

大体积进样液相色谱-串联质谱法测定 海水中 22 种抗生素

盛璨璨^{1,2}, 王兰香², 范圣晴^{1,2}, 何秀平¹, 刘晨光¹,
陈军辉¹, 韩超³, 李先国²

(1.自然资源部第一海洋研究所 青岛市现代分析与近海生态环境安全保障重点实验室 山东 青岛 266061; 2.中国海洋大学 化学化工学院 山东 青岛 266100; 3.浙江树人学院 生物与环境工程学院 浙江省污染暴露与健康干预重点实验室 浙江 杭州 310015)

摘要:本研究针对海水环境中抗生素浓度较低的情况,基于固相萃取(SPE)结合大体积进样液相色谱-串联质谱联用技术(LVI-LC-MS/MS),建立适用于海水中痕量抗生素检测的新方法,并用于近海海湾常见抗生素的分析。对离线 SPE 及液相色谱在线 SPE 大体积进样条件优化后,检测仅需 80 mL 海水样品。海水样品经离线 HLB 固相萃取柱富集后,采用 LVI-LC-MS/MS 检测(进样量 50 μ L),海水中 22 种抗生素在 0.07~12.50 ng/L 范围内均具有良好的线性关系($R^2>0.990$),方法检出限范围为 0.003~0.63 ng/L,定量限范围为 0.01~1.25 ng/L,各种抗生素的加标回收率为 55.87%~113.49%,精密度(相对标准偏差, RSD)为 1.13%~12.60%,表明该方法灵敏度高、准确性好。与常规小体积进样方法相比,该方法能有效提升样品利用率,显著降低海水样品用量和前处理时间,可满足海水环境中痕量抗生素的检测要求。最后,采用该方法对山东近海两个典型养殖海湾——四十里湾和桑沟湾海水中的抗生素进行了检测,在 36 个表、底层海水样品中共检出 9 种常见抗生素,主要为氟苯尼考(flufenicol, FF)、磺胺甲基异恶唑(sulfamethoxazole, SMX)、甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)、克拉霉素(clarithromycin, CTM)、脱水红霉素(dehydrated erythromycin, ERY-H₂O)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)等,总平均浓度范围为 0.05~8.19 ng/L。

关键词:离线固相萃取;在线固相萃取;抗生素;海水;四十里湾;桑沟湾

中图分类号:P734; X131

文献标识码:A

文章编号:1007-6336(2024)06-0980-13

Determination of 22 antibiotics in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with large-volume injection

SHENG Cancan^{1,2}, WANG Lanxiang², FAN Shengqing^{1,2}, HE Xiuping¹,
LIU Chenguang¹, CHEN Junhui¹, HAN Chao³, LI Xianguo²

(1.Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Offshore Eco-Environment Conservation, First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China; 2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3.Key Laboratory of Pollution Exposure and Health Intervention of Zhejiang Province, College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China)

收稿日期:2023-12-25, 修订日期:2024-01-30

基金项目:浙江省污染暴露与健康干预重点实验室开放基金项目(20220104);国家基金委-山东省联合基金项目(U2106205)

作者简介:盛璨璨(1998—),女,湖北黄冈人,硕士研究生,主要研究方向为海洋分析化学, E-mail: scc306755990@163.com

通信作者:陈军辉(1978—),男,河北新乐人,研究员,博士,主要研究方向为海洋生态环境化学, E-mail: jhchen@fio.org.cn

Abstract: A new method was developed for the simultaneous determination of various trace antibiotics in seawater using solid-phase extraction (SPE) combined with large-volume injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LVI-LC-MS/MS) and applied to the analysis of common antibiotics in nearshore bays. The optimization of offline SPE and online SPE (large volume injection) conditions was investigated. Under the optimal conditions, only 80 mL of seawater samples need to be enriched via an offline HLB SPE column, followed by detection through LVI-LC-MS/MS (injection volume of 50 μ L). Remarkably, the 22 antibiotics found in seawater exhibited a high level of linearity ($R^2 > 0.990$) within the concentration range of 0.07 to 12.50 ng/L. The lowest limit of detection (LOD) for these antibiotics is between 0.003 and 0.63 ng/L, while the limits of quantification (LOQ) range from 0.01 to 1.25 ng/L. Satisfactory recoveries (55.87%-113.49%), precision (relative standard deviations, $RSD=1.13\%-12.60\%$) were also achieved, demonstrating the high sensitivity and precision of the proposed method. Moreover, compared to the conventional small-volume injection method, this method effectively improved sample utilization rate and significantly reduced both the required seawater sample volume and pretreatment time. Therefore, the method meets the requirements for the detection of trace antibiotics in the seawater environment. To test the effectiveness of the method, antibiotics were detected in seawater samples collected from two mariculture bays in Shandong, namely Sishili bay and Sanggou bay. A total of 9 common antibiotics were detected in 36 samples of surface and bottom seawater, mainly florfenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim, clarithromycin, dehydrated erythromycin, and roxithromycin, with total average concentrations ranging from 0.05 to 8.19 ng/L.

Key words: offline solid phase extraction; online solid phase extraction; antibiotics; seawater; Sishili bay; Sanggou bay

抗生素是由微生物或高级动植物产生的具有活性抗病原体作用的一类次级代谢产物^[1]。由于抗生素具有治疗、预防疾病以及促进养殖渔业生物生长、发育等作用,因此是水产养殖业最常用的一类药物^[2-3]。据相关报道,在过去20年全球抗生素消费量增加了46%^[4],不仅对陆地水生环境造成污染,世界各地海水环境中检出抗生素的报道也越来越多,检出的抗生素主要为大环内酯类(macrolide, MLs)、磺胺类(sulfonamides, SAs)、喹诺酮类(quinolones, QNs)、四环素类(tetracyclines, TCs)及氯霉素类(chloramphenicols, CLs)等^[5]。中国是世界上水产养殖产品的最大生产国和消费国,抗生素的使用量和产量均居于世界首位^[6-7]。尽管大多数抗生素的半衰期较短,但长期频繁地使用抗生素会造成其在环境中累积,不仅会导致菌群间产生的耐药基因在环境中扩散从而引发细菌耐药问题,还会通过食物链传递直接威胁人类的健康^[8-10]。2022年12月,中国生态环境部将抗生素列入了《重点管控新污染物清单(2023版)》。因此,建立适用于海洋环境中常见抗生素的检测方法,阐明近海水环境中各类抗生素的污染现状势在必行。

