

分析与监测

超高效液相色谱串联质谱测定中水中喹诺酮类抗生素

王建凤^{1,2}, 王嘉琦², 刘喆², 王颖², 冯月超², 杜振霞¹, 贾丽²,
范筱京²

(1. 北京化工大学 分析测试中心, 北京 100029; 2. 北京市理化分析测试中心 北京市食品安全分析测试工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 建立了检测中水中14种喹诺酮类抗生素残留的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)方法。水样通过HLB固相萃取小柱富集后,经C18色谱柱分离,运用乙腈-0.2%甲酸的10 mmol/L 甲酸铵溶液进行梯度洗脱,质谱仪检测。采用电喷雾正模式电离(ESI^+),多反应监测(MRM)模式进行检测,外标法定量。在1~100 ng/mL的线性范围内,各物质的线性关系良好,线性相关系数均 ≥ 0.991 ,方法的检出限为0.2~1.0 ng/L,定量限为0.5~2.0 ng/L,回收率稳定, $\text{RSD} \leq 16\%$ 。该方法方便、准确,适用于中水中抗生素的痕量分析。

关键词: 中水; 喹诺酮类; UPLC-MS/MS

中图分类号: X832 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)06-0116-04

Determination of Quinolones Antibiotics in Reclaimed Water by Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer

WANG Jian-feng^{1,2}, WANG Jia-qi², LIU Zhe², WANG Ying², FENG Yue-chao²,
DU Zhen-xia¹, JIA Li², FAN Xiao-jing²

(1. Analysis and Testing Center, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing Engineering Research Center of Food Safety Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: A method for the determination of 14 quinolones antibiotics residues in reclaimed water by ultra performance liquid chromatography (UPLC-MS/MS) was developed. Water samples are firstly enriched by HLB solid phase extraction, then separated by C18 column and eluted with acetonitrile and 10 mmol/L ammonium formate solution with 0.2% formic acid included, the mass spectrometer is used for finally detection. The samples were ionized by positive electrospray ionization mode(ESI^+), detected by multiple reaction mode (MRM), and quantified by external standard method. In the range of 1~100 ng/mL, the regression equation of the antibiotics showed good liner relationship, and the linear correlation coefficients were no less than 0.991. The limits of detection and quantification were 0.2~1.0 ng/L and 0.5~2.0 ng/L respectively. As a result, the recoveries were stable, and the RSDs were less than

16%。The method is convenient and accurate, and could be applied to the trace analysis of antibiotics in reclaimed water.

Key words: reclaimed water; quinolones; UPLC-MS/MS

抗生素滥用危害较大,中国地表水的污染最大的是喹诺酮类和磺胺类^[1]。喹诺酮类的检测主要有液相色谱法、液相色谱串联质谱法^[2]。

中水,比自来水经济,比污水环保。《城市污水再生利用 农田灌溉用水水质》(GB 20922—2007)中对于新型有机污染物——药品及个人护理用品(PPCPs)参数限制较少,鉴于其在水中较难处理,目前暴露出水环境中抗生素残留问题的风险^[3]。笔者以中水为研究对象,运用超高效液相色谱-串联质谱,建立14种喹诺酮类抗生素高通量、高灵敏度检测方法,同时将该方法应用于中水中该类抗生素的检测。14种喹诺酮类抗生素包括双氟沙星(A)、沙拉沙星(B)、西诺沙星(C)、奥索利酸(D)、氟甲喹(E)、萘啶酸(F)、氧氟沙星(G)、恩诺沙星(H)、达氟沙星(I)、培氟沙星(J)、环丙沙星(K)、依诺沙星(L)、诺氟沙星(M)、吡哌酸(N)。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-三重串联四极杆质谱联用仪(TQ-S)、HLB固相萃取小柱(6 mL,500 mg)(美国Waters公司),VORTEX GENIE2涡旋振荡器(美国Scientific公司),N-EVAP112氮吹仪(美国Orbomation公司),KQ-500DE数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),CR22G高速冷冻离心机(日本Hitachi公司),Sartorius电子天平(精确至0.0001 g)(德国Sartorius公司),Suplucio固相萃取装置(安捷伦公司)。甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)。

