DOI:10.3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 04. 010　·公共卫生·

# HPLC-MS/MS 法测定济宁市区河水中 4 种喹诺酮类抗生素残留

张　凯[1]　公维磊[1]　倪永付[2]　刘杰锋[3▲]　慕明伟[3▲]

([1] 济宁医学院法医学与医学检验学院,济宁 272067;[2] 济宁出入境检验检疫局,济宁 272000;
[3] 济宁医学院,济宁 272067)

**摘　要　目的**　采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定济宁市区河水中诺司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸、氟甲喹 4 种喹诺酮类抗生素,以探索济宁市区河水中喹诺酮类抗生素的污染现状。**方法**　采集的水样经 HLB 固相萃取柱富集,真空干燥后,先用 0.5% 甲醇淋洗再用甲醇洗脱,氮吹浓缩至 0.1ml 以下,最后用 0.1% 甲醇定容至 0.5ml,以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相上机检测。采用 Hypersil GOLD-1.9μm,50mm×2.1mm(i.d)色谱柱分离,在电喷雾离子源(electrospray ion source,ESI)、正离子模式、多重反应监测(multi-reaction monitoring,MRM)模式下测定,外标法定量。**结果**　所测 4 种喹诺酮类化合物均在浓度为 5~200μg/L 的线性范围内,线性关系良好,相关系数 $R^2$ 均 >0.99,回收率 81.9%~115.0%,相对标准偏差均 <10%,定量限为 10μg/L,市区河水所采集的 20 个样品未检出司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸,但均检出氟甲喹,且均低于定量限 10μg/L。**结论**　济宁市区河水中诺司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸在检出限内均未检出,所有水样均检测出氟甲喹,含量较低,但应引起有关部门注意,观察长期效应。

**关键词**　固相萃取;高效液相色谱-串联质谱;喹诺酮类抗生素

**中图分类号**:O657　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2018)08-264-04

## Determination of 4 kinds of common quinolone antibiotics in the river water of Jining urban area by solid phase extraction – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry

*ZHANG Kai*[1], *GONG Weilei*[1], *NI Yongfu*[2], *LIU Jiefeng*[3▲], *MU Mingwei*[3▲]

([1] *School of Forensic and Laboratory Medicine*, *Jining Medical University*, *Jining* 272067, *China*;
[2] *Jining entry and exit inspection and Quarantine Bureau*, *Jining* 272000, *China*;
[3] *Jining Medical University*, *Jining* 272000, *China*)

**Abstract**: ***Objective***　To determine four kinds of quinolone antibiotics, including nobsparfloxacin, lomefloxacin, naphthalic and flumequine in the river water of Jining urban area by solid phase extraction – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, in order to explore the river water pollution status of quinolone antibiotics in the area. ***Methods***　Water samples were enriched by HLB solid phase extraction column. After vacuum drying, the samples were eluted with 0.5% methanol and then with methanol. The samples were concentrated to 0.1 ml or less by organomation, and finally diluted with 0.1% methanol to 0.5 ml. The solution of formic acid water – acetonitrile was used as mobile phase on the machine detection. The samples were separated by Hypersil GOLD – 1.9μm, 50mm × 2.1mm (id), and determined in the mode of electerspray ion source (ESI), positive ion mode, multi – reaction monitoring (MRM) mode, and quantified by external standard method. ***Results***　The 4 kinds of quinolone antibiotics had good linear relation ($R_2$ > 0.99) at the range of 5μg/L ~ 200μg/L. The recoveries were in the range of 81.9% ~ 115.0%. The relative

---

▲ 刘杰锋,慕明伟,济宁医学院 2013 级卫生检验与检疫专业学生

standard deviations were less than 10% and the limit of quantification was 10μg/L. Nobsparfloxacin, lomefloxacin and naphthalic were not detected in the 20 samples collected from the urban river. However, flumequine was detected in all samples, but the concentrations were below 10μg/L. ***Conclusion*** Nobsparfloxacin, lomefloxacin and naphthalic in the river water of Jining urban area were not detected within the detection limit. Flumequine was detected with low concentration in all water samples. The results suggested that the relevant departments should pay more attention to observe the long - term effect of flumequine in the river water of Jining urban area.

