

近海环境中抗生素分析样品前处理技术的研究进展

吕 敏¹, 陈令新^{1,2,3*}

(1. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003;
2. 山东省海岸带环境过程重点实验室, 山东 烟台 264003; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 抗生素在人和动物疾病防治方面的广泛及大量使用造成其源源不断地进入到环境中,并最终通过各种途径进入到近海环境中。由于抗生素可在水生生物体内蓄积,特别是其可促进细菌耐药性的产生与传播,已经威胁到生态和人类健康。抗生素种类复杂、性质各异,且在环境中存在浓度低,因此,发展各种基质中抗生素分析的前处理方法至关重要。该文综述了近十几年来近海水体、沉积物和生物体中抗生素的前处理方法,主要包括固相萃取、固液萃取、基质固相分散萃取和 QuEChERS 等几种常用前处理技术,并对方法中可能影响萃取和净化效果的各种因素进行了分析,最后对各种方法的优缺点和发展进行了总结和展望。

关键词: 抗生素;近海;前处理技术;综述

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2020)01-0095-09

Advances in sample pretreatment techniques for analysis of antibiotics in the coastal environment

LÜ Min¹, CHEN Lingxin^{1,2,3*}

(1. CAS Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;
2. Shandong Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, Yantai 264003, China;
3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The widespread and massive usage of antibiotics for the prevention and treatment of diseases in human and animals have resulted in their continuous discharge into the environment, and finally, into the coastal environment through various pathways. Accumulation of antibiotics in aquatic organisms poses a great threat to ecological and human health, especially because it facilitates the generation and spread of bacterial resistance. Given the diverse range of antibiotics with various features, as well as their presence at low concentrations in the environment, it is imperative to develop pretreatment techniques for antibiotics in various matrices. In this paper, the pretreatment methods proposed in recent decades for antibiotics in coastal water, sediment, and biota are summarized, with emphasis on commonly used methods such as solid-phase extraction, solid-liquid extraction, matrix solid-phase dispersion, and QuEChERS. Additionally, the potential factors influencing the extraction performance and clean-up efficiency are analyzed. The advantages and disadvantages of the methods and their development are finally discussed.

Key words: antibiotics; coastal; pretreatment techniques; review

收稿日期: 2019-07-03

* 通讯联系人. Tel: (0535) 2109130, E-mail: lxchen@yic.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金(41601525); 山东省自然科学基金(ZR2016DB07); 环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金(KF2017-11).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41601525); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2016DB07); Open Fund of State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology (No. KF2017-11).

抗生素是指能在低浓度下有选择性地抑制或影响其他生物功能的一类物质,包括生物产生的和人工合成的^[1]。抗生素被誉为 20 世纪最重要的医学发现之一。在世界范围内,每年有越来越多的抗生素被人工合成,而且抗生素的消费使用量也在逐年增加,预计至 2030 年畜用抗生素消费使用量将比 2011 年增加 67%^[2]。由于大部分抗生素不能被人体或动物代谢,通过排泄物的形式排出体外^[3],最终通过地表径流进入到近海环境中。已有研究显示一些抗生素可在鱼类等生物体内富集,具有生物放大效应^[4],威胁生态安全和人类健康。另外,抗生素会引发细菌耐药性,并造成耐药性的传播^[5]。因此,亟须掌握抗生素在环境中的行为及其环境效应,其中,建立环境中抗生素的分析方法成为关键。

由于抗生素在环境中的存在水平较低^[6-8],通常用高灵敏度和高选择性的液相色谱-质谱(HPLC-MS)或液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)进行检测分析。而样品前处理过程会直接影响仪器检测的灵敏度和稳定性,因此,发展各种环境基质中样品的前处理方法极为重要。目前已有环境水体^[9]、鱼体内^[10]抗生素分析样品前处理方法的综述,也有对近海包括抗生素等药品和个人护理用品存在水平的文献回顾^[8],然而尚缺乏对近海各种介质中抗生素分析样品前处理方法的文献综述。本文将对近十几年近海水体、沉积物和生物样品中抗生素测定的前处理方法进行回顾总结,并着重介绍了固相萃取(SPE)、固液萃取、基质固相分散萃取(MSPD)和 QuEChERS 等几种常用前处理技术。

1 海水中抗生素分析的样品前处理

由于抗生素在海水中的存在水平低,且海水基质复杂,因此,针对海水样品的前处理方法均是为了去除基质干扰以及富集目标物。目前水样中研究较多的抗生素包括磺胺类、四环素类、喹诺酮类和大环内酯类,另外,甲氧苄氨嘧啶因与磺胺类抗生素一起使用^[11],也是研究较多的抗生素。

1.1 预处理

水样一般会首先过滤去除颗粒物,其中,0.45 μm 或 0.7 μm 的玻璃纤维滤膜使用较多^[11-23],也有研究采用 1 μm 甚至更大孔径的玻璃纤维滤膜^[24,25]或其他滤膜^[26-28]。因此,这些方法测定的为溶解态的抗生素。考虑到重金属可与四环素类、喹诺酮类、大环内酯类等抗生素发生络合作用^[29],因

