

## 研究报告

固相萃取-色谱测定水、沉积物及土壤中  
氯霉素和3种四环素类抗生素刘虹<sup>\*1,2</sup> 张国平<sup>1</sup> 刘丛强<sup>1</sup><sup>1</sup>(中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)<sup>2</sup>(中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** 建立了固相萃取-高效液相色谱(UV)检测水、沉积物和土壤中的氯霉素、土霉素、四环素和金霉素4种抗生素的方法。水样、土壤和沉积物样品的前处理采用EDTA-McIlvaine缓冲溶液提取,用SAX-HLB串联小柱纯化和富集,用丙酮(含10%甲醇)洗脱进一步减小天然有机质的影响。采用乙腈和0.01 mol/L草酸溶液作为流动相,8 min内分离4种抗生素。测定了贵阳市阿哈湖、南明河和乌江渡水库的水样及沉积物,均有抗生素检出。

**关键词** 固相萃取, 高效液相色谱, 氯霉素, 四环素类, 抗生素

## 1 引言

从20世纪60年代,抗生素开始用作畜禽饲料添加剂<sup>[1]</sup>。近年来随着养殖业的迅速发展,为了治疗、预防动物疾病和促进其机体生长,饲养者盲目地使用抗生素。过量的抗生素进入环境中,会形成持续性的污染<sup>[2]</sup>,导致病菌耐药性的产生。这不仅影响到养殖业的生产,更威胁着人类的健康与生存环境。分属于氯霉素类的氯霉素(CAP),以及分属于四环素类的土霉素(OTC)、四环素(TC)和金霉素(CTC)是养殖业常用的抗生素类药物。以前的研究大多关注的是这些药物在食品中的残留<sup>[3,4]</sup>。从20世纪90年代,国际上开始关注其在地表环境(水、沉积物和土壤)中的行为,如四环素类在水体中的残留<sup>[5]</sup>,磺胺类药物在土壤中的残留和迁移<sup>[6]</sup>,以及四环素类、大环内酯类和磺胺类药物在土壤中的残留<sup>[7]</sup>等,但对环境中氯霉素残留的研究却较少。由于氯霉素和四环素类抗生素在养殖业中被广泛使用,因此建立同时测定环境中两类抗生素的方法是亟待解决的问题。

环境中抗生素的前处理最常用的是固相萃取法(SPE)<sup>[5,8,9]</sup>,但单一萃取柱的固相萃取法不能完全去除天然有机质(如腐殖酸)<sup>[10]</sup>,从而影响了色谱分离的效果。针对这些问题,本实验采用SAX-HLB联用-丙酮(含10%甲醇)洗脱的前处理方法,并采用等度淋洗的高效液相色谱法测定氯霉素和3种四环素。结果表明,SAX和丙酮(含10%甲醇)的使用有效地减少了水、沉积物和土壤中有机杂质的影响。采用乙腈和0.01 mol/L草酸溶液作为流动相等度洗脱,8 min内简捷快速地分离4种抗生素。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Agilent HP1100 高效液相色谱仪(紫外检测器);KS-2 康氏振荡器(上海浦东物理光学仪器厂);OASIS HLB 固相萃取柱(3 mL/60 mg, Waters公司);强阴离子交换柱(SAX)(3 mL/500 mg, Agilent公司);0.7 μm GF/F 玻璃纤维滤膜(Whatman公司)。

氯霉素、土霉素、四环素和金霉素均为Fluka公司产品;甲醇、乙腈均为色谱纯(美国Dikma公司);

2006-07-03 收稿;2006-10-07 接受

本文系中国科学院创新团队国际合作伙伴计划和中国科学院重要方向项目(No. KZCX3-SW-140)资助

\* E-mail: liu\_hong@mails.gucas.ac.cn

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、柠檬酸、 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、 $\text{NaOH}$  为分析纯;草酸为优级纯;超纯水(18.2 M $\Omega$  cm, Millipore)。

## 2.2 标准溶液及缓冲溶液的配制

准确称取 0.01 g 的 CAP、OTC、TC 和 CTC 标准品,加入少量甲醇溶解,然后转移到 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释到刻度,配制成 100 mg/L 的标准储备液,保存在 4℃ 冰箱中(不超过 3 个月)。