目前,常用于环境样品中抗生素的检测方法

有微生物检测法^[11]、酶联免疫分析法^[12]、毛细管电泳法^[13]、光学/电化学传感法^[14-15]、液相色谱-荧光检测法(LC-FLD)^[16]及液相色谱-质谱法(LC-MS)^[17]等。前4种方法虽然成本低,但特异性差、灵敏度低,检出限在ng/mL级别,LC-FLD法虽然检出限可达ng/L级,但海水中的多环芳烃等荧光物质会对抗生素的准确定量造成一定的干扰。LC-MS法特异性强、灵敏度高,是目前最受认可的抗生素检测方法^[18-19]。海水环境中抗生素的浓度通常较低,且高盐的海水质基给低浓度抗生素检测带来挑战,因此,需要对海水样品中的抗生素进行富集和净化。与液液萃取法、固相微萃取、分散液液微萃取法等常见水体样品前处理方式对比,固相萃取法(SPE)以操作简单、耗费有机溶剂少、易于实现自动化等优点被认为是水样中抗生素富集纯化的经典方法^[20-21]。现有的离线固相萃取法所需水样体积较大(≥ 1 L),不但增加了现场取样、保存和运输的难度,而且在固相萃取过程中水样体积过大易导致部分极性较大抗生素回收率较低^[20,22]。单独的在线固相萃取法的最大进样体积一般在2 mL之内^[23-24],富集倍数较小,对于海水中浓度较低、灵敏度较差的抗生素无法达到其检出要

求,因此有必要建立一种样品利用率高、富集倍数大、兼顾不同种类常见抗生素同步测定的新方法。

近年来,固相萃取结合大体积进样技术与液相色谱串联质谱联用被广泛应用于海洋藻毒素^[25-26]、微囊藻毒素^[27-28]、溴代阻燃剂^[29]及多环芳烃^[30]等的检测,该技术具有有机溶剂用量少、自动化程度高、快速高效等优点,在水环境有机污染物日常检测中具有广阔的应用前景。本研究旨在:(1)将离线固相萃取技术与在线固相萃取-液相色谱串联质谱相结合,通过对海水中各类抗生素的两步富集,在仅需几十毫升海水的条件下,实现海水中超痕量抗生素的测定;(2)对中国近海四十里湾及桑沟湾海水中22种常见抗生素的污染现状进行初步调查。相关研究结果可为深入了解我国近海海水环境中抗生素的赋存状态以及评估其潜在生态风险提供技术支撑和科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1290 Infinity II 超高效液相色谱仪,配有二元泵、自动进样器(最大进样量为900 μL)、柱温箱(带两位六通阀)和1260 Infinity型四元泵;G6470A 三重四极杆质谱仪,配有喷射流电喷雾离子源(AJS-ESI)(美国Agilent公司);UNIQUE-R20 实验室纯水仪(厦门锐思捷科学仪器有限公司);Fotector-02HT 高通量全自动固相萃取仪(厦门睿科集团股份有限公司);Fotector Plus 全自动氮吹仪(厦门睿科集团股份有限公司);HC-3018 型离心机(安徽中佳中科科学仪器公司);FA1104 电子天平(上海精天电子仪器厂);Poroshell 120 EC-C18 ($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$) 色谱柱(美国Agilent公司);PLRP-S($2.1 \text{ mm} \times 12.5 \text{ mm}$, $15 \mu\text{m}$) 捕集柱(美国Agilent公司);HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL)(苏州纳谱分析技术有限公司)。

标准品:四环素(tetracycline, TET)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、红霉素(erythromycin, ERY)、二氟沙星(difloxacin, DFH)、磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine, SMZ)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)、

氟苯尼考(florfenicol, FF)均购自上海Macklin生化科技有限公司;磺胺噻唑(sulfathiazole, STZ)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、洛美沙星(lomefloxacin, LMX)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、克拉霉素(clarithromycin, CTM)、甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)均购自上海源叶生物科技有限公司;金霉素(chlortetracycline, CTC)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR)、磺胺甲基异恶唑(sulfamethoxazole, SMX)均购自北京Solarbio科技有限公司;环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)均购自上海安耐吉化学有限公司;氟罗沙星(fleroxacin, FLE)购自天津普西唐生物科技有限公司;培氟沙星(pefloxacin, PEF)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;脱水红霉素(dehydrated erythromycin, ERY- H_2O)、环丙沙星-D8(ciprofloxacin-D8, CIP-D8)、恩诺沙星-D5(enrofloxacin-D5, ENR-D5)和诺氟沙星-D5(norfloxacin-D5, NOR-D5)均购自天津阿尔塔科技有限公司。以上标准品纯度均高于95%,可达到定量分析要求。

乙腈和甲醇(质谱纯,上海Macklin生化科技有限公司);甲酸(色谱纯,上海Macklin生化科技有限公司);乙酸铵(质谱纯,瑞士Fluka公司); $0.45 \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜(上海兴亚净化器件厂);实验用水为自制超纯水($18.25 \text{ M}\Omega/\text{cm}$)。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取22种抗生素标准品,用甲醇溶解制成500 $\mu\text{g/mL}$ 的单个标准储备液,取适量单个标准储备液及3种内标物溶液(CIP-D8、ENR-D5、NOR-D5),混合后用甲醇进行稀释,得到22种抗生素及3种内标的混合标准溶液。在10 mL容量瓶中用甲醇连续稀释混合标准溶液,得到系列标准溶液。所有标准溶液均储存在琥珀色玻璃瓶中, -20°C 避光保存。

1.3 实验条件

1.3.1 离线固相萃取条件与在线固相萃取条件

离线固相萃取条件:基于文献报道的方法^[20,31],选用HLB固相萃取柱(200 mg/6 mL)用于海水中抗生素的离线富集净化。具体流程如下:移取经 $0.45 \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜过滤的80 mL海水样品,添加0.04 g的 Na_2EDTA ,超声混合均匀后,

用甲酸调节 pH=3, 并加入内标物(5.00 ng/L)待萃取。采用全自动固相萃取仪进行海水样品处理, 具体步骤如下: 将水样以 2.0 mL/min 的流速通过 HLB 小柱(已用 10 mL 甲醇和 10 mL 超纯水进行活化与平衡, 加载流速为 2.0 mL/min)进行净化与富集, 并使用 10 mL 超纯水淋洗, 淋洗后用氮气吹干 10 min; 再采用 10 mL 甲醇洗脱目标化合物, 洗脱流速为 1.0 mL/min; 将甲醇洗脱液于 40 ℃ 条件下氮吹至干, 用 1 mL 甲醇-水溶液($V: V=1: 9$)复溶, 待测。

在线固相萃取条件: 海水样品经离线固相萃取后即可直接进行在线 SPE-LC-MS/MS 分析。使用 PLRP-S 小柱(2.1 mm×12.5 mm, 15 μm)作为在线 SPE 柱, 进样体积为 50 μL。在线固相萃取两个步骤的六通阀切换示意图如图 1 所示, 当六通阀 1 和 6 相连时, 加载流动相将样品输送到捕集柱上进行目标物在线富集及净化, 当六通阀切换到 1 和 2 相连时, 由样品加载流路切换到色谱分离流路, 富集在 SPE 柱上的待测物经洗脱液输送到分析柱后进行色谱分离和质谱检测。