**Keywords**: Solid phase extraction; High performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry; Quinolone antibiotics

抗生素(SAs)是最常见的抗菌药物之一,由于使用频繁,许多水体中都有可能产生残留,我国许多地区的水环境中都被检出过[1-2]。水体中抗生素残留浓度通常在 μg/L 或 ng/L 的水平[3-4]。虽然大多数抗生素的半衰期短,但由于使用频繁并易进入水体环境,导致形成“假持续”现象,进而对人类及整个生态系统构成产生长期的潜在危害。其中喹诺酮药物因其具有抗菌谱广、抗菌作用强、不良反应小及价格低廉等特点而广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的预防和治疗[5]。济宁市区河流较多,许多支流途径市区、多家医院、养殖场等,为了解目前济宁市区河水中喹诺酮类抗生素的现状,评价其河水治理的水平。本文采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法对司帕沙星、氟甲喹、洛美沙星、萘啶酸 4 种常用喹诺酮诺抗生素残留进行了测定。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

4 种喹诺酮类标准品:司帕沙星、氟甲喹、洛美沙星、萘啶酸,以上 4 种标准品均来自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度在 98% 以上;甲醇、乙酸乙酯、甲酸、盐酸、乙腈均为色谱纯,均由天津永大化学试剂有限公司提供。

### 1.2　仪器

超高效液相色谱三重四级杆质谱联用仪:Waters Acquity UPLC/Xevo TQMS 型,购于美国 Waters 公司;雷磁 PHSJ-3F,上海精科;真空泵 AP-01P,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;HLB 固相萃取柱 6cc/500mg, WAT106122 Cartridge, Rev, A;0.22μm 滤膜,南通市卫宁实验器材有限公司;HN200 多功能氮吹仪,上海海能科技仪器有限公司。

### 1.3　方法

**1.3.1**　样品采集　在济宁市区大运河、老运河人口稠密区和药品生产厂家附近河段采集 20 个水样各 0.5L 和供加标回收实验的 4 个水样各 2L,置于棕色玻璃瓶中,并加入 500mg/L 的叠氮化钠抑制微生物的生长,采集完成后放置 4℃ 保存,48h 之内富集完成。

**1.3.2**　样品处理　HLB 固相萃取柱在使用之前需进行润洗:1)先用 6ml 乙酸乙酯:甲醇(1:1)溶液润洗脱,2)再用 6ml 甲醇润洗,3)最后用 6ml 酸性水(pH4.2)润洗。水样在富集前先用定性滤纸过滤,然后再用 0.22μm 的滤膜过滤;滤液过柱富集完成之后,抽真空干燥 5 ~ 8min,之后用 6ml 0.5% 甲醇淋洗,再用 6ml 甲醇洗脱至 10ml 棕色玻璃比色管中,最后吹氮气浓缩 0.1ml 以下。4)转移至 0.5ml 的样品瓶中,再用 0.1% 的甲酸定容至 0.5ml 上机检测。

**1.3.3**　加标回收样品的处理　水样在富集前先用定性滤纸过滤,然后再用 0.22μm 的滤膜过滤,再将水样分成 4 份,各 500ml。其中一份与前面水样一起直接过柱富集,另外 3 份按照低、中、高 3 种浓度加入标准品做加标回收实验,同上过柱富集,水样流速控制在 5ml/min 以下。

**1.3.4**　标准溶液的配制　将司帕沙星、氟甲喹、洛美沙星、萘啶酸配制成浓度为 1mg/L 的标准储备液,甲醇-水(体积为 2:1)定容, - 20℃ 避光保存。然后用上述标准储备液逐步稀释配置成浓度为 5、10、20、50、100、200μg/L 的标准应用液。

## 2　结果

### 2.1　实验条件与优化

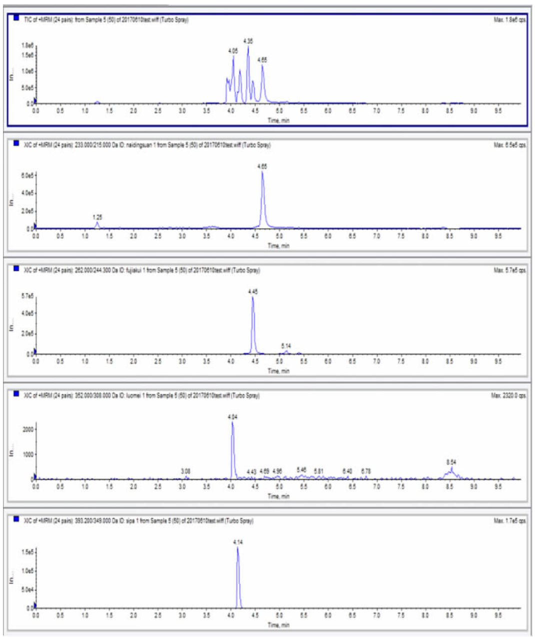
**2.1.1**　色谱条件　Hypersil GOLD-1.9μm, 50mm ×2.1mm(i.d)色谱柱;柱温 30℃;进样量为 5μl;流动相为 0.1% 甲酸-乙腈,流速 250μl/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1　流动相梯度洗脱条件

| 时间/min | 0.1% 甲酸/% | 乙腈/% | 流速/μl · min$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 0.00 | 90.0 | 10.0 | 250 |
| 2.00 | 90.0 | 10.0 | 250 |
| 5.00 | 10.0 | 90.0 | 250 |
| 6.00 | 10.0 | 90.0 | 250 |
| 7.00 | 90.0 | 10.0 | 250 |
| 8.00 | 90.0 | 10.0 | 250 |

