

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定地表水中的喹诺酮类抗生素残留

LCMSMS-039

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定地表水中 14 种喹诺酮类抗生素的方法。地表水样品经固相萃取富集后，用超高效液相色谱 LC-30A 在 7 min 内实现快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。使用外标法绘制 14 种喹诺酮类抗生素的校准曲线，线性良好，相关系数为 0.999 以上；对不同浓度的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的相对标准偏差分别在 0.437 % 和 4.937% 以下，仪器精密度良好。

关键词： 喹诺酮类抗生素 三重四极杆质谱 地表水 富集

喹诺酮类 (Quinolones) 是一类含有 4- 喹诺酮母核的化学合成抗菌药，它的抗菌谱广、抗菌活性强，广泛应用于畜牧、水产等养殖业中。然而，喹诺酮类药物有潜在的致癌性和遗传毒性，同时还容易使病菌产生耐药性。近年来，喹诺酮类抗生素在环境水体中的出现、迁移及潜在的生态危害已成为国际上环境领域研究的热点之一，建立准确适用的分析方法则是研究环境中抗生素分布及其环境行为与风险的基础。由于环境介质的复杂性和多样性，目前尚无环境中抗生素类污染物的标准分析方法。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基质中的抗生素类残留具有很强的定性能力，准确度高，是目前超痕量残留分析的首选方法。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 联用测定地表水中 14 种喹诺酮类抗生素的方法。

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×2 输液泵，DGU-20A5 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

液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. × 150 mm L., 2.2 μm

流动相：

A - 0.2% 甲酸水溶液；

B - 甲醇 - 乙腈溶液 (40:60; V/V)

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，梯度

洗脱程序见表 1

质谱条件

离子化模式：ESI(+)

离子喷雾电压：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

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：20 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 3

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.5	Pumps	Pump B Conc.	40
4.6	Pumps	Pump B Conc.	95
5.5	Pumps	Pump B Conc.	95
5.6	Pumps	Pump B Conc.	20
7	Controller	Stop	

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：共 14 种，分别为依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、萘啶酸和西诺沙星。

标准工作溶液配制：用甲醇配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液，用含有 0.2 % 甲酸的甲醇水 (20:80; v/v) 溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。各标准物质的具体浓度见表 2。

表2 混合标准工作液中各标准物质的浓度(μg/L)

名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
依诺沙星	1	5	10	50	100	500
氧氟沙星	0.5	2.5	5	25	50	250
诺氟沙星	5	25	50	250	500	2500
培氟沙星	1	5	10	50	100	500
环丙沙星	1	5	10	50	100	500
洛美沙星	0.5	2.5	5	25	50	250
达氟沙星	1	5	10	50	100	500
恩诺沙星	1	5	10	50	100	500
沙拉沙星	1	5	10	50	100	500
噁喹酸	0.5	2.5	5	25	50	250
氟甲喹	0.5	2.5	5	25	50	250
吡呱酸	0.5	2.5	5	25	50	250
萘啶酸	0.5	2.5	5	25	50	250
西诺沙星	5	25	50	250	500	2500

1.4 水样前处理方法

固相萃取：取 100 mL 地表水，用磷酸调节 pH4.2 作为待净化水样。分别用 6 mL 甲醇和 pH4.2 的去离子水，活化 HLB 固相萃取小柱 (200 mg, 6 mL)。将 100 mL 待净化水样以 5 mL/min 的流速过柱。用 3 mL 5% 甲醇淋洗，低真空抽干 HLB 固相萃取小柱。再以甲醇洗脱喹诺酮类抗生素。45℃氮吹仪浓缩至近干，用 0.2% 甲酸的甲醇水 (20:80; v/v) 溶液定容至 1.0 mL，过滤后进样分析。

