

环境水样中诺氟沙星的电喷雾萃取电离质谱测定法

李毅¹, 方小伟^{1,2}, 李婧¹, 张兴磊^{1,2}

1. 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室 江西 南昌 330013 2. 东华理工大学分析测试研究中心

摘要:目的 建立环境水样中诺氟沙星的电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)快速测定法。方法 将经过简单过滤后的环境水样直接进行电喷雾萃取电离质谱分析,雾化气压力为 1.6 MPa,质谱离子传输管温度为 200 °C,喷雾电压为 2.5 kV,以甲醇溶液为喷雾溶剂,流速为 4 μl/min,样品溶液流速为 11 μl/min。结果 在 50~10 000 μg/L 的线性范围内,该方法的线性回归方程为 $y=0.8758x-0.289$, $r=0.9998$ 。该方法的检出限为 1.53 μg/L,加标回收率为 76.2%~86.5%,RSD 为 1.12%~8.55%。结论 该方法灵敏度高、精密度好、分析速度快、能够承受环境水样中复杂基体的影响,适用于环境水样中诺氟沙星的直接定量检测。

关键词:电喷雾萃取电离质谱;诺氟沙星;水

中图分类号:O657.6 文献标志码:A 文章编号:1001-5914(2016)07-0629-04

Determination of norfloxacin in environmental water samples by extractive electrospray ionization mass spectrometry

LI Yi*, FANG Xiao-wei, LI Jing, ZHANG Xing-lei

*Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang, Jiangxi 330013, China

Corresponding author: ZHANG Xing-lei, E-mail: leizi8586@126.com

Abstract: Objective To develop a rapid and sensitive extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS) method for the determination of norfloxacin in environmental water samples. **Methods** The environmental water samples with simple filtering were directly analyzed by EESI-MS and the pressure of atomizing air, temperature of ion transport, electrospray voltage were 1.6 MPa, 200 °C, 2.5 kV, respectively. The CH₃OH was used as electrospray solvent with 4 μl/min flow rate and the sample flow rate was 11 μl/min. **Results** Under the optimized working conditions, the calibration graph was linear in the range of 50~10 000 μg/L ($r=0.9998$). The limit of detection was 1.53 μg/L. The relative standard deviations were ranged from 0.54% to 6.93% and the recovery rates were 76.2%~86.5%. **Conclusion** The results show that EESI-MS is a powerful analytical platform to provide high sensitivity, high precision, rapid analysis and high specificity for quantitative analysis of norfloxacin in environmental water samples.

Key words: Extractive electrospray ionization mass spectrometry; Norfloxacin; Water

诺氟沙星属于第三代氟喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广、抗菌作用强、副作用小等特点,广泛应用于动物和人类多种感染性疾病的防治。然而,人类和动物所使用的大部分抗生素类药物并没有得到有效利用,约有 40%~90% 的抗生素会以母体药物的形式从尿液或者粪便排出体外^[1-3]。这些排泄物一部分直接通过渗透、迁移、吸附等作用最终转入地表水、地下水等环境水源中;另一部分被用作肥料进入农田和农作物,最终经过雨水的冲刷及其它作用再次进入环境水源。叶必雄等^[4]对环境水体及饮用水中抗生素污染现状及健康影响进行了阐述,并对水环境中抗生素的来

源,分布及对人体健康的影响进行了系统的总结,结果表明,我国饮用水中的抗生素浓度与发达国家处于同一个水平。王丹等^[5]综述了我国地表水中含有抗生素的种类,并统计了中国地表水中已检测到的主要药物和个人护理品,其中,诺氟沙星排第 4,检出频率大于 60%。尽管地表水中的抗生素对饮用水安全尚不构成重大影响,但由此引发的生态风险并不应忽视。因此,对于环境水样中的抗生素的监测具有重要的意义。目前,环境水样中抗生素的分析检测方法主要包括酶联免疫吸附法^[6]、高效液相色谱法^[7-9]、液相色谱-质谱联用法^[10-12]、生物传感器法^[13]等。但这些方法一般均需要经过复杂的样品预处理过程,具有操作步骤繁琐,费时等缺点。电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)法^[14-16]作为近年发展起来的一种新兴质谱技术,具有分析速度快、灵敏度高、基质耐受力强、无化学污染等特点,能对复杂样品中的痕量物质进行快速质谱分析。本研究建立环境水样中诺氟沙星的电喷雾萃取电离质谱

DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2016.07.017

基金项目:国家自然科学基金(21365002,21305011);国家重大科学仪器设备专项(2011YQ14015008);长江学者和创新团队发展计划项目(IRT13054);江西省“赣鄱英才 555 工程”(赣才字[2011]1 号)

作者简介:李毅(1988-),男,硕士研究生,从事新型质谱技术的应用研究。

通讯作者:张兴磊, E-mail: leizi8586@126.com

(EESI-MS)快速测定法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 LTQ-XL 增强型线性离子阱质谱仪(美国 Finnigan 公司) EESI 离子源(东华理工大学研制) Xcalibur 型数据处理系统(美国 Finnigan 公司)。

诺氟沙星标准品(纯度为 99.5% ,中国食品药品检定研究院),甲醇(色谱纯,韩国 SK Chemicals 公司),冰乙酸(色谱纯,西陇化工股份有限公司)。实验用水为超纯水。

1.2 测定条件 设置 LTQ-MS 为正离子模式,雾化气(N_2 ,纯度 99.999%)压力为 1.6 MPa,质谱离子传输管温度为 200 °C,喷雾电压为 2.5 kV,以甲醇溶液为喷雾溶剂,流速为 4 $\mu\text{l}/\text{min}$;样品溶液流速为 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。EESI 离子源装置如图 1 所示,EESI 离子源的两个毛细管喷雾口到质谱进样口的距离(a)为 5 mm,两个毛细管喷雾口之间的距离(b)为 1 mm,两个喷雾通道间的夹角、样品雾化管与质谱进样口的角度分别为 60°和 150°。碰撞诱导解离(CID)的时间为 100 ms,离子的选择窗口为 1.0 Da,碰撞能量为 17%~25%,其他的参数由 LTQ-MS 系统自行优化得到,所得质谱数据扣除背景信息后导出。

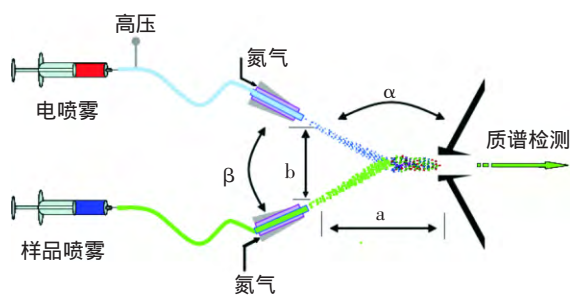


图 1 EESI 源装置示意图

1.3 标准曲线的绘制 准确称取 10 mg 诺氟沙星标准品于 100 ml 的容量瓶中,加入 1 ml 浓度为 0.1 mol/L 的盐酸溶液,超声 0.5 h 后,用超纯水定容并转入棕色试剂瓶中,得到 100 mg/L 诺氟沙星标准储备液,置于冰箱中备用,用超纯水将其逐级稀释为 0.05、0.1、0.5、1、10 mg/L 的诺氟沙星标准系列溶液。

选取母离子(m/z 320)的三级质谱中的特征碎片离子(m/z 256)作为定量离子,在优化的实验条件下,按 1.2 进行测定。对净响应信号强度的平均值以及样品的浓度分别取对数(即 $\lg I$ 、 $\lg C$),再以 $\lg I(y)$ 对 $\lg C(x)$ 绘制标准工作曲线。

1.4 水样的预处理方法 水样先经充分饱和的定性滤纸过滤,然后再用充分饱和的 0.45 μm 滤膜过滤,立即送实验室冰箱,保存。测定水样时,先让其恢复至室温,在优化的质谱条件下,直接进行 EESI-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 诺氟沙星标准溶液的 EESI-MS 分析 按照 1.3 的方法对 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 诺氟沙星标准溶液进行 EESI-MS 分析,在一级质谱图(图 2A)中,可观察到 $[M+H]^+$ (m/z : 320) 准分子离子峰,这与文献[17]报道的诺氟沙星准分子离子峰相一致。因 EESI 是在敞开的三维空间环境中进行的电离、萃取及荷能传递,外部环境对实验结果干扰性大,为排除假阳性,需采用串联质谱进一步确认。

