

LC-MS/MS 法测定生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留

LCMSMS-647

摘要： 本文参考江苏省预防医学会发布的团体标准《T/JPMA 004-2019 生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了快速分析方法。该方法采用内标法定量，线性关系良好，相关系数均大于 0.997；取 0.5 $\mu\text{g/L}$ 浓度标准溶液连续进样 6 针，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04~0.09% 和 1.25~4.76% 之间，仪器精密度良好；平均加标回收率在 62.7%~113.3% 之间，回收率良好。该方法灵敏可靠，可供相关行业人员参考使用。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 生活饮用水 β -内酰胺

近几十年来，抗生素受到广泛的使用，不仅作为人类和动物的治疗药物，还作为畜牧业和水产养殖业的生长促进剂。大量的使用使得抗生素广泛的残留在环境中，环境中的抗生素主要有三个来源：农用兽药、医用药物及污水处理厂出水的排放。 β -内酰胺类抗生素是目前生产和使用最多的抗生素种类之一，在不同的环境基质中都能检出其残留，对人体健康及生态系统构成了长期的潜在风险。

为规范生活饮用水中 β -内酰胺类药物残留的测定，江苏省预防医学会发布了团体标准《T/JPMA 004-2019 生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留的测定 液相色谱 - 串联质谱法》。本文以此为参考，使用岛津 LCMS-8050 液质联用仪，建立了一套快速检测生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留量的方法，该方法灵敏可靠，可为相关从业人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B X3

柱温箱：CTO-40C

质谱仪：LCMS-8050

工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm \times 2.1mm I.D., 1.9 μm , 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30807-02)

流动相：A 相 -0.05% 甲酸水溶液，B 相 - 甲醇 - 乙腈 (2: 3) 溶液

流速：0.3 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 3%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	3
1.10	Pumps	Pump B Conc.	15
9.50	Pumps	Pump B Conc.	75
9.60	Pumps	Pump B Conc.	95

11.50	Pumps	Pump B Conc.	95
11.60	Pumps	Pump B Conc.	3
17.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 管温度: 150°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	化合物	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	氨苄西林	69-53-4	350.10	106.10*	-12.0	-22.0	-19.0
				160.10	-23.0	-17.0	-28.0
2	头孢氨苄	15686-71-2	348.10	158.10*	-10.0	-11.0	-10.0
				174.20	-23.0	-15.0	-29.0
3	头孢唑林杂质 A	30246-33-4	345.00	185.10*	-12.0	-13.0	-11.0
				108.10	-17.0	-34.0	-18.0
4	阿洛西林	37091-66-0	462.10	246.10*	-10.0	-14.0	-25.0
				218.10	-22.0	-23.0	-22.0
5	头孢拉定	38821-53-3	350.10	176.20*	-10.0	-15.0	-11.0
				158.10	-17.0	-16.0	-15.0
6	苄青霉素	265989-30-8	312.10	200.10*	-11.0	-17.0	-19.0
				226.10	-11.0	-16.0	-23.0
7	苯唑西林	1173-88-2	434.10	160.10*	-30.0	-19.0	-30.0
				144.10	-12.0	-35.0	-14.0
8	双氯青霉素	3116-76-5	470.00	160.10*	-13.0	-16.0	-16.0
				311.00	-13.0	-18.0	-20.0
9	头孢匹林酸	21593-23-7	424.00	292.10*	-12.0	-17.0	-30.0
				152.10	-12.0	-24.0	-15.0
10	氯唑西林	61-72-3	468.10	160.10*	-13.0	-19.0	-30.0
				178.10	-13.0	-34.0	-17.0
11	头孢噻唑	80370-57-6	524.00	241.10*	-26.0	-18.0	-10.0
				210.00	-26.0	-22.0	-21.0
12	哌拉西林	61477-96-1	518.10	143.20*	-34.0	-22.0	-28.0
				160.20	-36.0	-14.0	-25.0
13	青霉素 G	69-57-8	367.10	160.10*	-10.0	-18.0	-15.0
				217.10	-18.0	-23.0	-23.0
14	青霉素 V	87-08-1	383.10	160.10*	-11.0	-18.0	-10.0
				114.10	-26.0	-37.0	-21.0

