

三重四极杆质谱测环境水中的 β -内酰胺类 抗生素

LCMSMS-023

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定环境水中痕量 (ng/L) β -内酰胺类抗生素的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。6 种 β -内酰胺类抗生素在 3 分钟内得到快速分离和检测。所有样品在 0.5 ~1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9999 以上；对 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 和 5 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.728% 和 3.581% 以下，系统精密度良好；从本市某自来水厂水源中检测出青霉素 V、邻氯青霉素和乙氧萘青霉素，含量分别为 3.126、8.638 和 2.900 ng/L。

关键词：环境水 β -内酰胺类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

随着抗生素的大量使用，在环境中相继检出抗生素物质，并且抗生素在环境水体中的污染尤为严重。这些在环境水体中残留的抗生素会引起细菌抗药性增强，已经直接影响到了人类的健康。 β -内酰胺类抗生素 (β -lactams) 是一类用量大、使用范围广且容易进入环境水体的抗生素，在水体中多以痕量存在，以此检测难度较大、分析成本高。目前国内尚未有对环境水中抗生素类药物痕量分析的相关标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，建立了一种快速准确测定环境水中 β -内酰胺类抗生素的方法，并采用所建立的方法对上海某条河流水源中的 β -内酰胺类抗生素污染状况进行了检测，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 (输液泵)，DGU-20A₃ (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-30AC (柱温箱)，CBM-20A (系统控制器)，LCMS-8030 (三重四极杆质谱仪)，LabSolutions Ver. 5.41 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III
(2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm)

流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液；B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：20 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	65
2.01	Pumps	Pump B Conc.	90
2.30	Pumps	Pump B Conc.	90
2.31	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：ESI+ 4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度: 250°C

驻留时间: 20 ms

加热模块温度: 400°C

延迟时间: 2 ms

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	青霉素G	335	160*	-10	-15	-19
			176	-10	-15	-21
2	青霉素 V	351	160*	-18	-15	-19
			114	-18	-40	-23
3	苯唑青霉素	402	160*	-12	-10	-19
			143	-12	-10	-19
4	邻氯青霉素	436	160*	-13	-15	-12
			277	-13	-20	-21
5	乙氧萘青霉素	415	199*	-13	-15	-15
			171	-13	-35	-20
6	双氯青霉素	470	160*	-14	-15	-18
			311	-14	-15	-24

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

准确称取适量青霉素 G、青霉素 V、乙氧萘青霉素、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素 6 种标准物质, 用乙腈 / 水 (1/3) 配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液溶液, 用水稀释成浓度为、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 μg/L 的标准工作液。

环境水样品前处理方法:

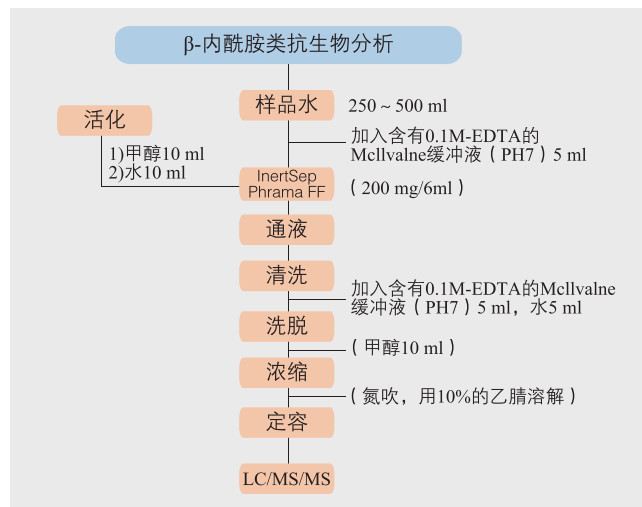


图1 环境水中β-内酰胺类抗生素样品前处理流程图

结果讨论

2.1 标准样品的产物离子扫描

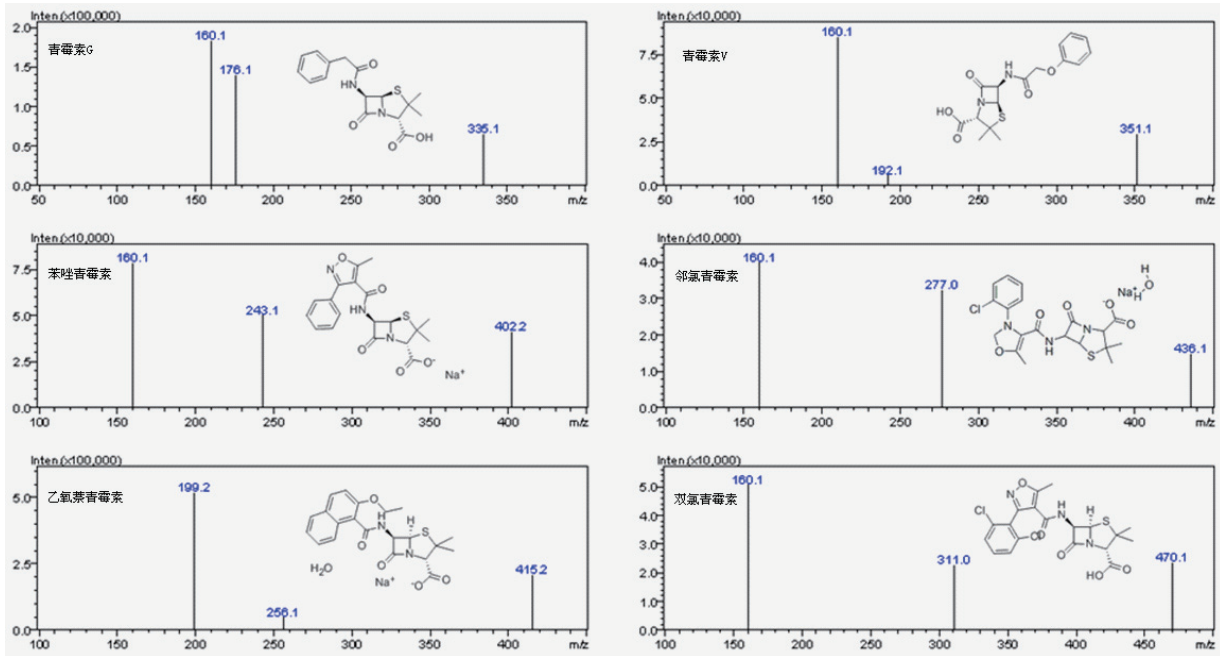


图2 标准样品产物离子扫描结果

2.2 标准样品的MRM色谱图

图3为500 μg/L标准样品的MRM色谱，6种β-内酰胺类抗生素在2分钟内得到了快速检测。

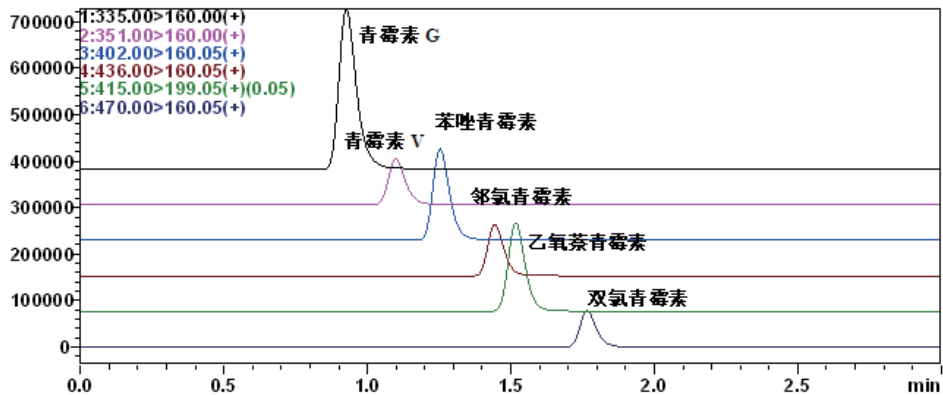


图3 β-内酰胺类抗生素标准样品的MRM色谱图

2.3 线性关系

将浓度为0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 μg/L的混合标准工作液按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图所示。6种β-内酰胺类抗生素在0.5~1000 μg/L浓度范围内所得校准曲线线性关系良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表3。