选择母离子(m/z 320)进行二级质谱分析,主要产生 m/z 分别为 302 和 276 的碎片离子,推测为母离子分别丢失一个 H_2O 分子和 CO_2 分子(图 2B)。

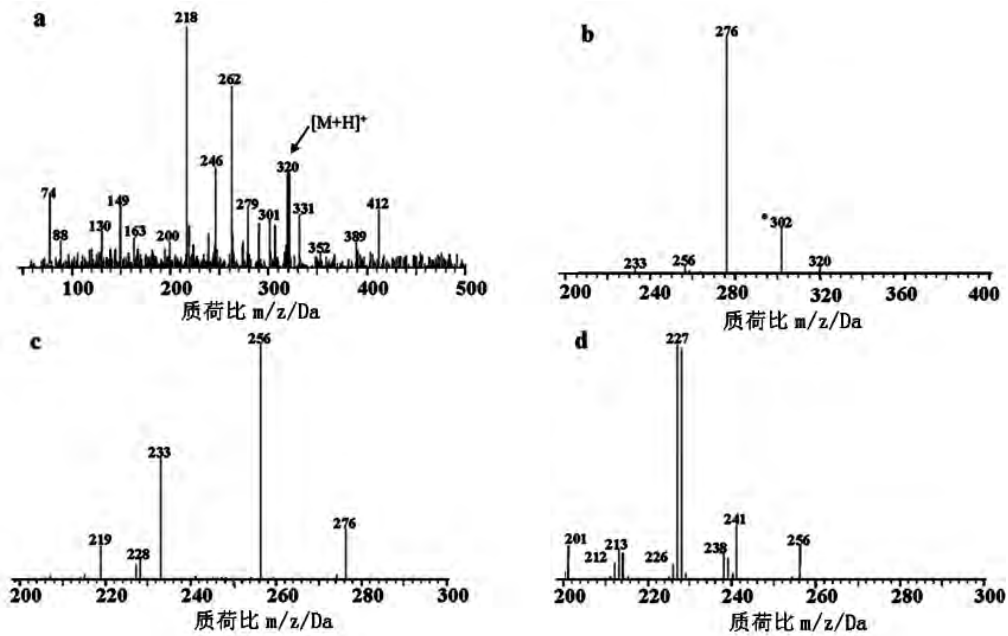
对二级质谱图中产生的主要碎片离子(m/z 276)进行串联质谱分析,得到 3 个主要的特征离子(m/z 分别为 256、233、219)(图 2C) 推测分别丢失一个 HF 分子、 $CH_2=CH-NH_2$ 和 $CH_3-CH_2-N=CH_2$ 之后形成的碎片离子。

选取三级质谱中产生的主要碎片离子 (m/z 为 256)进行串联质谱分析,可以发现在相应的四级质谱中,其进一步断裂生成 3 个主要的特征离子(m/z 分别为 228、227、213)(图 2D),其中 m/z 为 228 的碎片离子与 m/z 为 256 的碎片离子相比失去了一个质量数为 28 的基团,推测是重排失去一个 CO 的中性分子所致, m/z 为 213 的碎片离子与 m/z 为 256 的碎片离子相比失去了一个质量数为 43 的基团,推测为哌嗪环断裂重排,丢失 1 个 $CH_2=CH-NH_2$ 中性分子而形成, m/z 为 227 的碎片离子与 m/z 为 256 的碎片离子相比失去了 1 个质量数为 29 的基团,但该裂解途径还不是很清楚。

2.2 EESI-MS 条件的优化

2.2.1 电喷雾溶剂的选择 分别考察了不同比例的甲醇-水以及不同比例的甲醇-冰乙酸作为电喷雾溶剂时对诺氟沙星特征碎片离子(m/z 为 256)信号强度的影响,结果表明,以甲醇作为电喷雾溶剂时, m/z 为 256 的碎片离子信号强度最高。这可能是因为甲醇的表面张力较小,液滴更容易去溶剂化,可以得到较多的初级试剂离子。因此,本研究选择甲醇作为电喷雾溶剂。