此,萃取时常用 EDTA 络合重金属,可有效提高抗生素的萃取效率^[30,31]。

另外,抗生素结构比较复杂,通常具有酸性或碱性官能团,而在溶液中不同的存在状态直接影响其后续富集净化过程中的保留行为,因此,溶液 pH 也是影响其后续回收率的关键因素。在中性条件下,酸性化合物以解离状态存在,可以与环境基质中质子化的氨基官能团作用,而碱性化合物可以与环境基质中去质子化的酸性官能团作用,影响萃取效率;在碱性条件下,仲氨基 H^+ 解离程度提高,萃取效率会比中性条件下更低;而在低 pH 条件下,酸性化合物以分子状态存在,碱性化合物以中性或者阳离子状态存在,与基质作用减弱,萃取效率会提升^[32]。因此,对于大多数抗生素,酸性条件有利于它们的萃取。然而,有研究显示,酸性或碱性条件下一些 β -内酰胺类和头孢菌素类抗生素容易发生降解,进而导致回收率偏低^[9]。Gulkowska 等^[33]在分析大环内酯类、四环素类、喹诺酮类、 β -内酰胺类和头孢菌素类抗生素时,将样品分成两份,测 β -内酰胺类和头孢菌素类抗生素时,将水样调至中性,而将另一份水样调至酸性以测其他抗生素,最后得到较好的回收率。然而,该方法工作量较大,Zou 等^[13]在测定包括 β -内酰胺类和头孢菌素类在内的 21 种抗生素时,将水样酸化至 pH=3,实现了多组分抗生素的同时分析,虽然回收率有所降低,但仍在可接受范围内,且该方法更简便。值得注意的是,有些抗生素如四环素在较低 pH 条件下(pH<2)不稳定^[29],通常将 pH 调到 2~4 之间。

1.2 固相萃取

与传统液液萃取相比,SPE 更省时省力、耗费溶剂较少,且在多组分同时分析方面具有更好的重现性和选择性,已经成为水样中抗生素富集净化的经典方法。要想获得较好的富集净化效果,SPE 柱填料成为关键。亲水疏水反向平衡柱(HLB)因可同时富集净化极性和非极性的化合物,且可耐受较宽 pH 范围(1~14)而常用于各种酸性、中性和碱性化合物的前处理分析。特别地,因 HLB 小柱不含有硅醇基,因此较适合四环素类抗生素,不会造成后续测定过程中峰拖尾现象^[9]。在相同中性条件下,相比于 HLB,也有研究发现将混合型阳离子交换柱(MCX)和 HLB 串联起来使用可使磺胺醋酰、磺胺嘧啶和磺胺噻唑等磺胺类抗生素的回收率由 66.8%、64.2% 和 51.3% 分别提高到 88.9%、88.9% 和 67.4%^[26]。

理论上,MCX材料既具有反相柱的特点,又具有阳离子交换的优势,酸性条件更利于其对化合物的萃取。原因是,在低pH条件下(2.5~3),由于碱性化合物带正电,可强烈结合到阳离子交换剂上,而中性和酸性化合物可被反相材料较好地保留,所以碱性、酸性和中性化合物都可以有效保留在MCX材料上。

大多数研究后续用水、低浓度的甲醇水溶液或非极性的正己烷进行冲洗柱子,以去除EDTA以及干扰组分,待柱子抽干后,采用甲醇、酸化的甲醇或乙腈进行洗脱。当有其他化合物与抗生素一起分析时,甲醇洗脱后,也会根据化合物性质后续用别的溶剂进一步洗脱^[34]。近海海水中抗生素测定的前处理方法见表1。需要注意的是,由于一些抗生素易发生光降解,因此,收集的样品包括前面采集样品一般会储存在棕色瓶中。而且,与淡水水体中抗生素样品的前处理方法^[35]相比,整体流程类似。

2 沉积物和生物样品中抗生素分析样品的前处理

对于沉积物和生物样品,基质比水体更为复杂,处理过程也更为繁琐。对于生物血样,离心取血浆后,用甲酸水溶液稀释定容,然后过HLB小柱,用甲醇洗脱^[36,37]。对于固体样品,首先需要通过超声、微波、振荡或者加速溶剂萃取(ASE)把抗生素从基质中提取出来^[15,18-21,23,24,38-51],进一步进行净化。近年来,很多学者发展出更简便的方法,如MSPD^[52,53]和QuEChERS方法^[25,54-57],特别是QuEChERS方法,耗时更短。

2.1 预处理

沉积物样品一般需要冷冻干燥,后续研磨过筛没有统一标准,筛子孔径从0.15 mm到2 mm均有报道。考虑到不同粒径的颗粒对污染物的吸附能力不同,在比较不同研究污染物存在水平时筛孔直径也不能忽视。