1.2 样品前处理

准确量取500 mL水样,过滤,调节水样pH值为6.0,运用HLB固相萃取柱净化(使用前分别用6 mL甲醇、6 mL水进行活化),控制流速不超过5 mL/min,待水样完全流出后,抽干固相萃取小柱,用6 mL甲醇洗脱,收集洗脱液,氮吹浓缩,待洗脱液近干后,加入1.0 mL初始流动相溶解残渣,混匀,过0.22 μm滤膜,进行UPLC-MS/MS分析。

1.3 仪器条件

1.3.1 仪器色谱条件

色谱柱:BEH C18 色谱柱(1.7 μm,2.1 × 50

mm);流动相A':甲醇;流动相B':含0.2%甲酸的10 mmol/L甲酸铵;流速:0.2 mL/min;柱温:30℃;进样量:5 μL。

梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Mobile phase gradient elution procedure

时间/min	A'/%	B'/%
0	10	90
0.5	10	90
1.5	15	85
4.5	18	82
5.0	20	80
5.5	25	75
7.5	95	5
8.0	10	90
10.0	10	90

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI源),正模式检测,毛细管电压为3.0 kV,离子源温度为150℃,脱溶剂温度为400℃,锥孔气流速为150 L/h,脱溶剂气流速为800 L/h,多反应监测模式,各待测物监测离子对相关电压参数见文献[4]。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

分别配制浓度为100 ng/mL的各标准品,运用Intellistart进行自动调谐,通过改变锥孔电压,得到最强的分子离子峰 $[M+H]^+$ 的峰,通过改变碰撞能量,得到定性定量离子,从而使得各物质的灵敏度最强。

2.2 色谱条件的优化

通过甲醇-0.2%甲酸体系、甲醇-含0.2%甲酸的10 mmol/L甲酸铵水溶液体系,发现各物质在甲醇-含0.2%甲酸的10 mmol/L甲酸铵水溶液体系中响应较强,因此选择甲醇-含0.2%甲酸的10 mmol/L甲酸铵水溶液体系。

2.3 样品pH值的优化

比较了样品pH值改变时各化合物的提取效率,结果如图1所示,综合所有物质灵敏度,选择调节样品溶液的pH值为4。

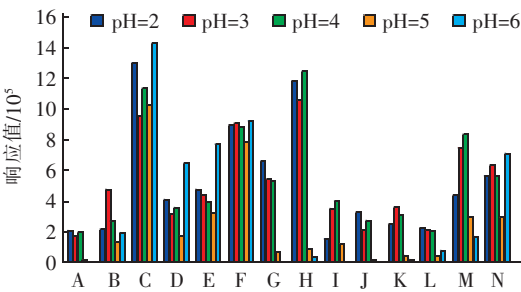


图 1 样品溶液 pH 值对提取效率的影响

Fig. 1 Effect of the pH of the sample solution on the extraction efficiency

2.4 EDTA 的优化

根据相关文献报道,往水样中加入 EDTA 二钠,可以络合水体中的重金属离子,避免这些重金属元素与目标抗生素发生反应而降低回收率。因此对是否加入 EDTA 二钠进行了考察,实验结果表明,加入 EDTA 二钠效果不明显,因此实验最终选择不加 EDTA 二钠。

2.5 固相萃取条件的优化

由于部分物质具有羧基和酚羟基,因此考察了固相萃取过程中是否需要甲酸活化、甲酸淋洗等条件,选择以下四种不同条件:a: 甲醇和水活化,水淋

洗;b: 甲醇、水、0.2% 甲酸活化,水淋洗;c: 甲醇、水、0.2% 甲酸活化,0.2% 甲酸淋洗;d: 甲醇、水、0.2% 甲酸活化,0.2% 甲酸、水分别淋洗。实验结果如图 2 所示,最终选择 a 条件进行固相萃取,简单方便。