2.2.2 电喷雾溶剂流速的选择 分别考察了电喷雾溶剂流速(1~8 $\mu\text{l}/\text{min}$)对诺氟沙星特征碎片离子(m/z 为 256)信号强度的影响,结果显示,随着电喷雾溶剂流速的增加, m/z 为 256 的信号强度呈先上升后下降的趋势;且当电喷雾溶剂流速为 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 时, m/z 为 256 的信号强度达到最大值。这可能是因为雾化效率会随着电喷雾溶剂流速的增加而增大,但是流速过大会导致雾化不充分而使电离效率降低。所以本研究中的电喷雾溶剂流速设定为 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。



A 一级质谱图 ;B 二级质谱图 ;C 三级质谱图 ;D 四级质谱图

图 2 诺氟沙星标准溶液的 EESI-MS 质谱图

2.2.3 电喷雾电压的选择 分别考察了不同电喷雾电压(2.0~4.5 kV)对诺氟沙星三级特征离子(m/z 256)信号强度的影响,结果表明,喷雾电压在 2.0~3.0 kV 范围内的变化对于 m/z 为 256 信号强度的影响不明显。这可能是因为配制诺氟沙星水溶液时加了盐酸,从而使得大部分诺氟沙星已成盐状态存在,在一定条件下,喷雾端口本身因超声雾化而形成离子供质谱分析^[18],所以喷雾电压对于其初级离子的产生便不会有明显的影响。当电压高于 3.0 kV 后 m/z 为 256 的信号强度下降,可能是因为 EESI 源两条通道间产生了电晕放电,使得诺氟沙星的离子化效率降低所致。因此,本研究选择的电喷雾压力为 2.5 kV。

2.2.4 喷雾气压力的选择 分别考察了喷雾气压力(0.6~1.8 MPa)对诺氟沙星三级特征离子(m/z 256)信号强度的影响,结果显示,在 0.6~1.6 MPa 范围内,随着喷雾气压力的增大, m/z 为 256 的信号强度迅速增强。因为随着喷雾气压力的增大,作用在带电液滴表面的剪切力增加,目标物质会更容易克服液滴的表面张力,小液滴会进一步雾化形成气相离子,更容易去溶剂化。当喷雾气压超过 1.6 MPa 后,喷雾口所形成的离子束分散程度增大,大部分离子会被分散到质谱口以外的区域,从而进入质谱的离子便会减少, m/z 为 256 的信号强度大幅度下降。因此,选择喷雾气压力为 1.6 MPa。

2.2.5 离子管传输温度的选择 离子传输管温度的变化对于离子的去溶剂化效果有很大的影响。分别考察了离子传输管温度在 100~350 °C 范围内对 m/z 为 256 信号强度的影响,结果显示,在 100~200 °C 范围

内,随着离子传输管温度的升高, m/z 为 256 的信号强度迅速增大;当离子传输管温度高于 200 °C 时,随着离子传输管温度的升高, m/z 为 256 的信号强度迅速下降,这可能是因为温度过高,诺氟沙星的热解离效应增强所致。因此,选择离子传输管温度为 200 °C。

2.2.6 样品溶液流速的选择 分别考察了不同样品溶液流速(3~13 $\mu\text{l}/\text{min}$)的变化对诺氟沙星特征碎片离子(m/z 256)信号强度的影响,结果显示,随着样品溶液流速的增大, m/z 为 256 的信号强度呈先上升后下降的趋势;且当样品溶液流速为 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ 时, m/z 为 256 的信号强度最高。因此,选择样品溶液流速为 11 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

2.3 线性范围、回归方程和检出限 在 50~10 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的线性范围内,该方法的线性回归方程为 $y=0.8758x-0.289$, $r=0.9998$ 。以 3 倍信噪比计算,该方法的检出限为 1.53 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.4 加标回收试验结果 向不含诺氟沙星的过滤后赣江水样中分别加入 400、2 000、4 000、6 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的诺氟沙星标准溶液进行加标回收试验,平行 6 次,结果见表 1。该方法的加标回收率为 76.2%~86.5%, RSD 为 1.12%~8.55%。