表3 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
依诺沙星	321.2	303.1*	-16.0	-20.0	-23.0
		203.9	-16.0	-48.0	-23.0
氧氟沙星	362.2	318.2*	-30.0	-18.0	-24.0
		261.1	-30.0	-28.0	-19.0
诺氟沙星	320.2	302.1*	-16.0	-20.0	-23.0
		231.1	-16.0	-46.0	-28.0
培氟沙星	334.2	316.2*	-13.0	-20.0	-24.0
		290.1	-13.0	-16.0	-22.0
环丙沙星	332.2	314.1*	-13.0	-16.0	-24.0
		231.0	-13.0	-44.0	-18.0
洛美沙星	352.2	265.0*	-18.0	-22.0	-20.0
		308.2	-18.0	-16.0	-23.0
达氟沙星	358.2	340.1*	-14.0	-20.0	-26.0
		255.0	-14.0	-42.0	-29.0
恩诺沙星	360.3	342.2*	-29.0	-20.0	-26.0
		316.2	-29.0	-20.0	-24.0
沙拉沙星	386.2	368.1*	-15.0	-20.0	-28.0
		299.1	-15.0	-25.0	-23.0
噁喹酸	262.1	244.1*	-30.0	-18.0	-30.0
		216.0	-30.0	-32.0	-26.0
氟甲喹	262.1	244.1*	-30.0	-16.0	-18.0
		202.0	-30.0	-36.0	-23.0
吡呱酸	304.2	286.1*	-30.0	-18.0	-22.0
		215.1	-30.0	-38.0	-24.0
萘啶酸	233.1	215.1*	-30.0	-14.0	-26.0
		187.0	-30.0	-28.0	-22.0
西诺沙星	263.1	245.1*	-21.0	-16.0	-19.0
		189.0	-21.0	-30.0	-22.0

注：*表示定量离子

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

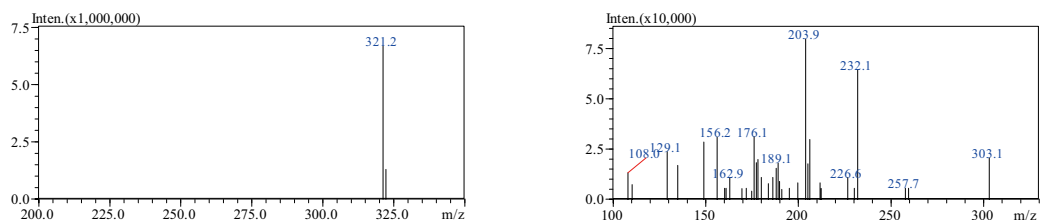


图1 依诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-48V）（右图）

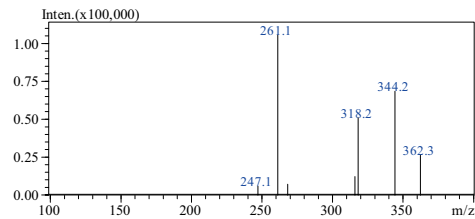
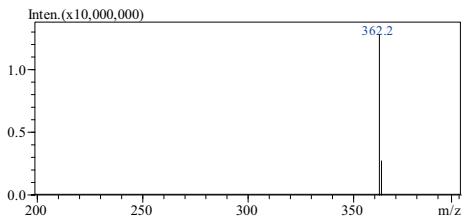


图2 氧氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

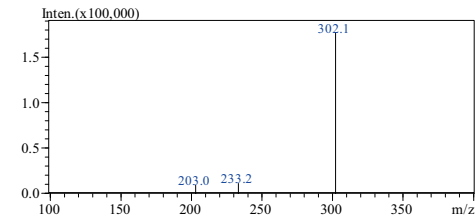
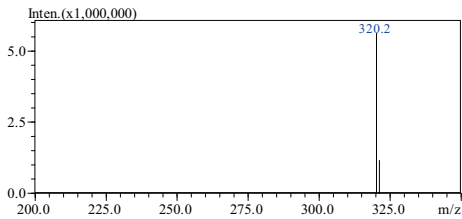


图3 诺氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

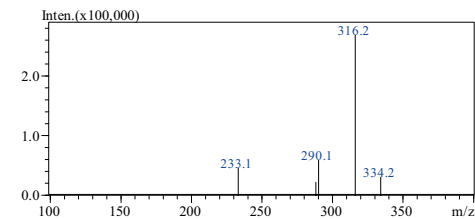
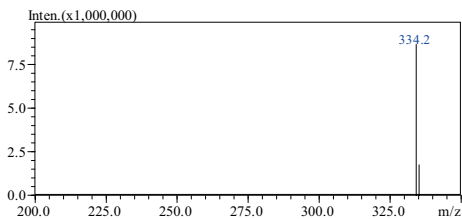