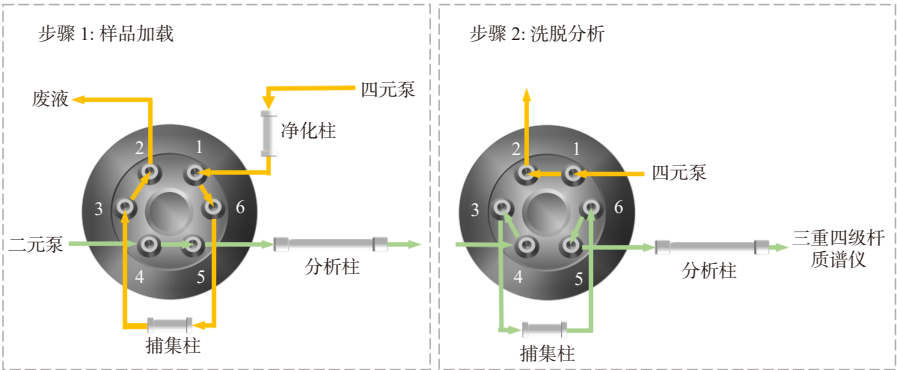


图 1 在线固相萃取两步骤的六通阀切换示意图

Fig. 1 Switch schematic diagram of six-way valve for on-line SPE system

1.3.2 液相色谱-串联质谱条件

液相色谱条件: Poroshell 120EC-C18(2.1 mm×100 mm, 4 μm) 色谱柱为分析柱; 柱温为 25 ℃; 在线固相萃取仪四元泵流动相 A 为含 2.5 mM/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为纯甲

醇; 超高效液相色谱二元泵流动相 A 为含 2.5 mM/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为纯乙腈; 流速为 0.3 mL/min; 运行时间为 12 min, 后运行 2 min。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 在线固相萃取及色谱分离梯度洗脱程序

Tab.1 Online SPE and chromatographic separation with gradient elution program

时间/min	四元泵			柱切换	时间/min	二元泵		
	流动相A/(%)	流动相B/(%)	流速/mL·min ⁻¹			流动相A/(%)	流动相B/(%)	流速/mL·min ⁻¹
0.00	98.00	2.00	1.00	1-6	0.00	90.00	10.00	0.30
2.00	98.00	2.00	1.00	1-2	2.00	90.00	10.00	0.30
3.00	20.00	80.00	1.00	1-2	5.00	77.00	23.00	0.30
6.00	20.00	80.00	1.00	1-2	8.00	40.00	60.00	0.30
7.00	98.00	2.00	1.00	1-2	9.00	0.00	100.00	0.30
9.00	98.00	2.00	1.00	1-6	11.00	0.00	100.00	0.30
12.00	98.00	2.00	1.00	1-6	12.00	90.00	100.00	0.30

质谱检测条件: 所有抗生素均在 ESI 正离子模式下检测, 毛细管电压为 4000 V; 喷雾气压(N_2)为 35 psi; 干燥气温度为 300 ℃, 鞘气温度

为 340 ℃; 干燥气(N_2)流速为 7 L/min, 鞘气(N_2)流速为 11 L/min。以多反应离子监测(MRM)模式对各组分进行质谱检测(表 2)。

表 2 22 种目标抗生素及 3 种同位素内标的质谱参数
Tab.2 Mass parameters of 22 target antibiotics and 3 isotopic internal standards

化合物	分子式	母离子(<i>m/z</i>)	定性离子/定量离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压/V	碰撞能量/V
CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332.1[M+H] ⁺	314.1/231.0*	130	21/49
CIP-D8	C ₁₇ H ₁₀ D ₈ FN ₃ O ₃	340.1[M+H] ⁺	296.1/322.1*	130	20/30
CTC	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479.1[M+H] ⁺	462.0/444.0*	135	16/22
CTM	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	748.4[M+H] ⁺	590.3/158.0*	165	21/29
DFH	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃ ·HCl	400.1[M+H] ⁺	299.1/382.1*	135	30/20
ENR	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360.1[M+H] ⁺	342.1/316.1*	130	25/21
ENR-D5	C ₁₉ H ₁₇ D ₅ FN ₃ O ₃	365.1[M+H] ⁺	321.1*	130	21
ERY	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734.4[M+H] ⁺	576.3/158.0*	155	17/29
ERY-H ₂ O	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂	716.4[M+H] ⁺	158.1*/558.4	150	25/9
FF	C ₁₂ H ₁₄ C ₁₂ FNO ₄ S	375.0[M+NH ₄] ⁺	340.0/241.0*	105	14/25
FLE	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	370.1[M+H] ⁺	268.9/326.0*	130	24/20
LMX	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	352.1[M+H] ⁺	308.1/265.1*	130	18/25
NOR	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320.0[M+H] ⁺	276.1/302.1*	130	17/25
NOR-D5	C ₁₆ H ₁₃ D ₅ FN ₃ O ₃	325.1[M+H] ⁺	307.1*	130	25
OFL	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362.0[M+H] ⁺	261.0/318.1*	140	29/21
OTC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461.2[M+H] ⁺	443.0/426.1*	115	11/21
PEF	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	334.2[M+H] ⁺	233.1/290.1*	130	28/16
ROX	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837.4[M+H] ⁺	558.3/679.3*	170	25/21
SDZ	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.9[M+H] ⁺	155.9/92.1*	100	13/33
SMR	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265.0[M+H] ⁺	156.0/92.0*	115	17/33
SMX	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254.0[M+H] ⁺	155.9/92.0*	104	17/29
STZ	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256.0[M+H] ⁺	92.0/156.0*	105	13/29
TET	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445.2[M+H] ⁺	154.0/410.1*	120	22/20
TMP	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291.3[M+H] ⁺	123.1/230.1*	145	26/17
SMZ	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278.9[M+H] ⁺	92.0/185.9*	120	33/17

注: *代表定量离子

1.3.3 样品采集与处理

于 2023 年 7 月在四十里湾及桑沟湾采集了表层及底层海水样品,详细站位布设信息如图 2。四十里湾毗邻北黄海,总面积约为 86.7 km²,海岸线长 20 km,水深较浅,为 8~15 m,主要的潮汐动力是半日潮,最大流速仅为 0.17~0.2 m/s,水体交换能力较差。桑沟湾位于中国最东端,占地面积为 150.3 km²,水深为 8~10 m,底质主要为沙,是山东半岛最开阔的海湾之一。所有海水样品均由有机玻璃采水器采集,并于 4℃ 冷藏避光保存在 1 L 的 PET 瓶中,24 h 内运回实验室

进行处理。

1.4 质量控制方法

实验中所有容器在使用之前均用超纯水和甲醇清洗 3 次;在每批次样品提取过程中同时做流程空白实验,以监测实验过程中的污染问题;在每批次的样品分析过程中,通过质控样、溶剂空白样和基质加标样对仪器的状态以及背景污染进行监测。为了去除在线 SPE 样品加载泵带来的抗生素背景干扰,在样品加载泵和进样器之间装一个净化柱 [PLRP-S 小柱(4.6 mm×12.5 mm, 15 μm)],用于去除流动相中的抗生素。