对于生物样品,血样一般离心,冷冻保存;其他一般取肌肉等生物组织样品,如对双壳贝类生物去壳,然后匀质化,经冷冻干燥或不经冷冻干燥直接冷冻保存。

2.2 固液提取

固液提取是向固体样品中加入提取溶剂,通过超声、振荡、加速溶剂萃取等方法将目标物从固体样品中提取出来,该法因操作简单且过程中不需要贵重仪器而成为应用最多的一种经典前处理方法,但

该方法后续通常会与SPE技术相结合,以进一步净化(见表2)。

提取溶剂是影响目标物回收率的关键,常用提取溶剂包括乙腈、甲醇、乙酸乙酯、酸化的乙腈或甲醇,以及甲醇-水、甲醇-乙腈等混合溶剂。McIlvaine/EDTA水溶液(pH 4)对四环素类抗生素有很高的溶解性,常用于从固体样品中提取四环素^[29]。在所有的提取溶剂中,乙腈因为较低的基质干扰效应被认为是较优的选择,但它对有些抗生素如阿莫西林的萃取效率较低^[46]。尽管如此,Freitas等^[47]比较了乙腈、甲醇以及混合溶剂对生物体中41种抗生素包括磺胺类、甲氧苄氨嘧啶、四环素类、大环内酯类、喹诺酮类、青霉素类和氯霉素类等7大类抗生素的处理效率,发现相对于其他溶剂体系,乙腈对目标抗生素的整体回收率最好,且不需要进一步SPE净化,快速方便。相比之下,甲醇会提取到较多的极性杂质,因此,很多学者会采用一定比例的甲醇水或甲醇-乙腈溶液作为萃取溶剂^[40,57]。

与 β -内酰胺类、大环内酯类、磺胺类和氟喹诺酮类等抗生素相比,针对氨基糖苷类抗生素的检测分析报道较少。一个主要原因是,氨基糖苷类抗生素在酸性条件下具有较强的极性和稳定性,需要高离子强度的溶剂进行提取。Gbylik等^[44]研究了鱼体中包括氨基糖苷类、 β -内酰胺类、大环内酯类、磺胺类、氟喹诺酮类和甲氧苄氨嘧啶类共34种抗生素的分析方法,提出分别用偏磷酸和七氟丁酸组成的离子对试剂和乙腈提取,最后混合可以使目标抗生素有较好的回收率,且应先采用离子溶剂提取,否则会导致氨基糖苷类抗生素回收率的降低。

生物样品中因含有较多的蛋白质,常加入乙腈、甲醇、丙酮或者这些溶剂与酸类物质包括三氯乙酸(TCA)、三氟乙酸、乙酸、柠檬酸和甲酸等的混合物,以促使蛋白质沉淀;另外,McIlvaine-EDTA、柠檬酸钠、草酸盐、磷酸盐缓冲液等也可以作为蛋白质去除剂^[58]。针对四环素类、喹诺酮类和大环内酯类等抗生素,也需要加入重金属络合剂以提高目标物的提取效率。Gbylik等^[44]测定鱼体内抗生素时,分别加入EDTA和20%三氯乙酸溶液以分别络合重金属、促进蛋白质的沉淀。

根据样品中目标物提取的情况,往往需要对提取液进一步做净化处理。常用步骤是通过旋蒸去除提取液中的有机溶剂,然后同水样处理方法,进一步采用SPE进行浓缩净化。由于沉积物或生物样品

