

河水中兽药多残留分析时亲水亲脂平衡柱的 基质效应和保留效果

林姗姗, 易启同, 洪家俊, 陈 猛*, 袁东星

(福建省海陆界面生态环境重点实验室, 厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 基质效应是液相色谱-质谱联用(LC-MS)定量分析中的重要干扰因素。以反渗透水为空白对照进行LC-MS/MS检测,在500倍浓缩条件下考察了33种兽药分别经Waters、Supelco和CNW等3种亲水亲脂平衡(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)固相萃取柱富集后的基质效应及其保留效果。结果表明,以反渗透水为基质时3种HLB柱均表现出外源性基质效应,对大部分喹诺酮类和四环素类兽药呈现促进效应,有两种HLB柱对雌激素类兽药等呈现抑制效应,对磺胺类兽药的基质效应不显著,有一种HLB柱对氯霉素类兽药呈现抑制效应;以河水为基质时,由于外源性杂质与内源性杂质共同作用,对大部分喹诺酮类和四环素类兽药呈现促进效应,对氯霉素类和雌激素类兽药呈现抑制效应,对磺胺类兽药基质效应不显著。与外标法相比较,基质匹配标准校正法可有效消除基质效应对检测结果的影响。在50 ng/L和200 ng/L两个加标水平下,Waters、Supelco和CNW 3种HLB柱对河水中33种目标兽药的校正后的回收率分别为40.3%~146.0%、37.8%~104.2%和52.9%~150.1%;RSD($n=4$)为0.2%~14.6%。相同实验条件下3种HLB柱的外源性基质效应不容忽视。而采用基质匹配标准校正法克服目标物基质效应,保留效果无显著差异,富集效果良好,为河水样品中兽药多残留分析方法中固相萃取柱的选择提供了科学依据。

关键词: 亲水亲脂平衡柱;液相色谱-质谱;兽药;河水;基质效应;保留效果

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)10-0980-09

Matrix effect and retention efficiency of hydrophilic-lipophilic balance cartridges in multi-residual determination of veterinary drugs in river water

LIN Shanshan, YI Qitong, HONG Jiajun, CHEN Meng*, YUAN Dongxing

(Fujian Provincial Key Laboratory for Coastal Ecology and Environmental Studies, College of the
Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Matrix effect is an important interfering factor in LC-MS quantitative analysis. In this paper, matrix effects and retention efficiencies of 33 veterinary drugs spiked in river water were studied on hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridges of 3 brands (Waters, Supelco, and CNW), using LC-MS/MS for detection and reverse osmosis (RO) water as the control under 500-fold concentration. In RO water, only the exogenous matrix effects were observed on three brands of HLB cartridges. Most quinolones and tetracyclines showed positive matrix effects. Estrogens showed negative matrix effects on two brands of HLB cartridges. Sulfonamides were not obviously affected by matrix effects. Chloramphenicols showed negative matrix effects on one brand of HLB cartridge. In river water, matrix effects were different from those of the RO water due to the combined exogenous and endogenous interfering substances. Sulfonamides showed slight matrix effects as those in RO water. Most quinolones and tetracyclines showed positive matrix effects. Chloramphenicols and estrogens showed negative matrix effects. Compared to the external standard method, matrix matched calibration method effectively overcame the matrix effects with better quantitative results. The recoveries of 33 target veterinary drugs spiked in river water at 50 ng/L and 200 ng/L levels were in the ranges of 40.3%–146.0% (Waters), 37.8%–104.2% (Supelco),

* 通讯联系人. Tel: (0592) 2183127, E-mail: mengchen@xmu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2012J01048); 中国科学院城市环境研究所开放基金项目(KLUEH201009).

收稿日期: 2013-04-24

and 52.9%–150.1% (CNW) with RSDs ($n = 4$) of 0.2%–14.6%. The results indicated that there was no significant difference in the retention efficiency between the 3 HLB cartridges with the matrix matched calibration method. This study provided supporting data for the HLB cartridge selection in multi-residual determination of the veterinary drugs in river water samples.

Key words: hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridges; liquid chromatography-mass spectrometry; veterinary drug; river water; matrix effect; retention efficiency

随着禽畜和水产养殖业的发展,各种兽药被大量使用,其中相当一部分通过直接投药、地表冲刷和废水排放等多种途径进入水体,影响环境健康和生态安全。在环境水体中兽药多残留的同时分析方法中,固相萃取(solid phase extraction, SPE)由于具有富集能力强、净化效果好、简单快速、重现性好、有机溶剂用量少、易于批量处理等优点而被广泛应用^[1-3]。目前应用较多的主要有 C18 柱^[4]、亲水亲脂平衡(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)柱^[1,5]、离子交换柱^[2]及混合相固相萃取柱^[6]等。由于兽药普遍极性较强,C18 柱、离子交换柱和混合相固相萃取柱在同时富集水中多种类兽药时均表现出一定的局限性。相比之下,HLB 柱以同时具有亲水性与亲脂性基团的 *N*-乙烯基吡咯烷酮-二乙烯基苯共聚物为填料,可以保留多种极性差异较大的化合物,因而得到广泛应用^[7,8]。已有研究中,高立红等^[9]、孙广大等^[10]和 Reverte 等^[5]采用 Waters 公司生产的 HLB 柱对河水的多种类兽药进行了富集,回收率符合分析要求,并有效应用于实际检测中;洪蕾洁等^[11]则采用上海安谱公司生产的 CNW HLB 柱对河水中的 10 种磺胺类兽药进行富集,回收率符合要求,实际检测效果良好;黄群腾等^[12]采用 Waters 公司生产的 HLB 柱对河水中 3 种酰胺醇类抗生素进行分析测定,回收率符合要求,并成功应用于九龙江下游河水的检测;杨常青等^[13]对比了 HLB、C18、WCX 柱对 16 种抗生素的富集效果,发现 HLB 柱的富集效果最好。这表明 HLB 柱对于中强极性的兽药具有良好的富集效率,在兽药检测方法研发过程中较为适用。目前常用的市售 HLB 柱品牌主要有美国 Waters 公司生产的 Oasis HLB、美国 Supelco 公司生产的 Supel-Select HLB 和上海安谱公司生产的 CNW Poly-Sery HLB。

在使用液相色谱-串联质谱联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术进行兽药多残留检测^[14,15]时,SPE 柱填料和样品基质带来的内源性和外源性干扰物质可能使目标物被