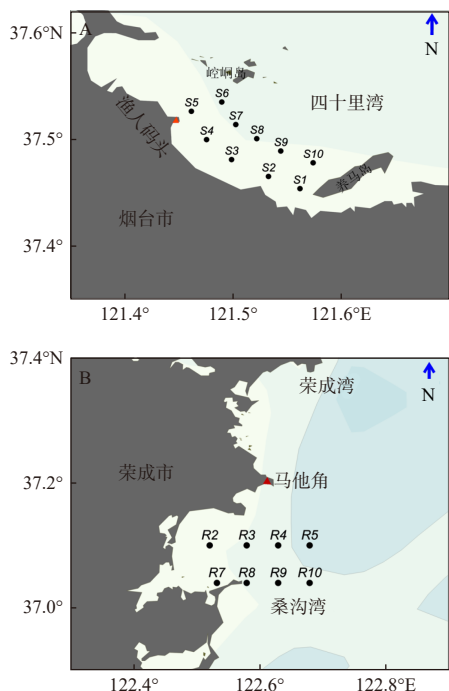


图2 四十里湾(A)及桑沟湾(B)采样站位

Fig. 2 Sampling stations in Sishili bay (A) and Sanggo bay (B)

2 结果与讨论

2.1 离线固相萃取条件的优化

2.1.1 离线固相萃取海水 pH 的优化

采用固相萃取法富集海水中的抗生素已有相关报道^[21,32],根据文献中固相萃取条件优化的结果,选择 HLB 小柱用于海水中抗生素的富集。在海水样品中添加质量浓度为 0.50 g/L 的 Na_2EDTA 。在此基础上,对离线固相萃取条件进行了进一步优化。

由于各类抗生素的化学性质差异较大,例如,喹诺酮类抗生素含有叔胺基及羧基官能团,属于两性化合物,极性较大^[33];大环内酯类抗生素是由乳酸环和糖通过糖苷键连接而成的碱性亲脂分子,极性较小^[34],因此,对离线固相萃取海水 pH (pH=3、pH=4、不调 pH) 进行了比较,结果如图 3 所示。喹诺酮类抗生素在海水 pH=3 的条件下富集效率更高,而磺胺类抗生素在不调 pH 的条件下峰形更窄,响应更佳。值得注意的是,ERY 属于弱碱性化合物,在水溶液 pH=7 条件下稳定,在加酸条件下易脱水形成 ERY-H₂O,

导致其回收率较低(表 3)。因此,若要检测海水中的 ERY,海水样品不加酸。除 ROX、ERY、CTC 以外,其余大环内酯类和四环素类抗生素均在 pH=3 的条件下富集效率更高,综合考虑,最终确定将海水样品 pH 调至 3 再进行离线固相萃取。

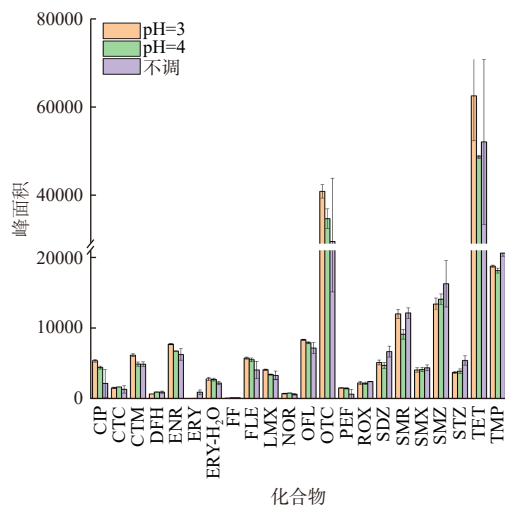


图3 海水样品 pH 对离线固相萃取目标化合物峰面积的影响

Fig. 3 Effect of pH on the peak area of the target compounds in off-line solid phase extraction

2.1.2 复溶溶剂中甲醇含量的优化

采用离线固相萃取结合在线固相萃取进行大体积进样分析时,样品经离线固相萃取后的复溶溶剂中的甲醇含量会直接影响后续色谱分离结果。如果复溶溶剂中的甲醇含量过低,部分疏水性较强的目标化合物可能溶解不够充分,直接影响该类物质的回收率。如果复溶溶剂中的甲醇含量过高,会降低各类抗生素在在线固相萃取柱上的吸附效率和色谱分离的峰型。因此对 5% 甲醇-水溶液、10% 甲醇-水溶液、20% 甲醇-水溶液和 50% 甲醇-水溶液作为复溶溶剂的效果进行了比较(图 4)。当样品进样体积为 50 μL 时,使用 5% 甲醇-水溶液作为复溶溶剂,SDZ、SMR、SMZ、STZ 及 TMP 等磺胺类抗生素峰面积普遍较小,其次是 CTM、ERY 等大环内酯类抗生素和 FLE、LMX 等喹诺酮类抗生素,亦有不同程度的损失;使用 50% 甲醇-水溶液作为复溶溶剂,FLE、OFL 等喹诺酮类抗生素丰度显著降低,且 STZ、SDZ 等磺胺类抗生素峰型展宽严

表 3 空白海水样品中 22 种抗生素的回收率结果
Tab.3 Recovery results of 22 antibiotics in blank seawater samples

化合物	2.00 ng/L		10.00 ng/L		50.00 ng/L	
	回收率/(%)	相对标准偏差RSD/(%)	回收率/(%)	相对标准偏差RSD/(%)	回收率/(%)	相对标准偏差RSD/(%)
CIP	87.29	8.44	108.62	2.53	83.55	8.49
CIP-D8	98.30	10.05	100.36	2.98	89.22	4.70
CTC	76.39	8.57	86.12	6.14	73.17	12.60
CTM	82.72	3.67	74.69	2.01	83.87	1.13
DFH	87.28	11.09	90.78	2.75	94.06	4.97
ENR	97.09	3.96	91.54	3.74	94.21	5.39
ENR-D5	96.05	6.76	93.51	2.90	93.36	4.33
ERY	16.06	3.28	18.45	6.37	20.77	9.47
ERY-H ₂ O	113.49	1.94	95.62	3.95	91.06	1.37
FF	83.81	8.72	82.74	0.77	89.79	1.35
FLE	98.31	5.93	101.29	1.50	90.09	4.34
LMX	87.01	9.52	103.77	0.88	81.63	1.82
NOR	67.94	10.26	98.43	8.07	65.77	6.97
NOR-D5	91.13	18.91	97.13	1.92	84.87	0.41
OFL	108.38	11.12	102.43	3.06	86.83	6.50
OTC	65.38	8.62	74.34	11.16	66.44	11.35
PEF	95.01	3.14	95.75	4.83	91.54	6.14
ROX	68.21	5.99	72.53	1.78	66.03	12.60
SDZ	86.06	6.94	72.69	2.00	75.10	10.29
SMR	70.14	8.85	68.53	3.57	69.31	4.78
SMX	75.11	8.32	71.93	3.00	72.95	8.80
SMZ	76.52	11.39	71.27	4.30	71.42	3.12
STZ	68.96	12.65	72.04	4.59	69.04	4.99
TET	55.87	6.77	67.36	10.65	62.62	5.07
TMP	91.94	2.85	89.34	2.25	92.31	2.79