表 1 近海海水中抗生素测定的前处理方法

Table 1 Pretreatment strategies for analyzing antibiotics in coastal water

Analytes	N	Filter/ μm	EDTA	pH adjustion	Column	Elution solvent	Analytical method	Recovery/ %	Sensitivity/ (ng/L)	Ref.
Sulfonamides, quinolones	8	0.7	added	2	HLB	methanol and actone	HPLC-MS/MS	22-62	0.09-0.5 ^a	[6]
Macrolides, sulfonamides, trimethoprim	11	0.7	added	3	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	78-88	0.2-6.6 ^b	[11]
Macrolide, trimethoprim, tetracycline, β-lactams, cephalosporins	9	0.45	added	3 or 7.5-8.0	HLB	acetonitrile or methanol	HPLC-MS/MS	93-116	2.0-13.0 ^a	[12]
Quinolones, macrolides, sulfonamides, tetracyclines, chloramphenicol, trimethoprim, cephalosporins, β-lactams	21	0.45	added	3	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	61-110	0.3-20 ^b	[13]
Quinolones, macrolides, sulfonamides, chloramphenicol	10	0.45	added	3	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	73-108	0.5-10.0 ^b	[14]
Sulfonamides, trimethoprim, tetracyclines, quinolones, macrolides, ionophores	37	0.7	added	3	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	41-(>500)	0.01-3.1 ^a	[15]
Tetracycline	1	0.7	-	2.5±0.5	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	98-114	1.3 ^c	[16]
Sulfonamides, macrolides, chloramphenicols	12	0.7	added	4	-	methanol	UPLC-MS/MS	63-127	0.01-1.1 ^c	[17]
Sulfonamides, tetracyclines, quinolones, aminoglycosides, macrolides, β-lactams, amphenicols	27	0.7	added	3	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	70-120	0.004-0.6 ^c	[18]
Tetracycline, quinolone, chloramphenicol	3	0.7	added	-	HLB	methanol (0.1% (v/v) formic acid)	LC-TOF/MS	65-120	100.0-500.0 ^d	[19]
Sulfonamides, quinolones, trimethoprim	12	0.45	-	-	BAKERBOND Speedisk (H ₂ O-PhiliC/DVB)	methanol	HPLC-MS/MS	61-98	0.2-16.7 ^d	[20]
Tetracyclines, quinolones, macrolides, sulfonamides	8	0.45	added	5	HLB	methanol and dichloromethane	HPLC-MS/MS	61-93	0.02-1.4 ^c	[21]
Quinolones, trimethoprim, sulfonamides, macrolides	13	0.45	added	3	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	61-148	0.1-1.5 ^b	[22]
Sulfonamides, quinolones, tetracycline, macrolides	9	0.7	added	3	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	73-94	0.2-3.2 ^b	[23]
Macrolides, quinolones, β-lactams, cephalosporin, lincosamide, trimethoprim, sulfonamides	32	1.6	added	2	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	33-226	-	[24]
Sulfonamide, trimethoprim	2	1	-	3	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	87-111	0.3-0.4 ^a	[25]
Sulfonamides, quinolones, tetracyclines	36	0.45	added	-	HLB and MCX	methanol	HPLC-MS/MS	67-109	0.1-2.4 ^b	[26]
Macrolides, tetracycline, cephalosporins, sulfonamide, trimethoprim, nitroimidazoles	13	0.45	added	-	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	<50-136	0.2-7.2 ^d	[27]
Chloramphenicols, sulfonamides, quinolones, tetracyclines, macrolides	20	1	added	4	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	62-129	0.01-1.2 ^a	[28]
Macrolides, sulfonamide, trimethoprim	5	-	-	7.0±0.2	HLB	ethyl acetate	HPLC-MS/MS	-	2.6-5.1 ^d	[34]

N: number of analytes; HLB: hydrophilic-lipophilic balance; MCX: mixed-mode cationic exchange. a: method detection limits (MDLs); b: LOQs; c: LODs; d: method quantification limits (MQLs); MDLs and MQLs; determined by considering the pre-concentration/dilution factor and the amount of sample.

表 2 近海沉积物和生物样品中抗生素测定的前处理方法

Table 2 Pretreatment strategies for analyzing antibiotics in coastal sediment and biota

Analytes	N	Matrix	Sample preparation	Extraction methods	Clean-up column (materials)	Elution solvent	Analytical method	Recovery/%	Sensitivity/(ng/g)	Ref.
Macrolide, sulfonamide, trimethoprim	3	fish plasma	centrifugation	-	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	81-89	<11.0 ng/L ^a	[36]
Sulfonamide, macrolide	2	fish plasma	centrifugation	-	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	-	1.3-8.6 ng/L ^a	[37]
Sulfonamides, macrolides, trimethoprim, tetracyclines, quinolones, ionophores	37	sediment	freeze-dried, homogenized	sonication	SAX and HLB	methanol	HPLC-MS/MS	65-(>500)	0.06-11.6 ^a	[15]
Sulfonamides, tetracyclines, quinolones, β -lactams, aminoglycosides, macrolides, amphenicols	27	sediment	freeze-dried, homogenized	sonication	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	70-120	0.004-0.6 ^b	[18]
Tetracycline, quinolone, chloramphenicol	3	sediment	freeze-dried	sonication	HLB	methanol (0.1% (v/v) formic acid)	LC-TOF/MS	65-117	1.0-5.0 ^c	[19]
Sulfonamides, tetracyclines, trimethoprim, quinolones	14	sediment	freeze-dried, ground	sonication	Discovery SAX, HLB	methanol	HPLC-MS/MS	89-131	0.5-30.6 ^c	[20]
Tetracyclines, quinolones, macrolides, sulfonamides	8	sediment	freeze-dried, homogenized	sonication	HLB	methanol and dichloromethane	HPLC-MS/MS	55-94	0.02-1.1 ^b	[21]
Sulfonamides, quinolones, tetracycline, macrolides	12	sediment	freeze-dried, homogenized	sonication	SAX and HLB	methanol	HPLC-MS/MS	55-99	0.3-2.5 ^d	[23]
Macrolides, quinolones, β -lactams, cephalosporin, lincosamide, trimethoprim, sulfonamides	32	sediment	freeze-dried	sonication	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	21-231	-	[24]
Sulfonamide, trimethoprim	2	suspended particles	freeze-dried, ground	QuEChERS	-	-	UPLC-MS/MS	94-127	0.1 ^a	[25]
Macrolides, sulfonamide, trimethoprim, nitroimidazoles	7	sediment	freeze-dried, homogenized	ASE	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	26-220	0.2-1.2 ^b	[38]
Tetracyclines, sulfonamides, quinolones, macrolide	17	sediment	freeze-dried, homogenized	sonication	HLB	methanol (0.1% (v/v) formic acid)	HPLC-MS/MS	73-127	0.5-14.1 ^a	[39]
Tetracycline	1	shrimps	homogenized	MSPD	-	acetonitrile-methanol (1:1, v/v)	HPLC	85±9	10.0 ^b	[52]
Sulfonamides, tetracyclines	6	fish	homogenized	shaking	-	-	HPLC-MS/MS	86-116	1.2-16.0 ^b	[40]
Sulfonamides, trimethoprim	8	shrimps	homogenized	QuEChERS	PSA and MgSO ₄	-	LC-TOFMS	33-115	0.1-4.5 ^b	[54]
β -Lactams, tetracyclines, chloramphenicols, sulfonamides, trimethoprim	16	fish, mussel	lyophilized, homogenized	microwave	-	-	HPLC-MS/MS	61-98	2.0-16.0 ^b	[41]
Quinolones, sulfonamides, macrolides	22	mollusks	lyophilized, ground	ASE	HLB	methanol (5% (v/v) ammonia)	HPLC-MS/MS	-	0.02-0.6 ^b	[42]