15	萘夫西林	985-16-0	415.10	199.10* 171.20	-15.0 -15.0	-18.0 -39.0	-20.0 -17.0
16	头孢噻肟酸	63527-52-6	456.00	125.10* 167.20	-16.0 -10.0	-50.0 -23.0	-21.0 -10.0
17	青霉素 G-D7	-	342.10	183.10	-12.0	-16.0	-18.0
18	头孢氨苄 -D5	-	353.10	158.10	-10.0	-11.0	-10.0
19	青霉素 V-D5	-	356.10	160.10	-17.0	-15.0	-30.0

* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

混合抗生素标准中间液 (10 µg/mL): 分别准确吸取各单一标准储备液, 用甲醇稀释至刻度, 配制成浓度为 10 µg/mL 的混合标准中间液。

混合抗生素内标化合物标准中间液: 分别吸取单一内标储备液, 用甲醇稀释至刻度, 配制成 2 µg/mL 的混合内标中间液。

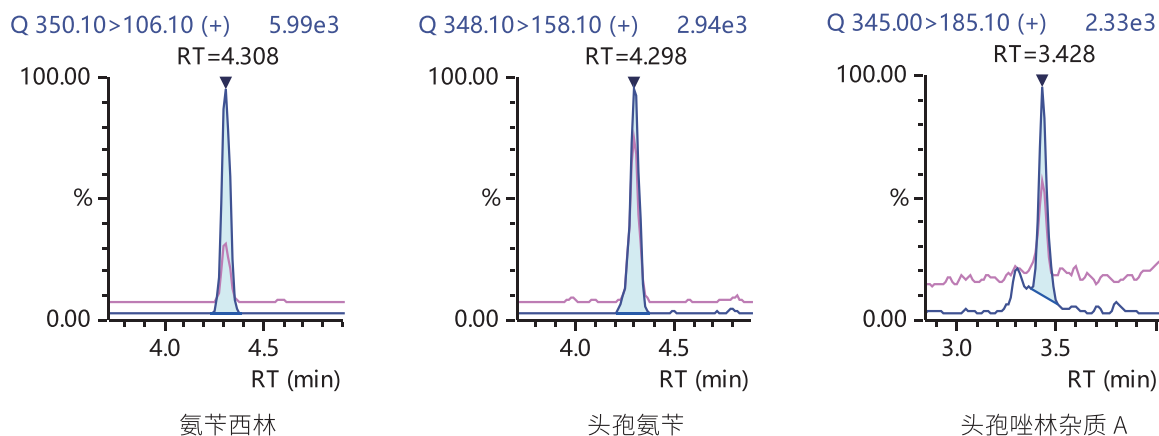
混合标准溶液: 用甲醇水溶液将抗生素标准中间液配制成混合标准系列溶液, 如 0.05 µg/L、0.1 µg/L、0.2 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、2 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L、100 µg/L, 各系列溶液中混合内标化合物浓度均为 10 µg/L, 液相色谱 - 串联质谱仪测定。临用现配。

1.4 样品前处理

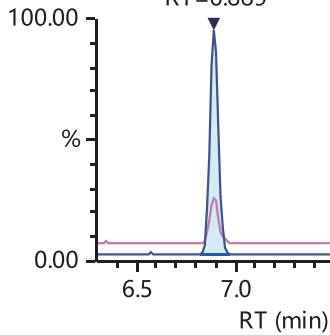
水样经溶剂过滤器 (配有玻璃纤维滤膜) 过滤, 量取 500 mL 水样, 加入 5 µL 混合内标溶液, 充分混匀后, 用 HLB 固相萃取柱 (500 mg/6 mL, 上样前依次用 10.0 mL 甲醇和 10.0 mL 纯水活化平衡) 进行富集净化, 上样流量为 20 mL/min。上样结束后, 先用 5.0 mL 的纯水以 2 mL/min 的流量进行淋洗, 再用氮气正压干燥固相萃取柱 15 min, 最后用 6.0 mL 甲醇以 2 mL/min 的流量洗脱待测物于试管中。将洗脱液置于 35°C 氮吹仪中浓缩至近干, 用 0.5 mL 甲醇水溶液复溶, 涡旋溶解 1 min, 微孔滤膜过滤, 供仪器测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