**2.1.2**　质谱条件　离子源为电喷雾离子源；电离模式为正离子；扫描方式为多重反应监测；电喷雾电压 4500V；鞘气压力 $2.07 \times 10^5$Pa；清扫气压力 0；辅助气压力 $6.89 \times 10^4$Pa；离子源温度 350℃。

**2.1.3**　流动相的选择　文献报道的流动相有乙腈-水、甲醇-乙腈-水、乙酸铵-乙腈等[5-6]。综合相关文献后我们发现低浓度的甲酸-乙腈作为流动相，可以加强离子化效率，提高方法灵敏度。在综合比较了 0.05%、0.1%、0.2%、0.4% 的甲酸-乙腈作为流动相的响应值和峰形效果，结果发现 0.1% 甲酸-乙腈作为流动相时所测的 4 种喹诺酮类抗生素，分离度高，响应效果好。见图 1。



注：洛美沙星，4.04min；司帕沙星，4.14min；氟甲喹，4.45min；萘啶酸，4.65min

图 1　0.1% 的甲酸-乙腈作为流动相时 4 种喹诺酮类抗生素色谱图

**2.1.4**　洗脱剂的选择　结果发现在其他条件相同情况下甲醇对司帕沙星、氟甲喹等 4 种喹诺酮类抗生素的回收率相对较好，所以选择甲醇作为洗脱剂。见表 3。

表 2　3 种洗脱剂的回收率

| 抗生素 | 回收率/% | | |
|---|---|---|---|
| | 甲醇 | 乙腈 | 乙酸乙酯 |
| 司帕沙星 | 88 | 82 | 93 |
| 萘啶酸 | 83 | 78 | 71 |
| 氟甲喹 | 85 | 108 | 78 |
| 洛美沙星 | 114 | 88 | 89 |

**2.1.5**　萃取速度的选择　萃取速度是影响富集效率的重要一环，太快可能会导致富集效率下降，太慢则会导致富集时间过长。在此过程中可能会受到较多外部因素的干扰，经过实验发现萃取速度在 2～5ml/min 时回收率高、重现性好。

**2.1.6**　方法的线性范围、相关系数（$R^2$）、检出限、定量限、精密度（RSD）、回收率　配制浓度为 5、10、20、50、100、200μg/L 的 4 种喹诺酮类混合标准溶液，在 5～200μg/L 浓度范围内线性关系较好，相关系数 $R^2 = 0.9921 \sim 0.9987$，以 3 倍信噪比确定检出限，均为 3μg/L，以 10 倍信噪比确定定量限，均为 10μg/L。另取供加标回收实验水样 2L，平均分成 4 份，每份 500ml，其中 1 份作空白，其他 3 份分别加入 4 种喹诺酮类抗生素，分别配制成 20、100、200μg/L 的低、中、高 3 种浓度的溶液，按照上述实验条件进行加标回收实验，计算回收率和精密度，4 种喹诺酮类浓度为 20μg/L 时，回收率 86.0%～103.6%；浓度为 100μg/L 时，回收率 85.6%～107.4%；浓度为 200μg/L 时，回收率 81.9%～115.0%，其 RSD 均 <10%。见表 3。

表 3　4 种喹诺酮类抗生素的定量限、相关系数、线性方程及回收率

| 抗生素 | 定量限 /μg · L$^{-1}$ | 相关系数 ($R^2$) | 线性方程 | 回收率/% | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 20μg/L | 100μg/L | 200μg/L |
| 司帕沙星 | 10 | 0.9965 | Y = 353625X + 416134 | 87.4 | 85.6 | 83.5 |
| 氟甲喹 | 10 | 0.9921 | Y = 475080X − 305520 | 90.3 | 87.8 | 89.4 |
| 洛美沙星 | 10 | 0.9939 | Y = 105643X + 48143 | 103.6 | 107.4 | 115.0 |
| 萘啶酸 | 10 | 0.9987 | Y = 128781X + 193789 | 86.0 | 86.9 | 81.9 |

## 2.2　水样测定结果

20 份水样中均未检出司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸，只有氟甲喹出现了峰，浓度在 $3.10 \sim 6.64 \times 10^5$，但浓度较低，低于检测限。

## 3　讨论

HPLC-MS/MS 法灵敏度高、检出限低、适用范围广、准确性好。本实验首先对水样进行了富集浓缩，然后上机检测，相比传统方法在较大程度上提高了该方法的灵敏度。另外对色谱条件、洗脱剂、