电离的能力受到抑制或促进从而产生基质效应^[16]。同时,SPE 填料对目标物的富集程度及目标物被洗脱的程度即保留效果也值得关注。文献调研发现,HLB 柱在当今环境和食品分析方法前处理中的应用日益广泛,会有更多新的研究需要进行 HLB 柱的效果评估。本文针对 33 种常见兽药,以反渗透水为空白对照,九龙江上游河水为实际基质,比较了 500 mg 填料规格的美国 Waters 公司 Oasis HLB、美国 Supelco 公司 Supel-Select HLB 和上海安谱公司 CNW Poly-Sery HLB 柱对目标兽药的基质效应和保留效果,为 HLB 柱在水环境中兽药多残留分析的应用和选择提供科学数据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱-串联质谱联用仪:Agilent 1260 液相色谱系统,串联 Agilent 6410 Triple Quad LC-MS/MS(电喷雾电离源,ESI)。色谱柱为 Phenomenex Kinetex C18(100 mm × 3 mm, 2.6 μm)。

PHB-10/e-301 型笔式 pH 计(上海康仪仪器有限公司);YP202N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);溶剂过滤器(天津津腾实验设备有限公司);12 通道固相萃取装置(美国 Supelco 公司);GM-0.33 型真空泵、0.22 μm 亲水性聚偏二氟乙烯(PVDF)针头式过滤器和 0.45 μm 醋酸纤维膜(天津津腾实验设备有限公司);SK-1 型快速混匀器(金坛市富华仪器有限公司)。

SPE 柱:500 mg/6 mL Oasis HLB(美国 Waters 公司);500 mg/12 mL Supel-Select HLB(美国 Supelco 公司);500 mg/6 mL CNW Poly-Sery HLB(上海安谱科学仪器有限公司);主要的理化参数见表 1。

甲酸(美国 Fluka 公司)、乙腈和甲醇(美国 Tedia 公司)均为色谱纯;乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA,上海申博化工有限公司)为分析纯;实验用水为超纯水,取自 Milli-Q 纯水机(美国

表 1 3 种 HLB 柱的理化参数
Table 1 Physical and chemical parameters of the 3 HLB cartridges

HLB column	Sorbent weight/mg	Tube volume/mL	Particle size/ μm	Pore size/nm	Total pore volume/ (cm^3/g)	Surface area/ (m^2/g)	MS friendly	pH range
Waters	500	6	50-65	7.3-8.9	1.18-1.44	727-889	Yes	1-14
Supelco	500	12	55-60	8.7	0.88	400-410	Yes	NA
CNW	500	6	60	18.0	NA	710	NA	1-4

NA: not available.

Millipore 公司); 含 0.1% 甲酸的甲醇-水(1:4, v/v) 溶液为定容溶剂。

目标兽药标准品: 甲砒霉素(纯度 99.7%)、氟甲砒霉素(纯度 97.0%)、氯霉素(纯度 99.0%)、尼卡巴嗪(纯度 99.0%)、雌三醇(纯度 99.0%)、己烯雌酚(纯度 99.00%)、氧氟沙星(纯度 98.0%)、磺胺嘧啶(纯度 99.5%)、磺胺噻唑(纯度 99.5%)、磺胺吡啶(纯度 99.0%)、磺胺二甲基嘧啶(纯度 99.5%)、磺胺对甲氧嘧啶(纯度 98.0%)、磺胺间甲氧嘧啶(纯度 99.0%)、磺胺甲恶唑(纯度 99.0%)、磺胺二甲氧嘧啶(纯度 99.0%)、磺胺氯哒嗪(纯度 99.0%)、磺胺甲噻二唑(纯度 98.5%)、磺胺二甲基异嘧啶(纯度 99.0%)、磺胺醋酰(纯度 99.4%)、四环素(纯度 97.0%)、金霉素(纯度 99.0%)、强力霉素(纯度 98.0%) 购自德国奥格斯堡公司(Dr. Ehrenstorfer GmbH); 结晶紫(纯度 94.4%)、诺氟沙星(纯度 99.0%)、环丙沙星(纯度 99.5%)、恩诺沙星(纯度 99.0%)、达氟沙星(纯度 98.4%)、氟甲喹(纯度 97.8%)、麻保沙星(纯度 99.0%)、磺胺二甲异恶唑(纯度 99.0%)、磺胺邻二甲嘧啶(纯度 99.8%)、己烷雌酚(纯度 99.5%)、双烯雌酚(纯度 98.1%) 购自美国 Sigma 公司。

分别称取各兽药标准品适量,以甲醇为溶剂,配成一定质量浓度的单标准储备液;取各单标准储备液适量,以甲醇为溶剂,配制成 33 种目标兽药的混合标准溶液,置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。

1.2 色谱与质谱条件

1.2.1 色谱条件

柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相流速: $0.25\text{ mL}/\text{min}$; 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

目标物分为 ESI+ (electron spray ionization+, ESI+) 项目和 ESI- 项目两组。ESI+ 项目的流动相为: 含 0.1% 甲酸的超纯水 (A_1) 和含 0.1% 甲酸的乙腈 (B_1); 梯度洗脱程序为: $0\sim 2\text{ min}$, 10% B; $2\sim 10\text{ min}$, 10% B ~ 15% B; $10\sim 12\text{ min}$, 15% B; $12.01\sim 16\text{ min}$, 25% B; $16\sim 24\text{ min}$, 25% B ~ 80% B; $24\sim 26\text{ min}$, 80% B; $26.01\sim 30\text{ min}$, 10% B。ESI- 项目的

流动相为: 超纯水 (A_2) 和乙腈 (B_2); 梯度洗脱程序为: $0\sim 1\text{ min}$, 25% B; $1.01\sim 5\text{ min}$, 45% B; $5\sim 9\text{ min}$, 45% B ~ 80% B; $9\sim 12\text{ min}$, 80% B; $12.01\sim 15\text{ min}$, 25% B。

1.2.2 质谱条件

离子源: ESI; 去溶剂气: 氮气; 辅助加热温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速: $10\text{ L}/\text{min}$; 毛细管电压: 4000 V ; 检测模式: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM); 33 种目标物优化后的质谱参数见表 2。

1.3 样品前处理

前处理方法主要在 EPA 1694^[17] 和本课题组已有研究基础^[18, 19] 上选定。水样分别为反渗透水及河水, 样品经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后待处理。

