

LC-MS/MS 检测水中 17 种氟喹诺酮类抗生素

LCMSMS-926

摘要：本文参考《水质 17 种氟喹诺酮类抗生素的测定 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法》征求意见稿，建立了 17 种氟喹诺酮类抗生素的检测方法。方法验证结果表明：在考察的线性范围内，线性相关系数大于 0.995，线性良好，高中低标准溶液重复进 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差不高于 0.20% 和 9.65%，仪器重复性良好，加标回收率在 80.2-133.7% 之间。该方法灵敏度高且结果准确，可为水中氟喹诺酮类抗生素的检测提供参考。

关键词：三重四极杆质谱 水 氟喹诺酮类抗生素

技术特点：

- ❖ 应对《水质 17 种氟喹诺酮类抗生素的测定 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法》征求意见稿，灵敏度和分析时间优于标准；
- ❖ 使用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进行积分，可有效消除噪音峰，方便准确。

氟喹诺酮类抗生素 (FQs) 是畜牧养殖业中广泛使用的广谱性抗菌剂，该抗生素施用于动物后，大部分以抗生素原药或代谢物的形式经动物排泄物排出，对地表水、土壤及沉积物、地下水等造成污染，影响动物、植物和微生物的正常生命活动，并通过食物链最终影响人类的健康，因此，FQs 是一种在环境中一类新型污染物，具有巨大的生态风险。

目前，FQs 的检测方法主要有检测方法包括毛细管电泳分析法，酶联免疫吸附法、气相色谱法 (ECD)、液相色谱质谱联用等。毛细管电泳法速度快，

灵敏度低，检出限高；酶联免疫吸附法检测速度快，但存在交叉反应。高效液相色谱联用质谱法灵敏度高，选择性好，是 FQs 比较理想的分析方法。

本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，参考《水质 17 种氟喹诺酮类抗生素的测定 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法》征求意见稿，建立了 17 种 FQs 的检测方法。该方法可在 12 min 内完成 17 种 FQs 的定性定量分析，可供相关检测人员参考使用。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：	Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30001-04)		
流动相：	A 相 - 5mM 甲酸铵 +0.5% 甲酸水溶液; B 相 - 甲醇		
流速：	0.30 mL/min	进样体积：	1 μL

柱 温 : 40°C

洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 35%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	35
5.50	泵	B.Conc	55
6.00	泵	B.Conc	95
8.50	泵	B.Conc	95
8.60	泵	B.Conc	35
12.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+

接口温度 : 300°C

接口电压 : 4.5 kV

D L 温度 : 250°C

雾化气流速 : 氮气 3.0 L/min

加热块温度 : 400°C

加热气流速 : 空气 10 L/min

驻留时间 : 10 ms

干燥气流速 : 氮气 10 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

碰撞气 : 氦气 230 kPa

MRM 参数 : 见表 2

表 2 17 种 FQs MRM 采集参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais (V)	CE(V)	Q3 Pre Bais (V)	内标
1	马波沙星	363.1	72.1*	-18	-24	-28	环丙沙星 -D8
			320.1	-18	-16	-20	
2	氟罗沙星	370.1	326.1*	-18	-19	-14	恩诺沙星 -D5
			269.1	-18	-27	-27	
3	氧氟沙星	362.0	318.1*	-13	-19	-20	恩诺沙星 -D5
			261.1	-13	-27	-26	
4	培氟沙星	334.0	316.1*	-12	-21	-20	环丙沙星 -D8
			290.2	-12	-18	-18	
5	依诺沙星	321.0	303.1*	-12	-21	-19	环丙沙星 -D8
			232.1	-16	-35	-23	
6	诺氟沙星	320.2	302.2*	-16	-21	-19	环丙沙星 -D8
			231.05	-12	-38	-14	
7	环丙沙星	332.1	314.1*	-16	-21	-20	环丙沙星 -D8
			288.1	-16	-19	-27	
8	恩诺沙星	360.1	316.1*	-13	-20	-26	恩诺沙星 -D5
			245.2	-13	-28	-20	