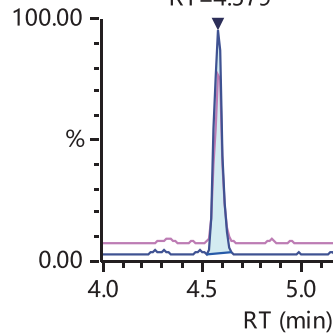


Q 462.10>218.10 (+) 6.86e3
RT=6.889



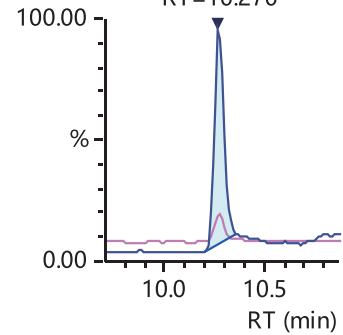
阿洛西林

Q 350.10>176.20 (+) 2.13e3
RT=4.579



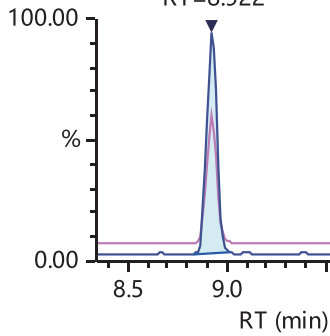
头孢拉定

Q 312.10>200.10 (+) 1.50e4
RT=10.270



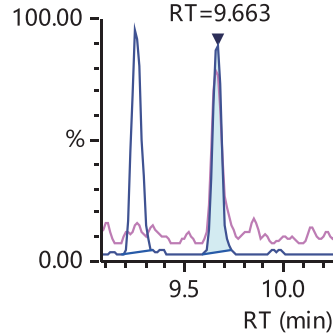
苜青霉素

Q 434.10>160.10 (+) 8.57e3
RT=8.922



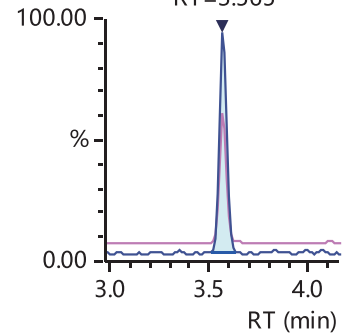
苜唑西林

Q 470.00>160.10 (+) 1.07e3
RT=9.663



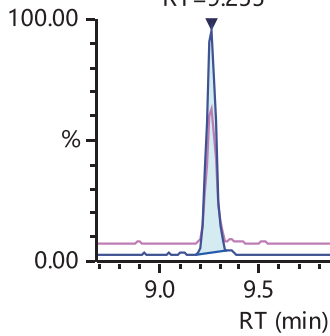
双氯青霉素

Q 424.00>292.10 (+) 4.65e3
RT=3.565



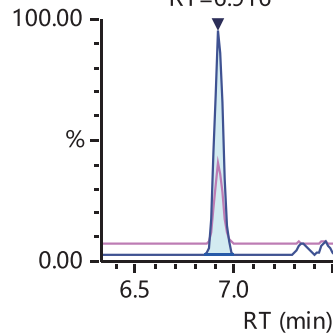
头孢匹林酸

Q 468.10>160.10 (+) 3.59e3
RT=9.255



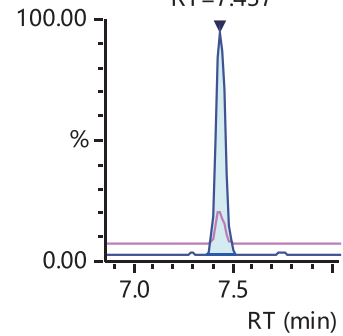
氯唑西林