称取一定量的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和柠檬酸,分别配制成 0.1、0.2 和 0.4 mol/L 的溶液。按照 3:2 的比例混合  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和柠檬酸,配制成 McIlvaine 溶液。将 0.1 mol/L EDTA 溶液与 McIlvaine 缓冲溶液按照 1:1 的比例混合,配制成 EDTA-McIlvaine 提取液(混合后 pH 值约为 4)。

## 2.3 水样的前处理

取 500 mL 水样,加入 50 mL EDTA-McIlvaine 缓冲溶液,混匀,静置片刻后用玻璃纤维滤膜过滤,再通过 SAX-HLB 串联小柱<sup>[10,11]</sup>(SAX 和 HLB 均用 2 mL 丙酮,2 mL 甲醇,2 mL 超纯水预处理)。萃取完成后,移去 SAX 柱,用 2 mL 15% 的甲醇冲洗 HLB 柱(以去除部分有机杂质),再用 3 mL 丙酮(含 10% 甲醇)洗脱抗生素。洗脱液装于 4 mL 棕色样品瓶中。洗脱液经高纯 Ar 气吹干后,再用 250  $\mu\text{L}$  甲醇定容,密封冷藏于 4℃ 待测。

## 2.4 沉积物和土壤的前处理

将沉积物或土壤样品冷冻干燥后碎至 0.30 mm 粒径,称取 4 g 放入锥形瓶中,加入 20 mL EDTA-McIlvaine 缓冲溶液,振荡 30 min,取上层提取液。反复提取 3 次后,合并 3 次提取液,并用玻璃纤维滤膜过滤。其余步骤同上。

## 2.5 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS (200 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:0.01 mol/L 的草酸水溶液和乙腈(60:40, V/V);流速:1.0 mL/min;进样环体积:20  $\mu\text{L}$ ;柱温:25℃;检测波长:278 nm。

# 3 结果与讨论

## 3.1 提取液的选择

四环素类抗生素(TCs)的吸附性很强,而且易与金属离子螯合<sup>[11,12]</sup>,而氯霉素的吸附性比 TCs 弱<sup>[13]</sup>。因此在提取时,首先考虑适合 TCs 的提取液。

EDTA-McIlvaine 缓冲溶液作为 TCs 的提取液,在食品和环境样品中都有应用<sup>[11,12,14]</sup>,但 McIlvaine 溶液的 pH 值却不尽相同。根据 TCs 的性质可以看出,酸性溶液比较适合对 TCs 的萃取,但是当 pH < 2 时,TCs 容易分解<sup>[12]</sup>。经过实验比较,本实验选择了 pH 4 的 McIlvaine 缓冲液与 0.1 mol/L EDTA 缓冲液混合作为 TCs 的提取液。实验结果证明 EDTA-McIlvaine 对于 CAP 的萃取效果同样很好。因此本实验选择 EDTA-McIlvaine(pH 4)缓冲溶液同时萃取 TCs 和 CAP。

## 3.2 干扰的去除

在水、沉积物和土壤中,天然有机质(主要为腐殖酸)含量常常很高,对 HPLC 检测有很大的影响。处理样品时,如果只用 HLB 小柱纯化和富集,HLB 小柱在吸附抗生素的同时也会吸附大量的有机质。在用甲醇洗脱时,由于甲醇的洗脱性很强,在完全洗脱抗生素的同时,也会洗脱大量的其它有机物,导致色谱分离时,有机质的峰很高,并形成拖尾,对 CAP 的影响很大。于是采用两个步骤消除有机质的干扰:(1)在 HLB 柱之前串联 SAX 柱。在酸性的 EDTA-McIlvaine 提取液中,腐殖酸类有机质都以阴离子形式存在,在通过 SAX 柱时可以被去除<sup>[10]</sup>,而抗生素可以通过 SAX 柱;(2)用丙酮(含 10% 的甲醇)洗脱抗生素。甲醇是常用的洗脱液<sup>[2,11]</sup>,其洗脱性强是因为极性高。丙酮的极性比甲醇弱,对腐殖酸的溶解性也较小<sup>[15]</sup>,代替甲醇作为洗脱液可以减少大部分有机质的洗脱。考虑到纯丙酮不能完全洗脱 HLB 柱上的抗生素,因此在丙酮中加入适量甲醇混合使用,以期能结合二者优点。经过实验证明甲醇和丙酮的比例为 1:9(V/V)时,可以完全洗脱 HLB 柱上的抗生素,同时也能有效地减少对有机质的洗脱,取得良好的效果。