图4 培氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

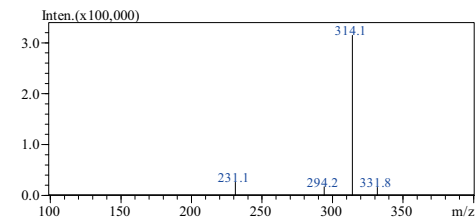
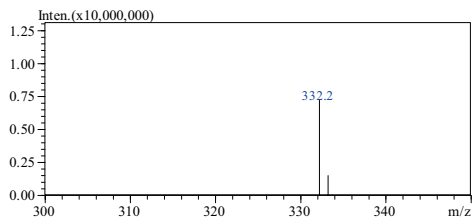


图5 环丙沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

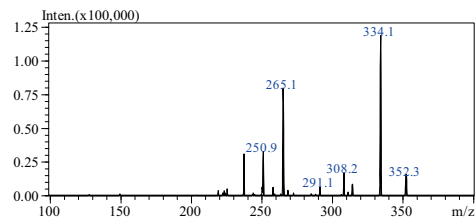
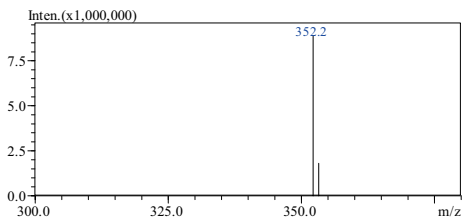


图6 洛美沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

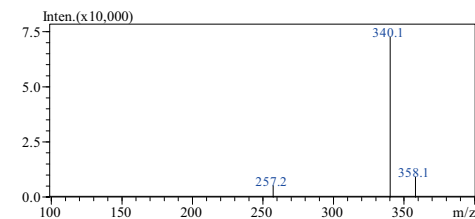
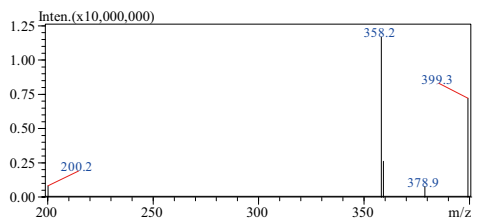