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

Analytes	N	Matrix	Sample preparation	Extraction methods	Clean-up column (materials)	Elution solvent	Analytical method	Recovery/%	Sensitivity/(ng/g)	Ref.
Sulfonamides, tetracyclines, chloramphenicol	20	sediment, biota	lyophilized, homogenized	shaking	MCX; HLB	methanol-ammonia (95:5, v/v); methanol	HPLC-MS	59-112	0.6-5.8 ^b	[43]
Macrolides, tetracyclines, sulfonamides, quinolones, trimethoprim, β -lactams, aminoglycosides	36	fish	-	shaking	Strata X-CW	methanol (2% (v/v) formic acid)	HPLC-MS/MS	96-111	-	[44]
Tetracyclines	7	fish, shrimps	homogenized	ASE	-	-	HPLC	79-103	5.0-10.0 ^b	[45]
Macrolides, quinolones, β -lactams, cephalosporin, lincosamide, trimethoprim, sulfonamides	32	mussels	frozen	sonication	HLB	methanol	HPLC-MS/MS	21-231	-	[24]
Nitroimidazoles	8	fish, shrimps	homogenized	QuEChERS	-	-	UPLC-MS/MS	75-92	-	[55]
Quinolones, tetracyclines, chloramphenicol, macrolides, trimethoprim, β -lactams, sulfonamides	31	fish, shrimps	-	shaking	-	-	HPLC-MS/MS	42-120	0.06-4.6 ^d	[46]
Sulfonamides, quinolones, trimethoprim, tetracyclines, macrolides, β -lactams, chloramphenicol	41	gilthead sea bream	homogenized	shaking	-	-	UPLC-MS/MS	92-111	-	[47]
Sulfonamides, quinolones, trimethoprim, lincosamide, macrolides	21	fish	homogenized	ASE	-	-	HPLC-MS/MS	55-113	0.003-0.6 ^b	[48]
Lincosamide, sulfonamides, trimethoprim, macrolides	9	mollusks	homogenized	shaking	-	-	HPLC-MS/MS	87-121	<1.0 ^a	[49]
Nitroimidazoles, sulfonamides, macrolides	7	bivalves	freeze-dried, grounded	ASE	HLB	methanol	UPLC-MS/MS	30-116	0.01-3.7 ^a	[50]
Sulfonamides, ionophores, trimethoprim, tetracyclines, quinolones, macrolides	37	fish, mollusks, shrimps	-	sonication	SAX and HLB	methanol	HPLC-MS/MS	57-299	0.1-9.1 ^a	[15]
Sulfonamides	14	fish	freeze-dried, grounded	MSPD	-	methanol-water-ammonia (50:49:1, v/v/v)	HPLC-MS/MS	71-91	2.3-16.4 ^b	[53]
Macrolides, tetracycline, lincosamides, sulfonamides, nitroimidazoles, amphenicol, trimethoprim	23	mussels, fish	freeze-dried	QuEChERS	-	-	UPLC-MS/MS	30-70	0.01-0.3 ^a	[56]
Tetracycline, quinolone, chloramphenicol	3	invertebrates species	freeze-dried	sonication	MAX and HLB	acidified acetonitrile-methanol (70:30, v/v)	LC-TOF/MS	63-110	100.0-500.0 ^c	[19]
Tetracyclines	5	fish	homogenized	QuEChERS	C18	-	UPLC-MS/MS	80-105	0.5-1.3 ^b	[57]
Nitrofurans	4	fish, shrimps	homogenized	sonication	-	-	HPLC-FLD	91-105	0.2-0.3 ^b	[51]

ASE: accelerated solvent extraction; MSPD: matrix solid-phase dispersion; PSA: primary secondary amine; SAX: strong anion exchange. a: MDLs; b: LODs; c: MQLs; d: LOQs.

