

· 监测技术 ·

超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法 测定水中喹诺酮类抗生素

顾海东,尹燕敏,秦宏兵

(苏州市环境监测中心站,江苏 苏州 215004)

摘要: 采用固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法同时测定水中环丙沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、洛美沙星、诺氟沙星等5种喹诺酮类抗生素,优化了前处理和分离检测条件。5种目标化合物在6.5 min内完成分析,在1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~ 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性良好,方法检出限为0.3 ng/L ~ 1.0 ng/L ,空白和实际水样加标回收率为81.5% ~ 116%,平行测定的RSD为6.0% ~ 14.1%。

关键词: 喹诺酮类抗生素;固相萃取;超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法;水质

中图分类号: O657.63

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2013)03-0034-04

Determination of Quinolones in Water Samples by Solid Phase Extraction-Ultra Performance Liquid Chromatography Electro-spray Tandem Mass Spectrometry

GU Hai-dong, YIN Yan-min, QIN Hong-bing

(Suzhou Environmental Monitoring Center, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

Abstract: A rapid analytical method for simultaneous determination of five quinolones (QNs) including ciprofloxacin, ofloxacin, enrofloxacin, lomefloxacin and norfloxacin in water sample was developed. Under optimizing process of extraction, separation and determination, the five antibiotics were analyzed within 6.5 min. The results showed good linearity ranging from 1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, and detection limits of 5 QNs between 0.3 ng/L and 1.0 ng/L . The average recoveries rate of blank and real samples were in the range of 81.5% ~ 116% with the RSDs between 6.0% and 14.1%.

Key words: Quinolone; SPE; UPLC-MS/MS; Water quality

喹诺酮类抗生素(QNs)被大量用于人类和动物医疗,还被添加于饲料中,以提高饲料利用率和促进动物生长。抗生素摄入后大部分以原药和代谢产物的形式随粪、尿排出体外^[1],成为新的环境污染物质,并以多种途径进入河水、地表水甚至饮用水及土壤^[2]中。近年来,喹诺酮类抗生素在水体、土壤中^[3-4]普遍被检出,在环境中主要以痕量存在,在水体中的质量浓度通常在 ng/L 到 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的水平^[5]。

目前检测喹诺酮类抗生素的方法很多,包括免疫法、薄层色谱法(TLC)、高效毛细管电泳法(HPCE)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法

(HPLC)和液质联用技术,其中最常用的方法是高效液相色谱法,分别使用紫外(UV)、荧光(FLD)、二极管阵列(DAD)和质谱(MS,MS/MS)检测器^[6-7]。液质联用技术由于其较高的灵敏度^[8-9],被广泛应用于环境中喹诺酮类的检测。今采用固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定环丙沙星(CIP)、氧氟沙星(OFL)、恩诺沙星

收稿日期:2012-09-26;修订日期:2013-02-27

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项基金资助项目(2009ZX07313-007);江苏省环境监测科研基金资助项目(1006)

作者简介:顾海东(1973—),男,江苏大丰人,高级工程师,硕士,从事环境有机污染物监测与研究。

(ENR)、洛美沙星(LOM)、诺氟沙星(NOR)等 5 种喹诺酮类抗生素,优化了前处理和分离检测条件,应用于实际水样分析,灵敏度高,定量准确。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Waters Acquity UPLC/Xevo TQMS 超高效液相色谱三重四级杆质谱联用仪,UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm 21 mm × 50 mm),美国 Waters 公司;6 位 Autotrace SPE 全自动固相萃取仪,美国 Caliper 公司;MG-2200 型氮吹仪,日本 EYELA 公司。

CIP、OFL、ENR、LOM、NOR 标准物质,均购于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH;乙腈(色谱纯),德国 Merck 公司;甲醇(色谱纯),德国 Merck 公司;甲酸(色谱纯),美国 Tedia 公司;氢氧化钠(优级纯),国药集团化学试剂有限公司;硫酸(优级纯);Na₂EDTA(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯;试验用水为蒸馏水或去离子水。

1.2 仪器分析条件

色谱条件:柱温 40 °C,进样体积 1 μL,流动相由 0.1% 甲酸溶液(A)和甲醇(B)组成,梯度洗脱程序见表 1,流量为 0.2 mL/min。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution of QNs

时间 t/min	φ(A) /%	φ(B) /%
0	85	15
5	80	20
5.01	85	15

质谱条件:采用正离子电喷雾离子源(ESI⁺),多反应监测(MRM)模式,质谱条件见表 2。

表 2 质谱条件

Table 2 MS conditions of QNs

化合物	母离子	子离子	停留时间 t/s	锥孔电压 U/V	碰撞能量 Q/eV
OFL	362.1	178.8	0.05	30	44
		205.0	0.05	30	38
		218.6	0.05	30	40
ENR	360.1	72.1	0.05	32	32
		84.0	0.05	32	32
		189.0	0.05	32	46
LOM	352.1	194.7	0.05	30	44
		237.0	0.05	30	34