流动相以及萃取速度等实验条件进行了优化,并通过加标回收实验对该方法进行了质量控制,保障结果的准确性和精密度,能够快速准确地对水体中司帕沙星、氟甲喹、洛美沙星、萘啶酸 4 种喹诺酮类抗生素进行检测。

所检测的 20 个水样中在检出限为 3μg/L 内均未检出司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸,但均检出了氟甲喹,其含量均低于定量限 10μg/L。这可能与济宁市近些年对运河附近的相关污染企业、工厂进行了整改以及加强了污水排放处理,大运河水质优良,污染可以忽略不计。另外,喹诺酮类抗生素在水中的溶解性较差,易受水环境的温度、某些离子浓度和光照等影响,水样在过滤、富集时也可能会有附着在悬浮颗粒物上的样品损失。有文献报道一些喹诺酮药物在水体的半衰期不超过半年[7],雨水也有一定的稀释作用,因此,本地区司帕沙星、洛美沙星、萘啶酸含量极低。所有水样均检出了氟甲喹,虽然浓度较低,不超过国家标准,但说明济宁市大运河市区段已受到了氟甲喹的污染,而氟甲喹是一种高效的广谱抗菌药,主要用于畜禽疾病的治疗,该污染来源有可能是周边畜禽市场、畜禽养殖场排放污水所致。因此,希望有关部门及早加强其检测和监督。

**参考文献:**

[1] 秦延文,张雷,时瑶,等. 大辽河表层水体典型抗生素污染特征与生态风险评价[J]. 环境科学研究,2015,28(3):361-368.

[2] 甘秀梅,严清,高旭,等. 典型抗生素在中国西南地区某污水处理厂中的行为和归趋[J]. 环境科学,2014,35(5):1817-1823.

[3] Archundia D, Duwig C, Lehembre F, et al. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes[J]. Science of the Total Environment, 2017, 576: 671-682. DOI: 10. 1016/j. scitotenv. 2016. 10. 129.

[4] Kawecki S, Kuleck G, Dorsey JH. The prevalence of antibiotic-resistant bacteria (ARB) in waters of the Lower Ballona Creek Watershed, Los Angeles County, California[J]. Environ Monit Assess, 2017, 189 (6): 261. DOI: 10. 1007/s10661-017-5964-9.

[5] 倪永付,朱莉萍,王勇,等. 微波辅助萃取 – 高效液相色谱 – 串联质谱法检测猪肉中四种氟喹诺酮类药物残留[J]. 肉类工业,2012. (9):41-44.

[6] 王全秋,马建民,夏曦. 超高效高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肌肉中 13 种喹诺酮类药物残留[J]. 质谱学报,2014,35(2):185-192.

[7] 吴银宝,廖新俤,汪植三,等. 兽药恩诺沙星(enrofloxacin)的水解特性[J]. 应用生态学报,2006,17(6):1086-1090.

(收稿日期　2017-11-27)
(本文编辑:石俊强)

(上接第 263 页)

[2] 张作记. 行为医学量表手册[M]. 北京:中华医学电子音像出版社,2005:236-237.

[3] 汪向东,王希林,马宏. 心理卫生量表评定手册[J]. 中国心理卫生杂志,1992,增刊:122-124.

[4] Michaela Holubova, Jan Presko, Radovan Hreby. Coping strategies and self-stigma in patients with schizophrenia-spectrum disorders[J]. Patient Preference and Adherence, 2016, 24 (10): 1151-1158. DOI: org/10. 2147/ppa. s106437.

[5] 殷爱华,张敬悬,李馨. 精神分裂症患者与正常人应对方式的对照研究[J]. 精神医学杂志,2012,25(4):261-264. DOI:13969/j. issn. 1009-7201. 2012. 04. 006.

[6] Wenjun Yu, Jia Chen, Jize Hu. Relationship between mental health and burden among primary caregivers of outpatients with schizophrenia [J]. Family Process, 2018, 22(1):16-17. DOI:org/10. 111/famp. 12340.

[7] 冯慧,卢山. 精神分裂症患者家属心理健康与应对方式分析[J]. 当代护士,2013,12(1):12-16.

[8] 严保平,赵素银,桑文华,等. 精神分裂症患者应对方式、父母教养方式及防御方式的性别差异[J]. 临床精神医学杂志,2014,24(1):24-25.

[9] 李然,杨俊生,郭采琴,等. 大学生应对方式及其与父母教养方式的关系研究[J]. 当代继续教育,2015,33(187):79-82.

[10] Hui-Chien Ong, Norhayati lbrahim, Suzaily Wahab. Psychological distress, perceived stigma, and coping among caregivers of patients with schizophrenia[J]. Psychology Research and Behavior Management, 2016, 9: 211-218. DOI: org/10. 2147/prbm. s112129.

(收稿日期　2018-03-19)
(本文编辑:林琳)