1.3.1 保留效果研究的前处理

将不同品牌的 HLB 柱接在固相萃取装置上, 依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水活化。在 500 mL 过滤后的反渗透水和河水中分别加入相同浓度的兽药混合标准溶液和 $0.25\text{ g Na}_2\text{EDTA}$, 混匀后以 $4\sim 6\text{ mL}/\text{min}$ 的速率通过 SPE 柱。富集完毕后以 6 mL 的甲醇-水(5:95, v/v) 进行淋洗, 依次用 8 mL 的甲醇和 4 mL 甲醇-二氯甲烷(1:1, v/v) 进行洗脱。洗脱液于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮吹浓缩至干, 以定容溶剂定容至 1 mL , 涡旋混匀后, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ PVDF 针头式过滤器过滤, 待 LC-MS/MS 检测。

1.3.2 基质效应研究的前处理

取 500 mL 过滤后的反渗透水和河水, 不加标准样品, 按照 1.3.1 节进行 SPE 萃取, 洗脱液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮吹浓缩至干。用与 1.3.1 节中加标浓度相同的混合标准溶液定容至 1 mL , 涡旋混匀后经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ PVDF 针头式过滤器过滤, 待 LC-MS/MS 检测。

2 结果与讨论

2.1 目标兽药的质谱参数优化

以适当浓度的目标物标准溶液进行质谱参数优化。选择合适的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子峰响应, 并选择 2~3 个信号强度适宜的子离子组成监测离子对, 确定其相应的最佳碰撞能, 以 MRM 模

式进行检测。优化后的目标物母离子 (precursor ion , PI)、源内碎裂电压 (fragmentor voltage , FV)、子离子 (product ion , DI)、碰撞能 (collision energy , CE) 等质谱参数及仪器检出限 (instrument detection limit , IDL , 以 $S/N=5$ 计) 见表 2。

2.2 液相色谱条件优化

在流速 0.25 mL/min、进样量 10 μ L 的条件下, 分别用流动相 A₁ 和 B₁ 优化磺胺类、喹诺酮类和四环素类目标兽药的分离; 用流动相 A₂ 和 B₂ 优化氯霉素类、雌激素类等目标兽药的分离。优化后目标兽药分组分析梯度程序见 1.2.1 节, MRM 谱图见图 1。

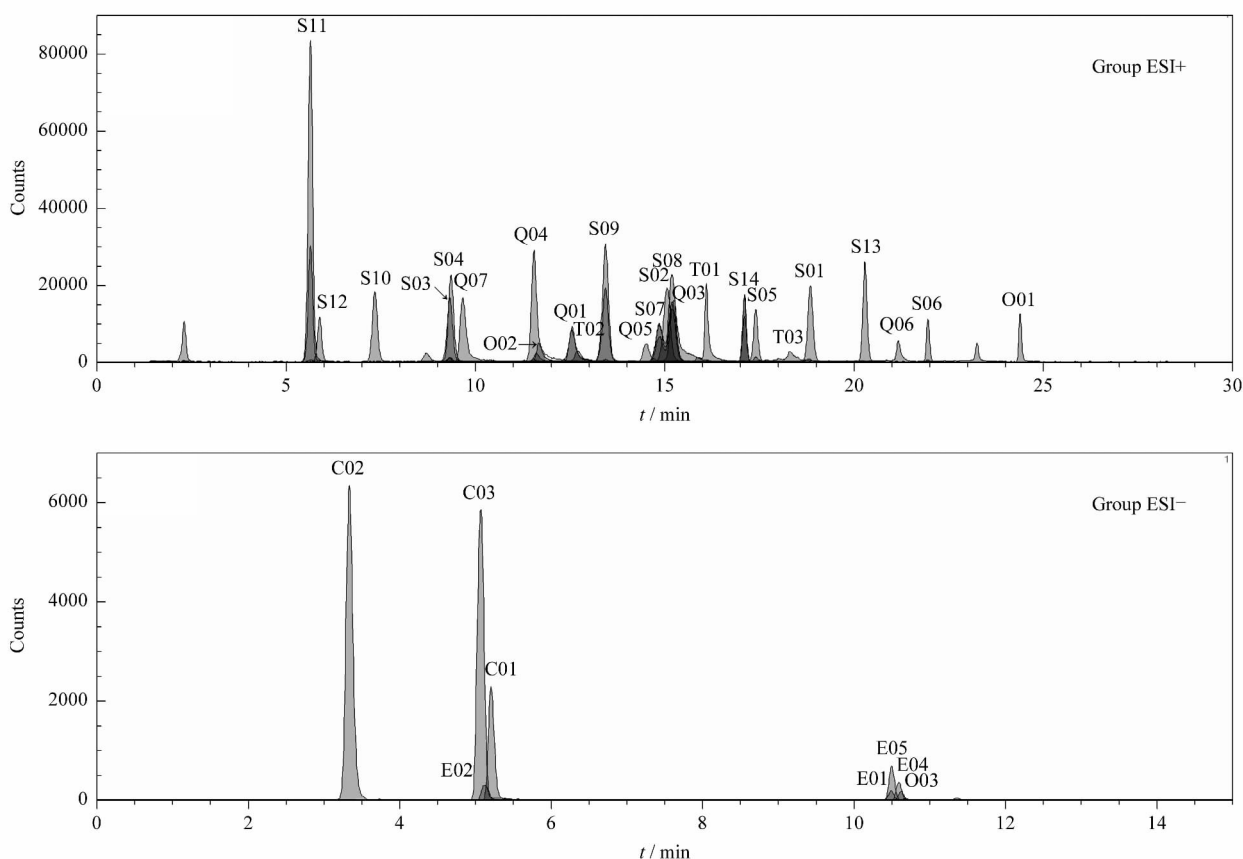


图 1 目标兽药分组分析的 MRM 谱图
 Fig. 1 MRM chromatograms of the grouped target veterinary drugs
 Peaks match the veterinary drugs in Table 2.