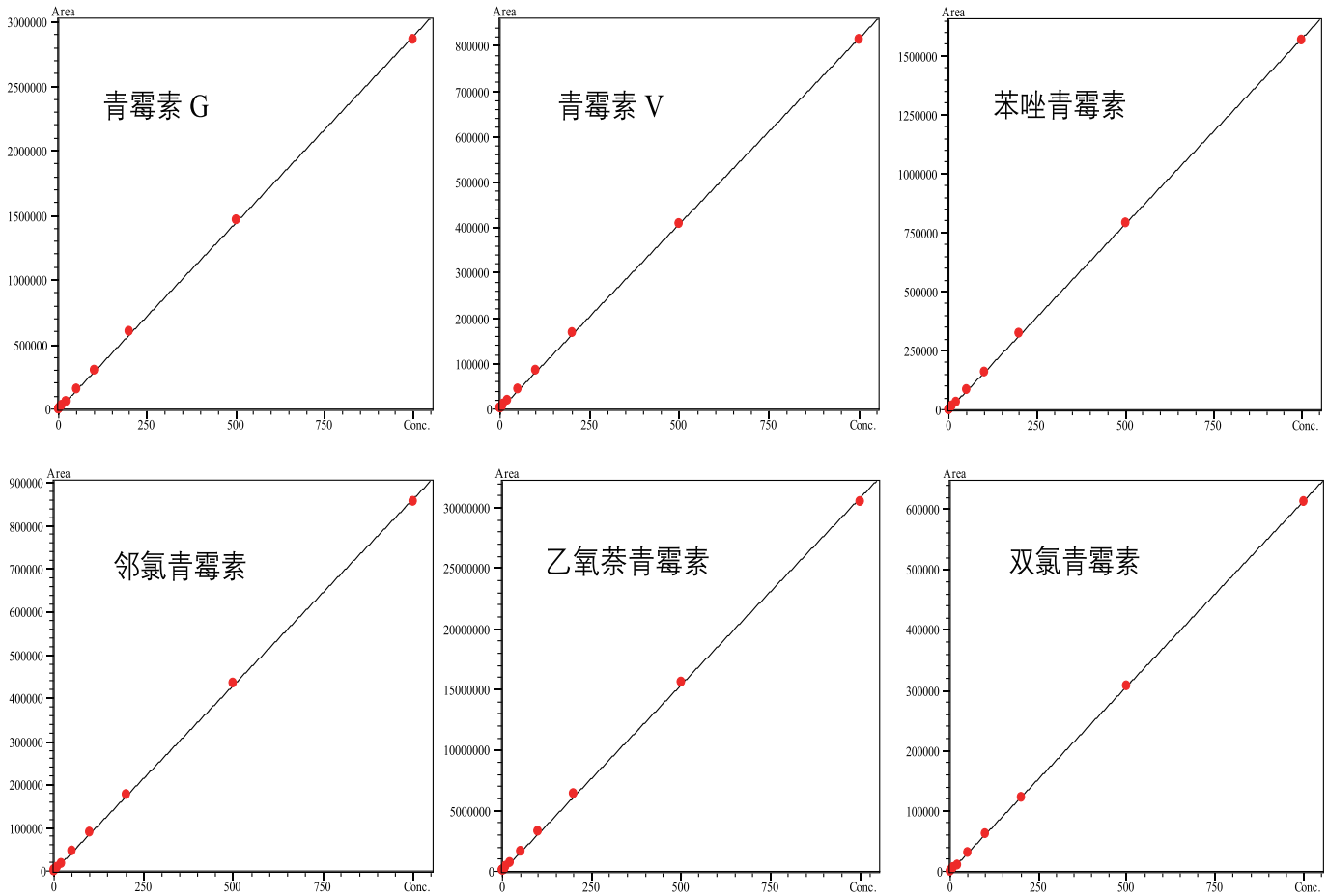


图4 6种β-内酰胺类抗生素的标准工作曲线

表3 6种β-内酰胺类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限(μg/L)	定量限 (μg/L)
1	青霉素 G	$Y = 2888.94X$	0.9999	0.06	0.20
2	青霉素 V	$Y = 817.009X$	0.9999	0.30	0.71
3	苯唑青霉素	$Y = 1573.83X$	0.9999	0.03	0.17
4	邻氯青霉素	$Y = 861.933X$	0.9999	0.08	0.28
5	乙氧萘青霉素	$Y = 30762.9X$	0.9999	0.01	0.05
6	双氯青霉素	$Y = 614.067X$	0.9999	0.07	0.21

2.4 精密度实验

对 5 μg/L、50 μg/L 和 500 μg/L 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.201%~0.728% 和 0.719%~3.581% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (5 ng/L)		RSD% (50 ng/L)		RSD% (500mg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
青霉素 G	0.728	0.935	0.558	2.150	0.469	0.988
青霉素 V	0.506	2.075	0.488	3.409	0.400	0.724
苯唑青霉素	0.607	2.247	0.436	1.215	0.369	1.661
邻氯青霉素	0.463	2.431	0.361	3.149	0.316	1.855
乙氧萘青霉素	0.311	1.549	0.299	0.719	0.300	0.911
双氯青霉素	0.238	3.581	0.201	1.802	0.365	1.360

2.5 灵敏度及回收率实验

6 种 β -内酰胺类抗生素低浓度 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 标准品色谱图如图 5 所示。回收率试验以 500 mL 环境水样为研究对象, 分别加入不同浓度的 β -内酰胺类抗生素混标, 按 1.3 中的方法进行前处理, 以考察分析方法的可靠性。在 500 mL 环境水样中, 加标浓度分别为 1 ng/L、4 ng/L 和 10 ng/L, 加标回收率结果详见表 5。环境水样加标色谱图见图 6、图 7 和图 8。

