

聚合物整体柱微萃取-液相色谱-串联质谱法 测定工业废水中6种喹诺酮药物残留量

陈志冉*, 崔鹏

(黄河水利职业技术学院, 河南 开封 475004)

摘要:以甲基丙烯酸丁酯为功能单体, 二甲基丙烯酸乙二醇酯为交联剂, 正丙醇和聚乙二醇 400 为致孔剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 在不锈钢管模具中制备聚合物整体柱(BMA-co-EDMA); 以 BMA-co-EDMA 柱为萃取介质, 利用聚合物整体柱微萃取技术, 结合液相色谱-串联质谱法(LC-MS), 建立了同时测定工业废水中 6 种喹诺酮药物残留量的分析方法。结果表明, 在 0.2~100.0 ng/mL 质量浓度范围内, 各目标物定量离子峰面积与其质量浓度呈现良好线性关系, 相关系数在 0.999 6~0.999 9 之间, 检出限在 0.07~0.35 ng/L, 定量限在 0.2~1.0 ng/L, 回收率在 92.3%~98.6%, 相对标准偏差在 0.7%~3.7%。与其他方法相比, BMA-co-EDMA 柱稳定性和重现性良好, 可反复使用 10 次以上。

关键词: 聚合物整体柱; 固相微萃取; LC-MS; 工业废水; 喹诺酮

中图分类号: X703.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)05-0228-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.05.052

Determination of six quinolones residues in industrial wastewater by polymer monolithic column microextraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Zhi-ran*, CUI Peng

(Yellow River Conservancy Technical Institute, Kaifeng 475004, China)

Abstract: A polymer monolithic column is prepared in a stainless steel tube mold with butyl methacrylate as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking agent, *n*-propanol and polyethylene glycol 400 as porogen, and azo-bis-isobutyronitrile as initiator. The method to determine simultaneously 6 kinds of quinolones residues in industrial waste is developed by polymer monolithic microextraction combining with LC-MS through using BMA-co-EDMA column as extractive medium. The results show that the peak area of quantitation ion of each target substance shows a good linear relationship with its concentration in the range of 0.2–100.0 ng·mL⁻¹, with correlation coefficient ranging from 0.999 6 to 0.999 9. The detection limits range from 0.07 ng·L⁻¹ to 0.35 ng·L⁻¹. The quantitation limits range from ng·L⁻¹ to 1.0 ng·L⁻¹. The recovery rates range from 92.3% to 98.6%, and the relative standard deviations range from 0.7% to 3.7%. Compared with other methods, BMA-co-EDMA column has good stability and reproducibility, which can be used repeatedly more than 10 times.

Key words: polymer monolithic column; solid-phase microextraction; LC-MS; industrial waste; quinolone

喹诺酮类(4-quinolones)又称吡酮酸类或吡啶酮酸类,基本骨架为氮(杂)双并环结构,是作用于革兰阴性菌的广谱抗菌药物,广泛应用于泌尿生殖系统疾病、胃肠疾病、呼吸道、皮肤组织等各类感染性疾病治疗^[1-2]。但喹诺酮类药物具有生物活性,若喹诺酮类药物生产工厂排放的工业废水中含有喹诺酮类药物残留,可经生物链进入到自然环境中,若长期误食被喹诺酮类药物污染的食物,会使人体产生抗药性,甚至具有潜在“三致”威胁^[3-8]。因此,建

立工业废水中喹诺酮类药物残留的分析检测方法很有必要。

聚合物整体柱微萃取(polymer monolith micro extraction, PMME)是一种新型固相微萃取技术,是由不同比例的功能单体、交联剂、致孔剂、引发剂等混合物在不锈钢管或毛细管内通过光或热原位聚合制备而成的多孔整体材料,具有制备简便、传质效率高、负载能力高、化学结构可变、可重复使用等特点,已在环境、食品、药品、生物等复杂样品前处理广泛

收稿日期:2017-11-22;修回日期:2018-03-13

基金项目:河南省科技厅支持项目(172102410035);黄河水利职业技术学院 2016 年科技项目(2016KXJS009)