Q 524.00>241.10 (+) 5.13e3
RT=6.916



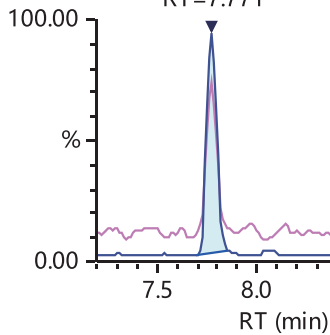
头孢噻味

Q 518.10>143.20 (+) 2.87e3
RT=7.437



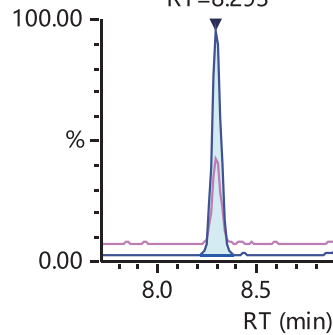
派拉西林

Q 367.10>160.10 (+) 3.71e3
RT=7.771



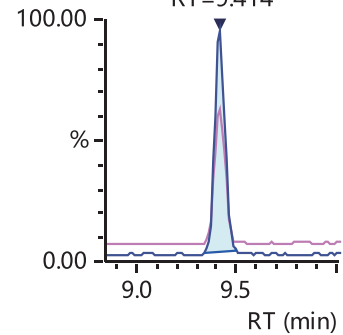
青霉素 G

Q 383.10>160.10 (+) 1.49e4
RT=8.293



青霉素 V

Q 415.10>199.10 (+) 9.80e3
RT=9.414



苜夫西林

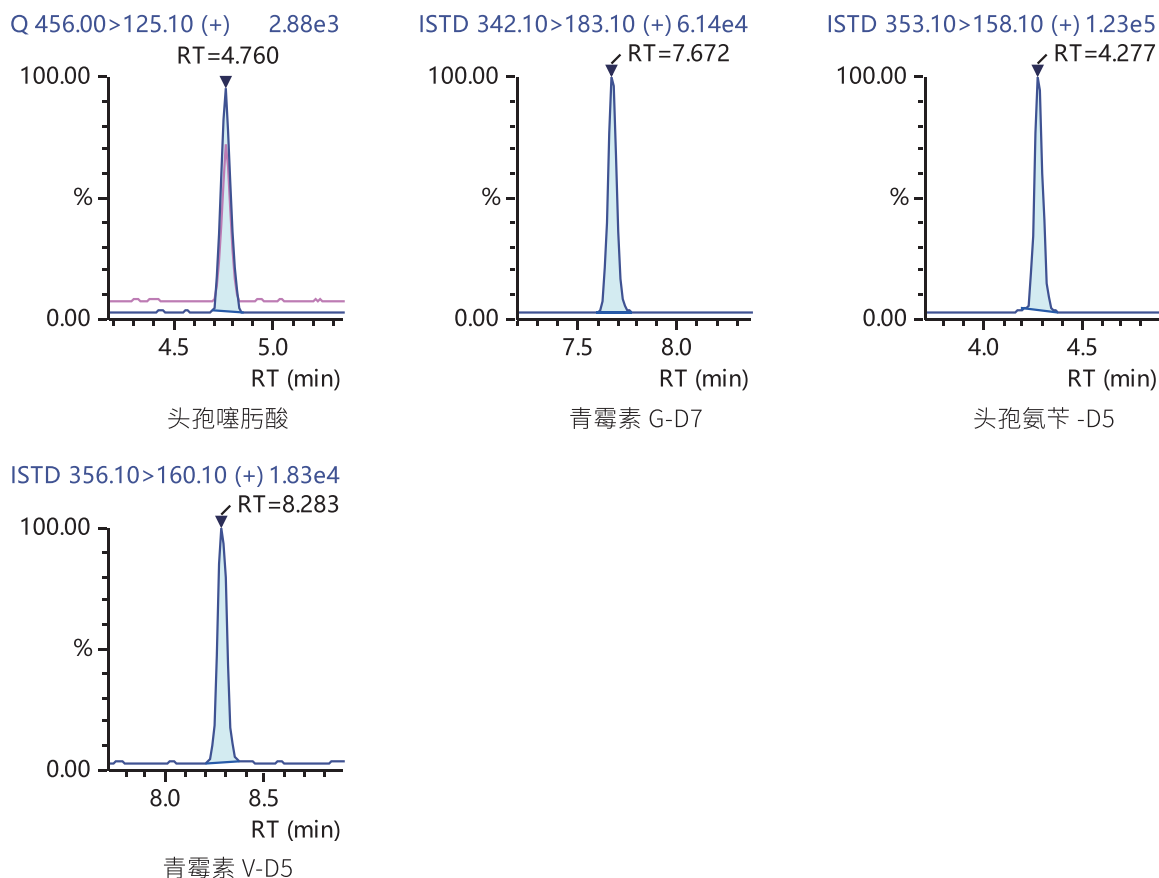


图1 16种β-内酰胺(0.2 μg/L)及3种内标(10 μg/L)的混合标准溶液MRM色谱图

2.2 校准曲线

取标准溶液等体积进样测定,采用内标法定量。青霉素G以青霉素G-D7为内标,青霉素V、双氯青霉素以青霉素V-D5为内标,头孢氨苄、头孢拉定、头孢噻肟酸、氯唑西林、萘夫西林、苯唑西林、头孢噻唑、头孢匹林酸、哌拉西林、氨苄西林、头孢唑林杂质A、阿洛西林、苄青霉素以头孢氨苄-D5为内标。以浓度比为横坐标,峰面积比为纵坐标,绘制校准曲线,所得16种化合物的校准曲线线性关系良好。线性方程、线性范围、相关系数见表3。