9	达氟沙星	358.0	340.1* 82.2	-18 -26	-24 -43	-21 -30	恩诺沙星 -D5
10	洛美沙星	352.1	265.1* 308.1	-25 -10	-24 -18	-26 -13	恩诺沙星 -D5
11	奥比沙星	396.0	352.1* 295.1	-14 -14	-19 -24	-15 -30	恩诺沙星 -D5
12	二氟沙星	399.9	356.1* 299.1	-20 -20	-20 -29	-16 -30	恩诺沙星 -D5
13	沙拉沙星	386.1	368.1* 342.1	-19 -11	-24 -19	-24 -23	恩诺沙星 -D5
14	加替沙星	376.0	261.1* 332.1	-19 -14	-33 -18	-26 -21	恩诺沙星 -D5
15	莫西沙星	402.0	384.1* 358.2*	-11 -11	-22 -20	-17 -23	环丙沙星 -D8
16	氟甲喹	261.9	244.0* 202.0	-10 -13	-19 -33	-10 -19	氟甲喹 -13C3
17	那氟沙星	361.0	343.1* 283.1	-13 -13	-23 -39	-22 -28	氟甲喹 -13C3
18	环丙沙星 -D8	340.0	322.1* 296.2	-12 -17	-22 -19	-20 -19	/
19	恩诺沙星 -D5	365.0	347.1* 321.2	-13 -13	-22 -20	-22 -14	/
20	氟甲喹 -13C3	265.1	247.1* 205.1	-10 -20	-18 -33	-24 -19	/

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

水样恢复至室温，充分混匀，经滤膜过滤，弃去至少 1 mL 初滤液后，移取 1.0 mL 滤液于样品瓶中，加入 10 μ L 内标工作溶液（其中环丙沙星 -D8、恩诺沙星 -D5 浓度为 1 mg/L；氟甲喹 -13C3 浓度为 0.2 mg/L），混匀待测。

1.4 校准曲线的制备

吸取适量混合标准中间液，使用 pH 值为 2 的盐酸溶液进行逐级稀释，浓度为 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL，取 1 mL 的系列标准溶液，再加入 10 μ L 内标工作溶液，混匀后供液相色谱 - 串联质谱测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