重;使用 10% 甲醇-水溶液和 20% 甲醇-水溶液作为复溶溶剂时,各个目标化合物的丰度相差不大,考虑到峰型展宽以及进样体积等因素,最终选用 10% 甲醇-水溶液作为复溶溶剂,其灵敏度和稳定性能满足检测需要。

2.2 在线固相萃取条件的优化

2.2.1 在线捕集柱和分析柱的选择

22 种目标抗生素包括酸碱两性化合物,极性范围较宽,因此选用 Agilent PLRP-S 富集柱为在线 SPE 柱,其填料为刚性(聚乙烯/二乙烯基苯)材料,不仅热稳定性及化学稳定性好,而且亲水性强,耐 pH 范围广,因此适用于小分子、合成

生物分子和大分子的纯化,满足本研究的需要。为了确保各类抗生素从在线 SPE 柱洗脱到分析柱时不会扩散,分析柱对目标抗生素的保留容量需要大于在线 SPE 柱。比较了 Agilent Zorbax Eclipse plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)和 Agilent Poroshell 120 EC-C18(2.1 mm×100 mm, 4 μm)色谱柱,二者均可与 PLRP-S 捕集柱结合使用,但 EC-C18 色谱柱作为分析柱时,分析时间更短,柱效更高,部分抗生素的峰型更尖锐,方法稳定性更好,因此选用 EC-C18 色谱柱作为分析柱。

2.2.2 二元泵初始流动相乙腈比例的影响

由于不同种类抗生素极性相差较大,采用梯

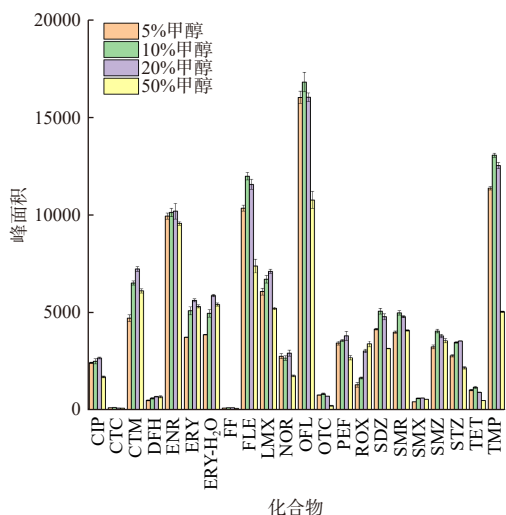


图 4 复溶溶剂中甲醇含量对目标化合物峰面积的影响

Fig. 4 Effect of methanol content in the redissolving solvent on the peak area of the target compounds

度洗脱才能实现对各种抗生素的有效分离,但是分析柱梯度洗脱程序初始流动相乙腈的占比对在线 SPE-LC-MS/MS 成功分离检测多种抗生素有重要影响。若初始流动相乙腈占比过低,会降低在线 SPE 柱洗脱抗生素的效率,进而导致部分极性较大的磺胺类抗生素色谱峰展宽;若初始流动相乙腈占比过高,可能导致极性相对较强的四环素类抗生素在分析柱上无法保留而降低分离度。通过对流动相梯度洗脱程序的系统优化,本研究确定初始流动相乙腈占比为 10% 可以实现各种抗生素的在线 SPE-LC-MS/MS 分离分析。从 22 种抗生素标准溶液的 MRM 提取离子图(图 5)可以看出,各种抗生素的色谱峰尖锐对称,分离度良好。

2.2.3 样品加载流动相的优化

当样品溶液从液相色谱进样器加载到在线 SPE 柱时,样品加载流动相需要保持非常弱的洗脱能力,才能确保在线 SPE 柱对目标抗生素的富集,同时还要考虑与 EC-C18 分析柱的兼容性,因此,需要对在线 SPE 柱样品加载流动相组成进行优化。对不同含量甲醇-水溶液(2%、5% 和 10%, 均含有 2.5 mM/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸)作为样品加载流动相进行了比较,结果如图 6 所示。当甲醇含量为 2% 和 5% 时,各类抗生素能够很好地保留在捕集柱上,而当甲醇含量为 10%

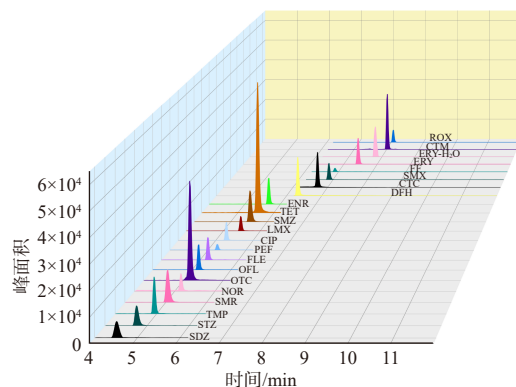


图 5 22 种抗生素混合标准溶液(500.00 ng/L)在线 SPE-LC-MS/MS 分析 MRM 色谱图

Fig. 5 MRM chromatograms of 22 antibiotics mixed standard solutions (500.00 ng/L) analyzed by online SPE-LC-MS/MS

时,会导致部分抗生素富集效率明显下降,并且出现峰展宽现象,因此,选择 2% 甲醇-水溶液作为加载流动相。

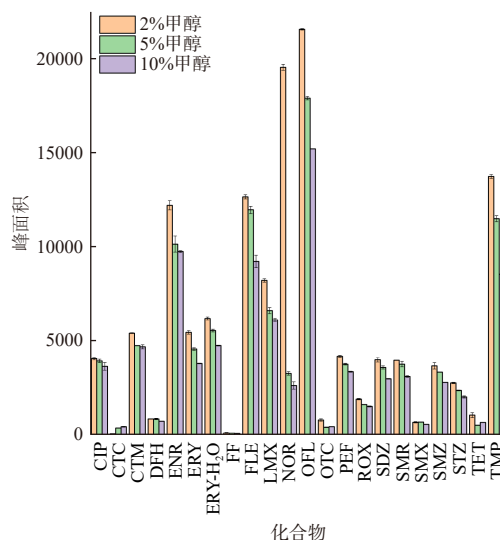


图 6 样品加载流动相甲醇比例对目标化合物峰面积的影响

Fig. 6 Effect of sample loading mobile phase methanol ratio on peak area of target compounds

2.2.4 样品加载流速的优化

样品加载流速是影响抗生素吸附到在线固相萃取柱上的另外一个重要参数。适当增加加载速率有助于将目标化合物充分加载到在线 SPE 柱上,并减少样品基质干扰。结果如图 7 所示,随着样品加载流速的增加,喹诺酮类抗生素