作者简介:陈志冉(1986-),女,硕士,讲师,研究方向为环境工程,通讯联系人, hxxxtxs2016@qq.com。

应用^[9-12]。笔者利用 PMME 技术与液相色谱串联质谱法,以甲基丙烯酸丁酯(BMA)为功能单体,二甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)为交联剂,正丙醇和聚乙二醇 400 为致孔剂,偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,在不锈钢管模具中制备聚合物整体柱;以该聚合物整体柱为萃取介质,结合液相色谱-串联质谱法(LC-MS)建立了同时测定喹诺酮类药物生产工厂排放的工业废水中 6 种喹诺酮类药物残留量的分析方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型液相色谱仪,美国 Agilent 公司生产;Nicolet-6700 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo 公司生产;TECNAI G2 F20 型透射电子显微镜,美国 FEI 公司生产;5427 R 型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司生产;MS3 型漩涡混合器,德国 IKA 公司生产;ZHWHY-200D 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器有限公司生产;Mill-Q A10 型超纯水器,美国 Millipore 公司生产。

6 种喹诺酮类药物标准品:恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、氟罗沙星,纯度均 $\geq 99.0\%$,100.0 mg/L,上海安谱实验科技股份有限公司生产。根据实验需要,用甲醇-水(体积比为 2:8)将标准品储备液稀释成 1.0 mg/L 工作标准溶液。

甲基丙烯酸丁酯、二甲基丙烯酸乙二醇酯、偶氮二异丁腈、正丙醇、聚乙二醇 400、氨水,均为分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司生产;乙酸铵、乙腈、乙醇、甲醇,均为色谱纯,美国 TEDIA 公司生产;实验用水均为 Milli-Q 所制的超纯水。

1.2 液相色谱-串联质谱条件

液相色谱条件:色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈反相色谱柱(250 mm×4.6 mm,5.0 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B),梯度洗脱程序为:0~4.5 min,80% A;4.5~7.5 min,5% A;7.5~12.0 min,80% A;流速为 0.2 mL/min;进样量为 10.0 μ L;柱温为 35 $^{\circ}$ C。

质谱条件:离子源为电喷雾电离源(ESI),正离子模式;离子源温度为 500 $^{\circ}$ C;电喷雾电压为 5 500 V;雾化气压力为 350 kPa;辅助气压力为 350 kPa;气帘气压力为 140 kPa;扫描模式为选择多反应监测(MRM)模式,6 种喹诺酮类物质谱参数如表 1 所示。

表 1 6 种喹诺酮类药物物质谱参数

名称	保留时间/ min	定性离子对 (<i>m/z</i>) (母离子/ 子离子)	定量离子对 (<i>m/z</i>) (母离子/ 子离子)	碰撞气 能量/ eV	去簇 电压/ V
恩诺沙星	4.87	360.3/316.1 360.3/245.2	360.3/316.1	26 34	80
洛美沙星	5.91	352.3/265.1 352.3/308.3	352.3/265.1	30 23	93
氧氟沙星	6.17	362.3/318.3 362.3/261.2	362.3/318.3	25 35	90
培氟沙星	7.43	334.2/316.1 334.2/290.2	334.2/316.1	25 24	84
氟罗沙星	6.44	370.4/326.2 370.4/269.2	370.4/326.2	24 36	100
环丙沙星	7.21	332.2/288.2 332.2/245.2	332.2/288.2	23 30	80

1.3 聚合物整体柱的制备

将甲基丙烯酸丁酯(1.0 mmol)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(3.0 mmol)、正丙醇(14.0 mmol)、聚乙二醇 400(2.5 mmol)、偶氮二异丁腈(10 mg)在室温下超声波混合、脱气后灌入不锈钢管(250 mm×4.6 mm)中,将不锈钢管两端密封后,置于 55 $^{\circ}$ C 恒温水浴中反应 24 h。取出不锈钢管接入到高压泵,用甲醇以 0.3 mL/min 的流速冲洗未反应的功能单体、交联剂、致孔剂,获得聚合物整体柱(BMA-co-EDMA),备用。

1.4 聚合物整体柱微萃取

PMME 过程包括 4 个步骤:预处理、吸附、洗涤、洗脱。首先,用 5 mL 甲醇和 5 mL 水分别依次以 0.5 mL/min 和 0.1 mL/min 的流速预处理聚合物整体柱(BMA-co-EDMA);将 2 mL 待测样以 0.02 mL/min 的流速上样至整体柱;以 0.5 mL/min 的流速注入 1 mL 水,除去残留的样品基质;以 0.02 mL/min 的流速注入 2 mL 乙腈洗脱目标分析物,收集洗脱液,氮吹至干,用乙腈溶解并定容至 500 L,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,供 LC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 制备条件对聚合物整体柱的影响