为了证明 SAX 柱和丙酮作为洗脱液的效果,将相同的加标沉积物分为等量的 S1、S2 和 S3 三组,用

EDTA-McIlvaine 缓冲溶液提取后分别采用3种纯化富集的方法,即:HLB-甲醇洗脱、SAX-HLB 串联-甲醇洗脱和SAX-HLB串联-丙酮(含10%的甲醇)洗脱。在HPLC检测时,S2的有机质峰高比S1的有机质峰高减小50%,但抗生素的出峰无明显变化;S3比S2有机质峰高降低30%,抗生素的出峰无明显变化。以上实验结果说明,使用SAX和丙酮(含10%的甲醇),既可以减少有机质的影响,又不会影响回收率(表1)。因此,本实验选择SAX-HLB联用纯化富集-丙酮(含10%甲醇)洗脱作为沉积物、土壤中抗生素检测的前处理方法。

3.3 色谱条件的选择

TCs的结构使其能够和金属离子螯合,导致在色谱分离时的峰形会形成明显的拖尾。在流动相中添加草酸溶液能够很好地消除拖尾现象<sup>[16]</sup>。实验证明当草酸的浓度为0.01 mol/L,草酸和乙腈比例为60:40(V/V)时,不仅TCs出峰尖锐无拖尾,而且CAP的出峰同样良好(图1为超纯水配制的1 mg/L的标准溶液色谱图,用河水和湖水配制的标准溶液分离效果没有差别)。因此选择乙腈和0.01 mol/L的草酸溶液作为流动相。

TCs的紫外检测波长一般在250~400 nm之间<sup>[13]</sup>,因此在此区间选择TCs和CAP共同的最优检测波长。选择254、270、300、340和355 nm进行比较,结果证明,当检测波长超过300 nm以后,CAP的峰很低,而在270 nm时4种抗生素的峰都很高。在260~280 nm的范围内进一步实验比较,最后选择278 nm为4种抗生素的共同检测波长。

3.4 线性、重现性、检出限和回收率

标准的线性、重现性、检出限和加标样品的回收率结果见表2和表3。

将标准储备液用超纯水稀释,配制成0.2、0.5、1、2.5、10和25 mg/L的混合标准系列溶液,得标准系列的相关系数(*r*)为0.9987~0.9999,重现性好于1.7%。以3倍信噪比求得CAP、OTC、TC和CTC的检测限分别为23、18、20和32 μg/L。

在空白河水、沉积物和土壤(3种基质经

表3 抗生素的标准加入的回收率(%)

Table 3 Recovery of antibiotics in water and sediment (%)

| 样品 Sample (%) | 加入量 Added (mg/L) | 回收率 Recovery (%) |     |    |     | 样品 Sample (%) | 加入量 Added (mg/L) | 回收率 Recovery (%) |     |    |     |
|---------------|------------------|------------------|-----|----|-----|---------------|------------------|------------------|-----|----|-----|
|               |                  | CAP              | OTC | TC | CTC |               |                  | CAP              | OTC | TC | CTC |
| 水 Water       | 0.2              | 85               | 79  | 85 | 88  | 沉积物 Sediment  | 0.2              | 47               | 46  | 54 | 36  |
|               | 1.0              | 93               | 89  | 98 | 97  |               | 1.0              | 79               | 54  | 42 | 49  |
|               | 5.0              | 94               | 60  | 80 | 98  |               | 5.0              | 83               | 46  | 62 | 47  |

表1 3种前处理方法的回收率(%)

Table 1 Recoveries of three pretreatment methods (%)

|  | CAP | OTC | TC | CTC |
|--|-----|-----|----|-----|
| HLB-甲醇 Methanol                                    | 68  | 51  | 42 | 35  |
| SAX-HLB-甲醇 Methanol                                | 67  | 53  | 43 | 36  |
| SAX-HLB-丙酮 Acetone (含10%甲醇 including 10% methanol) | 64  | 58  | 48 | 36  |

HLB: hydrophilic-liphophilic balance; SAX: strong anion exchanger; CAP: chloroamphenicol; OTC: oxytetracycline; TC: tetracycline; CTC: chlortetracycline.