的丰度整体呈现先增加后减少的趋势,而磺胺类抗生素的丰度呈现减少的趋势,减少的幅度并不大,但可以看出色谱峰展宽与分离效果下降。因此,在本研究中,最终确定以 1.0 mL/min 的流速加载样品 2 min,加载流动相体积约为进样体积 (50 μ L) 的 40 倍,满足各类目标抗生素在线快速富集的要求。此外,较大的进样量可能会导致样品环中的目标分析物残留,为了减小残留效应,在六通阀从 1-6 位切换至 1-2 位后,四元泵加载流动相提升至 80% 的甲醇,并以 1.0 mL/min 的流速冲洗样品环 3 min,可以确保所有目标抗生素均没有明显的残留效应。

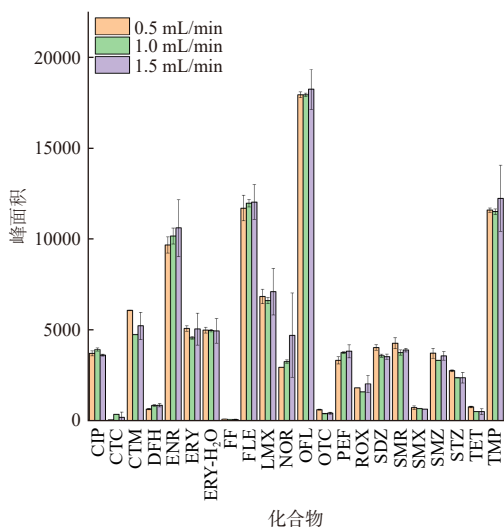


图7 样品加载流速对目标化合物峰面积的影响

Fig. 7 Effect of sample loading flow rate on peak area of target compounds

2.3 方法学考察

2.3.1 基质效应

基质效应 (Matrix Effect, ME) 通常导致分析物信号的抑制,或者偶尔导致分析物信号的增强。本研究将 80 mL 南极海水按同样的样品前处理流程处理后得到空白基质,将用其配制成的混合标准溶液与 10% 甲醇-水溶液配制的混合标准溶液进行在线 SPE-LC-MS/MS 分析比较,评价基质效应。基质效应计算公式^[35]如下:

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

式中: A_x 为基质匹配混合标准溶液中各种抗生素的峰面积; A_s 为甲醇配制的相同浓度的标准品中抗生素峰面积。当 ME(%) 在 -20% ~

20% 范围时,基质效应可忽略不计;当 ME(%) 在 -50% ~ -21% 和 21% ~ 50% 范围时,存在中等程度基质效应;当 ME(%) > 50% 或 < -50% 时,基质效应较强。结果显示,22 种抗生素均有不同程度的基质效应,其中 CTC、OTC、TET、FLE、PEF、SMR、STZ 的基质效应较强,其他目标化合物的基质效应均为中等程度及以下。总的来说,海水中的抗生素检测受到基质影响较大,尤其是 CTC、OTC 和 TET 这 3 种四环素类抗生素,在海水基质条件下质谱信号明显高于纯水,ME% 分别达到 -634.13%、-1046.28% 和 -736.16%; 相关文献表明^[35-37],四环素类抗生素包含 4 个稠合环,具有两个酮基团,易于与蛋白质、硅醇基和金属离子强烈结合,Na₂EDTA 可以有效阻止重金属离子的干扰,此外,盐析效应也可能是造成四环素类抗生素富集效率增大的原因。因此,需采用基质匹配标准曲线进行实际样品中各种抗生素的定量测定。

2.3.2 回收率与精密度

取南极海水样品,采用标准加入法对方法的回收率和精密度进行考察,向空白海水样品中添加低、中、高 (2.00 ng/L、10.00 ng/L、50.00 ng/L) 3 种浓度水平的抗生素混合标准溶液,按 2.1 节方法对样品进行前处理,每个加标样品平行处理 3 份,扣除本底值后计算其加标回收率和相对标准偏差 (RSD),方法的加标回收率结果列于表 3。结果表明,两步固相萃取法能有效富集抗生素,方法精密度良好 (RSD < 13%),能满足实际海水样品中 22 种抗生素测定的分析要求。

2.3.3 检出限、定量限与线性

用南极海水样品的空白提取溶液作为基质溶液配制不同浓度抗生素混合标准溶液,浓度分别为 0.07 ng/L、0.13 ng/L、0.25 ng/L、0.63 ng/L、1.25 ng/L、2.50 ng/L、6.25 ng/L、12.50 ng/L (其中 CTC、OTC 和 TET 浓度为上述的 10 倍),由低浓度到高浓度依次进样。本研究采取外标法定量,以各组分峰面积为纵坐标,各组分的浓度为横坐标进行线性回归分析,除 FF、NOR 在 0.63 ~ 12.50 ng/L 浓度范围以及 TMP 在 0.13 ~ 12.50 ng/L 浓度范围呈现较好的线性关系外,其余抗生素均在 0.07 ~ 6.25 ng/L 浓度范围线性关

系良好,所有抗生素的相关系数(R^2)均大于 0.9900。以 3 倍信噪比作为方法的检出限(LOD), 10 倍信噪比作为方法的定量限(LOQ), 结果如表 4 所示。22 种抗生素的 LOD 范围为 0.003 ~ 0.63 ng/L, LOQ 范围为 0.01 ~ 1.25 ng/L, 满足海水环境中抗生素的检测需要。

表 4 在线 SPE-LC-MS/MS 分析 22 种抗生素的线性范围、检出限、定量限和精密度结果
Tab.4 Linearity, LOD , LOQ and precision (RSD) of 22 antibiotics analyzed by online SPE-LC-MS/MS

化合物	线性范围/ng·L ⁻¹	线性回归方程	R^2	LOD /ng·L ⁻¹	LOQ /ng·L ⁻¹	相对标准偏差 RSD /(%) ($n=6$)
CIP	0.07 ~ 6.25	$y=463.73x-130.84$	0.9947	0.06	0.13	1.82
CTC	0.07 ~ 6.25	$y=97.90x+111.57$	0.9976	0.63	1.25	9.57
CTM	0.07 ~ 6.25	$y=1435.1x+749.46$	0.9924	0.003	0.01	1.42
DFH	0.07 ~ 6.25	$y=987.75x+503.26$	0.9936	0.06	0.13	3.70
ENR	0.07 ~ 6.25	$y=701.03x+242.54$	0.9962	0.06	0.13	2.80
ERY	0.07 ~ 6.25	$y=778.3x+344.15$	0.9940	0.03	0.05	3.14
ERY-H ₂ O	0.07 ~ 6.25	$y=616.59x-60.572$	0.9933	0.03	0.05	1.56
FF	0.63 ~ 12.5	$y=150.26x+9.0052$	0.9923	0.63	1.25	0.99
FLE	0.07 ~ 6.25	$y=582.66x+66.704$	0.9976	0.06	0.13	2.75
LMX	0.07 ~ 6.25	$y=400.33x-41.397$	0.9996	0.06	0.13	3.38
NOR	0.63 ~ 12.5	$y=87.398x-151.94$	0.9941	0.63	1.25	6.02
OFL	0.07 ~ 6.25	$y=665.49x-102.58$	0.9980	0.06	0.13	1.47
OTC	0.07 ~ 6.25	$y=262.16x+461.39$	0.9960	0.63	1.25	7.55
PEF	0.07 ~ 6.25	$y=144.76x+28.173$	0.9991	0.25	0.50	2.91
ROX	0.07 ~ 6.25	$y=309.51x+131.08$	0.9946	0.06	0.13	2.38
SDZ	0.07 ~ 6.25	$y=727.33x+71.627$	0.9967	0.13	0.25	1.34
SMR	0.07 ~ 6.25	$y=1105.7x+608.06$	0.9932	0.03	0.05	2.01
SMX	0.07 ~ 6.25	$y=491.41x+264.13$	0.9936	0.06	0.13	2.58
SMZ	0.07 ~ 6.25	$y=1011.5x+718.55$	0.9920	0.01	0.03	1.91
STZ	0.07 ~ 6.25	$y=678.08x+519.94$	0.9924	0.06	0.13	1.67
TET	0.07 ~ 6.25	$y=418.86x-148.18$	0.9987	0.63	1.25	2.54
TMP	0.13 ~ 6.25	$y=866.27x+677.59$	0.9917	0.06	0.13	1.37