考察了功能单体甲基丙烯酸丁酯(BMA)、交联剂二甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)、致孔剂正丙醇和聚乙二醇 400、引发剂偶氮二异丁腈(AIBN)等制

备条件对聚合物整体柱聚合情况的影响。结果显示:功能单体 BMA 和交联剂 EDMA 影响聚合物整体柱(BMA-co-EDMA)对目标物的萃取效果,当功能单体 BMA 物质的量在 0.5~1.0 mmol,随着 BMA 物质的量的增加,BMA 和 EDMA 的比例随之增加,交联剂 EDMA 使得形成的 BMA-co-EDMA 聚合物交联度逐渐减小,结构由致密变得松散,使得整体柱的渗透性升高,从而逐渐提高了 BMA-co-EDMA 对 6 种喹诺酮类药物的萃取效率;当 BMA 物质的量为 1.0 mmol 时,BMA 和 EDMA 的比例为 1:3,BMA-co-EDMA 交联度较好,结构较为松散,渗透性良好,对 6 种喹诺酮类药物的萃取效率高达 97.36%,这是由于 BMA 具有负电荷,而 EDMA 具有 2 个碳烯双键、亚甲基基团和疏水作用,使得聚合物孔结构中 50 nm 以下的微孔较多,且聚合物骨架表面提供较多的疏水作用,从而有利于喹诺酮类药物的分析;当 BMA 物质的量大于 1.0 mmol 时,交联剂剂量较少,使得聚合物的聚合度太低,结构松散而无法制备 BMA-co-EDMA 整体柱。故选择 BMA 物质的量为 1.0 mmol,EDMA 物质的量为 3.0 mmol。

2.2 聚合物整体柱 BMA-co-EDMA 扫描电镜

利用扫描电镜对聚合物整体柱 BMA-co-EDMA 进行表征,结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,聚合物整体柱 BMA-co-EDMA 内固定相与不锈钢管内壁键合紧密,使 BMA-co-EDMA 具有承受柱压的机械性能,如图 1(a) 所示;柱内固定相颗粒分布均匀,固定相键合紧密,形成致密的网状结构,并具有空隙结构,使得整体柱具有良好的通透性,如图 1(b) 所示。

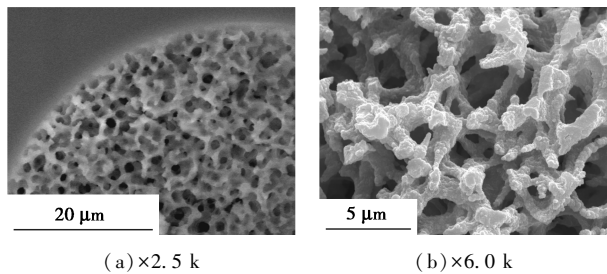


图 1 聚合物整体柱 BMA-co-EDMA 扫描电镜图

2.3 聚合物整体柱性能评价

在优化的实验条件下,分别测定聚合物整体柱(BMA-co-EDMA)第 1、2、5 和 10 次对 6 种喹诺酮类药物的相对标准偏差(RSD)和柱效(N, $N = 5.54 \times (T_r/W_{1/2})^2$,其中 T_r 为被测组分保留时间, $W_{1/2}$ 为半峰宽)来评价整体柱性能。结果表明,同一批次和不同批次合成的 BMA-co-EDMA 萃取 6 种喹诺酮

类药物的相对标准偏差为 0.8%~5.7%,平均 RSD 为 3.8%,因此,BMA-co-EDMA 的稳定性和重现性良好,且可以重复使用至少 10 次,有效提高了使用效率,减低了检测成本。根据塔板理论,连续 5 次重复进样测定,色谱峰半峰宽窄,左右对称,呈正态分布,保留时间在 4.87~7.43 min,柱效在 2 167~2 935 plates/m,表明聚合物整体柱 BMA-co-EDMA 具有较高的柱效。