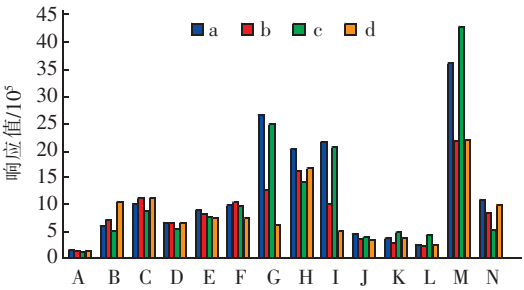


图 2 固相萃取条件优化

Fig. 2 Optimization of solid phase extraction conditions

2.6 线性范围、线性方程和检出限量限

对所建立的方法进行方法学考察,配制标准溶液并进行线性拟合,结果如表 2 所示。由表 2 中的数据可见,各物质在 1 ~ 100 ng/mL 范围线性关系良好,线性相关系数均不小于 0.991,以信噪比分别为 3 : 1 和 10 : 1 对各物质的检出限和定量限进行考察,结果也见表 2。

表 2 待测物线性范围、方程、相关系数及 LOD、LOQ

Tab. 2 Linear range, equation, correlation coefficient and LOD, LOQ of analytes

项目	线性范围/(ng · mL ⁻¹)	线性方程	r ²	检出限/(ng · L ⁻¹)	定量限/(ng · L ⁻¹)
A	1 ~ 100	y = 30 229x + 18 050	0.999	0.6	2.0
B	1 ~ 100	y = 1 121x - 550	1.000	0.6	2.0
C	1 ~ 100	y = 121 099x + 1 932	1.000	0.2	1.0
D	1 ~ 100	y = 13 040x - 8 232	1.000	0.6	2.0
E	1 ~ 100	y = 164 974x + 464 157	0.991	0.2	1.0
F	1 ~ 100	y = 317 468x + 302 238	0.991	0.2	0.5
G	1 ~ 100	y = 42 345x + 50 562	0.992	0.2	0.5
H	1 ~ 100	y = 33 917x - 47 858	0.995	0.6	2.0
I	1 ~ 100	y = 5 868x - 8 049	0.999	0.2	0.5
J	1 ~ 100	y = 10 541x - 5 070	0.997	0.2	1.0
K	1 ~ 100	y = 20 864x + 145	0.991	0.2	1.0
L	1 ~ 100	y = 834x - 2 084	0.993	1.0	2.0
M	1 ~ 100	y = 16 051x - 15 988	0.993	0.6	2.0
N	1 ~ 100	y = 1 720x + 250	1.000	0.5	1.0

2.7 回收率和精密度

取空白(阴性样本)的中水水样,分别向其中加入 20、40、140 ng/L 喹诺酮类混合标准溶液进行加标回收试验,平行测定 6 次,测定结果如表 3 所示。由表 3 中的数据可见,在中高添加浓度时,有 9 种物

质的回收率介于 50% ~ 100%, 5 种物质的回收率介于 37% ~ 54%, RSD 均不超过 16%。与高浓度相比,大部分物质低浓度回收率有所降低,因此在实际样品的测定中可通过回收率校正,检测出其准确含量。

表 3 待测物准确度及精密度实验结果

Tab. 3 Results of recoveries and precision tests %

项 目	平均回收率±相对标准偏差		
	20 ng/L	40 ng/L	140 ng/L
添加水平			
A	44.38±2.80	66.99±0.71	71.50±1.72
B	31.22±2.22	37.87±1.15	44.08±3.12
C	82.05±15.47	86.32±0.47	98.33±5.11
D	55.37±4.37	58.05±5.39	70.64±6.08
E	53.40±3.36	85.02±03.79	79.39±1.06
F	64.22±2.00	89.06±3.05	78.47±2.26
G	49.63±2.79	61.27±1.08	84.71±1.14
H	41.94±14.63	69.96±0.67	51.71±12.92
I	41.72±2.02	45.55±4.86	41.13±0.67
J	47.90±4.12	50.95±3.40	63.74±15.02
K	35.02±0.47	44.92±2.26	50.27±5.77
L	39.51±1.91	50.27±2.38	54.64±3.41
M	28.59±2.38	37.51±3.78	39.70±8.70
N	36.08±1.81	53.08±11.31	45.70±12.09

