

## 关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；抗生素；Fotector Plus；Auto EVA-60

## 介绍

沙星类（Quinones, QNs）抗生素(图1)是一类人工合成的新型杀菌性抗菌药物，具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性以及毒副作用小、价格低廉等特点，被大量用于治疗 and 预防水生动物疾病及促生长。但研究表明，所使用的抗生素仅20~30%被鱼类吸收，大部分进入环境中，而这部分抗生素再次进入食物链，可能导致养殖环境中病菌耐药性的产生，导致二次污染。这不仅影响到水产养殖业的健康发展，而且还威胁着生态环境的安全。水样中残留喹诺酮类抗生素，通过饮用进入人体，可能对人体肝脏功能造成严重损伤。因此，建立水环境中这类药物的检测方法尤为重要。目前，喹诺酮类药物残留检测方法，主要包括HPLC-UV、HPLC-FD、HPLC-DVD、LC-MS/MS、LC-ESI-MS/MS，另外还有荧光光谱法、毛细管电泳法和酶联免疫法等。

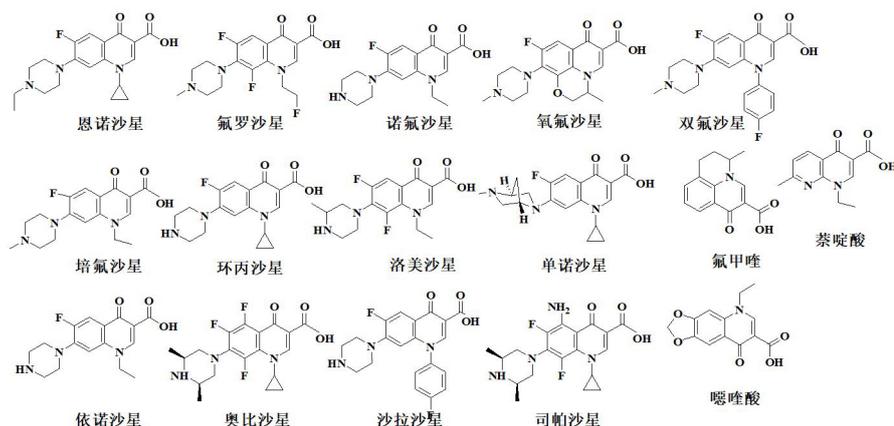


图1. 16种沙星类抗生素的结构式

本报告选择MCX阳离子交换柱进行富集、净化，超高压液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）联用技术检测，建立了环境水样中高灵敏的分析方法，该方法有望应用于水产养殖中。

## 1. 仪器与试剂

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

MCX 固相萃取柱 (RayCure MCX, 200 mg/6 mL, RC-204-72857)

高效液相色谱: (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410。

甲醇, 乙腈 (TEDIA 色谱纯); 甲酸, 氨水 (优级纯)。

## 2. 样品前处理

### 2.1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪
----------	--------------------------

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	活化	MeOH (Methanol)	废液2	5	10	2.6
2	活化	pH4.0 Formic Acid/Water	废液1	10	10	1.6
3	大体积上样	sample-1	废液1	6	200	115.3
4	淋洗	pH4.0 Formic Acid/Water	废液1	5	10	2.6
5	气推		废液1	30	20	2
6	洗脱	5% ammonia/MeOH	收集	1	10	10.5
7	气推			20	5	0.8
8	结束					

图2. Fotector Plus水中啥沙星抗生素固相萃取方法

固相萃取柱	MCX (RayCure, 200 mg/6 mL)
活化	甲醇
淋洗	pH=4.0 的甲酸水溶液
洗脱	5%的氨水甲醇溶液

### 2.2 富集净化

依次用甲醇 (10 mL) 和水 (10 mL) 以 5.0 mL/min 的速率活化/平衡和淋洗固相萃取柱, 备用。取纯净水样 200 mL, 加入标准品 (100  $\mu$ L, 100 ppb), 加入 EDTA-MCilvaine 缓冲溶剂 (50 mL, 0.1 mol/L) 调节水环境的 pH 为 4, 以 5 mL/min 的速率经固相萃取小柱富集后; 用甲酸水溶液 (pH=4.0) 10 mL 以 10 mL/min 速率淋洗; 气推后用 10 mL 的 5% 氨水甲醇以 1.0 mL/min 的速率洗脱。收集的样品在 25  $^{\circ}$ C, 5 psi 条件下浓缩至近干, 流动相乙腈-水溶液 (10:90, v/v, 0.1% 甲酸) 定容至 1.0 mL, 供 LC/MS-MS 分析。全自动固相萃取方法见图 2。

## 3. 液质检测条件

### 3.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 $\mu$ m $\times$ 2.1 mm $\times$ 50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: 10 mM ammonium acetic (0.1% formic acid), B: Methanol
柱温	30 $^{\circ}$ C
进样体积	10 $\mu$ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI <sup>+</sup>
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 $^{\circ}$ C
簇电压	4000
雾化压力	35psi