基质比水体更为复杂,有研究^[15,23]在 HLB 柱前串联强阴离子交换柱(SAX)以去除基质中的腐殖质,降低基质效应。由于生物样品脂肪含量较高,且正己烷可溶解脂类物质,而不能溶解抗生素,因此,也可用它进行样品净化^[43]。

2.3 MSPD

MSPD 第一步通常是将样品和吸附剂用研钵研磨混匀,然后将其放入带筛板的空柱子里,用溶剂进行洗脱。MSPD 方法后面的洗脱过程与 SPE 类似,但 MSPD 方法洗脱过程中样品与溶剂接触面积更大。MSPD 因所用样品和溶剂量比较少,近年来已广泛用于污泥、食品等固体和半固体样品中农药等有机污染物的前处理^[59-61],目前用于近海环境中抗生素分析样品前处理的研究较少(见表 2)。

样品量跟吸附剂量的比例与样品种类和含水量有关,含水量较高的样品所需吸附剂的比例通常也较高。吸附剂、洗脱溶剂的选择均会影响基质去除以及目标物的回收率。对于四环素类等抗生素,在研磨过程中也会加入 EDTA 以络合重金属^[52]。Villar-Pulido 等^[54]采用氨基材料 Bondesil-NH₂ 和乙腈分别作吸附剂和洗脱溶剂测定虾中的抗生素,磺胺类抗生素的回收率大部分低于 40%。Shen 等^[53]研究了不同吸附剂(十八烷基(C18)、中性氧化铝、HLB 材料和多壁碳纳米管)和洗脱溶剂(不同比例的甲醇氨水溶液)对鱼肉中 14 种磺胺类抗生素的前处理效果,发现 HLB 材料效果最好,其次是中性氧化铝,而 C18 对大部分磺胺类抗生素均有较好的效果(因对氨基苯磺酰胺具有较强的亲水性,回收率较低),所用洗脱溶剂均能较好地为目标物洗脱下来,但含甲醇多的洗脱溶剂会造成基质效应增大,因此,选择适当配比的甲醇氨水溶液会取得较好的效果。另外,有学者在对柱子洗脱前采用正己烷淋洗柱子以去除脂溶性杂质,降低基质效应^[52]。

2.4 QuEChERS 方法

QuEChERS 方法最早提出于 2003 年,因具有快速(quick)、简单(easy)、廉价(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)和安全(safe)的特点而得名^[62]。该方法通常是取一定量样品至离心管中,如果是干样,萃取前需要加水,接着加入乙腈等溶剂,振荡或超声提取,然后加入无水 MgSO₄ 和 NaCl,立刻振荡,使水相和有机相分离,并将目标物从水相提取到有机相中;离心取有机相,后续通常会通过分散固相萃取(d-SPE)进一步净化,具体是将

提取液加入含有 PSA(primary secondary amine)等吸附剂和无水 MgSO₄ 的离心管中;振荡离心后取上清液可直接上机测定。在该方法中,添加 NaCl 可以去除水溶性较高的极性干扰基质,同时加入 MgSO₄ 和 NaCl 可促使水相和有机相的分离,且盐的存在可降低极性物质的溶解度,所以该方法对极性物质也有较高的回收率。PSA 吸附剂作为弱离子交换剂,可以与提取液中的酸性脂肪酸等杂质作用,达到净化的目的;MgSO₄ 可以去除提取液中的水分,进而可以促使 PSA 去除酸类杂质。

QuEChERS 已被广泛用于各种样品中农药的前处理分析^[63-67],近年来,有研究学者开始将该方法用于样品中抗生素的处理^[68-70](见表 2)。而根据目标物和基质的不同,萃取体系及吸附材料往往也需进行调整优化。针对虾中的磺胺类和嘧啶类抗生素,Villar-Pulido 等^[54]采用乙酸酸化的乙腈提取后,加 1.75 g NaCl 和 4 g MgSO₄ 进行盐析分层,然后向乙腈相中加入 250 mg PSA 和 750 mg 无水 MgSO₄ 通过 d-SPE 进一步净化。而对于悬浮颗粒物中的磺胺类和嘧啶类抗生素,Cantwell 等^[25]采用乙酸-乙酸钠酸化的乙腈提取,并用 3 g MgSO₄ 进行盐析分层,取乙腈相浓缩后直接上机测定,并未经过 d-SPE 进一步净化。针对鱼体内的四环素类抗生素,Grande-Martinez 等^[57]采用 EDTA-McIlvaine 缓冲液和乙腈溶液进行提取,加(NH₄)₂SO₄ 进行盐析,并采用 C18 经过 d-SPE 进一步净化。由于 d-SPE 过程中的吸附材料最终要通过离心或过滤丢弃,且与 SPE 过程相比,丢掉的吸附材料上仍会残留较多目标化合物,造成回收率的偏低。据研究,PSA、C18 以及硅胶、氧化铝等一些吸附材料,可造成一些喹诺酮类和 β-内酰胺类抗生素回收率偏低^[71,72]。因此,有学者通过加入正己烷对萃取后的有机相进一步净化^[55]。