2.4 液相色谱-串联质谱条件的优化

用蠕动泵将 1.0 μg/mL 6 种喹诺酮类药物混合标准溶液注入质谱检测器中,在正负离子扫描模式下,选择一级质谱中响应信号最高的离子作为母离子;在不同碰撞电压下对母离子进行碰撞诱导裂解,优化碰撞能量和电压,根据碎片离子的信号强度,选择离子对(m/z) 360.3/316.1、352.3/265.1、362.3/

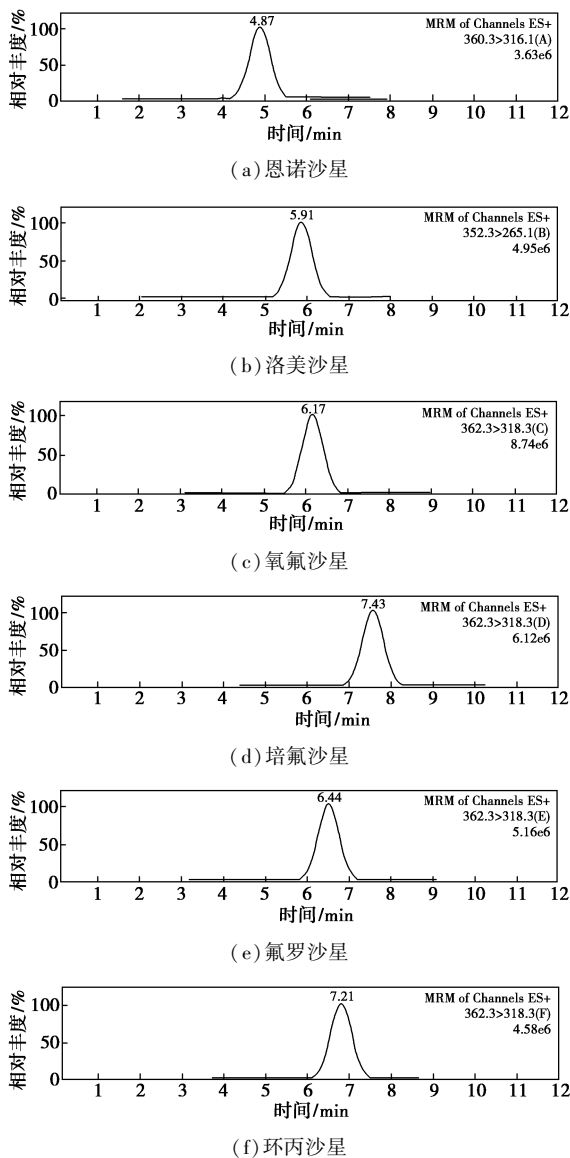


图 2 6 种喹诺酮类药物液相色谱-质谱图

318.3、334.2/316.1、370.4/326.2、332.2/288.2 分别作为恩诺沙星、洛美沙星、氧氟沙星、培氟沙星、氟罗沙星、环丙沙星的定量离子对(如表1所示)。

为了提高6种喹诺酮类药物检测的灵敏度和分辨率,考察了色谱柱、流动相种类及其比例对6种喹诺酮类药物的分离效果。结果表明:用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)作为色谱柱,流动相为0.1%甲酸水溶液和乙腈,6种喹诺酮类药物经梯度洗脱后可有效分离,保留时间在4.87~7.43 min,峰形尖锐且对称,质谱响应和保留时间重复性好,其色谱图如图2所示。

2.5 线性范围、检出限和定量限

在优化的实验条件下,分别对6种喹诺酮类药物混合标准溶液0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 ng/mL各个质量浓度进行测定($n=3$),以定量离子峰面积(y)对质量浓度(x)作图,绘制标准曲线,得到回归方程,如表2所示。从表2中可以看出,在0.2~100.0 ng/mL质量浓度范围内,各目标物定量离子峰面积与其质量浓度呈现良好线性关系,相关系数(r^2)在0.999 6~0.999 9之间。以3倍信噪比作为检出限(LODs, $S/N=3$),以10倍信噪比作为定量限(LOQs, $S/N=10$),结果显示:LODs在0.07~0.35 ng/L之间,LOQs在0.2~1.0 ng/L之间。