2.4 实际海水样品分析

使用建立的方法对山东近海两个养殖海湾四十里湾和桑沟湾表、底层海水样品中的 22 种抗生素进行了测定,结果详见表 5。四十里湾表、底层海水中共检出 4 类 9 种抗生素,浓度为 0.04 ~ 11.71 ng/L; 桑沟湾表、底层海水中共检出 4 类 7 种抗生素,浓度范围为 0.02 ~ 16.15 ng/L,其余抗生素浓度均低于检出限(< LOD)。由表 5 可见,四十里湾表、底层海水中抗生素种类多于桑沟湾,且除 SMX 及 TMP 以外,其余抗生素浓度均大于桑沟湾。该研究结果可能与两湾的环境特征有关,四十里湾近岸有耕地、山林,人类

活动密集^[38];此外,在距四十里湾最大沿岸入海河流辛安河 500 m 处有一座污水处理厂,不断有城市污水汇入海湾^[39]。而桑沟湾则是典型养殖海湾,抗生素来源主要为渔业用药。FF 为四十里湾及桑沟湾表、底层海水样品中检出浓度最大的抗生素,根据以往对其他海域表层海水的研究,该浓度高于中国大连沿海海域(平均浓度 3.50 ng/L 和 0.53 ng/L)^[40-41],但远低于中国南海北部湾(平均浓度 87.82 ng/L 和 78.50 ng/L)^[42-43]、韩国济州岛和全罗南道省的邻近养殖海域^[44](平均浓度 42.00 ng/L)。其余检出的所有抗生素的平均浓度仅为 0.05 ~ 0.40 ng/L,与中国黄海海阳

养殖海域^[21]、黄海灵山湾^[33]、渤海莱州湾^[45]、大连沿海养殖海域^[40-41]表层海水相比较,检出种类较多,但其浓度处于中等偏下水平。此外,在四十里湾及桑沟湾表、底层海水样品中,磺胺类抗生素及大环内酯类抗生素检出率均达到 100%,磺胺类及大环内酯类抗生素具有较高的溶解度

及流动性,易于在水中迁移和分布^[45-46],因此广泛分布于中国黄渤海附近的养殖海域^[21,39-40]。综上所述,在四十里湾和桑沟湾海水环境中均检出多种抗生素,两湾海水环境中抗生素的潜在危害有待进一步评估。

表 5 四十里湾和桑沟湾表、底层海水样品中 9 种抗生素的浓度水平($n=36$)
Tab.5 Concentration level of 9 antibiotics in surface seawater samples and bottom seawater samples from Sishili bay and Sanggou bay ($n=36$)

抗生素		四十里湾表、底层海水					桑沟湾表、底层海水				
		最小值 /ng·L ⁻¹	最大值 /ng·L ⁻¹	中位数 /ng·L ⁻¹	平均值 /ng·L ⁻¹	检出率 /(%)	最小值 /ng·L ⁻¹	最大值 /ng·L ⁻¹	中位数 /ng·L ⁻¹	平均值 /ng·L ⁻¹	检出率 /(%)
CLs	FF	5.81	11.71	8.18	8.62	100.00	4.89	16.15	6.52	7.40	100.00
MAs	SMX	0.15	0.49	0.29	0.31	100.00	0.15	1.08	0.36	0.43	100.00
	TMP	0.11	0.54	0.29	0.30	100.00	0.17	0.83	0.32	0.35	100.00
MLs	CTM	0.04	0.12	0.07	0.07	100.00	0.02	0.09	0.04	0.04	100.00
	ERY-H ₂ O	0.22	0.46	0.36	0.36	100.00	0.23	0.38	0.27	0.27	100.00
	ROX	0.05	0.17	0.10	0.11	100.00	0.05	0.11	0.08	0.08	43.75
QNs	CIP	0.13	0.21	0.15	0.15	35.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00
	ENR	0.20	0.43	0.32	0.32	10.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00
	OFL	0.08	0.35	0.14	0.17	65.00	0.08	0.11	0.09	0.10	25.00

注: n.d.表示未检出

3 结论

(1)本文建立了一种基于离线 HLB-SPE 富集结合在线 PLRP-SPE 大体积进样 LC-MS/MS 同时测定海水中大环内酯类、磺胺类、喹诺酮类、四环素类及氯霉素类等常见抗生素的新方法。该方法的线性范围为 0.07 ~ 12.50 ng/L($R^2>0.990$), 检出限范围为 0.003 ~ 0.63 ng/L, 定量限范围为 0.01 ~ 1.25 ng/L, 加标回收率范围为 55.87% ~ 113.49%, RSD 均小于 12.60%, 表明该方法不仅具有良好的精密度和回收率, 而且稳定性好、准确度高。

(2)该方法一次分析仅需 80 mL 海水样品, 大大提高了海水样品利用率, 降低了现场海水样品采集、保存及运输的压力, 节省了人力和物力。利用该方法在四十里湾及桑沟湾表、底层海水样品中共检出 9 种抗生素, 浓度范围为 0.02 ~ 16.15 ng/L, 说明这两个海湾的海水遭受一定程度的抗生素污染; 此外, 还说明该方法适用于实际海水样品中低浓度抗生素的准确测定, 可

为近海海水环境中抗生素的监测提供技术支撑。

参考文献:

[1] 常东浩, 葛菁萍. 生态环境中抗生素检测与降解方法的研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(27): 59-64.

[2] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(7): 1137-1144.

[3] LANGBEHN R K, MICHELS C, SOARES H M. Antibiotics in wastewater: From its occurrence to the biological removal by environmentally conscious technologies[J]. Environmental Pollution, 2021, 275: 116603.