3 结论与展望

整体上,目前近海环境关注的抗生素种类有限,且多局限于磺胺类、喹诺酮类、四环素类和大环内酯类抗生素,未来需关注其他抗生素。相比较而言,近海水相中抗生素的前处理方法较成熟,也有基于 SPE 的 Online-SPE 在线前处理系统,可与 LC-MS/MS 直接相连,实现了自动化。沉积物和生物样品因基质更为复杂,在提取目标物的同时去除基质干扰也成为关键。固液萃取、MSPD 和 QuEChERS 方

法是目前常用的 3 种固体样品前处理技术。其中,固液萃取应用较多,但其所需溶剂较多,操作步骤较为繁琐。MSPD 技术所需溶剂和样品量均较少,但因研磨和装柱过程中操作上的差异容易造成重现性差,且面临着无法自动化的问题。QuEChERS 方法目前已有针对特定目标物的市场化产品,但在抗生素分析样品前处理方面研究较少。考虑到有些抗生素极性较大,最后 d-SPE 所用吸附剂需要谨慎选择,PSA 因对极性物质具有吸附作用会造成回收率的降低。其他材料如磁性材料通过将目标物吸附到表面,在外部磁场作用下使目标化合物与基质分离,具有富集效率高、分离过程简便等优点,具有良好的应用前景。另外,分子印迹材料因具有高选择性,可有针对性地对某种或某类物质进行吸附,相比于 C18、PSA 等具有较广吸附范围的材料,分子印迹材料在目标物萃取或者净化方面可能是一个较好的选择。

参考文献:

- [1] Kemper N. *Ecol Indicators*, 2008, 8(1): 1
- [2] Van Boeckel T P, Brower C, Gilbert M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(18): 5649
- [3] Mompelat S, Le Bot B, Thomas O. *Environ Int*, 2009, 35(5): 803
- [4] Xie Z X, Lu G H, Liu J C, et al. *Chemosphere*, 2015, 138: 140
- [5] Martinez J L. *Science*, 2008, 321(5887): 365
- [6] Lv M, Sun Q, Hu A Y, et al. *J Hazard Mater*, 2014, 280: 696
- [7] Danner M C, Robertson A, Behrends V, et al. *Sci Total Environ*, 2019, 664: 793
- [8] Arpin-Pont L, Bueno M J M, Gomez E, et al. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23(6): 4978
- [9] Kim C, Ryu H D, Chung E G, et al. *J Environ Manage*, 2018, 217: 629
- [10] Santos L, Ramos F. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 52: 16
- [11] Zhang R J, Tang J H, Li J, et al. *Sci Total Environ*, 2013, 450: 197
- [12] Gulkowska A, He Y H, So M K, et al. *Mar Pollut Bull*, 2007, 54(8): 1287
- [13] Zou S C, Xu W H, Zhang R J, et al. *Environ Pollut*, 2011, 159(10): 2913
- [14] Xu W H, Yan W, Li X D, et al. *Environ Pollut*, 2013, 182: 402
- [15] Chen H, Liu S, Xu X R, et al. *Mar Pollut Bull*, 2015, 90(1/2): 181
- [16] Kim W, Lee Y, Kim S D. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, 145: 221
- [17] Zhao H, Cao Z, Liu X, et al. *Mar Pollut Bull*, 2017, 125(1/2): 208
- [18] Li S, Shi W Z, Li H M, et al. *Sci Total Environ*, 2018, 636: 1009
- [19] Gonzalez-Gaya B, Cherta L, Nozal L, et al. *Sci Total Environ*, 2018, 643: 994
- [20] Siedlewicz G, Bialk-Bielinska A, Borecka M, et al. *Mar Pollut Bull*, 2018, 129(2): 787
- [21] Guo X Y, Feng C H, Gu E X, et al. *Sci Total Environ*, 2019, 671: 548
- [22] Xie H J, Wang X P, Chen J W, et al. *Sci Total Environ*, 2019, 656: 946
- [23] Liang X M, Chen B W, Nie X P, et al. *Chemosphere*, 2013, 92(11): 1410
- [24] Klosterhaus S L, Grace R, Hamilton M C, et al. *Environ Int*, 2013, 54: 92
- [25] Cantwell M G, Katz D R, Sullivan J C, et al. *Environ Toxicol Chem*, 2017, 36(7): 1846
- [26] Na G S, Gu J, Ge L K, et al. *Chin J Oceanol Limnol*, 2011, 29(5): 1093
- [27] Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D. *J Chromatogr A*, 2012, 1248: 104
- [28] Yan C X, Yang Y, Zhou J L, et al. *Environ Pollut*, 2013, 175: 22
- [29] Anderson C R, Rupp H S, Wu W H. *J Chromatogr A*, 2005, 1075(1/2): 23
- [30] Hernandez F, Sancho J V, Ibanez M, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2007, 26(6): 466
- [31] Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D. *J Chromatogr A*, 2013, 1292: 173
- [32] Mol H G J, Plaza-Bolanos P, Zomer P, et al. *Anal Chem*, 2008, 80(24): 9450
- [33] Gulkowska A, He Y, So M K, et al. *Mar Pollut Bull*, 2007, 54(8): 1287
- [34] Nodler K, Licha T, Bester K, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(42): 6511
- [35] Feng M J, Yang Z B, Zhang Q, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(5): 525
封梦娟, 杨正标, 张芹, 等. 色谱, 2019, 37(5): 525
- [36] Lazarus R S, Rattner B A, Brooks B W, et al. *Integr Environ Assess Manag*, 2015, 11(1): 118
- [37] Scott W C, Du B W, Haddad S P, et al. *Environ Toxicol Chem*, 2016, 35(4): 983
- [38] Moreno-Gonzalez R, Rodriguez-Mozaz S, Gros M, et al. *Environ Res*, 2015, 138: 326
- [39] Liu X H, Zhang H B, Li L Z, et al. *Mar Pollut Bull*, 2016, 109(1): 597
- [40] Chafer-Pericas C, Maquicira A, Puchades R, et al. *Aquacult Res*, 2010, 41(9): e217
- [41] Fernandez-Torres R, Lopez M A B, Consentino M O, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(5): 1146
- [42] Li W H, Shi Y L, Gao L H, et al. *Environ Pollut*, 2012, 162: 56
- [43] Na G S, Fang X D, Cai Y Q, et al. *Mar Pollut Bull*, 2013, 69(1/2): 233
- [44] Gbylik M, Posyniak A, Mitrowska K, et al. *Food Addit Contam Part A-Chem*, 2013, 30(6): 940
- [45] Liu Y, Yang H L, Yang S, et al. *J Chromatogr B*, 2013, 917: 11
- [46] Fedorova G, Nebesky V, Randak T, et al. *Chemical*