表 2 目标兽药的质谱参数、线性范围、相关系数 (r^2) 及仪器检出限
 Table 2 MS parameters, linear ranges, correlation coefficients (r^2) and IDLs of the target veterinary drugs

No.	Veterinary drug	MS parameters				Linear range / (μ g/L)	r^2	IDL / (μ g/L)
		PI (m/z)	DI (m/z)	FV / V	CE / eV			
S01	sulfamethoxazole (磺胺甲恶唑)	254.1	156.1*, 160.1	100	10, 15	0.5 - 100	1.0000	0.5
S02	sulfamethizole (胺甲噻二唑)	271.0	156.0*, 108.1	100	10, 20	0.1 - 100	1.0000	0.1
S03	sulfapyridine (磺胺吡啶)	250.0	156.0*, 184.1	100	10, 15	0.5 - 100	0.9999	0.5
S04	sulfathiazole (磺胺噻唑)	256.0	156.0*, 108.0	100	10, 20	0.5 - 100	1.0000	0.5
S05	sulfamonomethoxine (磺胺氯哒嗪)	285.0	156.0*, 108.0	100	10, 20	0.1 - 100	1.0000	0.1
S06	sulfadimethoxine (磺胺二甲氧嘧啶)	311.1	156.0*, 245.1, 218.0	120	18, 15, 15	0.1 - 100	1.0000	0.1
S07	sulfamer (磺胺间甲氧嘧啶)	281.1	156.0*, 188.0	120	10, 10	0.1 - 20	1.0000	0.1
S08	sulfamonomethoxine (磺胺对甲氧嘧啶)	281.0	156.0*, 215.1	120	15, 15	0.1 - 100	1.0000	0.1
S09	sulfamethazine (磺胺二甲基嘧啶)	279.1	156.0*, 186.0*	120	15, 15	0.5 - 100	1.0000	0.5
S10	sulfadiazine (磺胺嘧啶)	251.0	156.0*, 185.1	100	10, 15	1.0 - 100	1.0000	1.0
S11	sulfaisodimidine (磺胺二甲基异嘧啶)	279.0	124.1*, 186.0	120	20, 10	0.2 - 100	1.0000	0.2
S12	sulfacetamide (磺胺醋酸)	215.0	156.0*, 108.0	80	5, 15	0.5 - 100	1.0000	0.5
S13	sulfisoxazole (磺胺二甲异恶唑)	268.0	156.0*, 113.0	100	10, 10	0.1 - 100	1.0000	0.1
S14	sulfamethoxypridazine (磺胺邻二甲嘧啶)	281.0	156.0*, 126.0, 108.0	120	10, 15, 20	0.5 - 100	1.0000	0.5

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

No.	Veterinary drug	MS parameters				Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	r^2	IDL/ ($\mu\text{g/L}$)
		PI (m/z)	DI (m/z)	FV/ V	CE/ eV			
Q01	ciprofloxacin (环丙沙星)	332.1	314.1*, 288.1	120	15, 15	5.0 – 100	0.9975	5.0
Q02	norfloxacin (诺氟沙星)	320.1	302.1*, 276.1	120	15, 10	5.0 – 100	0.9975	5.0
Q03	enrofloxacin (恩诺沙星)	360.1	342.1*, 316.1	120	15, 15	5.0 – 100	0.9930	5.0
Q04	ofloxacin (氧氟沙星)	362.1	318.1*, 261.0	140	15, 20	0.5 – 100	0.9958	0.5
Q05	danofloxacin (达氟沙星)	358.1	340.0*, 283.1	150	20, 20	5.0 – 100	0.9909	5.0
Q06	flumequine (氟甲喹)	262.0	244.0*, 202.0	100	15, 20	0.2 – 40	0.9996	0.2
Q07	marbofloxacin (麻保沙星)	363.1	345.1*, 320.0	120	15, 20	5.0 – 500	0.9950	5.0
T01	chlortetracycline (金霉素)	479.1	462.1, 444.1*	120	10, 15	5.0 – 100	0.9982	5.0
T02	tetracycline (四环素)	445.1	427.1, 410.0*	120	5, 15	5.0 – 100	0.9980	5.0
T03	doxycycline (强力霉素)	445.1	428.1*, 410.1	120	15, 20	5.0 – 100	0.9983	5.0
C01	chloramphenicol (氯霉素)	-321.1	257.0, 151.0*	120	5, 10	0.5 – 100	0.9999	0.5
C02	thiamphenicol (甲砜霉素)	-354.1	290.0, 185.1*	130	5, 15	0.5 – 500	1.0000	0.2
C03	florfenicol (氟甲砜霉素)	-356.1	336.2, 185.0*	110	10, 12	0.5 – 500	1.0000	0.2
E01	diethylstilbestrol (己烯雌酚)	-267.3	237.1*, 222.1	150	25, 30	5.0 – 100	0.9988	5.0
E02	estriol (雌三醇)	-287.0	170.6*, 144.8	200	34, 34	125 – 25000	1.0000	5.0
E04	hexoestrol (己烷雌酚)	-269.2	119.0, 134.1*	120	20, 5	0.5 – 500	1.0000	0.5
E05	dienoestrol (双烯雌酚)	-265.2	235.3*, 249.2	150	20, 20	0.5 – 500	0.9995	0.5
O01	crystal Violet (结晶紫)	372.2	356.2*, 340.1	200	40, 50	0.008 – 8.0	0.9959	0.008
O03	nicarbazin (尼卡巴嗪)	-301.1	137.0*	80	2	0.1 – 10	0.9998	0.5

IDL: instrument detection limit, $S/N=5$; PI: precursor ion; DI: product ion; FV: fragmentor voltage; CE: collision energy.

* Quantitative ions.

2.3 基质效应考察

在 LC-MS/MS 分析中,由于基质的干扰,目标物被 ESI 电离源电离的能力受到影响,造成目标物信号强度改变的现象称为基质效应(matrix effect, ME)^[20]。基质效应的产生原因主要有:(1)与目标成分共同萃取出的基质成分或者具有高质子亲和力的物质,通过促进或占据电离液滴表面的电位点影响目标物的电离效率,从而导致目标物响应信号增强或者降低^[7, 21];(2)来自流动相或试样中的非挥发组分阻碍液相中形成的目标物离子进入气相,导致目标物信号发生变化^[22];(3)具有较高表面活性的物质提高液滴表面张力,从而抑制目标物的离子化^[23, 24]。根据杂质来源分为外源性杂质和内源性

杂质^[20]。外源性杂质来源于预处理过程中的缓冲溶液、无机离子、有机酸、固相萃取柱等;内源性杂质主要为存在于基质中的各种有机物。基质效应会影响实验结果的重现性和工作曲线的线性,导致定性定量的不准确^[20-25]。

