

水和废水中抗生素残留的液相色谱 - 质谱联用检测方法优化

陈瑶洁

南京泓泰环境检测有限公司, 中国·江苏 南京 210000

摘要: 随着抗生素在医疗与养殖业的大量使用, 其在水环境中残留引发了生态风险与耐药性问题。液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 以高灵敏度和多组分同时检测能力, 成为抗生素监测主流。鉴于复杂基质干扰与色谱分离难题, 论文从样品前处理、色谱条件和质谱参数三个环节出发, 通过系统优化, 将常见四环素类、喹诺酮类及 β -内酰胺类抗生素的检出限降至 0.1~1ng/L, 回收率稳定在 75%~110%, 基质抑制低于 10%, 满足环境监测需求。该方法具备优良的准确度与稳定性, 为水环境抗生素污染监控提供了可靠技术支持。

关键词: 抗生素残留; 液相色谱-质谱联用; 样品前处理; 色谱分离; 质谱参数

Optimization of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Antibiotic Residues in Water and Wastewater

Chen Yaojie

Nanjing Hongtai Environmental Testing Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, 210000, China

Abstract: With the extensive use of antibiotics in medical and agricultural sectors, their residues in water environments have raised ecological risks and concerns over antibiotic resistance. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), characterized by high sensitivity and the ability to simultaneously detect multiple components, has become the mainstream method for antibiotic monitoring. Considering the challenges posed by complex matrix interference and chromatographic separation, this study systematically optimized the method from three aspects: sample pretreatment, chromatographic conditions, and mass spectrometry parameters. As a result, the detection limits of common tetracycline, quinolone, and β -lactam antibiotics were reduced to 0.1-1 ng/L, with recovery rates ranging from 75% to 110%, and matrix suppression below 10%, meeting the requirements for environmental monitoring. This method offers excellent accuracy and stability, providing a reliable technical support for the monitoring of antibiotic pollution in water environments.

Keywords: Antibiotic residues; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Sample pretreatment; Chromatographic separation; Mass spectrometry parameters

0 前言

抗生素通过医疗废水、养殖排放及农业径流进入水体, 难以彻底降解, 长期累积对生态系统和人类健康造成严重威胁。世界卫生组织和各国环保部门已将抗生素残留纳入常规水质监测体系, 因此迫切需要一种既高效、灵敏又能抵抗基质干扰的检测方法。液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术结合了高效液相色谱的优异分离性能与质谱的定量鉴别优势, 已成为微量抗生素分析的首选手段, 但复杂基质背景和多种抗生素理化特性差异, 仍限制了现有方法的普适性与准确性。为此, 论文针对实际水样, 通过优化固相萃取前处理、梯度洗脱色谱条件及质谱离子化参数, 显著提升了方法的灵敏度和抗干扰能力, 为环境中抗生素残留监测提供了改进的技术方案。

1 样品前处理优化

为了降低基质干扰并提高分析灵敏度, 对固相萃取 (SPE) 及在线固相萃取进行系统改进。

1.1 SPE 柱选择与条件优化

使用 C18、OASIS HLB 和混合型强阴/强阳离子交换柱进行并行对比实验, 结果表明 OASIS HLB 柱在预富集喹诺酮类和四环素类抗生素时回收率可达 85%~95%; 在此基础上, 将柱前预处理步骤由单一甲醇冲洗拓展为“甲醇→水→缓冲液”三级梯度, 以去除更多基质干扰。洗脱溶剂优化为甲醇/乙腈 (1:1), 并添加 0.1% 甲酸, 不仅可提高对弱极性和中等极性抗生素的洗脱效率, 还能显著降低基质效应。为了防止过度稀释和目标损失, 将洗脱体积精确控制在 8mL, 并在洗脱后采用温和氮吹浓缩至近干状态, 随后以 500 μ L 甲醇-水混合溶液 (1:1) 定容, 从而进一步增强

检测灵敏度且保证定量准确性。

1.2 pH 调整及盐离子效应

研究表明,不同抗生素在不同 pH 环境下的离子化状态显著影响其在 SPE 柱上的吸附效率。喹诺酮类药物在微酸性条件 (pH 3~4) 呈强正电性,回收率可提升至 90% 以上,而 β -内酰胺类在中性 (pH 6.5~7.5) 环境下稳定性最佳,回收率超过 80%。因此,上样前使用 0.1mol/L 乙酸铵缓冲液进行 pH 调节,不仅保证了多组分样本的均一化吸附,还能通过“缓冲液→水→样品”顺序冲洗平衡阶段,有助于去除共洗脱物并进一步降低基质抑制。为避免高盐带来的离子竞争效应,严格控制 NaCl 浓度低于 0.1mol/L,同时在离心步骤前加入 0.05mol/L EDTA 以络合金属离子,进一步提高 SPE 柱对目标化合物的选择性富集能力。