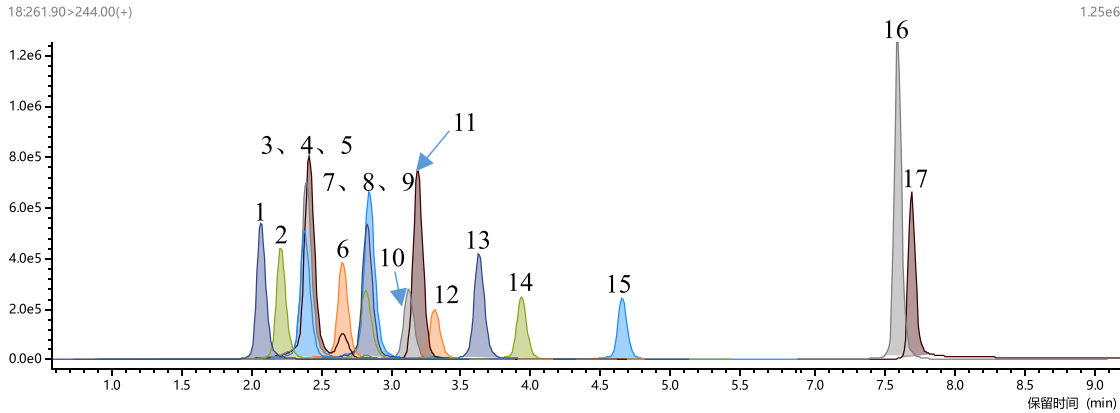
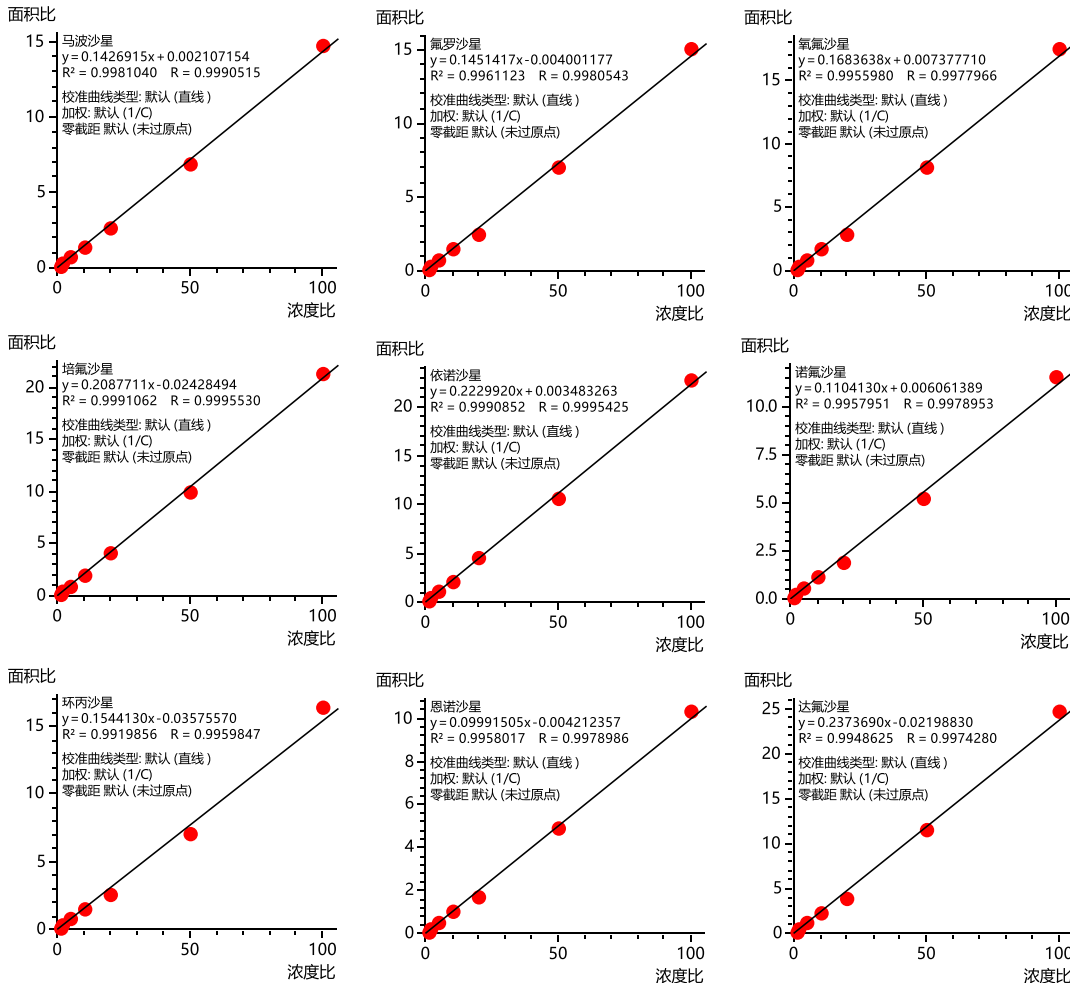


图 1 17 种 FQs (10 ng/mL) 的 MRM 图谱 (出峰序号见表 2)

2.2 线性范围

将上述混合标准系列工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用内法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比值为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示，17 种 FQs 线性相关系数 R 均大于 0.995，线性良好。以 1 ng/mL 标准溶液重复进 7 次，采用 $MDL = t_{(n-1,0.99)} * S$ 计算方法检出限，其中 $t_{(n-1,0.99)}$ 为自由度为 n-1，置信度为 99% 时的 t 分布，S 为 7 次平均测定的标准偏差。17 种 FQs 方法检出限见表 3。