[4] HVISTENDAHL M. China takes aim at rampant antibiotic resistance[J]. Science, 2012, 336(6083): 795-795.

[5] WANG X, LIN Y, ZHENG Y, et al. Antibiotics in mariculture systems: A review of occurrence, environmental behavior, and ecological effects[J]. Environmental Pollution, 2022, 293: 118541.

[6] LULIJWA R, RUPIA E J, ALFARO A C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers[J]. Reviews in

- Aquaculture, 2020, 12(2): 640-663.
- [7] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [8] DONG Y, LI F, WANG Y. Low-dimension nanomaterial-based sensing matrices for antibiotics detection: A mini review[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 551.
- [9] MARCHANT J. When antibiotics turn toxic[J]. Nature, 2018, 555(7697): 431-433.
- [10] MARTÍNEZ J L, COQUE T M, BAQUERO F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(2): 116-123.
- [11] CHUNG H H, LEE J B, CHUNG Y H, et al. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 297-301.
- [12] JIANG W, WANG Z, BEIER R C, et al. Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide Residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4): 1995-1999.
- [13] LI X, YANG Y, MIAO J, et al. Determination of sulfa antibiotic residues in river and particulate matter by field-amplified sample injection-capillary zone electrophoresis[J]. ELECTROPHORESIS, 2020, 41(18/19): 1584-1591.
- [14] JOSHI A, KIM K H. Recent advances in nanomaterial-based electrochemical detection of antibiotics: Challenges and future perspectives[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 153: 112046.
- [15] NAG P, SADANI K, MOHAPATRA S, et al. Evanescent Wave Optical Fiber Sensors Using Enzymatic Hydrolysis on Nanostructured Polyaniline for Detection of β -Lactam Antibiotics in Food and Environment[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(4): 2299-2308.
- [16] TONG C, ZHUO X, GUO Y. Occurrence and risk assessment of four typical fluoroquinolone antibiotics in raw and treated sewage and in receiving waters in Hangzhou, China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 7303-7309.
- [17] GROS M, RODRÍGUEZ-MOZAZ S, BARCELÓ D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1292: 173-188.
- [18] GB/T 39999—2021, 化妆品中恩诺沙星等15种禁用喹诺酮类抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- [19] GB/T 24800.1—2009, 化妆品中九种四环素类抗生素的测定 高效液相色谱法[S].
- [20] 封梦娟, 杨正标, 张 芹. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定表层水体中5类40种抗生素[J]. 色谱, 2019, 37(5): 525.
- [21] HAN Q F, ZHAO S, ZHANG X R, et al. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China[J]. Environment International, 2020, 138: 105551.
- [22] ZHOU J L, MASKAOUI K, LUFADJEU A. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 731: 32-39.
- [23] AXEL M, EWELINA K, JENNY-MARIA B, et al. An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(9): 8692-8699.
- [24] 尹杨媛, 崔正国, 白 莹, 等. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时检测海水养殖水体中15种药物[J]. 环境化学, 2023, 42(3): 1017-1028.
- [25] WANG J, CHEN J, HE X, et al. Simple determination of six groups of lipophilic marine algal toxins in seawater by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chemosphere, 2021, 262: 128374.
- [26] SHENG C, HE X, SHEN N, et al. Occurrence and phase distribution of lipophilic marine algal toxins in the bottom boundary layer and sediment-porewater system of two mariculture sites[J]. Chemosphere, 2023, 341: 140109.
- [27] 冯月超, 马立利, 王红艳, 等. 在线固相萃取-液相色谱质谱联用法检测水中21种有机污染物[J]. 分析试验室, 2014, 33(11): 1290-1295.
- [28] JONES M, JANSSEN E M L. Quantification of multi-class cyanopeptides in swiss lakes with automated extraction, enrichment and analysis by Online-SPE HPLC-HRMS/MS[J]. CHIMIA, 2022, 76(1/2): 133-133.
- [29] 张蓓蓓, 章 勇, 穆 肃, 等. 全自动在线固相萃取-液质联用测定水中两类溴代阻燃剂[J]. 环境化学, 2014, 33(3): 477-484.
- [30] WANG C, LIU J, CHEN Y, et al. Quantitation of ultra-trace nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons isomers in water by online solid-phase extraction coupled-liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1635: 461738.
- [31] WEI Y, ZHANG Y, XU J, et al. Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments, and fish muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2014, 8(3): 357-371.
- [32] CHEN H, LIU S, XU X R, et al. Antibiotics in typical marine

- aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 90(1/2): 181-187.
- [33] 董晓, 李兆新, 孙晓杰, 等. 固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定养殖海水中17种喹诺酮类药物[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 127-138.
- [34] PETROVIĆ M, HERNANDO M D, DÍAZ-CRUZ M S, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067(1/2): 1-14.
- [35] PAN L. Trace determination of multiple hydrophilic cyanotoxins in freshwater by off- and on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Science of the Total Environment*, 2022.
- [36] ANDERSEN W C, ROYBAL J E, GONZALES S A, et al. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1/2): 145-150.
- [37] GU C, KARTHIKEYAN K G, SIBLEY S D, et al. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid[J]. *Chemosphere*, 2007, 66(8): 1494-1501.
- [38] 叶孟杰, 孙红成, 高昊东, 等. 烟台四十里湾营养物质产生特征及影响分析[J]. *中国环境监测*, 2006 (5): 88-91.
- [39] 邢红艳, 孙珊, 马元庆, 等. 四十里湾海域营养盐年际变化及影响因素研究[J]. *海洋通报*, 2013, 32(1): 53-57.
- [40] NA G, FANG X, CAI Y, et al. Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 69(1/2): 233-237.
- [41] DU J, ZHAO H, WANG Y, et al. Presence and environmental risk assessment of selected antibiotics in coastal water adjacent to mariculture areas in the Bohai Sea[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 177: 117-123.
- [42] ZHANG R, PEI J, ZHANG R, et al. Occurrence and distribution of antibiotics in mariculture farms, estuaries and the coast of the Beibu Gulf, China: Bioconcentration and diet safety of seafood[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 154: 27-35.
- [43] ZHANG R, DU J, DONG X, et al. Occurrence and ecological risks of 156 pharmaceuticals and 296 pesticides in seawater from mariculture areas of Northeast China[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 792: 148375.
- [44] CHOI S, SIM W, JANG D, et al. Antibiotics in coastal aquaculture waters: Occurrence and elimination efficiency in oxidative water treatment processes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 396: 122585.
- [45] HAN Q F, ZHANG X R, XU X Y, et al. Antibiotics in marine aquaculture farms surrounding Laizhou Bay, Bohai Sea: Distribution characteristics considering various culture modes and organism species[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 760: 143863.
- [46] SHI Y, GAO L, LI W, et al. Investigation of fluoroquinolones, sulfonamides and macrolides in long-term wastewater irrigation soil in Tianjin, China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 89(4): 857-861.

(本文编辑: 胡莹莹)