表2 方法的线性范围、检出限和定量限

分析物	回归方程	相关系数 r^2	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	LODs/ (g·L ⁻¹)	LOQs/ (g·L ⁻¹)
恩诺沙星	$y=49136x+2385$	0.9999	0.5~100.0	0.15	0.50
洛美沙星	$y=16937x-1428$	0.9996	0.2~100.0	0.07	0.20
氧氟沙星	$y=50590x-3931$	0.9997	1.0~100.0	0.35	1.00
培氟沙星	$y=32129x-2528$	0.9998	0.5~100.0	0.15	0.50
氟罗沙星	$y=26247x+1821$	0.9997	0.2~100.0	0.07	0.20
环丙沙星	$y=13839x+3674$	0.9998	0.2~100.0	0.07	0.20

2.6 回收率和精密度

取3份喹诺酮类药物生产工厂排放的工业废水试样,按1.2和1.3中所述的操作步骤进行加标回收率试验,结果如表3所示。从表3中可以看出,6种喹诺酮类药物在加标质量浓度0.2~100.0 ng/L范围内,回收率在92.3%~98.6%之间,相对标准偏差(RSD)为0.7%~3.7%。表明该法回收率高、精密度好,可用于工业废水中喹诺酮类药物残留

检测。

表3 回收率和精密度 ($n=6$)

分析物	加标量/ (ng·L ⁻¹)	工业废水1		工业废水2		工业废水3	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
恩诺沙星	0.5	93.3	1.4	94.1	2.6	92.7	2.2
	50.0	97.3	2.3	92.7	3.4	98.2	3.2
	100.0	98.5	1.6	96.5	3.6	97.5	2.9
洛美沙星	0.2	97.5	2.7	98.4	2.6	93.7	3.5
	50.0	94.7	2.8	96.2	3.7	94.5	2.3
	100.0	93.6	2.8	97.3	1.9	95.5	3.1
氧氟沙星	1.0	92.3	1.2	96.5	2.5	94.3	2.2
	50.0	93.4	1.8	94.4	3.2	92.6	2.5
	100.0	94.8	2.1	92.8	2.1	98.6	3.4
培氟沙星	0.5	92.8	1.5	95.3	3.1	96.4	1.4
	50.0	95.5	1.6	94.4	1.3	93.6	3.3
	100.0	97.6	1.5	93.2	0.7	96.9	2.1
氟罗沙星	0.2	97.7	2.2	94.6	3.2	92.7	2.3
	50.0	95.1	2.5	96.2	3.4	96.4	3.6
	100.0	94.3	2.1	92.9	2.9	94.6	2.4
环丙沙星	0.2	95.9	1.9	94.7	1.8	95.9	3.1
	50.0	96.8	0.9	96.2	2.4	96.7	1.9
	100.0	97.3	1.4	95.8	2.5	98.1	2.6

2.7 实际样品分析

针对实际喹诺酮类药物生产工厂排放的工业废水,按照所建立的聚合物整体柱固相微萃取-液相色谱-串联质谱法测定工业废水中6种喹诺酮残留量,结果如表4所示。从表4中可以看出,30份工业废水中,6份水样检出含有部分喹诺酮类药物,阳性检出率为20%。在阳性样品中,恩诺沙星残留量较高,在1.9~51.4 μg/L之间,平均值为23.1 μg/L,阳性检出率高达83.3%,这是由于恩诺沙星对革兰氏阴性菌具有较好的杀灭作用而导致企业广泛生产,从而引起部分工业废水中检出恩诺沙星残留。

表4 阳性样品检测结果 (μg·L⁻¹)

目标物	样1	样2	样3	样4	样5	样6
恩诺沙星	6.7	1.9	—	51.4	25.3	30.3
洛美沙星	3.3	0.7	—	—	4.8	—
氧氟沙星	—	—	—	2.4	—	—
培氟沙星	—	—	1.2	—	2.7	—
氟罗沙星	2.1	—	—	—	—	0.4
环丙沙星	—	0.3	1.6	—	—	—

2.8 与其他方法的比较

通过查阅相关文献,将聚合物整体柱(BMA-co-EDMA)微萃取环境水样中喹诺酮类药物的方法与其他有关方法进行比较^[13-15],结果如表 5 所示。从

表 5 中可以看出,该方法的检测器、检出限、回收率与文献报道结果基本一致,但与固相萃取(HLB)样品前处理相比,BMA-co-EDMA 可以反复使用至少 10 次以上,有效提高柱子使用效率,降低检测成本。