梯度洗脱	0.0-1.0 min, 90%流动相 A; 1.0-4.0 min, 50%的流动相; 50% 流动相 A 保持 2 min; 6.01-7.01 min, 90%的流动相 A; 7.01-10.0 min, 90%的流动相 A 保持 3 min。
------	---

### 3.2 MRM 参数

表 1. 16 种抗生素的串联质谱检测参数

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
依诺沙星	321.2	303.2	20	125	20	7
		232.1	20	125	36	7
氟罗沙星	370.0	370.0	20	135	13	7
		326.2	20	135	25	7
诺氟沙星	320.2	302.2	20	130	18	7
		233.1	20	130	22	7
氧氟沙星	362.2	318.2	20	140	16	7
		261.1	20	140	26	7
培氟沙星	334.2	316.2	20	145	18	7
		290.3	20	145	14	7
环丙沙星	332.2	314.2	20	125	18	7
		231.1	20	125	40	7
洛美沙星	352.3	308.2	20	120	14	7
		265.1	20	120	22	7
丹诺沙星	358.2	340.2	20	135	20	7
		255.1	20	135	42	7
恩诺沙星	360.2	342.2	20	135	20	7
		316.2	20	135	16	7
奥比沙星	396.4	396	20	135	21	7
		295.1	20	135	37	7
沙拉沙星	386.2	342.2	20	125	18	7
		299.2	20	125	30	7
双氟沙星	400.2	356.3	20	135	18	7
		299.1	20	135	30	7
司帕沙星	393.3	349.3	20	150	18	7
		292.2	20	150	26	7
氟甲喹	262.1	262.1	20	105	13	7
		244.1	20	105	33	7
噁嗉酸	262.2	262	20	100	13	7
		244	20	100	29	7
萘啶酸	233.2	233	20	90	9	7
		215.1	20	90	25	7

### 3.3 色谱图

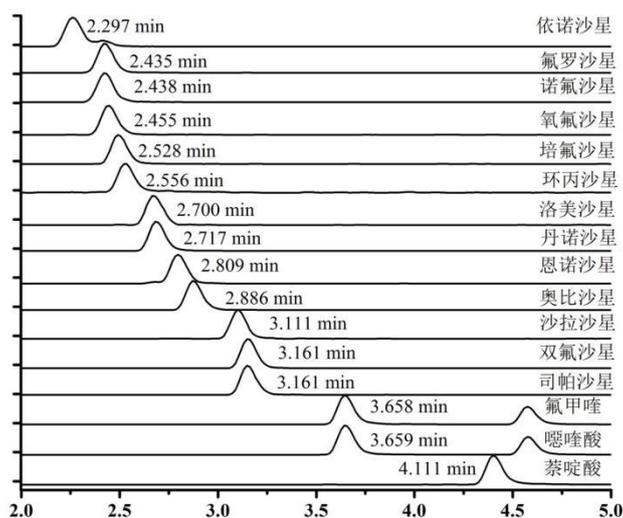


图 3. 16 种喹诺酮标准物质的 MRM 色谱图 (5 ng/mL, 进样量 10 μL)

## 4. 样品测试

### 4.1 基质效应验证

取纯净水样，按照上述的样品处理步骤后，氮吹至近干，加入标准使用液(1ppm, 20 μL)，定容成 1mL, 供 LC/MS-MS 检测。如果基质加标浓度准确，则可以直接用标准曲线对样品进行定量；如果不准确，请使用基质加标做曲线进行单点定量。

选择定量离子的峰面积作为纵坐标，浓度作为横坐标，做相关曲线，曲线为线性回归，各点权重

相等，拟合出工作曲线，要求  $R^2 > 0.99$ ；此曲线两周需要重新配置一次。

### 4.2 样品基质加标测试

对桶装纯净水和生活废水进行加标实验，加标浓度为低浓度 (25 ng/L)、中浓度 (50 ng/L) 和高浓度 (100 ng/L)，结果如表-2 所示：除了恩诺沙星和司帕沙星在 76.9~79.4%外，大部分的加标回收率在 82.5~114.2 %之间，RSD 在 1.5~16.6%。该方法能够实现在水样中 16 种喹诺酮抗生素进行检测。

表 2.加标回收率

化合物 Compounds	桶装纯净水加标浓度(n=6) Concentration of standard spiked matrix samples(ng/L)						生活废水加标浓度(n=4) Concentration of standard spiked matrix samples(ng/L)			
	25		50		100		25		100	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
伊诺沙星	109.0	10.3	95.5	7.5	107.6	6.4	99.0	10.3	86.7	9.7
氟罗沙星	102.5	12.9	104.0	3.0	114.3	4.6	92.5	12.9	94.9	14.6
诺氟沙星	114.2	12.6	100.0	6.3	112.4	2.0	104.2	12.6	99.7	11.1
氧氟沙星	107.7	6.1	102.8	4.0	114.2	4.0	107.7	6.1	100.3	6.4
培氟沙星	110.9	6.0	91.3	8.5	114.1	1.5	100.9	6.0	97.3	13.3
环丙沙星	104.7	7.4	100.7	6.4	104.1	2.4	104.7	7.4	89.2	16.6
洛美沙星	104.2	7.4	107.5	7.3	109.7	7.3	104.2	7.4	107.9	15.4
丹诺沙星	107.7	14.9	101.1	6.5	114.7	3.8	107.7	14.9	90.9	12.4
恩诺沙星	99.6	9.0	77.4	7.3	110.3	9.8	79.6	9.0	95.0	5.1