图7 达氟沙星的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

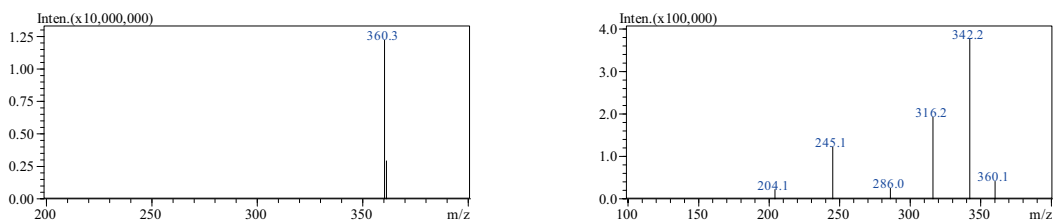


图8 恩诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

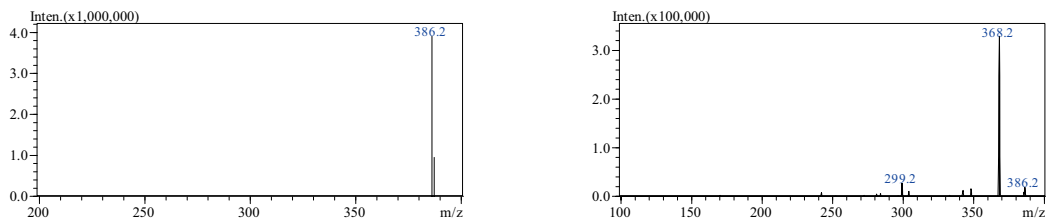


图9 沙拉沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

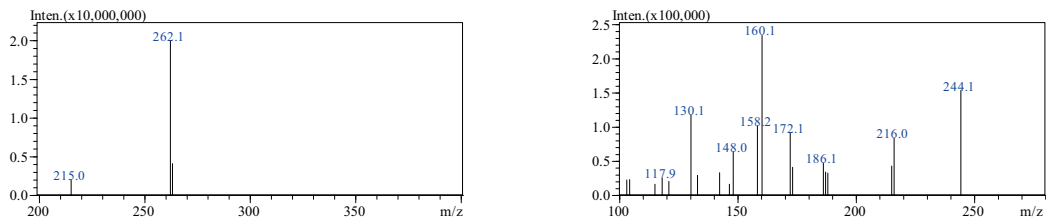


图10 噁啉酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

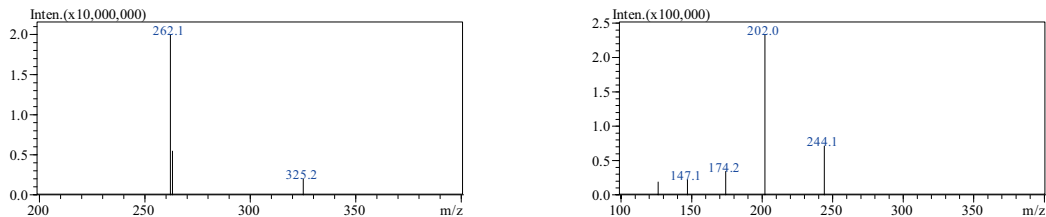


图11 氟甲喹的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

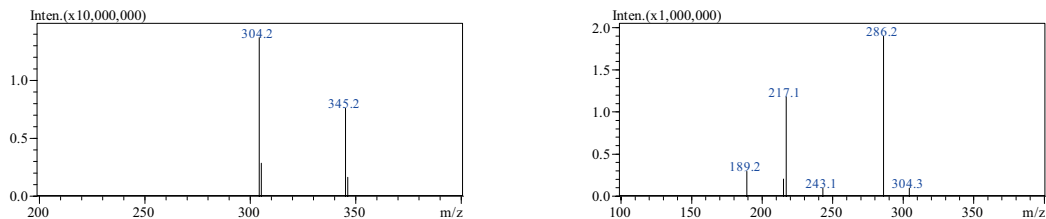


图12 吡啶酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

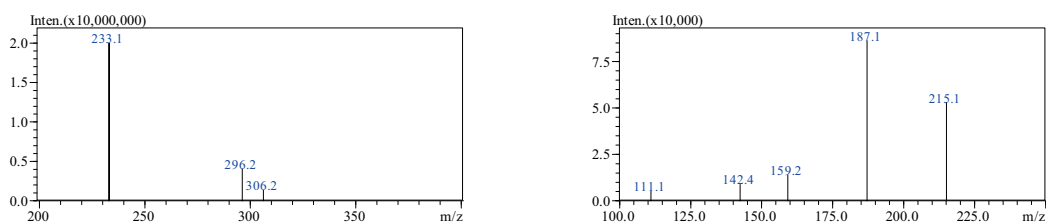


图13 菸啶酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

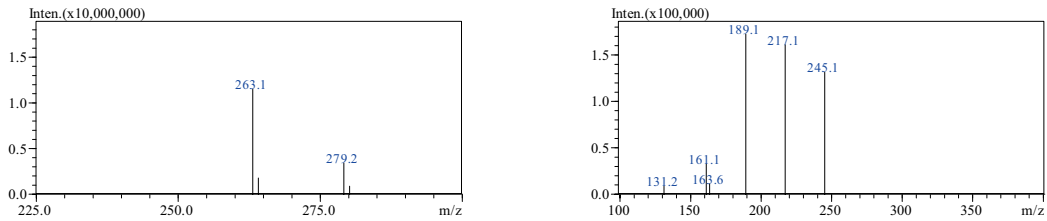


图14西诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V）（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