表3 16种化合物校准曲线参数

No.	化合物	校准曲线	相关系数 r	线性范围 (μg/L)
1	氨苄西林	$Y = (2.20662)X + (0.00523996)$	0.9995	0.2-100
2	头孢氨苄	$Y = (1.14048)X + (0.00477027)$	0.9979	0.2-100
3	头孢唑林杂质 A	$Y = (0.806767)X + (0.00141473)$	0.9975	0.2-100
4	阿洛西林	$Y = (2.76882)X + (0.00428756)$	0.9991	0.1-50
5	头孢拉定	$Y = (0.802018)X + (0.00170912)$	0.9983	0.2-100
6	苄青霉素	$Y = (7.42939)X + (-0.0112485)$	0.9985	0.1-50
7	苯唑西林	$Y = (3.94339)X + (0.00144069)$	0.9992	0.1-50
8	双氯青霉素	$Y = (2.58537)X + (0.00180001)$	0.9992	0.1-100
9	头孢匹林酸	$Y = (1.54748)X + (0.00245849)$	0.9994	0.2-100
10	氯唑西林	$Y = (1.49636)X + (-0.000917212)$	0.9982	0.05-50
11	头孢噻唑	$Y = (1.96341)X + (0.00185238)$	0.9987	0.1-50
12	哌拉西林	$Y = (1.33689)X + (0.000277836)$	0.9983	0.2-100

13	青霉素 G	$Y = (3.34275)X + (-0.00332057)$	0.9995	0.1-50
14	青霉素 V	$Y = (34.7156)X + (0.0590019)$	0.9995	0.2-100
15	萘夫西林	$Y = (4.54709)X + (0.00634772)$	0.9981	0.2-100
16	头孢噻肟酸	$Y = (1.32342)X + (0.00201285)$	0.9977	0.2-100

2.3 精密度实验

对 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液连续测定 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 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04~0.09% 和 1.25~4.76% 之间，仪器精密度良好。

表 4 精密度考察结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	氨苄西林	0.07	3.29
2	头孢氨苄	0.08	3.49
3	头孢唑林杂质 A	0.08	3.85
4	阿洛西林	0.06	1.25
5	头孢拉定	0.08	4.34
6	苄青霉素	0.04	3.62
7	苯唑西林	0.05	1.55
8	双氯青霉素	0.05	3.34
9	头孢匹林酸	0.08	3.65
10	氯唑西林	0.04	3.02
11	头孢噻唑	0.07	4.53
12	哌拉西林	0.06	2.80
13	青霉素 G	0.05	4.76
14	青霉素 V	0.04	1.58
15	萘夫西林	0.05	1.79
16	头孢噻肟酸	0.09	3.44

2.4 回收率考察

取空白水样品，精密加入混合对照品溶液（添加量参照团体标准 T/JPMA 004-2019 中的方法定量限，以氨苄西林计为 0.6 ng/L ），按 1.4 供试品溶液的制备进行样品前处理，回收率测定结果见表 5。结果表明，16 种化合物的平均回收率在 62.7~113.3% 之间。

表 5 回收率考察结果 (n=3)

No.	化合物	加标浓度 (ng/L)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	氨苄西林	0.6	106.4	7.48
2	头孢氨苄	1.5	104.1	2.39
3	头孢唑林杂质 A	1.5	113.3	4.31
4	阿洛西林	0.6	99.4	3.31
5	头孢拉定	1.5	94.3	4.16
6	苄青霉素	0.6	62.7	10.85
7	苯唑西林	0.3	100.4	3.14
8	双氯青霉素	0.3	109.5	2.02

9	头孢匹林酸	1.5	81.9	0.38
10	氯唑西林	0.3	93.2	4.95
11	头孢噻吩	0.6	108.6	3.43
12	哌拉西林	1.0	105.5	3.85
13	青霉素 G	0.3	110.9	3.30
14	青霉素 V	0.3	103.9	1.76
15	萘夫西林	0.3	101.9	1.90
16	头孢噻肟酸	5.0	94.7	2.15

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用建立了快速测定生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留的分析方法。该方法线性范围宽、重复性好、准确度高，满足团体标准《T/JPMA 004-2019 生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留的测定 液相色谱 - 串联质谱法》的检测要求，可以作为生活饮用水中 16 种 β -内酰胺类药物残留量的监测方法，供相关行业检测人员参考。

岛津应用云