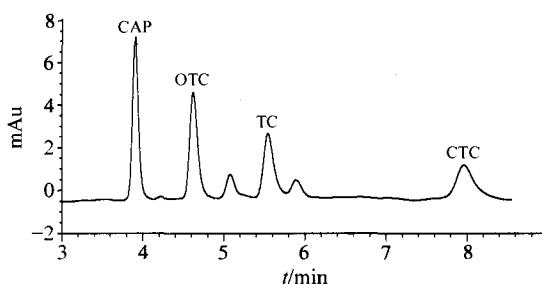


图1 4种抗生素的HPLC分离图(1 mg/L标准,去离子水配制)

Fig. 1 HPLC separation of four antibiotics (1 mg/L standard in water)

表2 线性、重现性和检出限

Table 2 Linearity, repeatability and detection limits

|   | CAP    | OTC    | TC     | CTC    |
|---|--------|--------|--------|--------|
| 线性相关系数 Linearity Correlation coefficient ( <i>r</i> ) | 0.9994 | 0.9995 | 0.9987 | 0.9999 |
| 重现性 Repeatability (%)                                 | 1.7    | 1.6    | 1.3    | 0.9    |
| 检出限 Detection limits (μg/L)                           | 23     | 18     | 20     | 32     |

实验证明不含抗生素)中添加标准溶液,采用前述方法富集测定,求出回收率。结果表明:(1)同一种抗生素在不同的介质中回收率不同。这是因为不同介质中抗生素的吸附性不同,进而导致回收率的差异。

可以看出,对于同一种抗生素,水样的回收率最高,土壤其次,而沉积物最低。文献[2,10,11]报道,OTC、TC 和 CTC 在地表水中的回收率为 76%~99%、86%~98% 和 87%~90%,在土壤中的回收率为 27%~85%、33%~41% 和 57%~76% (沉积物尚缺乏 TCs 的结果,而 CAP 无对比结果),与本实验结果基本处于相同范围;(2)不同的抗生素在同一介质中回收率不同。由于 TCs 的吸附性比 CAP 强,因此 TCs 的回收率比 CAP 低。

### 3.5 实际样品中的应用

在贵阳市的阿哈湖水库、乌江渡水库和南明河采集水样、沉积物。

阿哈湖是贵阳市饮用水源(但过去养鱼网箱较多,为了保证水质,到采样时已全部拆除)。在岸边的钓鱼场附近采集水样 2 个(阿哈湖 1、2),在湖心采集水样 1 个(阿哈湖 3);乌江渡水库位于乌江中上游,沿两岸分布很多养鱼网箱。从上游往下的养鱼区分别采集水样 2 个(乌江渡 1、2)、沉积物 2 个(乌江渡 3、4),在远离养鱼区的下游约 1500 m 处(靠近大坝)采集沉积物 1 个(乌江渡 5)。南明河是贯穿贵阳市的一条河流,在流经贵阳城区后有南北两个排污口排出的城市污水汇入。在两个排污口分别采集水样(南北排污口),于排污口上游约 200 m 处采集水样(南明河)以作对比。

采用上述方法,对样品进行测定,结果如表 4 所示。结果表明:(1)阿哈湖的养鱼网箱虽然已经拆除,但是水中仍有抗生素的检出;(2)乌江渡水库养鱼区的水样中的抗生素含量并不高,其原因可能是水流动性大。沉积物中的抗生素含量较高,在养鱼区下游 1500 m 处的沉积物中的抗生素含量也较高,说明抗生素具有一定的迁移性;(3)贵阳市南明河排污口上游抗生素含量少。城市的污水中的抗生素含量明显高于上游,说明城市污水是抗生素的重要来源。