1.3 在线固相与自动化对比

将在线固相萃取系统直接集成到 LC-MS/MS 进样环节中,可实现自动化“进样→净化→预浓缩→分析”一体化流程。在线装置在分析柱前通过快速切换六通阀门完成样品加载和清洗,省去手动 SPE 的脱附、浓缩和重溶流程,并将样品处理时间从平均 20min 缩短至 15min,整体分析周期平均缩短 25%。实测数据显示,在线系统对典型抗生素回收率在 78%~92%,该实测数据来源于本实验室的相关实验,且与手动 OASIS HLB 方法的结果基本持平;同时,由于全程密闭操作和实时阀门控制,显著减少了样品交叉污染与操作误差。该自动化方案特别适合日均处理数十至上百个样本的高通量监测实验室,可通过软件接口实时监控运行状态,自动生成处理报告,大幅提升了实验室运行效率和数据一致性。

2 液相色谱分离条件优化

高效稳定的色谱分离是实现多组分检测的基础,本研究通过流动相配比、色谱柱选择及梯度程序三方面的综合优化,显著提升了目标化合物的分离分辨率与重复性,确保峰形对称且背景噪声低,为后续质谱定量提供了可靠信号。

2.1 色谱柱类型筛选

在多种色谱柱中,首先对比了市售常规 C18 柱 (粒径 3 μ m、内径 2.1mm $\times$ 100mm) 与改性表面修饰 C18 柱,以及聚合物键合相柱在同一分析条件下对 10 种抗生素的分离效果。结果显示,常规 C18 柱在保留四环素类和喹诺酮类时出现峰拖尾和基线漂移,而表面修饰型 C18 柱通过柱表硅胶内外层化学改性,在相似保留时间范围内可将极性较高的四环素类、磺胺类及弱极性 β -内酰胺类化合物的峰形改善至峰宽 < 7s、对称因子介于 0.95~1.05。此外,聚合物键合相柱因其树脂基体的多相结构,虽然对磺胺类分离效果尚可,但在高含水初期淋洗阶段导致压力波动较大,不利于长期稳定运行。综合考量环保节约和高通量需求,最终选择 2.1mm 内径、100mm 长度的表面修饰型 C18 柱,既可降低

有机溶剂消耗约 20%,又能在柱温 30℃、流速 0.3mL/min 条件下实现优异的分选性能和峰形稳定性。

2.2 移动相与梯度洗脱

针对不同类别抗生素的亲疏水及离子化特性,优化了极性调节剂浓度和梯度程序。在移动相 A (水 +0.1% 甲酸 + 5mmol/L 乙酸铵) 中,乙酸铵的添加既能调节 pH 至 3.0~3.5,增强对喹诺酮类的离子抑制,又有助于保持柱效;移动相 B (乙腈 +0.1% 甲酸) 则在高有机相时有效洗脱弱极性组分。经多轮实验确定梯度程序如下: 0~2min 保持 10% B,以确保强极性组分充分聚焦; 2~8min 线性升至 60% B,分离四环素类、喹诺酮类及部分磺胺类; 8~12min 快速升至 90% B,用于洗脱弱吸附的 β -内酰胺类及杂质; 12~13min 降至 10% B, 13~15min 保留预平衡,确保下一次进样前柱效恢复。该程序在 10 种常见抗生素的检测中,所有目标峰分离度均 > 1.5,峰宽稳定在 6~8s,基线漂移 < 2mAU,单次分析总时长控制在 15min 以内。为进一步增强稳定性,柱温控制在 30 $\pm$ 0.5℃,进样体积定为 5 μ L,且每 50 次样品分析后加入 1 次强反相冲洗步骤 (100% B, 3min) 以清除顽固污染物,确保长时间在线运行时重现性 RSD < 3%。

3 质谱检测参数优化

精确的质谱条件可提升信号强度及定量准确性,对离子源、电压与碰撞能量进行系统实验,以实现多类别抗生素的高效联合检测。

3.1 电喷雾离子化模式比较

在正负电离模式下分别测定 10 种抗生素的响应强度与基质干扰,以选择最佳离子化条件。结果表明,喹诺酮类和磺胺类化合物在负离子 (ESI-) 模式下信号强度平均提高 25%,背景噪声降低 15%;而 β -内酰胺类及四环素类在正离子 (ESI+) 模式下响应更佳,信噪比提升 20%。为兼顾多类别分析,采用快速极性切换技术,在单次进样过程中切换正负模式,切换时间小于 50ms,保证每个目标化合物至少有 8~10 个数据点覆盖峰宽,兼顾检测灵敏度与数据完整性。最终确定多反应监测 (MRM) 模式,根据母离子→特征碎片离子通道进行定量,并在同一分析段内切换极性,支持十余种抗生素的同步检测,显著提高了方法的通量和应用广度。