2. 8 实际样品的测定

将该方法应用于北京三个小区的实际中水样品的测定,结果见表 4。共计有氧氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、诺氟沙星四种物质的阳性检出,浓度介于 9.35 ~ 300.82 ng/L。

表 4 实际样品含量的测定结果

Tab. 4 Determination results of actual sample

项目	ng · L ⁻¹			
	氧氟沙星	培氟沙星	依诺沙星	诺氟沙星
样品 1	42.17		37.35	9.35
样品 2	106.18	300.82	283.34	177.16
样品 3	92.77		62.97	97.96

3 结语

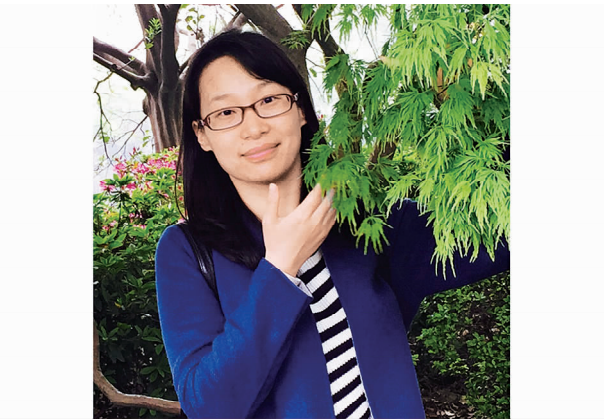
建立了中水中喹诺酮类抗生素残留的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。水样通过 HLB 固相萃取小柱富集后,经 C18 色谱柱分离,运用乙腈-含甲酸的甲酸铵溶液进行梯度洗脱,质谱仪检测。电喷雾正模式电离(ESI⁺),多反应监测(MRM)模式进行检测,在 1 ~ 100 ng/mL 的线性范围内,各物质的线性关系良好,线性相关系数均≥ 0.991,方法的检出限为 0.2 ~ 1.0 ng/L,定量限为 0.5 ~ 2.0 ng/L,回收率稳定,RSD≤16%。

参考文献:

[1] 章强,辛琦,朱静敏,等. 中国主要水域抗生素污染现状及其生态环境效应研究进展[J]. 环境化学,2014,33(7):1075-1083.

Zhang Qiang, Xin Qi, Zhu Jingmin, *et al.* The antibiotic contaminations in the main water bodies in China and the associated environmental and human health impacts[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33 (7): 1075 - 1083 (in Chinese).

[2] 任珂君,刘玉,徐健荣,等. 广东一饮用水源地河流沉积物及鱼体中氟喹诺酮类(FQs)抗生素残留特征研究[J]. 环境科学学报,2016,36(3):760-766.
Ren Kejun, Liu Yu, Xu Jianrong, *et al.* Residues characteristics of fluoroquinolones (FQs) in the river sediments and fish tissues in a drinking water protection area of Guangdong Province[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(3): 760 - 766 (in Chinese).
[3] 吴青峰,洪汉烈, Li Zhao-hui. 环境中抗生素污染物的研究进展[J]. 安全与环境工程, 2010, 17(2): 68 - 72.
Wu Qingfeng, Hong Hanlie, Li Zhaohui. Progress of research on antibiotic contamination[J]. Safety and Environmental Engineering, 2010, 17 (2): 68 - 72 (in Chinese).
[4] 冯月超,王颖,王建凤,等. 液质联用法同时测定火锅调料中 15 种喹诺酮类抗生素[J]. 分析实验室, 2016, 35(8): 924 - 927.
Feng Yuechao, Wang Ying, Wang Jianfeng, *et al.* Simultaneous determination of 15 quinolones in Chinese hotpot ingredient by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2016, 35(8): 924 - 927 (in Chinese).



作者简介:王建凤(1987-),女,山西吕梁人,硕士,助理研究员,主要从事食品中添加剂、农药、兽药等残留以及环境中水溶性离子、有毒有害物质等研究及测试工作,共发表 12 篇科技论文,其中 4 篇被 SCI 收录。

E-mail: wangj871218@163.com

收稿日期:2017-06-06