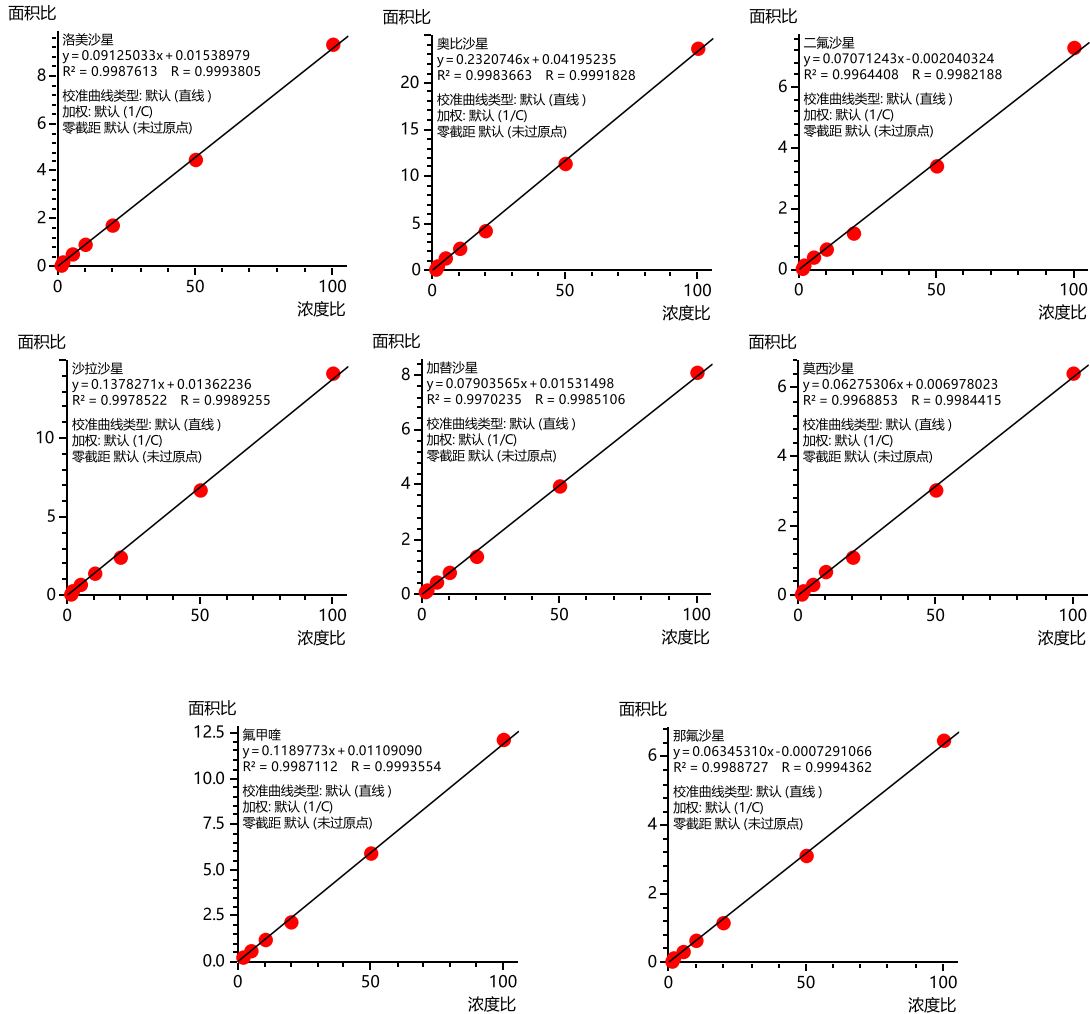


图 2 17 种 FQs 校准曲线

表 3 标准曲线信息

No.	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
1	马波沙星	1-100	0.9990	89.4~109.4	0.01
2	氟罗沙星	1-100	0.9995	91.4~106.2	0.01
3	氧氟沙星	1-100	0.9993	90.0~110.3	0.01
4	培氟沙星	1-100	0.9987	886~108.8	0.01
5	依诺沙星	1-100	0.9997	88.7~109.8	0.01
6	诺氟沙星	1-100	0.9991	86.11~115.0	0.01
7	环丙沙星	1-100	0.9987	87.0~110.6	0.01
8	恩诺沙星	1-100	0.9990	89.8~112.6	0.01
9	达氟沙星	1-100	0.9989	82.1~108.4	0.02
10	洛美沙星	1-100	0.9987	96.6~116.5	0.01
11	奥比沙星	1-100	0.9998	91.8~106.8	0.01

12	二氟沙星	1-100	0.9995	88.0-109.5	0.01
13	沙拉沙星	1-100	0.9988	83.0-114.1	0.02
14	加替沙星	1-100	0.9992	87.0-119.4	0.01
15	莫西沙星	1-100	0.9988	88.0-103.4	0.02
16	氟甲喹	1-100	0.9996	93.9-106.2	0.01
17	那氟沙星	1-100	0.9988	90.2~113.3	0.01

2.3 精密度实验

对 2、10、50 ng/mL 不同浓度的 FQs 混合标准工作溶液连续测定 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：17 种 FQs 的保留时间和峰面积相对标准偏差不高于 0.20% 和 9.65%，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	2 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
