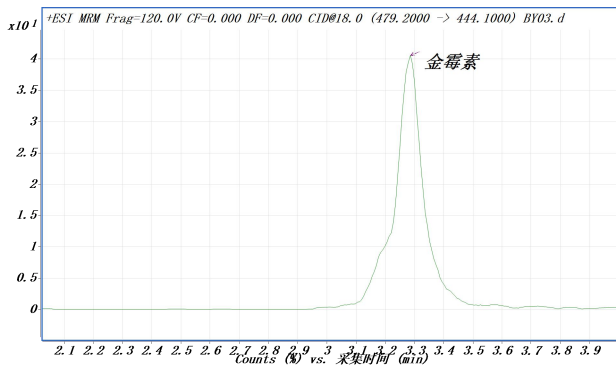
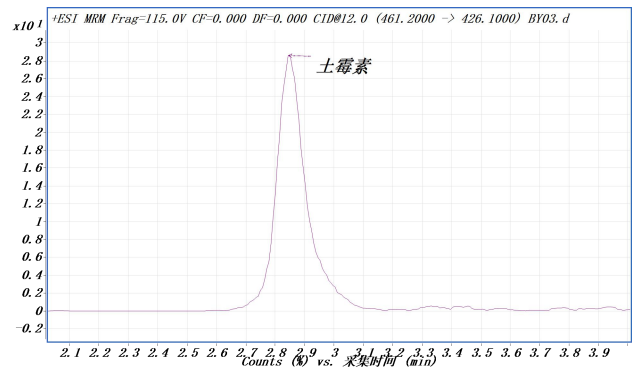
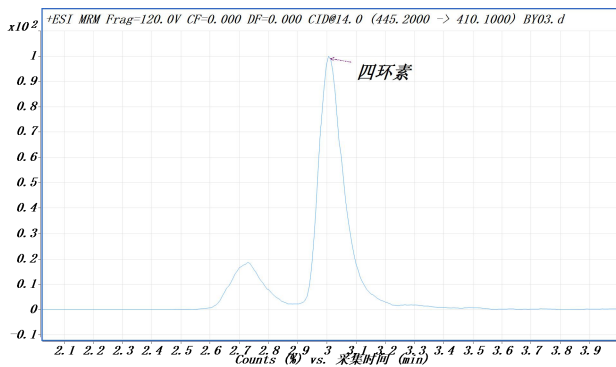
Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
тетрациклин	445.2	427.1	40	120	6	7
		410.1	40	120	14	7
		154	40	120	26	7
Окситетрациклин	461.2	443.2	40	115	8	7
		426.1	40	115	12	7
Хлортетрациклин	479.2	444.1	40	120	18	7
		462	40	120	12	7
Доксициклин	445	428.1	40	125	14	7
		321.1	40	125	30	7
		267.1	40	125	38	7
Линкомицин	407	359.1	20	128	13	7
		126	20	128	29	7
Клиндамицин	425	174.1	20	215	37	7
		377.2	20	150	17	7
		126.2	20	150	29	7
тилмикозин	869	696.5	20	215	41	7
		174.3	20	215	49	7
Эритромицин	734	576.4	20	160	13	7
		158.1	20	160	29	7
Тилозин	916	145.1	20	215	41	7
		174.1	20	215	37	7
гитармицин	772	215.2	20	215	22	7
		174.2	20	215	29	7