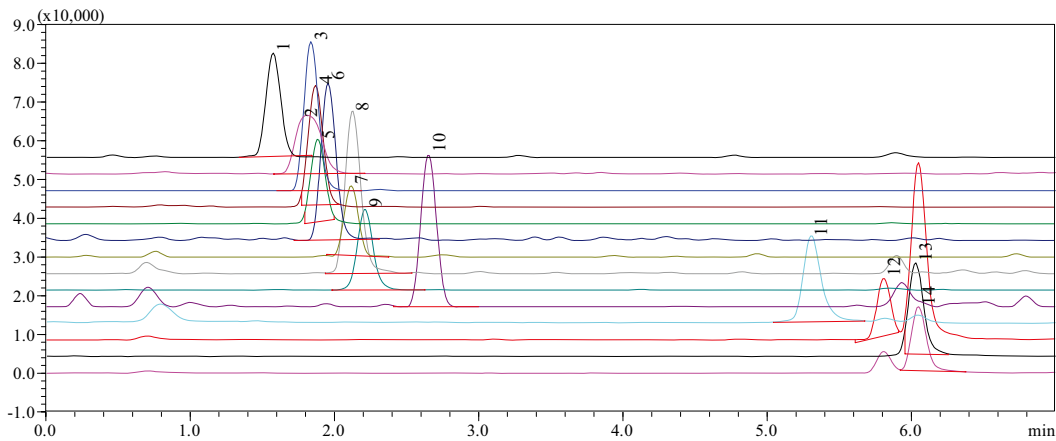


图15标准样品的MRM色谱图

(1、2.5 $\mu\text{g/L}$ 吡呱酸；2、5 $\mu\text{g/L}$ 依诺沙星；3、2.5 $\mu\text{g/L}$ 氧氟沙星；4、25 $\mu\text{g/L}$ 诺氟沙星；5、5 $\mu\text{g/L}$ 培氟沙星；6、5 $\mu\text{g/L}$ 环丙沙星；7、2.5 $\mu\text{g/L}$ 洛美沙星；8、5 $\mu\text{g/L}$ 达氟沙星；9、5 $\mu\text{g/L}$ 恩诺沙星；10、5 $\mu\text{g/L}$ 沙拉沙星；11、25 $\mu\text{g/L}$ 西诺沙星；12、2.5 $\mu\text{g/L}$ 噁喹酸；13、2.5 $\mu\text{g/L}$ 萘啶酸；14、2.5 $\mu\text{g/L}$ 氟甲喹)

2.3 线性范围

将不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 30~43 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 4。