		R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%
1	马波沙星	0.09	1.82yi	0.08	3.89	0.04	0.43
2	氟罗沙星	0.12	2.89	0.06	4.52	0.05	3.56
3	氧氟沙星	0.10	1.77	0.04	1.78	0.04	1.03
4	培氟沙星	0.13	5.09	0.04	2.94	0.06	0.90
5	依诺沙星	0.09	4.81	0.03	1.72	0.04	0.96
6	诺氟沙星	0.13	4.47	0.07	5.18	0.03	1.33
7	环丙沙星	0.13	5.46	0.05	1.91	0.03	1.50
8	恩诺沙星	0.13	3.72	0.02	2.35	0.03	1.04
9	达氟沙星	0.17	3.96	0.03	2.26	0.04	2.82
10	洛美沙星	0.10	5.21	0.03	1.37	0.04	0.50
11	奥比沙星	0.07	4.00	0.04	1.01	0.07	0.49
12	二氟沙星	0.10	3.20	0.03	2.43	0.06	1.69
13	沙拉沙星	0.16	4.28	0.06	1.09	0.06	1.13
14	加替沙星	0.07	3.49	0.03	3.53	0.07	0.85
15	莫西沙星	0.11	3.81	0.07	4.50	0.07	0.89
16	氟甲喹	0.03	3.60	0.03	1.17	0.05	0.14
17	那氟沙星	0.03	9.65	0.03	5.28	0.05	0.67

2.4 加标回收率实验

取生活污水样品，加入 17 种 FQs 混合标准品储备溶液，加标浓度分别为 2、10、50 ng/mL，按照 1.3 平行处理 3 份，17 种 FQs 平均加标回收率结果在 80.2-133.7% 之间（见表 5）。

表 5 加标回收率结果 (n=3)