续表

化合物	母离子	子离子	停留时间 t/s	锥孔电压 U/V	碰撞能量 Q/eV
CIP	332.1	251.0	0.05	30	24
		203.2	0.05	30	36
		231.0	0.05	30	34
		245.1	0.05	30	24
NOR	320.1	205.0	0.05	32	34
		205.5	0.05	32	40
		233.1	0.05	32	22

1.3 样品分析

固相萃取小柱依次用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、6 mL Na₂EDTA 溶液活化。在 500 mL 水样中加入 3 g Na₂EDTA,调节 pH 值后过小柱,富集完成后用 10 mL 水淋洗,氮吹 20 min,用 10 mL 洗脱液洗脱。收集洗脱液,氮吹至近干后用初始流动相定容,过 0.2 μm 膜后进样分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

甲醇和乙腈是液相色谱常用的流动相。对大部分目标物而言,以甲醇为流动相可获得比乙腈更高的灵敏度,这是由于甲醇比乙腈更易电离,目标物离子化效率高,分析灵敏度较高。试验比较了在相同的仪器条件下,流动相分别为甲醇、乙腈时目标物的响应,发现以甲醇为流动相时,灵敏度略高于乙腈,因而采用甲醇体系为流动相。喹诺酮类抗生素均为两性化合物,在流动相中加入甲酸,可有效改善峰形,提高离子化效率。试验发现,在不加甲酸的条件下,喹诺酮类的出峰时间大大推迟,而甲酸体积分数超过 0.2% 时,仪器响应有下降趋势。因此,该试验选择甲酸的体积分数为 0.1%。

2.2 质谱条件优化

根据待测物的化学结构,5 种喹诺酮类抗生素均适合在 ESI 源的正离子模式下离子化。采用多反应监测(MRM)模式,其母离子均为 [M + H]⁺,去溶剂气为氮气,流量 1 000 mL/h,碰撞气为氩气,流量 0.15 mL/min。将标准物质用甲醇稀释为 1.00 mg/L 5 种喹诺酮类抗生素混合标准溶液,通过 Infusion 方式将目标化合物直接引入三重四级杆质谱,进行质谱参数优化。调整碰撞能量,寻找母离子对应的子离子,利用 Masslynx 软件的 Intel-listart 功能,自动选择子离子,优化锥孔电压、碰撞能量等参数。

2.3 固相萃取条件优化

试验采用美国 Waters 公司的 Oasis HLB 固相萃取小柱, HLB 柱填充的是亲水、亲脂平衡的水可浸润型反相吸附剂。分别考察了 HLB 柱和普通 C₁₈ 小柱对喹诺酮类的萃取效果, 结果表明, HLB 柱对目标化合物的萃取效率更高。因此, 该试验采用 HLB 柱富集和净化水样。

影响固相萃取富集效率的因素包括样品 pH 值、洗脱溶液类型、上样流量等。采用空白加标的方式优化上述因素。比较了 pH 值分别为 3 和 7 时空白加标水样的提取效率, 结果表明, 当 pH 值为 3 时, 提取效率明显更高。因此, 水样和活化小柱用的 Na₂EDTA 溶液均用 1 mol/L 硫酸溶液调节 pH 值为 3。

实际水样中通常含有一定量的金属离子, 易与抗生素螯合, 给提取带来困难。加入 EDTA, 能有效减少抗生素与金属离子的螯合^[10]。用 Cu²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 做干扰试验, 发现当有上述离子存在时, 目标化合物的回收率为 11.4% ~ 59.6%; 加入 EDTA 后, 回收率为 68.4% ~ 92.1%, 且测定结果相对稳定。因此, 该试验加入 EDTA, 以螯合部分金属离子。

分别以甲醇、乙腈和酸化的甲醇(含 0.1% 甲酸)为洗脱液进行洗脱, 发现甲醇和乙腈的洗脱效率明显低于酸化的甲醇。因此, 洗脱液采用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液。

当上样流量分别为 5 mL/min、10 mL/min 时, 空白加标回收率无显著差异, 该试验选择上样流量为 10 mL/min。

2.4 方法线性范围与检出限

5 种喹诺酮类抗生素标准物质(20.0 μg/L) 总离子流见图 1。

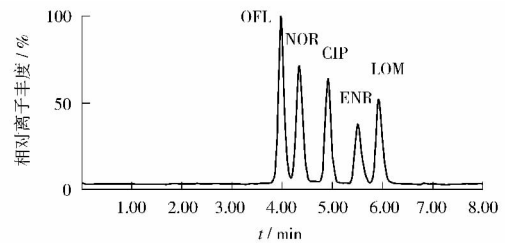


图1 5种喹诺酮类抗生素标准物质(20.0 μg/L) 总离子流

Fig. 1 TIC of 5 standards (20.0 μg/L)