以反渗透水为空白对照,九龙江上游河水为实际基质,按照 1.3 节的样品预处理方法进行处理,用等浓度的标准溶液定容,利用公式(1)计算目标兽药 ME 值:

$$ME = A_p / A_s \times 100\% \quad (1)$$

其中 A_p 为定容样品标准溶液的峰面积, A_s 为相同浓度标准溶液的峰面积。对 33 种目标兽药进行分析,计算所得的 ME 值如表 3 所示。

表 3 3 种品牌 HLB 柱在不同水样中的基质效应($n=4$)
Table 3 Matrix effects of the 3 brands of HLB cartridges to different water samples ($n=4$)

Veterinary drug	ME/% (RSD/%)					
	RO water			River water		
	Waters	Supelco	CNW	Waters	Supelco	CNW
Sulfamethoxazole (磺胺甲恶唑)	100.0 (2.4)	73.3 (3.0)	102.4 (2.7)	89.8 (4.4)	99.1 (4.2)	83.8 (4.2)
Sulfamethizole (胺甲噻二唑)	97.0 (0.4)	95.1 (11.0)	110.0 (1.1)	96.6 (2.6)	97.4 (2.0)	88.1 (2.0)
Sulfapyridine (磺胺吡啶)	101.2 (0.8)	107.3 (7.2)	113.1 (2.0)	86.4 (4.0)	99.7 (2.1)	80.8 (2.1)
Sulfathiazole (磺胺噻唑)	101.0 (3.4)	102.4 (6.3)	102.8 (1.9)	89.0 (7.4)	101.2 (7.2)	80.5 (7.1)
Sulfamonomethoxine (磺胺氯噻唑)	96.9 (7.8)	103.9 (9.0)	106.9 (0.5)	91.3 (2.8)	94.3 (10.6)	94.3 (10.6)
Sulfadimethoxine (磺胺二甲氧噻唑)	94.9 (2.6)	52.4 (1.2)	117.6 (1.2)	94.5 (6.5)	41.8 (5.9)	90.3 (15.9)
Sulfameter (磺胺间甲氧噻唑)	101.4 (3.2)	103.6 (7.0)	102.8 (1.5)	96.9 (10.8)	106.0 (10.3)	90.0 (10.3)
Sulfamonomethoxine (磺胺对甲氧噻唑)	97.0 (3.3)	99.2 (13.0)	104.5 (1.0)	107.6 (2.2)	95.7 (1.3)	103.8 (7.4)
Sulfamethazine (磺胺二甲基噻唑)	101.0 (3.1)	108.5 (8.3)	103.6 (5.1)	93.4 (1.9)	115.1 (7.5)	113.7 (8.4)

表 3 (续)
Table 3 (Continued)

Veterinary drug	ME/% (RSD/%)					
	RO water			River water		
	Waters	Supelco	CNW	Waters	Supelco	CNW
Sulfadiazine (磺胺嘧啶)	102.0 (1.4)	108.1 (1.4)	106.1 (0.1)	102.2 (8.2)	112.0 (7.8)	90.8 (7.8)
Sulfaisodimidine (磺胺二甲异嘧啶)	101.9 (3.8)	108.1 (4.1)	114.9 (2.4)	96.5 (11.2)	102.3 (10.3)	121.0 (10.3)
Sulfacetamide (磺胺醋酰)	96.5 (1.4)	101.4 (1.5)	101.7 (1.9)	77.4 (1.0)	112.2 (1.0)	73.7 (1.0)
Sulfisoxazole (磺胺二甲异恶唑)	98.3 (1.0)	31.8 (3.9)	110.6 (1.2)	77.3 (3.2)	46.1 (2.7)	70.3 (2.7)
Sulfamethoxyppyridazine (磺胺邻二甲嘧啶)	97.0 (3.3)	99.2 (13.0)	109.1 (1.3)	97.1 (2.5)	92.8 (1.8)	90.6 (5.2)
Ciprofloxacin (环丙沙星)	141.8 (5.3)	161.1 (16.1)	149.8 (11.5)	184.6 (1.1)	181.4 (1.5)	187.5 (4.0)
Norfloxacin (诺氟沙星)	199.1 (1.4)	226.3 (4.8)	143.7 (0.2)	195.4 (6.3)	205.5 (6.1)	193.5 (9.4)
Enrofloxacin (恩诺沙星)	112.1 (7.4)	142.5 (12.7)	184.0 (0.9)	158.2 (1.1)	136.5 (3.0)	147.4 (13.9)
Ofloxacin (氧氟沙星)	119.8 (3.0)	148.3 (7.4)	175.0 (2.2)	153.1 (1.1)	131.6 (2.7)	144.6 (6.1)
Danofloxacin (达氟沙星)	122.3 (8.0)	146.6 (8.6)	133.1 (7.0)	203.9 (2.9)	229.6 (7.4)	205.1 (8.5)
Flumequine (氟甲喹)	149.3 (1.4)	163.9 (5.5)	153.8 (3.2)	368.9 (5.7)	240.6 (3.2)	491.4 (7.8)
Marbofloxacin (麻保沙星)	115.9 (0.4)	159.8 (0.5)	153.3 (0.6)	110.6 (6.7)	120.1 (8.2)	83.0 (8.6)
Chlortetracycline (金霉素)	317.1 (3.4)	341.2 (2.4)	133.9 (1.8)	428.0 (0.5)	695.0 (8.1)	699.6 (3.8)
Tetracycline (四环素)	254.2 (6.4)	256.0 (12.4)	122.0 (9.0)	262.4 (1.4)	252.9 (5.0)	266.1 (2.9)
Doxycycline (强力霉素)	299.8 (9.0)	263.4 (4.2)	125.6 (4.5)	253.8 (4.7)	195.1 (7.1)	254.7 (3.1)
Chloramphenicol (氯霉素)	92.0 (0.1)	62.4 (0.9)	117.9 (3.0)	21.2 (5.3)	16.7 (10.1)	30.6 (12.2)
Thiamphenicol (甲砒霉素)	57.2 (4.0)	59.3 (5.1)	52.7 (0.9)	20.2 (9.1)	36.0 (7.5)	21.0 (8.3)
Florfenicol (氟甲砒霉素)	91.6 (0.3)	56.1 (1.6)	107.5 (3.5)	25.7 (2.6)	16.5 (6.0)	30.3 (12.6)
Diethylstilbestrol (己烯雌酚)	60.8 (2.5)	90.7 (1.2)	84.1 (10.4)	67.1 (9.4)	117.1 (6.2)	134.9 (11.7)
Estriol (雌三醇)	71.1 (4.2)	40.5 (8.0)	75.7 (14.5)	56.6 (4.1)	42.6 (7.6)	51.3 (10.8)
Hexoestrol (己烷雌酚)	50.5 (5.9)	69.8 (2.0)	83.5 (8.7)	58.5 (8.1)	39.7 (7.9)	27.3 (7.9)
Dienoestrol (双烯雌酚)	53.7 (1.6)	75.4 (2.1)	83.2 (2.7)	42.2 (9.9)	26.0 (9.7)	21.3 (9.7)
Crystal Violet (结晶紫)	52.8 (8.6)	2158.0 (3.7)	1637.4 (3.2)	82.4 (7.6)	155.6 (6.1)	132.3 (6.1)
Nicarbazin (尼卡巴嗪)	72.2 (6.4)	197.1 (3.6)	203.5 (5.0)	70.2 (5.7)	52.2 (9.5)	41.1 (6.2)