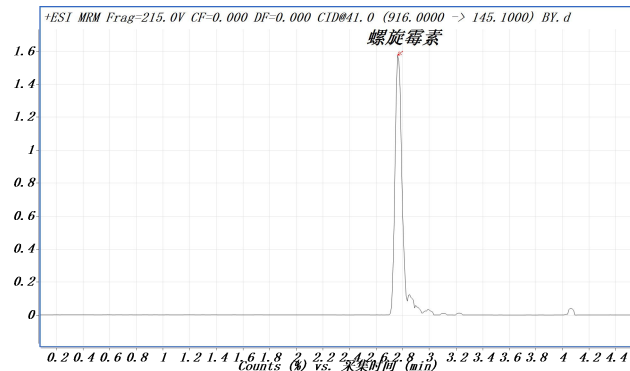
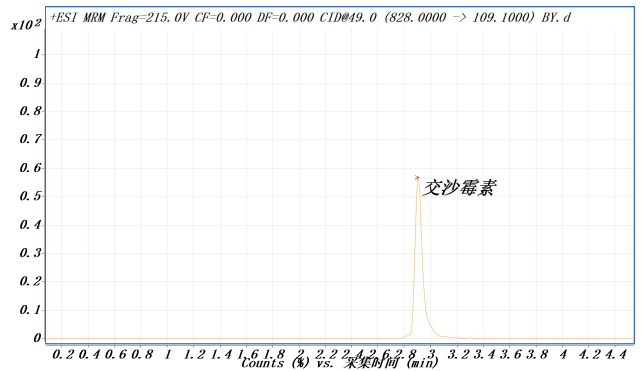
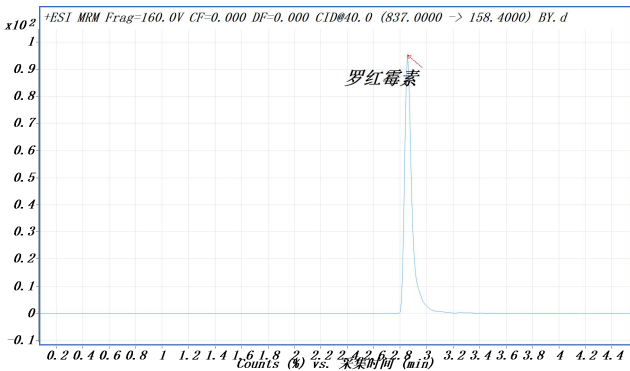
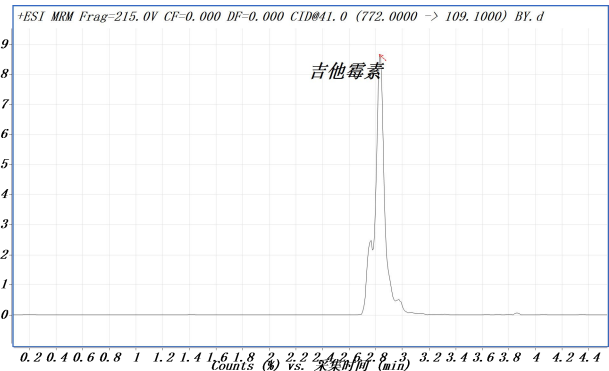
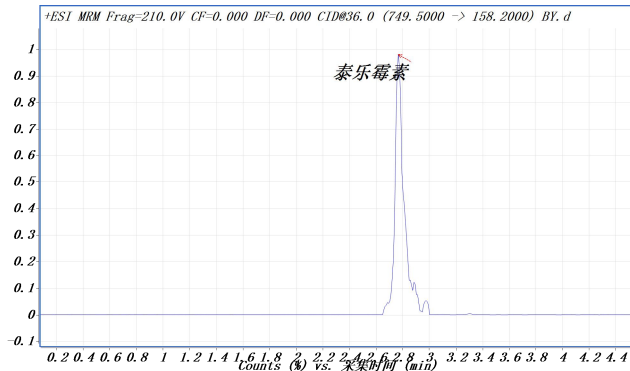
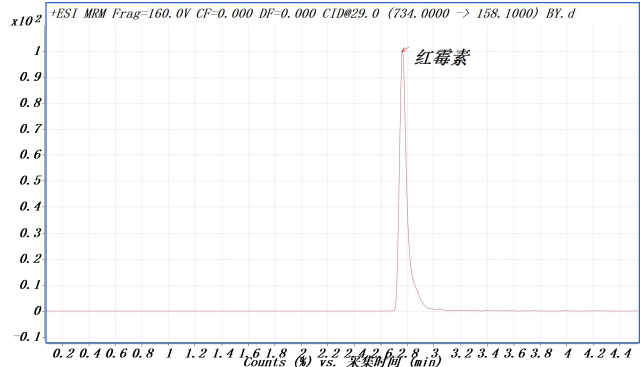
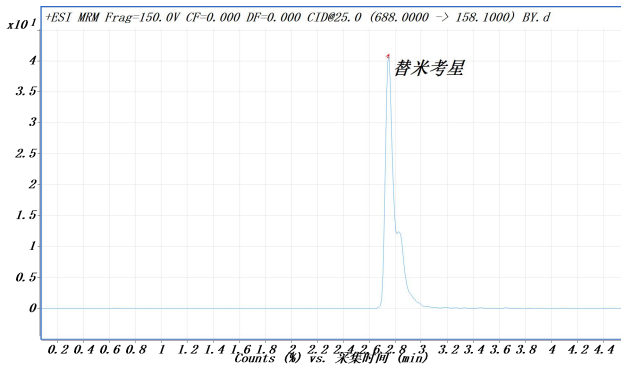
Рокситромицин	837	109.1	20	215	41	7
		158.4	20	160	40	7
джозамицин	828	174.1	20	215	33	7
		109.1	20	215	49	7
спирамицин	843	174.2	20	185	25	7
		109.1	20	185	41	7

Таблица 1. Параметры обнаружения тандемной масс-спектрометрии 4 тетрациклинов и 9 макролидов

### 3. 3 хроматограммы

На рисунке ниже представлены масс-спектры 4 образцов тетрациклина и 9 соединений макролидов:





## 4. Проверка осуществимости метода

### 4.1 Проверка эффекта матрицы

Возьмите пробу чистой воды, выполните описанные выше этапы обработки пробы, упарьте азотом до почти сухого состояния, добавьте стандартный раствор (1 ppm, 20 мкл) и доведите объем до 1 мл для анализа ВЭЖХ-МС/МС. Если концентрация с добавлением матрицы точна, вы можете напрямую использовать стандартную кривую для количественного определения образца; если она неточна, используйте кривую с добавлением матрицы для выполнения количественного анализа.