将喹诺酮类标准储备液(100 mg/L) 用甲醇-0.1% 甲酸溶液(体积比为 15:85) 稀释配制成标准溶液系列(1.00 μg/L ~ 100 μg/L), 在上述仪器条件下分析。以定量离子对的响应面积和对应的质量浓度进行线性回归, 得到标准曲线, 线性关系良好, 回归方程和相关系数见表 3。

以 2 ~ 5 倍基线噪声响应对应的浓度进行空白加标, 以 3 倍信噪比(S/N) 估算方法检出限, 结果见表 3。

表3 5种喹诺酮类抗生素的保留时间、回归方程、相关系数和检出限

Table 3 Retention time (RT), linear equations, correlation coefficients and detection limits (DLs) of QNs

化合物	保留时间 <i>t</i> /min	回归方程	相关系数 <i>R</i>	方法检出限 ρ /(ng · L ⁻¹)
OFL	3.98	$Y = 91.3X - 72.8$	0.998 8	0.3
ENR	5.51	$Y = 39.6X - 45.8$	0.998 5	0.7
LOM	5.92	$Y = 48.8X - 63.8$	0.997 6	0.6
CIP	4.92	$Y = 58.0X - 65.1$	0.997 1	0.4
NOR	4.34	$Y = 17.5X - 20.4$	0.993 7	1.0

2.5 精密度与加标回收试验

在空白水样和实际水样中分别添加 10 ng 和

100 ng 目标化合物, 进行加标回收试验, 采用外标法定量, 结果见表 4。

表4 精密度与加标回收试验结果

(*n* = 3)

Table 4 Test results of recoveries

(*n* = 3)

化合物	样品类型	测定值 ρ /(ng · L ⁻¹)	加标质量 <i>m</i> /ng	平均回收率/%	RSD/%
OFL	空白水样	—	10	93.4	9.4
		—	100	112	7.1

续表

化合物	样品类型	测定值 $\rho / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	加标质量 m / ng	平均回收率 / %	RSD / %
ENR	实际水样	7.4	10	92.8	8.7
		5.9	100	88.1	6.8
	空白水样	—	10	115	9.1
		—	100	105	8.5
LOM	实际水样	—	10	86.5	7.6
		—	100	81.8	7.3
	空白水样	—	10	94.4	10.9
		—	100	116	6.0
CIP	实际水样	—	10	83.4	12.4
		1.5	100	93.1	8.1
	空白水样	—	10	88.9	8.9
		—	100	94.8	8.3
NOR	实际水样	—	10	81.9	9.9
		—	100	93.3	7.6
	空白水样	—	10	81.5	11.9
		—	100	97.1	10.2
	实际水样	—	10	82.4	14.1
		1.6	100	94.6	8.4

3 结语

采用固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定水中 5 种喹诺酮类抗生素,在 6.5 min 内完成分析,5 种目标化合物的方法检出限为 0.3 ng/L ~ 1.0 ng/L,空白水样和实际水样的加标回收率分别为 81.5% ~ 116% 和 81.8% ~ 94.6%。该法具有快速、简便、灵敏、绿色环保等特点,适用于环保行业对喹诺酮类抗生素的检测。

[参考文献]

- [1] MCARDELL C S, MOLNAR E, SUTER M J F, et al. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland [J]. Environ. Sci. Technol 2003, 37: 5479 - 5486.
- [2] YE Z Q, WEINBERG H S, MEYER M T. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. Anal. Chem, 2007, 79: 1135 - 1144.
- [3] MIAO X S, BISHAY F, CHEN M, et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada [J]. Environ. Sci. Technol 2004, 38: 3533 - 3541.
- [4] GOLET E M, STREHLER A, ALDER A C, et al. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and

sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction [J]. Anal. Chem, 2002, 74: 5455 - 5462.

- [5] LI B, ZHANG T, XU Z Y, et al. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal. Chim. Acta 2009(645): 64 - 72.
- [6] RENEW J E, HUANG C H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J. Chromatogr. A 2004(1042): 113 - 121.
- [7] GOLET E M, ALDER A C, HARTMANN A, et al. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Anal. Chem 2001, 73: 3632 - 3638.
- [8] 宋俊密, 丁海霞, 段爱玲, 等. 高效液相色谱-电喷雾电离质谱法测定地表水中微囊藻毒素 [J]. 环境监测管理与技术, 2011, 23(6): 65 - 67.
- [9] 张川, 胡冠九, 孙成. UPLC-ESI-MS/MS 法同时测定水中 7 种抗生素 [J]. 环境监测管理与技术 2009, 21(3): 37 - 40.
- [10] EL-KOMMOS M E, SALEH G A, EL-GIZAWI S M, et al. Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterials using metal chelation [J]. Talanta 2003, 60(5): 1033 - 1050.