回收率实验时,每一个添加水平的水样经处理后测得的响应值与等浓度混合标准溶液响应值的比值,即为外标法计算所得回收率;同时,每一个添加水平附加一份按照 1.3.2 节的方式处理后的基质匹配混合标准溶液(平行测定两次),同一浓度的加标水样经预处理后测得的响应与基质匹配混合标准溶液响应的百分比,即为基质匹配标准校正法计算所得的回收率。外标法与基质匹配标准校正法分别计算所得回收率如表 4 所示。

基质效应的评价方面,ME 值在 80%~120% 之间时表示基质效应不显著;高于 120% 即呈现基质正效应,目标兽药信号被基质干扰促进;低于 80% 即呈现基质负效应,目标兽药信号被基质干扰抑制。可以看出,所有结果的 RSD 均在 0.1%~16.1% 之间。

14 种磺胺类兽药受到的基质效应干扰最小。Waters HLB 柱对河水中的磺胺醋酰和磺胺二甲异恶唑表现出轻微抑制作用,其他磺胺类兽药在反渗透水和河水中均未表现出基质效应。Supelco HLB 柱对反渗透水和河水中的磺胺二甲氧嘧啶和磺胺二甲异恶唑呈现显著抑制作用,其他均未表现出基质效应。CNW 的 HLB 柱对反渗透水中 14 种磺胺类

兽药均未表现出基质效应,但对河水中的磺胺醋酰和磺胺二甲异恶唑表现出轻微抑制效应,对磺胺二甲嘧啶表现出轻微促进效应。

7 种喹诺酮类兽药受到的基质效应干扰最大。Waters HLB 柱对反渗透水中的环丙沙星、诺氟沙星、氟甲喹表现出显著的促进效应,对河水中除麻保沙星外的 6 种喹诺酮类兽药均呈现显著的促进效应。Supelco 和 CNW HLB 柱对反渗透水中的全部 7 种兽药均表现出显著促进效应,而对河水中除麻保沙星外的 6 种兽药表现出显著的促进效应。

对于 3 种四环素类兽药,除 CNW 的 HLB 柱对反渗透水中的四环素和强力霉素没有显著基质效应外,其他均表现出显著的基质促进效应。

对于河水中的 3 种氯霉素类兽药,3 种 HLB 柱均表现出显著抑制效应。而在反渗透水中,Supelco HLB 仍全部为抑制效应,Waters 和 CNW HLB 柱则都仅对甲砒霉素表现出抑制效应。

Waters HLB 柱对反渗透水和河水中的 4 种雌激素类兽药均表现出轻微抑制效应;Supelco HLB 柱对反渗透水和河水中除己烯雌酚外的其他兽药表现出抑制效应;CNW HLB 柱对反渗透水中的 4 种

表 4 3 种品牌 HLB 柱对河水中加标兽药的回收率 (n=4)
Table 4 Recoveries of target veterinary drugs spiked in river water on the 3 brands of HLB cartridges (n=4)