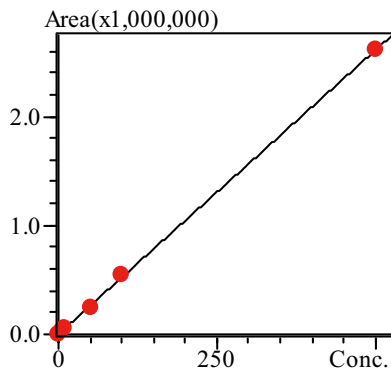


图16依诺沙星的校准曲线

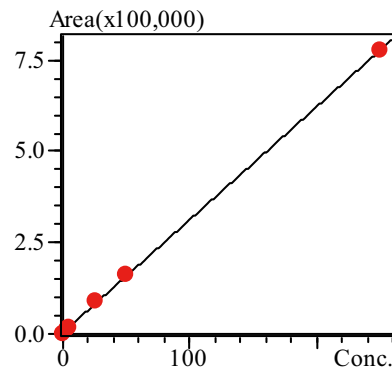


图17氧氟沙星的校准曲线

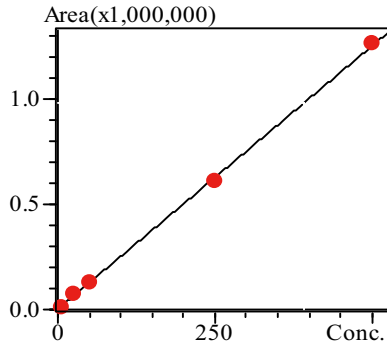


图18 诺氟沙星的校准曲线

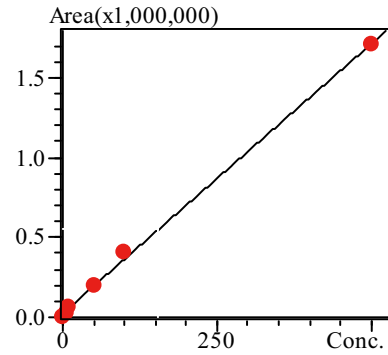


图19 培氟沙星的校准曲线

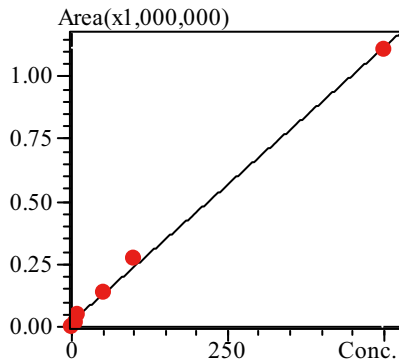


图20 环丙沙星的校准曲线

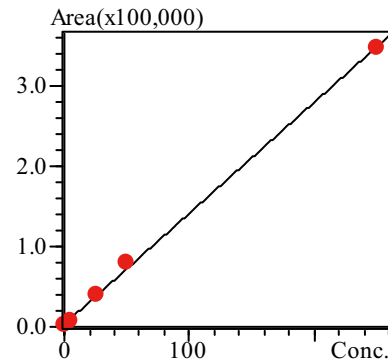


图21 洛美沙星的校准曲线

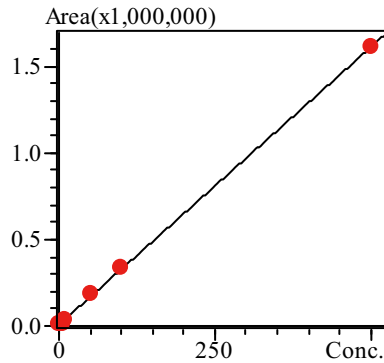


图22 达氟沙星的校准曲线

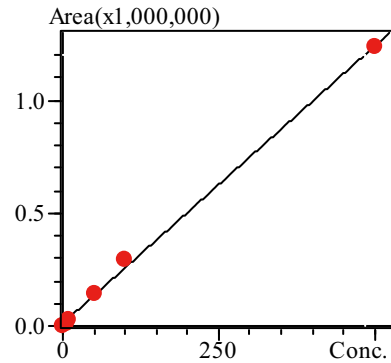


图23 恩诺沙星的校准曲线

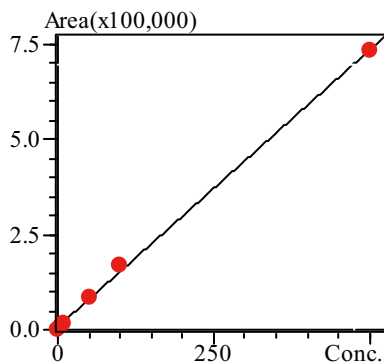


图24 沙拉沙星的校准曲线

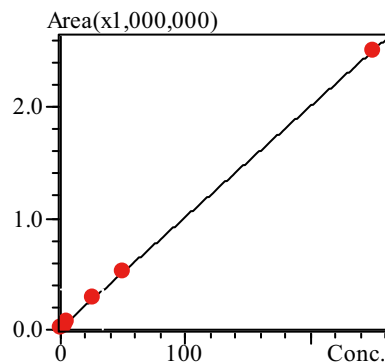


图25 恩替啶酸的校准曲线

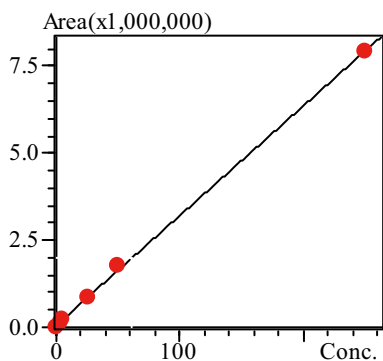


图26 氟甲喹的校准曲线

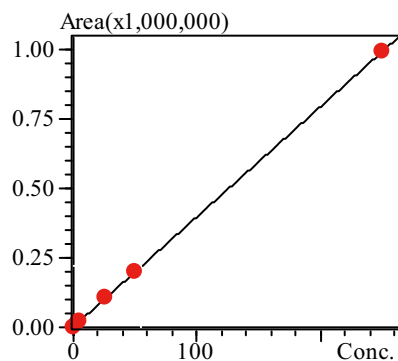


图27 吡嘧酸的校准曲线

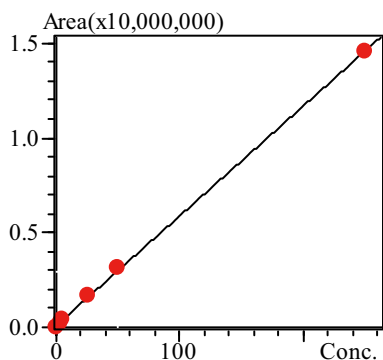


图28 吡嘧酸的校准曲线

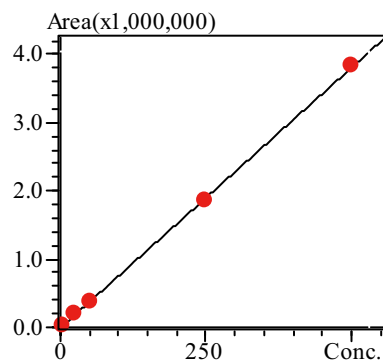


图29 西诺沙星的校准曲线

表4 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
1	依诺沙星	$Y = (5210.26)X + (3090.70)$	1.0~500	1.0000
2	氧氟沙星	$Y = (3088.28)X + (4327.79)$	0.5~250	0.9998
3	诺氟沙星	$Y = (2499.58)X + (1672.78)$	5~500	0.9998
4	培氟沙星	$Y = (3370.81)X + (26856.7)$	1.0~500	0.9993
5	环丙沙星	$Y = (2189.90)X + (21093.5)$	1.0~500	0.9992
6	洛美沙星	$Y = (1382.09)X + (3417.15)$	0.5~250	0.9995
7	达氟沙星	$Y = (3207.19)X + (7670.04)$	1.0~500	0.9999
8	恩诺沙星	$Y = (2457.58)X + (12362.3)$	1.0~500	0.9992