Выберите площадь пика количественного иона по оси ординат, а концентрацию по оси абсцисс и постройте корреляционную кривую. Кривая представляет собой линейную регрессию с одинаковым весом для каждой точки. Составьте рабочую кривую, требующую  $R^2 > 0,99$ ; эту кривую необходимо перенастраивать раз в две недели.

### 4.2 Пример тестирования

Чтобы проверить степень извлечения этого метода, в этом эксперименте были добавлены вышеуказанные 9 макролидов и 4 стандарта тетрациклина (20 мкл, 1 мг/л) в очищенную воду (200 мл) и проведена проверка стандартного дополнительного восстановления ( $n = 4$ ).

Результаты испытаний представлены в Таблице 2. рН = 4,90 использовали для четырех видов тетрациклинов и макролидов (для тилмикозин рН = 4,0). Степень извлечения девяти макролидов колебалась от 80,00% до 120,00%, и только для спирамицина составила 70,60%. Относительные стандартные отклонения 4 тетрациклинов и 9 макролидов находились в пределах 13%. Это показывает, что этот метод может быть хорошо применен для обнаружения 4 видов тетрациклинов и 9 видов макролидов в пробах воды.

вещество (Compound)	Степень извлечения (%) Sample-1	Степень извлечения (%) Sample-2	Степень извлечения (%) Sample-3	Степень извлечения (%) Sample-4	среднее Average Recoveries(%)	RSD(%)
тетрациклин	90.08	95.33	77.90	73.11	84.10	12.30
Окситетрациклин	107.41	93.89	78.81	94.35	93.61	12.49
Хлортетрациклин	112.01	111.00	96.73	89.16	102.23	10.92
Доксициклин	107.40	103.62	108.19	108.92	107.03	2.20
Линкомицин	120.33	118.83	96.95	97.75	109.72	11.85
Клиндамицин	85.80	97.58	79.43	80.03	85.71	9.82
тилмикозин (рН 4,3)	94.00	107.04	95.95	79.12	94.03	12.21
Эритромицин	120.17	97.93	98.26	107.81	106.04	9.88
Тилозин	106.58	98.01	95.01	92.99	98.15	6.10
гитармицин	90.69	93.19	80.12	90.29	88.57	6.53
Рокситромицин	91.45	108.84	97.82	92.18	97.57	8.23
джозамицин	106.02	93.22	102.22	84.97	96.61	9.76
спирамицин	75.18	68.01	67.98	71.22	70.60	4.83

Таблица 2. Степень извлечения и значение RSD для проб чистой воды (100 нг/л)

## 5. Результаты и выводы

5.1 Для данного метода следует учитывать влияние матрицы. Помехи на этом этапе возникают не только из-за влияния примесей в пробе воды, но и из-за мешающих примесей, имеющих в непроверенных картриджах ТФЭ, используемых растворов хроматографического класса и т. д. Поэтому во избежание возникновения матричного эффекта необходима проверка процесса пробоподготовки.

5.2 Если картридж ТФЭ представляет собой модель с концентрацией 500 мг/6 мл, время сушки колонки следует увеличить до 20 минут. В процессе продувки азотом и концентрирования конечного элюента следует контролировать степень высыхания и не допускать чрезмерного высыхания.

5.3 Для элюирования необходимо использовать 10 мл водного раствора, чтобы облегчить удаление остаточной ЭДТА в картридже ТФЭ и не допустить, чтобы она мешала обнаружению соединений флаксацина в последующем элюенте.

## 6. Преимущества

Высокопроизводительная автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus обрабатывает 6 образцов одновременно и 60 образцов за одну загрузку. Все основные команды: активация, загрузка, промывка и элюирование полностью автоматизированы, что значительно повышает эффективность и надежность прибора, обеспечивает высокую степень извлечения. Автоматизированная система упаривания в токе азота Auto EVA-60 выполняет быструю концентрацию образцов.



**Автоматизированная система твердофазной экстракции серии Fotector от RayKol**



**Автоматизированная система упаривания в токе азота серии EVA от RayKol**



**Ведущий поставщик решений для автоматизированной  
подготовки проб**