Veterinary drug	Waters HLB												Supelco HLB												CNW HLB											
	50 ng/L				200 ng/L				50 ng/L				200 ng/L				50 ng/L				200 ng/L				50 ng/L				200 ng/L							
	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %	RE/ %	RM/ %	RSD/ %									
Sulfamethoxazole (磺胺甲恶唑)	56.4	62.8	4.2	41.5	46.3	4.3	57.8	58.3	8.8	45.8	46.2	0.6	59.2	70.7	3.4	63.3	75.5	5.9																		
Sulfamethizole (胺甲噻二唑)	44.4	46.0	5.4	38.9	40.3	3.4	53.7	55.2	3.4	43.3	44.5	3.3	59.4	67.4	4.2	58.0	65.8	10.4																		
Sulfapyridine (磺胺吡啶)	39.3	45.5	9.5	38.9	45.0	1.5	54.9	55.0	4.9	41.4	41.5	1.9	61.4	76.0	8.3	62.1	76.8	2.0																		
Sulfathiazole (磺胺噻唑)	39.0	43.9	1.5	35.9	40.3	0.8	53.7	53.0	1.5	40.9	40.4	0.7	56.9	70.8	7.4	59.4	73.8	6.9																		
Sulfamonomethoxine (磺胺氯噻唑)	40.4	44.2	6.6	44.6	48.8	1.0	45.6	48.4	4.6	42.8	44.8	2.9	58.7	62.2	5.9	61.9	65.6	7.4																		
Sulfadimethoxine (磺胺二甲氧噻唑)	51.1	54.1	8.4	47.8	50.6	7.1	26.1	62.4	3.9	22.8	54.4	0.7	60.4	66.9	9.6	59.0	65.4	6.1																		
Sulfamer (磺胺同甲氧噻唑)	42.2	43.6	4.6	39.5	40.7	6.1	58.1	54.8	3.9	42.6	40.3	2.9	64.7	71.9	4.2	63.8	70.9	4.7																		
Sulfamonomethoxine (磺胺对甲氧噻唑)	56.6	52.6	3.0	54.0	50.2	9.1	67.3	70.3	8.6	44.5	46.5	2.0	75.3	72.5	4.1	69.6	67.1	3.9																		
Sulfamethazine (磺胺二甲基噻唑)	67.1	71.9	2.4	55.0	58.9	6.2	65.0	56.5	11.7	49.2	44.1	6.0	67.7	59.6	9.7	62.9	55.3	2.9																		
Sulfadiazine (磺胺噻唑)	49.0	47.9	9.5	47.3	46.2	0.4	62.2	55.6	2.2	46.9	41.9	1.6	66.2	72.8	8.8	66.8	73.5	6.5																		
Sulfaisodimidine (磺胺二甲基异噻唑)	48.5	50.2	5.3	50.8	52.6	6.0	50.8	49.6	11.8	44.4	43.6	3.6	72.9	60.3	7.4	64.0	52.9	5.2																		
Sulfacetamide (磺胺醋酰)	42.3	54.6	8.9	42.6	55.0	0.5	33.3	39.7	10.0	40.0	37.8	4.3	54.7	74.1	1.3	61.1	82.9	8.6																		
Sulfisoxazole (磺胺二甲异恶唑)	36.5	47.3	9.1	35.1	45.4	7.8	28.3	61.5	9.1	17.9	38.9	1.2	49.7	70.7	3.3	46.4	66.1	11.6																		
Sulfamethoxypridazine (磺胺邻二甲噻唑)	43.2	44.5	9.4	44.0	45.3	6.3	52.9	56.9	1.4	39.2	42.2	3.3	64.3	71.0	6.2	63.3	69.8	3.3																		
Ciprofloxacin (环丙沙星)	130.6	70.8	8.3	182.1	98.7	3.1	130.7	72.0	6.2	133.8	73.8	3.3	169.4	90.3	6.3	140.6	75.0	7.4																		
Norfloxacin (诺氟沙星)	143.0	73.2	8.5	185.4	94.9	4.1	140.6	68.4	4.9	142.4	69.3	5.3	173.6	89.7	7.7	147.4	76.2	4.1																		
Enrofloxacin (恩诺沙星)	132.4	83.7	7.9	152.7	96.5	6.9	114.1	83.6	6.2	127.4	93.3	0.0	161.5	109.5	7.7	142.9	97.0	5.2																		
Ofloxacin (氧氟沙星)	136.0	88.9	0.8	144.8	94.6	3.8	80.8	61.4	0.2	86.2	65.5	4.8	139.4	96.4	9.1	124.4	86.0	6.1																		
Danofloxacin (达氟沙星)	174.0	85.4	12.6	212.3	104.1	4.5	163.1	71.0	8.1	163.8	71.3	2.8	216.7	105.7	9.8	196.7	95.9	2.3																		
Flumequine (氟甲喹)	318.1	86.2	13.6	336.0	91.1	8.8	236.3	98.2	4.5	222.6	92.5	1.4	421.0	85.7	2.5	354.4	72.1	2.5																		
Marbofloxacin (麻保沙星)	83.9	75.9	5.5	110.7	100.1	3.6	55.4	46.1	4.5	55.7	46.4	5.5	96.8	116.7	6.6	87.2	105.1	11.3																		
Chlortetracycline (金霉素)	382.6	89.4	13.6	400.2	93.5	10.7	724.1	104.2	4.4	650.7	93.6	2.9	1049.9	150.1	3.1	834.3	119.3	9.5																		
Tetracycline (四环素)	263.7	100.5	11.9	283.5	108.0	11.3	238.4	94.3	6.3	214.6	84.8	1.2	391.8	147.2	6.8	332.6	125.0	5.7																		
Doxycycline (强力霉素)	237.5	93.6	11.3	251.2	99.0	12.7	191.0	97.9	3.3	160.7	82.4	0.2	376.5	141.7	5.5	315.6	123.9	6.1																		
Chloramphenicol (氯霉素)	23.7	112.1	14.6	26.3	124.2	4.1	15.7	93.5	4.7	16.0	95.9	1.8	31.6	103.1	4.3	28.0	91.4	8.7																		
Thiamphenicol (甲氧苄啶)	24.9	123.1	10.4	29.5	146.0	1.3	30.3	84.3	13.9	25.3	70.3	1.4	22.8	108.3	6.4	19.2	91.3	8.5																		
Florfenicol (氟甲砜霉素)	28.5	110.7	11.5	30.1	116.9	4.6	15.1	91.5	1.0	14.6	88.3	1.4	32.6	107.4	3.0	27.6	91.0	6.5																		
Diethylstilbestrol (己烯雌酚)	47.6	70.9	7.2	33.1	49.2	1.9	63.7	54.4	10.4	65.5	56.0	8.9	147.3	109.2	0.9	98.0	72.6	6.6																		
Estril (雌三醇)	71.6	126.7	1.9	63.4	112.2	13.8	33.1	77.7	7.8	22.6	53.2	7.9	57.6	112.3	3.4	41.4	80.7	4.2																		
Hexoestrol (己烷雌酚)	23.2	42.6	9.8	22.7	41.7	0.1	27.1	68.2	4.5	23.7	59.6	9.3	26.1	95.6	4.8	18.1	66.1	10.3																		
Dienoestrol (双烯雌酚)	21.4	50.7	6.3	20.5	40.7	1.8	12.6	43.2	10.0	10.0	40.4	2.7	18.6	87.5	0.0	13.1	61.5	0.8																		
Crystal Violet (结晶紫)	51.3	62.3	12.5	71.2	86.5	4.8	79.1	50.8	7.3	94.2	60.6	13.4	87.0	65.8	8.9	69.1	59.5	11.0																		
Nicarbazin (尼卡巴嗪)	73.3	104.5	14.3	87.8	125.0	8.6	21.8	40.9	5.9	50.7	97.2	0.8	28.0	68.1	8.5	20.8	52.3	36.7																		

RE: recovery calculated by external standard calibration method; RM: recovery calculated by matrix matched standard calibration method.