9	沙拉沙星	$Y = (1453.99)X + (7474.59)$	1.0~500	0.9994
10	噻啶酸	$Y = (9946.96)X + (18523.3)$	0.5~250	0.9999
11	氟甲喹	$Y = (31449.4)X + (66461.2)$	0.5~250	0.9998
12	吡嘧酸	$Y = (3955.87)X + (2805.99)$	0.5~250	1.0000
13	萘啶酸	$Y = (57834.6)X + (105320)$	0.5~250	0.9999
14	西诺沙星	$Y = (7624.15)X + (-8145.69)$	5~500	0.9998

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014 % ~ 0.437 % 和 1.309 % ~ 4.937% 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (5 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (50 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
依诺沙星	0.437	4.576	0.272	3.315	0.152	1.309
培氟沙星	0.158	4.419	0.248	3.974	0.065	1.762
环丙沙星	0.273	4.706	0.163	3.438	0.085	2.81
达氟沙星	0.143	3.545	0.186	3.172	0.079	2.468
恩诺沙星	0.212	4.756	0.225	3.75	0.099	2.719
沙拉沙星	0.238	4.353	0.06	1.918	0.119	2.622
	RSD% (2.5 µg/L)		RSD% (5 µg/L)		RSD% (25 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氧氟沙星	0.245	4.625	0.3	4.556	0.145	2.719
洛美沙星	0.188	4.937	0.14	4.052	0.119	2.916
噁喹酸	0.023	4.79	0.023	3.308	0.014	2.45
氟甲喹	0.018	2.934	0.014	2.184	0.019	2.251
吡呱酸	0.202	3.765	0.268	3.762	0.036	2.645
萘啶酸	0.057	4.633	0.01	2.592	0.046	2.738
	RSD% (25 µg/L)		RSD% (50 µg/L)		RSD% (250 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
诺氟沙星	0.2	3.989	0.252	2.864	0.069	2.706
西诺沙星	0.046	4.384	0.075	1.782	0.04	1.344