表 4 实际样品测定结果

Table 4 Analytical results of real samples

| 样品 Sample            | CAP  | OTC | TC  | CTC   |
|----------------------|------|-----|-----|-------|
| 阿哈湖水 Aha lake 1      | 0.6  | 0.6 | 0.7 | 0.9   |
| 阿哈湖水 Aha lake 2      | 0.7  | 0.5 | 0.4 | 0.6   |
| 阿哈湖水 Aha lake 3      | 0.8  | 0.6 | 1.1 | 0.5   |
| 水 Water (μg/L)       |      |     |     |       |
| 南明河 Nanming river    | 0.2  | 0.3 | 1.4 | N. D. |
| 南污水口 South sewage    | 4.3  | 5   | 4.4 | 2.2   |
| 北污水口 North sewage    | 1.8  | 8   | 10  | 3.4   |
| 乌江渡 Wujiangdu 1      | 0.2  | 0.2 | 0.4 | 0.6   |
| 乌江渡 Wujiangdu 2      | 0.24 | 0.2 | 0.3 | N. D. |
| 沉积物 Sediment (μg/kg) |      |     |     |       |
| 乌江渡 Wujiangdu 3      | 37   | 156 | 113 | 90    |
| 乌江渡 Wujiangdu 4      | 18   | 119 | 84  | 42    |
| 乌江渡 Wujiangdu 5      | 5.2  | 21  | 248 | 73    |

N. D. 表示未检出(not detectable)。

### References

- Ji Cheng(计成), Guo Ju'en(郭巨恩), Yang Ying(杨瑛), Liu Jinhua(刘金华). *Review of China Agricultural Technology*(中国农业科技导报), **2001**, 3(1): 55~58
- Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 1509~1518
- Yue Zhenfeng(岳振峰), Qiu Yueming(邱月明), Lin Xiuyun(林秀云), Ji Caini(吉彩霓). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2006**, 34(9): 1255~1259
- Schenck F J, Callery P C. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 812: 99~109
- Revert S, Borrull F, Plcurull E, Marc R M. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1010: 225~232
- Boxall A B A, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J. *Toxicology Letters*, **2002**, 131: 19~28
- Jacobsen A M, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, Hansen S H. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1038: 157~170
- Yang S, Carlson K H. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1038: 141~155
- Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, Thurman E M, Zaugg S D, Barber L B, Buxton H T. *Environment Science & Technology*, **2002**, 36: 1202~1211
- Blackwell P, Lützhøft H C H, Ma H P, Halling-Sørensen B, Boxall A B A, Kay P. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045: 111~117
- Blackwell P, Lützhøft H C H, Ma H P, Halling-Sørensen B, Boxall A B A, Kay P. *Talanta*, **2004**, 64: 1058~1064
- Oka H, Ito Y, Matsumoto H. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 882: 109~133
- Tolls J. *Environment Science & Technology*, **2001**, 35: 3397~3406
- Kay P, Blackwell P A, Boxall A B A. *Environment Pollution*, **2005**, 134: 333~341

15 Li N, Lee H K. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 3077 ~ 3084

16 Stolker A A M, Brinkman U A T. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1067: 109 ~ 133

## Determination of Chloramphenicol and Three Tetracyclines by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection

Liu Hong<sup>\*1,2</sup>, Zhang Guo-Ping<sup>1</sup>, Liu Cong-Qiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry,  
Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002)

<sup>2</sup>(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

**Abstract** A method for determination of chloramphenicol, oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in water, sediment and soil, using solid phase extraction with high performance liquid chromatography-UV detection was developed. The four antibiotics in water, sediment and soil were extracted using a mixture of EDTA and McIlvaine buffer (citric acid and sodium orthophosphate), then cleaned-up and pre-concentrated by a tandem method using strong anion exchanger (SAX) cartridge and hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridge and then eluted by acetone (including 10% methanol) to depress the interference of nature organic compounds. Using acetonitrile and 0.01 mol/L oxalic acid as the mobile phase, the four antibiotics were separated within 8 min. This method was applied to the analysis of antibiotics in lake water, river water and lake sediment.

**Keywords** Solid phase extraction, high performance liquid chromatography, chloramphenicol, tetracyclines, antibiotics

(Received 3 July 2006; accepted 7 October 2006)

### 《蛋白折叠液相色谱法》

该书是第一部全面和系统地论述采用液相色谱对变性蛋白折叠并同时复性的专著。其内容涉及蛋白折叠液相色谱的原理、方法、设备、典型实验及其在化学、化工、生物化学、分子生物学、基因工程及生物制药等方面的应用。除了对蛋白的分子结构及用于变性蛋白折叠的一般方法进行简要介绍外,该书主要论述将液相色谱用于变性蛋白折叠、分子构象变化及其工业化中所遇到的新理论、新方法、新设备和新技术。该书可供化学化工、生物化学、生物分子学、基因工程及生物制药等领域科研人员、工程师参考,也可作为大专院校相关专业教师和研究生用书。

该书由西北大学耿信笃、白泉、王超展著,科学出版社出版。