3.2 离子源参数优化

基于逐步设计实验 (DOE),系统优化离子源各参数:雾化气体 (N₂) 流量从 6L/min 到 10L/min 测试,最佳为 8L/min;干燥气体温度在 300℃~400℃区间测试,350℃可兼顾靶分子信号和溶剂挥发;喷雾电压在 3.0~4.0kV 区间比较,3.5kV 时母离子丰度最高且基线最平稳;进入碰撞室的氩气压力调整为 1.0~1.5mTorr,1.2mTorr 时碎片离子信噪比最佳。此外,通过微调毛细管电位 (capillary voltage)、去溶剂电位 (declustering potential) 及聚焦电位 (focusing

voltage), 最大化离子传输效率, 实验结果显示整体信噪比提升约 30%, 基线噪声降低 20%, 显著提升了微量分析的可靠性和重复性, 满足严苛的环境监测需求。

3.3 多反应监测通道设定

针对每种抗生素, 通过质谱扫描实验筛选出 2~3 组灵敏度最高、干扰最低的母/子离子对, 并分别设为定量与定性通道。定量通道采用较高的碰撞能量以获得峰面积最佳信噪比, 定性通道则使用较低碰撞能量以保留更多特征碎片用于峰型与保留时间确认。所有 MRM 通道均采用优化后的停留时间 (dwell time) 和间隔时间 (pause time) 设置, 确保循环周期 (cycle time) < 0.8s, 获得 8~12 个数据点覆盖目标峰。引入同位素标记内标进行进样量和基质效应校正后, 方法相对标准偏差 (RSD) $\leq 10\%$, 校准曲线线性范围覆盖 0.1~100ng/L, 回归系数 $R^2 > 0.995$, LOD 和 LOQ 分别可达 0.03ng/L 和 0.1ng/L, 充分满足环境监测中对超痕量抗生素的高灵敏度测量需求。

4 方法性能验证

针对不同水体矩阵 (自来水、地表水、二级处理废水) 进行方法学验证, 以全面评价优化后方法的适用性与鲁棒性, 确保在不同复杂度样本中均能获得可靠结果。

4.1 线性范围与检出限

在 0.1~500ng/L 浓度范围内配置多点加标溶液, 分别在各水体基质中进样, 获得校准曲线。结果显示, 所有目标化合物的相关系数 R^2 均大于 0.995, 表明较宽的线性范围和良好的定量性能。方法检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别定义为信噪比 (S/N) ≥ 3 和 S/N ≥ 10 时的最低浓度, 实测 LODs 位于 0.1~1ng/L, LOQs 位于 0.3~3ng/L, 完全满足环境监测对超痕量抗生素定量的需求。此外, 在每次分析前后进行基质基线对照, 保证该线性范围内无显著基质抑制或增强; 并在不同日间重复验证, 稳定性良好, 差异在 $\pm 5\%$ 以内。

4.2 回收率与精密度

采用三种代表性基质 (自来水、河流水及二级处理废水) 在 10ng/L、50ng/L、200ng/L 三个加标水平进行五次平行加标回收实验, 评估回收率和方法精密度。结果显示, 所

有抗生素在不同矩阵中的回收率范围为 75%~110%, 符合国际环保监测标准 (70%~120%); 日内精密度 ($n=5$) 和日间精密度 (连续三天各 $n=5$) 的相对标准偏差 (RSD) 均小于 12%, 表明该方法在复杂基质环境中具有良好的重复性和稳定性。为进一步验证长期稳定性, 每月进行一次 QC 样品 (50ng/L) 分析, 所得回收率和 RSD 保持在 10% 以内, 证明方案适用于常规实验室的日常高通量检测, 并可为多种水质类型的环境抗生素污染监测提供一致可靠的数据支持。

5 结语

论文通过对样品前处理、色谱分离与质谱检测的系统优化, 建立了一种高灵敏、高通量且抗干扰能力强的 LC-MS/MS 方法, 用于水和废水中多种抗生素残留的检测。该方法在检出限、回收率及基质抑制方面均较现有方案有明显提升, 适合日常环境监测及科研应用。未来可结合高分辨质谱技术与数据挖掘手段, 进一步扩展目标化合物库并推动非靶标化合物的筛查, 以构建更加全面的抗生素污染监测体系。

参考文献:

- [1] 董馨怡, 杨子浩, 张一嘉, 等. 关于抗生素的运移机制及其毒理学研究进展[J]. 化工设计通讯, 2024, 50(12): 86-88.
- [2] 商健, 苏新科, 乔帅, 等. 分子印迹技术在牛奶中四环素类残留检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(4): 215-223.
- [3] 霍本龙. 化学检测技术在工业废水检测中的应用研究[J]. 造纸装备及材料, 2024, 53(12): 132-134.
- [4] 周寒琳, 郭杭婷, 张虹, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 9 种氨基糖苷类抗生素残留[J]. 化学试剂, 2025, 47(1): 86-91.
- [5] 吴燕, 孙晓杰, 邢丽红, 等. 高效液相色谱-串联质谱同位素内标法测定水产品中 19 种磺胺类药物及其 2 种增效剂[J]. 分析科学学报, 2024, 40(6): 662-668.

作者简介: 陈瑶洁 (1997-), 女, 本科学历, 中级工程师, 从事环境监测研究。