表 5 本方法与其他方法的对比

方法	分析对象	前处理	检测器	LODs/(ng·L ⁻¹)	回收率/%
尹燕敏等 ^[13]	水	固相萃取(HLB)、一次性	UPLC-MS	0.01~0.50	68.0~132.0
顾海东等 ^[14]	水	固相萃取(HLB)、一次性	UPLC-MS	0.3~1.0	81.5~116
杨路平等 ^[15]	饮用水	固相萃取(HLB)、一次性	UPLC-MS	0.04~1.8	69.2~85.2
本方法	环境水样	BMA-co-EDMA、十次性	LC-MS	0.07~0.35	92.3~98.6

3 结论

以 BMA 为功能单体,EDMA 为交联剂,正丙醇和聚乙二醇 400 为致孔剂,AIBN 为引发剂,在不锈钢管模具中制备聚合物整体柱;以该聚合物整体柱为萃取介质,利用 PMME 技术与 LC-MS 法建立了同时测定喹诺酮类药物生产工厂排放的工业废水中 6 种喹诺酮残留量的分析方法。结果显示:聚合物整体柱(BMA-co-EDMA)稳定性和重现性良好,可重复使用至少 10 次,有效提高了使用效率,降低了检测成本;在 0.2~100.0 ng/mL 质量浓度范围内,各目标物定量离子峰面积与其质量浓度呈现良好线性关系,相关系数(r^2)在 0.999 6~0.999 9 之间,LODs 在 0.07~0.35 ng/L,LOQs 在 0.2~1.0 ng/L,回收率在 92.3%~98.6% 之间,RSD 在 0.7%~3.7%。该方法回收率高、精密度好,可用于工业废水中 6 种喹诺酮类药物残留检测,适用于环境保护部门对环境水样的日常监测。

参考文献

[1] 苏思慧,何江涛,杨蕾,等.北京东南郊土壤剖面氟喹诺酮类抗生素分布特征[J].环境科学,2014,35(11):4257-4266.
 [2] 高立红,史亚利,刘杰民,等.污水中氟喹诺酮类抗生素的分析方法[J].环境化学,2010,29(5):948-953.
 [3] Rocha Diego G, Santos Flavio A, DA Silva Julio Cesar C, et al. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 34(3): 1379-1391.
 [4] 刘靖靖,林黎明,江志刚,等.高效液相色谱法同时检测 8 种喹诺酮类兽药残留量[J].分析试室,2007,26(8):5-9.
 [5] 金高娃,蔡友琼,于慧娟,等.超高效液相色谱法测定水产品中 3

种喹诺酮类药物残留量[J].理化检验-化学分册,2012,48(1):43-48.
 [6] 张毅,岳振峰,蓝芳,等.分散固相萃取净化与液相色谱/串联质谱法测定牛奶中 8 类禁用药物残留量[J].分析化学,2012,40(5):724-729.
 [7] 李锋格,苏敏,李晓岩,等.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肝中磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J].色谱,2011,29(2):120-125.
 [8] Fernandez-Torres R, Bello Lopez MA, Consentino M, et al. Enzymatic-microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 54(3): 1146-1156.
 [9] 黄京芳,冯钰铨,林幸华.聚合物整体柱管内固相微萃取-高效液相色谱在线联用测定血浆中的氟喹诺酮类药物[J].中国药理学杂志,2009,44(12):941-945.
 [10] 黄秀静,熊珍珍,吴春兰,等.聚合物整体柱的制备及应用研究进展综述[J].化学工程师,2017,261(6):58-60.
 [11] 王娜妮,张扬,董宇,等.聚合物整体柱在中药分析中的应用[J].中华中医药学刊,2015,33(7):1716-1719.
 [12] 王洪涛,刘文鹏,宫小明,等.聚合物整体柱-液质联用测定硝基咪唑代谢物[J].食品研究与开发,2013,32(23):30-36.
 [13] 尹燕敏,沈颖青,朱月芳,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水和沉积物中磺胺类、喹诺酮类和氯霉素类抗生素残留[J].分析科学学报,2015,31(2):000228-232.
 [14] 顾海东,尹燕敏,秦宏兵.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药物[J].环境监测管理与技术,2013,25(3):34-37.
 [15] 杨路平,焦燕妮,邵立君,等.超高效液相色谱-质谱法测定饮用水中 14 种氟喹诺酮类药物的残留量[J].理化检验-化学分册,2016,52(4):397-399. ■