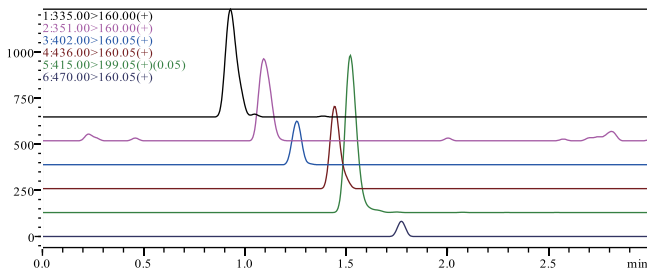


图5 0.5 $\mu\text{g/L}$ 6种 β -内酰胺类抗生素标准样品色谱图

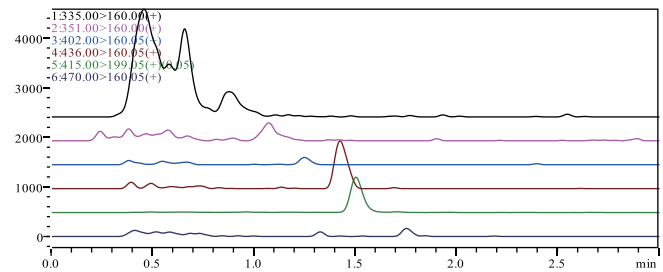


图6 1 $\mu\text{g/L}$ 6种 β -内酰胺类抗生素环境水基质加标色谱图

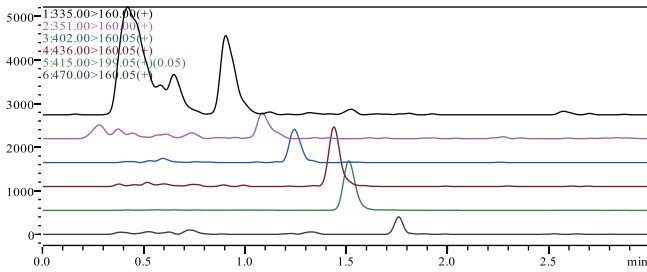


图7 4 $\mu\text{g/L}$ 6种 β -内酰胺类抗生素环境水基质加标色谱图

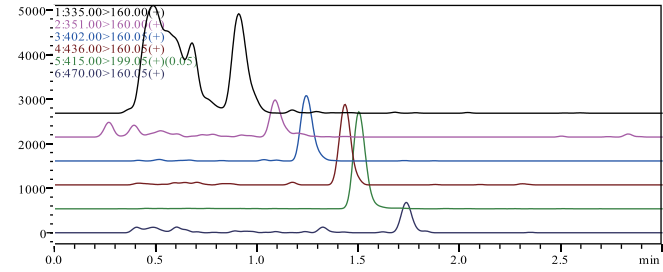


图8 10 $\mu\text{g/L}$ 6种 β -内酰胺类抗生素环境水基质加标色谱图

表5 6种 β -内酰胺类抗生素平均回收率结果

样品名称	加标浓1ng/L	加标浓度 4 ng/L	加标浓度 10 ng/L
青霉素 G	91.03%	114.90%	85.18%
青霉素 V	104.13%	87.96%	95.48%
苯唑青霉素	92.40%	86.05%	83.60%
邻氯青霉素	84.32%	89.45%	95.68%
乙氧萘青霉素	88.23%	84.95%	97.34%
双氯青霉素	92.20%	102.55%	85.52%

2.6 实际样品

将上海某条河流水源为环境水样品，定性离子对的相对丰度与与浓度相当的标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表 6 中的规定，判定样品中存在相应的被测物，环境水样中检出了三种 β -内酰胺类抗生素（青霉素 V、邻氯青霉素和乙氧萘青霉素），其浓度分别为 3.126、8.638 和 2.900 ng/L。

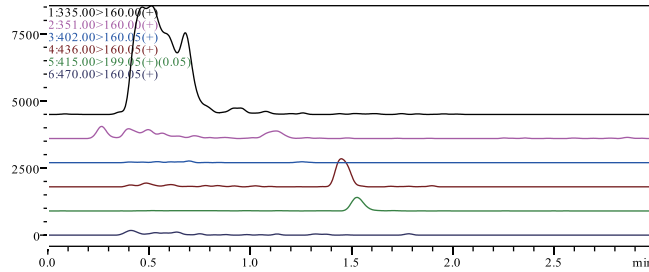


图9 环境水样品色谱图

表6 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%-50%	>10%-20%	≤ 10%
允许的相对偏差	± 20%	± 25%	± 30%	± 50%

表7 环境水样中检出的三种 β -内酰胺类抗生素相对离子丰度信息

名称	0.5 $\mu\text{g/L}$ 标准样品	环境水样
青霉素 V	39.36	38.35
邻氯青霉素	53.33	51.84
乙氧萘青霉素	36.66	36.90

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定环境水中 6 种 β -内酰胺类抗生素的方法。该方法分析速度快，灵敏度高，精密度良好；在 0.05~1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.9999 以上。从上海某条河流水源中检测出青霉素 V、邻氯青霉素和乙氧萘青霉素，含量分别为 3.126、8.638 和 2.900 ng/L。