- Papers, 2014, 68(1): 29
- [47] Freitas A, Leston S, Rosa J, et al. *Food Addit Contam Part A-Chem*, 2014, 31(5): 817
- [48] Liu S S, Du J, Chen J W, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(12): 1320
刘思思, 杜鹃, 陈景文, 等. 色谱, 2014, 32(12): 1320
- [49] Bayen S, Estrada E S, Juhel G, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(19): 5553
- [50] Alvarez-Munoz D, Huerta B, Fernandez-Tejedor M, et al. *Talanta*, 2015, 136: 174
- [51] Luo X Z, Sun Z W, Wang X, et al. *New J Chem*, 2019, 43(6): 2649
- [52] Gomez-Jimenez S, Espinosa-Plascencia A, Valenzuela-Villa F, et al. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 24
- [53] Shen Q, Jin R Y, Xue J, et al. *Food Chem*, 2016, 194: 508
- [54] Villar-Pulido M, Gilbert-Lopez B, Garcia-Reyes J F, et al. *Talanta*, 2011, 85(3): 1419
- [55] Gadaj A, di Lullo V, Cantwell H, et al. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 105
- [56] Serra-Compte A, Alvarez-Munoz D, Rodriguez-Mozaz S, et al. *Food Chem Toxicol*, 2017, 104: 3
- [57] Grande-Martinez A, Moreno-Gonzalez D, Arrebola-Liebanas F J, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 155: 27
- [58] Perez-Rodriguez M, Pellerano R G, Pezza L, et al. *Talanta*, 2018, 182: 1
- [59] Hoff R B, Pizzolato T M. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2018, 109: 83
- [60] Capriotti A L, Cavaliere C, Foglia P, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2015, 71: 186
- [61] Li M Y, Sun Q, Li Y, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(18): 4953
- [62] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412
- [63] Deng H F, Zhang J Y, Huang K, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(12): 1211
邓慧芬, 张建莹, 黄科, 等. 色谱, 2018, 36(12): 1211
- [64] Pszczolinska K, Michel M. *J AOAC Int*, 2016, 99(6): 1403
- [65] Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, et al. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1
- [66] Dong Y L, Liu W J, Cao J, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(9): 1397
董亚蕾, 刘文婧, 曹进, 等. 分析化学, 2017, 45(9): 1397
- [67] Zhang Y Z, Yu Z, Wang Y, et al. *Environmental Chemistry*, 2018, 37(12): 2827
张煜卓, 于湛, 王妍, 等. 环境化学, 2018, 37(12): 2827
- [68] Bruzzoniti M C, Checchini L, De Carlo R M, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(17): 4089
- [69] Zhao N, Liang J C, Shi L Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(3): 313
赵娜, 梁嘉诚, 时丽艳, 等. 色谱, 2019, 37(3): 313
- [70] Fang C R, Gao J, Wang Y X, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(11): 1119
方从容, 高洁, 王雨昕, 等. 色谱, 2018, 36(11): 1119
- [71] Salvia M V, Vulliet E, Wiest L, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1245: 122
- [72] Salvia M V, Cren-Olive C, Vulliet E. *J Chromatogr A*, 2013, 1315: 53