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将低浓度混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比和检出限（以 3 倍信噪比计算），依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、萘啶酸和西诺沙星的信噪比和方法检出限如表 6 所示。

表 6 信噪比(S/N)和方法检出限 (LOD)

名称	浓度水平 (µg/L)	S/N	LOD(ng/L)
依诺沙星	1.00	13.99	2.36
氧氟沙星	0.50	30.66	0.54
诺氟沙星	5.00	38.72	4.26
培氟沙星	1.00	46.99	0.70
环丙沙星	1.00	7.97	4.14
洛美沙星	0.50	50.95	0.32
达氟沙星	1.00	9.50	3.47
恩诺沙星	1.00	32.37	1.02
沙拉沙星	1.00	9.16	3.60
噁喹酸	0.50	39.59	0.42
氟甲喹	0.50	69.69	0.24
吡呱酸	0.50	26.84	0.61
萘啶酸	0.50	44.12	0.37
西诺沙星	5.00	29.67	5.56

2.6 加标回收率实验

以地表水为待测样品，检测 14 种喹诺酮类抗生素。在地表水中检测到萘啶酸，含量为 9.17 ng/L，色谱图如图 30。为了研究该前处理方法对不同浓度水样的提取效率，以 100 mL 水样为研究对象，分别加入不同量萘啶酸标准物质，水样的浓度分别为 50 ng/L、250 ng/L 和 500 ng/L，加标回收率分别为 90.0%、96.2% 和 80.8%。地表水加标样品的色谱图见图 31、图 32 和图 33。

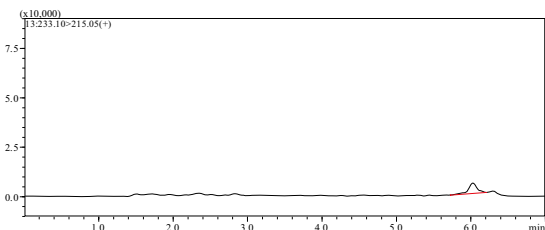


图 30 地表水样检测到萘啶酸色谱图

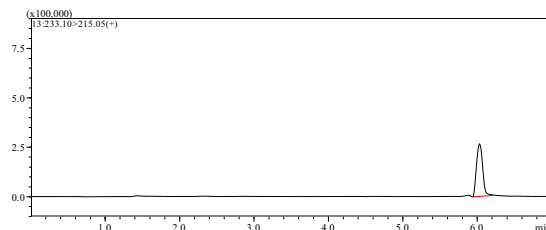


图 32 地表水样加标(250ng/L)色谱图

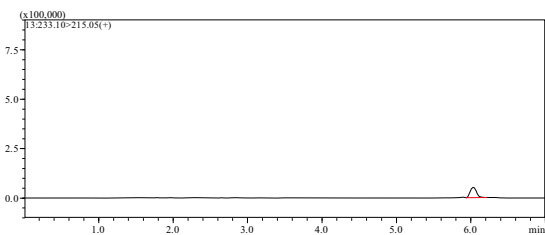


图 31 地表水样加标50 ng/L色谱图

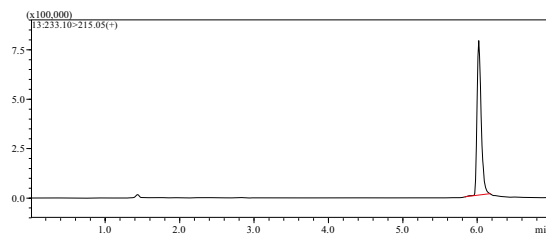


图 33 地表水样加标(500 ng/L)色谱图

结论

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 联用测定地表水中 14 种喹诺酮类抗生素的方法。该方法在 7.0 min 之内完成 14 种目标物的分离分析，且精密度高，线性范围宽，校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。在地表水中检测到萘啶酸，含量为 9.17 ng/L，萘啶酸的加标回收率在 80.8% ~96.2% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏高的特点，适合大规模环境水体喹诺酮类抗生素污染现状的调研工作。