奥比沙星	93.5	10.3	97.5	8.0	106.0	8.2	93.5	10.3	95.8	2.5
沙拉沙星	100.2	7.4	113.2	4.4	96.4	6.6	100.2	7.4	84.5	4.0
双氟沙星	97.9	12.0	94.7	6.0	111.9	9.8	97.9	12.0	90.0	9.3
司帕沙星	76.9	8.4	95.2	4.2	88.6	14.4	76.9	8.4	84.3	1.8
氟甲喹	99.6	10.4	105.7	6.0	102.2	5.6	99.6	10.4	82.5	3.0
噁喹酸	99.6	10.4	103.2	7.4	99.7	9.4	99.6	10.4	83.2	3.7
萘啶酸	110.9	6.6	99.9	6.5	99.3	7.1	110.9	6.6	86.5	2.8

### 4.3 不同类型固相萃取柱对沙星类化合物的富集效果

取纯净水为样品，加标的质量浓度分别为 50 ng/L，按照上述方法，进行 4 平行样测定，考察该方法的不同固相萃取柱的回收率和重现性，分析结果如图-4 所示：纯净水中抗生素的平均回收率分布在 65.00-91.38%(HLB)，71.21-152.28%(MAX) 和

77.41-123.21%(MCX)。HLB 回收率普遍偏低，MAX 柱中沙星的回收率偏高，培氟沙星和氧氟沙星的回收率均超过了 140%，而且 MAX 柱需要在水样中加入氢氧化钠，容易造成水样中金属离子的水解沉淀，容易造成管路的堵塞。相比之下 MCX 柱的平行性比 HLB 柱和 MAX 好，回收率大部分在 90 %-110%之间，除了恩诺沙星回收率偏低，只有 77.41%。

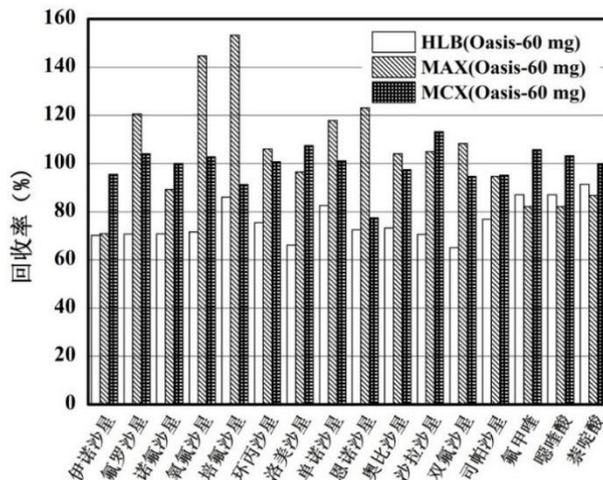


图 4. 三种柱子的回收率对比

## 5. 结果与讨论

5.1 对于 16 种沙星类化合物在水中的富集方法，应考虑实验过程中基质对化合物检测的干扰。此步的干扰不仅来自于水样中杂质干扰，同时商业化的固相萃取小柱，使用的色谱级溶液等等都存在干扰杂质，因此需要进行基质效应确认，以避免前处理富集过程中存在基质效应。

5.2 氮吹浓缩过程中应控制吹干程度，不可过分干燥。

5.3 对于沙星类的两性化合物，在 pH=7.0 左右时，主要以带负电荷的形式存在水溶液中，此时进行富集，固相小柱无法对目标物进行吸附。因此

需要进行 pH 调节至 4.0 左右，使其成为带铵根的正离子，利于下一步进行阳离子交换柱富集。

6.4 淋洗时采用甲酸酸化的水溶液，利于将固相萃取小柱中残留的 EDTA 除去，避免其在后续的洗脱液中干扰沙星类化合物的检测。

## 6. 解决方案的优势

Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪能同步进行 6 个样品处理，自动连续处理 60 个样品，从活化、上样、淋洗到洗脱等多种基础命令全部实现自动化，大大提高了仪器精度和可靠性，保证了回收率。

AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪可自动完成对

小体积样品的快速，平行浓缩。



全自动固相萃取仪  
净化



全自动平行浓缩仪  
浓缩



睿科集团股份有限公司  
RayKol Group Corp., Ltd.

## 自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: [www.raykol.com](http://www.raykol.com)

电话: 400-885-1816

邮箱: [info@raykol.com](mailto:info@raykol.com)



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020年5月版