表 1 环境水样中诺氟沙星 EESI-MS 法的加标回收试验结果($n=6$)

加标值($\mu\text{g}/\text{L}$)	测定值($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}/\text{L}$)	$RSD(\%)$	回收率($\%$)
400	346 \pm 4.45	1.25	86.5
2 000	1 583 \pm 15.50	1.12	79.2
4 000	3 366 \pm 287.91	8.55	84.2
6 000	4 923 \pm 125.02	6.22	76.2

2.5 实际水样的测定 于 2015 年 1 月 31 日,采集赣江南昌段表层水样,采用本方法进行测定,结果显示,水样中未检测出诺氟沙星。

3 小结

本实验采用电喷雾萃取电离质谱法,在正离子模式下,选取诺氟沙星三级特征碎片离子(m/z 256)作为定量离子,通过优化电喷雾溶剂及组成、电喷雾电压、离子传输管温度、电喷雾溶剂和样品溶液流速、喷雾气压力,提高诺氟沙星的离子化效率。该方法灵敏度高、精密度好、分析速度快、能够承受环境水样中复杂基体的影响,适用于批量环境水样中诺氟沙星的直接定量检测,可望在小型质谱仪上实现对环境水样中药物残留及污染的现场分析,为 EESI-MS 在环境药物残留及污染监测领域的应用提供了新的思路。

参考文献

- [1] Jjemba P. The effect of chloroquine, quinacrine and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota[J]. Chemosphere, 2002, 46: 1019-1025.
- [2] Phillips I, Casewell M, Cox T et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53: 28-52.
- [3] Kumar K, Gupta SC, Chander Y et al. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment [J]. Adv Agron, 2005, 87: 1-54.
- [4] 叶必雄, 张岚. 环境水体及饮用水中抗生素污染现状及健康影响分析[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(2): 173-178.
- [5] 王丹, 隋倩, 赵文涛, 等. 中国地表水环境中药物和个人护理品的研究进展[J]. 科学通报, 2014, 59(9): 743-751.
- [6] Cui J, Zhang K, Huang Q et al. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody [J]. Anal Chim Acta, 2011, 688: 84-89.
- [7] Xu W, Zhang G, Zou S et al. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Environ Pollut, 2007, 145: 672-679.
- [8] Li J, Cai Y, Shi Y et al. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography-spectrophotometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1139: 178-184.
- [9] Wang P, Yuan T, Hu J et al. Determination of cephalosporin antibiotics in water samples by optimised solid phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detector [J]. Int J Environ Anal Chem, 2011, 91: 1267-1281.
- [10] Reverté S, Borrull F, Pocurull E et al. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2003, 1010: 225-232.
- [11] Xiao Y, Chang H, Jia A et al. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1214: 100-108.
- [12] Jia A, Xiao Y, Hu J et al. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216: 4655-4662.
- [13] Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: assay optimization process for estrone as example [J]. Talanta, 2005, 65: 313-323.
- [14] Chen H, Touboul D, Jecklin MC et al. Manipulation of charge states of biopolymer ions by atmospheric pressure ion/molecule reactions implemented in an extractive electrospray ionization source [J]. Eur J Mass Spectrom, 2007, 13: 273-280.
- [15] Chen HW, Venter A, Cooks G. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation [J]. Chem Comm, 2006, 19: 2042-2044.
- [16] Zhang H, Ching K, Chen HW et al. Molecular characterization of ongoing enzymatic reactions in raw garlic cloves using extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2015, 87: 2878-2883.
- [17] 卢晓蕊, 霍任锋, 许海东, 等. 化妆品中喹诺酮类抗生素的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(6): 518-520.
- [18] 杨水平, 周瑜芬, 胡秀丽, 等. 超声喷雾电离源的研制与表征[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 266-272.

收稿日期 2015-07-28 责任编辑 韩威