雌激素类兽药未表现出显著的基质效应,对河水中己烯雌酚呈现促进效应,而对其他兽药呈现显著抑制效应。

对于反渗透水中的结晶紫和尼卡巴嗪, Waters HLB 均为显著抑制效应, Supelco 和 CNW 的 HLB 均为显著促进效应。而在河水中, Waters HLB 对结晶紫未有显著基质效应, Supelco 和 CNW 的 HLB 均为轻微的促进效应; 3 种 HLB 柱均对尼卡巴嗪呈现抑制效应。

总体而言,无论是在反渗透水还是河水中,磺胺类兽药的基质效应都最轻微,喹诺酮和四环素的基质效应最严重。相对于反渗透水,河水中内源性杂质与外源性杂质的共同作用使得部分目标兽药的基质效应发生较大变化。如氯霉素类兽药在反渗透水中的基质效应不显著,对河水中的尼卡巴嗪则有基质抑制效应; Supelco 和 HLB 柱对反渗透水中的尼卡巴嗪有基质促进效应,在河水中的变为基质抑制效应等。分离度对基底效应的影响方面,结合图 1 可知,结晶紫和甲矾霉素等在分离度良好的条件下仍然呈现较为严重的基质效应,而磺胺甲噁二唑和磺胺对甲氧嘧啶等保留时间非常接近,但基质效应却不明显。综上所述,基质效应复杂且难以避免,应在 LC-MS/MS 方法开发和验证时给予充分重视。

此外,外标法定量的回收率结果与河水中的基质效应基本对应。如河水中氯霉素的 ME 值为 16.7% ~ 36.0%,对应外标法回收率为 14.6% ~ 32.6%; 四环素的 ME 值为 195.1% ~ 699.6%,对应外标法回收率为 191.0% ~ 1 049.9%。因此,采用 HLB 进行兽药分析时,外标法定量结果受到基质效应影响严重,无法准确反映回收率情况。而采用基质匹配标准法校正后,3 种 HLB 柱的磺胺类兽药回收率分别为 40.3% ~ 71.9%、37.8% ~ 70.3% 和 52.9% ~ 82.9%; 氯霉素类兽药回收率分别为 110.7% ~ 146.0%、70.3% ~ 95.9% 和 91.0% ~ 108.3%; 喹诺酮类兽药回收率分别为 70.8% ~ 104.1%、46.1% ~ 98.2% 和 72.1% ~ 116.7%; 四环素类兽药回收率分别为 89.4% ~ 108.0%、82.4% ~ 104.2% 和 123.9% ~ 150.1%; 雌激素类兽药回收率分别为 40.7% ~ 126.7%、40.4% ~ 77.7% 和 61.5% ~ 112.3%,基本符合要求, RSD ($n = 4$) 在 0.2% ~ 14.6% 之间,较好地克服了基质效应的干扰。这表明 3 种品牌的 HLB 柱在外标法定量时保留效果差异较大,而在用基质匹配标准法校正后回收率规律相似,较为统一,说明基质匹配标准校正法较好地校正了因基质效应产生的影响。

3 结论

以 LC-MS/MS 为仪器分析手段,考察了在填料量和前处理方法相同的条件下, Waters Oasis HLB、Supelco Supel-Select HLB 和 CNW Poly-Sery 等 3 种常用市售 HLB 柱对河水中多种类兽药进行固相萃取时的基质效应和保留效果。结果显示,对于相同基质的目标兽药,3 种品牌 HLB 柱呈现的基质效应大体类似,但程度有一定区别,不应忽视。由于上述基质效应,外标法无法准确对目标兽药进行定量。而基质匹配标准校正法则可有效消除基质效应,校正后 3 种品牌 HLB 柱的保留效果无显著差异,均可较好地满足河水中兽药多残留的检测需求。本研究结果为实际河水样品中兽药多残留分析方法的建立,尤其是固相萃取操作中 HLB 柱型的选择及消除基质效应并准确定量的方法提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Seifrtova M, Pena A, Lino C M, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391: 799
- [2] Benito-Peña E, Partal-Rodera A I, León-González M E, et al. *Anal Chim Acta*, 2006, 556: 415
- [3] Batt A L, Aga D S. *Anal Chem*, 2005, 77: 2940
- [4] Hilton M J, Thomas K V. *J Chromatogr A*, 2003, 1015: 129
- [5] Reverte S, Borrull F, Pocurull E, et al. *J Chromatogr A*, 2003, 1010: 225
- [6] Liu H, Zhang G P, Liu C Q. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (刘虹, 张国平, 刘丛强. 分析化学), 2007, 35(3): 315
- [7] Kasprzyk-Hordén B, Dinsdale R M, Guwy A J. *J Chromatogr A*, 2007, 1161: 132
- [8] Mitani K, Kataoka H. *Anal Chim Acta*, 2006, 562: 16
- [9] Gao L H, Shi Y L, Li W H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 色谱), 2010, 28(5): 491
- [10] Sun G D, Su Z Y, Chen M. *Chinese Journal of Chromatography* (孙广大, 苏仲毅, 陈猛. 色谱), 2009, 27(1): 54
- [11] Hong L J, Shi L, Zhang Y L, et al. *Environmental Science* (洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 等. 环境科学), 2012, 33(2): 652
- [12] Huang Q T, Chen M, Yuan D X, et al. *Journal of Xiamen University: Natural Science* (黄群腾, 陈猛, 袁东星, 等. 厦门大学学报: 自然科学版), 2007, 46(1): 77
- [13] Yang C Q, Wang L X, Hou X H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (杨常青, 王龙星, 侯晓红, 等. 色谱), 2012, 30(8): 756
- [14] Hirsch R, Ternes T A, Haberer K, et al. *J Chromatogr A*, 1998, 815: 213
- [15] Chen C Y, Wen T Y, Wang G S, et al. *Sci Total Environ*, 2007, 378: 352
- [16] Wang L Q, He L M, Zeng Z L, et al. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society* (王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 质谱学报), 2011, 32(6): 321
- [17] US EPA. Method 1694: 2007
- [18] Lu W Q. [MS Dissertation]. Xiamen: Xiamen University (陆婉清. [硕士学位论文]. 厦门: 厦门大学), 2010
- [19] Su Z Y. [MS Dissertation]. Xiamen: Xiamen University (苏仲

- 毅. [硕士学位论文]. 厦门: 厦门大学, 2008
- [20] Trufelli H, Palma P, Famiglini G, et al. *Mass Spectrom Rev*, 2011, 30: 491
- [21] Kebarle P, Tang L. *Anal Chem*, 1993, 65: 972A
- [22] King R C, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, et al. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11: 942
- [23] Cech N B, Enke C G. *Anal Chem*, 2000, 72: 2717
- [24] Zhou S, Cook K D. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2001, 12: 206
- [25] Wu J M, Qian X Q, Yang Z G, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 1471