序号	化合物名称	样品浓度 (ng/mL)	加标 2 ng/mL		加标 10 ng/mL		加标 50 ng/mL	
			回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	马波沙星	N.D.	93.0	2.49	88.5	3.95	80.2	4.52
2	氟罗沙星	N.D.	97.0	3.10	108.7	4.59	90.9	0.88
3	氧氟沙星	N.D.	106.5	3.12	103.6	4.59	84.9	0.92
4	培氟沙星	N.D.	80.5	5.76	82.7	1.12	88.3	4.14
5	依诺沙星	N.D.	81.5	1.23	91.0	2.64	92.1	4.22
6	诺氟沙星	N.D.	91.0	5.78	96.0	1.63	81.7	1.76
7	环丙沙星	N.D.	102.5	3.66	101.5	2.65	88.7	3.78
8	恩诺沙星	N.D.	100.0	4.16	105.6	3.74	91.0	0.94
9	达氟沙星	N.D.	80.5	3.11	90.5	7.99	81.2	0.86
10	洛美沙星	N.D.	102.0	9.54	121.4	2.86	102.3	0.53
11	奥比沙星	N.D.	96.0	1.59	131.8	2.87	109.0	1.15
12	二氟沙星	N.D.	94.5	0.81	123.7	1.73	117.7	1.83
13	沙拉沙星	N.D.	106.0	6.25	133.7	1.80	111.8	1.77
14	加替沙星	N.D.	90.5	0.64	119.3	0.35	107.6	0.50
15	莫西沙星	N.D.	95.0	4.08	91.7	0.76	84.5	2.66
16	氟甲喹	N.D.	98.0	1.06	105.5	0.66	92.9	0.70
17	那氟沙星	N.D.	92.0	5.51	95.0	4.42	93.4	0.22

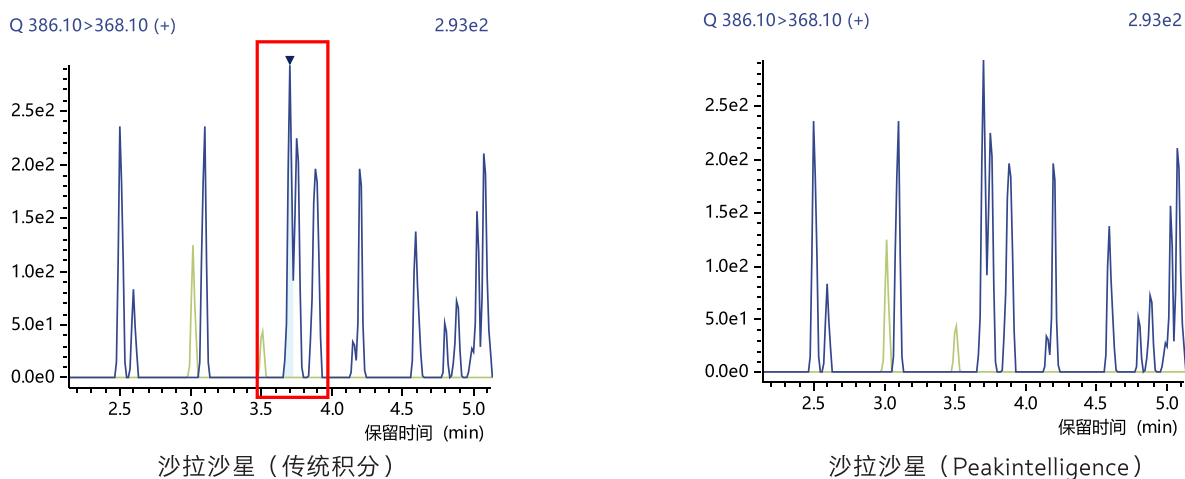


图 3 传统积分同 Peakintelligence™积分效果对比图

在传统的积分模式下，有可能会将噪音识别成目标峰（如图 3 左图），需要手动进行确认和删除。使用 Peakintelligence™自动积分模式，软件可自动判别为噪音而不识别，可大大降低数据处理工作量。

■ 结论

本文参考《水质 17 种氟喹诺酮类抗生素的测定 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法》征求意见稿，建立了 17 种氟喹诺酮类抗生素的检测方法。方法验证结果表明：在考察的线性范围内，线性良好，高中低标准溶液重复进 6 次，仪器重复性良好，加标回收率在 88.3-116.8% 之间，方法准确可靠。该方法可为水中氟喹诺酮类抗生素检测提供良好的参考。

岛津应用云

