ICS 13.020.30
Z 05

青 岛 微 藻 产 业 学 会
团 体 标 准

T/QMIS XX - XXXX

海水中喹诺酮类药物的测定
高效液相色谱-串联质谱法

Determination of Quinolones in seawater by HPLC-MS/MS method

（征求意见稿）

2022 -XX-XX 发布　　2022-XX-XX 实施

青岛微藻产业学会　　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本标准由青岛微藻产业学会提出并归口。

本标准起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、青岛浩澳环保科技有限公司、天祥（天津）质量技术服务有限公司青岛分公司。

本标准主要起草人：李兆新、孙晓杰、郭萌萌、邢丽红、彭吉星、吴海燕、孙伟红、刘　莹、董　晓、高金芳、王勇、刘宗丽、史昕航、刘云龙。

海水中喹诺酮类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

警示——本实验操作过程中需接触大量有机溶剂，且标准物质或溶液均具有毒性，样品前处理实验应在通风橱内进行。

1 范围

本方法规定了液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）测定海水中17种喹诺酮类药物残留量的样品采集、处理、分析步骤、结果计算、质量保证和质量控制的方法和程序。

本方法适用于海水、河口水及入海排污口污水样品中依诺沙星、麻保沙星、氧氟沙星、培氟沙星、氟罗沙星、洛美沙星、诺氟沙星、环丙沙星、奥比沙星、恩诺沙星、丹诺沙星、沙拉沙星、司帕沙星、双氟沙星、噁喹酸、氟甲喹、萘啶酸单种或多种药物残留量的测定。

海水中喹诺酮类药物的检出限为5.0 ng/L，检测定量限为20.0 ng/L。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 17378.2 海洋监测规范第2部分：数据处理与分析质量控制

GB 17378.3 海洋监测规范第3部分：样品采集、贮存与运输

3 方法原理

海水样品中的喹诺酮类药物经固相萃取柱富集、净化，用液相色谱–串联质谱仪测定，内标法定量分析。

4 试剂和材料

除非另有说明，分析时所用试剂均为分析纯。

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

4.3 乙腈（C2H3N）：色谱纯。

4.4 甲酸（CH_2O_2）：色谱纯。

4.5 乙酸铵（CH_3COONH_4）：色谱纯。

4.6 盐酸（HCl）：ρ=1.19 g/mL。

4.7 盐酸溶液（0.10 mol/L）：准确量取盐酸（4.6）8.40 mL，用水稀释至1000 mL。

4.8 乙酸铵溶液（5.00 mol/L）：准确称取 0.1925 g 乙酸铵（4.5）用水溶解并稀释至 500 mL。用盐酸溶液（4.7）调节 pH 为 3±0.05，现用现配。

4.9 甲酸水溶液（0.1%）：准确量取 0.50 mL 甲酸（4.4），用水稀释并定容至 500 mL。

4.10 甲酸水（0.1%）-乙腈：（9+1，体积比），准确量取 90 mL 0.1%甲酸水溶液（4.9）和 10 mL 乙腈（4.3）混合。

4.11 标准品：依诺沙星（enoxacin， ENX，纯度为 99.0%）、麻保沙星（marbofloxacin，MAR，纯度为 99.0%）、氧氟沙星（ofloxacin，OFL，纯度为 99.0%）、培氟沙星（pefloxacin，PEF，纯度为 99.0%）、氟罗沙星（fleroxacin，FLE，纯度为 99.0%）、洛美沙星（lomefloxacin，LOM，纯度为 98.0%）、诺氟沙星（norfloxacin，NOF，纯度为 99.0%）、环丙沙星（ciprofloxacin，CIP，纯度为 99.9%）、奥比沙星（orbifloxacin，ORB，纯度为 99.0%）、恩诺沙星（enrofloxacin，ENR，纯度为 99.8%）、丹诺沙星（danofloxacin mesylate，DAN，纯度为 99.9%）、沙拉沙星（sarafloxacin，SAR，纯度为 98.0%）、司帕沙星（sparfloxacin，SPX，纯度为 99.6%）、双氟沙星（difloxacin，DIF，纯度为 98.0%）、噁喹酸（oxloinic acid，OA，纯度为 98.0%）、氟甲喹（flumequine，FLU，纯度为 98.5%）、萘啶酸（nalidixic acid，FLE，纯度为 99.0%）。

4.12 内标物质：氘代诺氟沙星（D_5-NOF，纯度为 99.0%）、氘代环丙沙星（D_8-CIP，纯度为 99.0%）、氘代恩诺沙星（D5-ENR，纯度为 99.0%）。

4.13 标准储备溶液（1.00 mg/mL）：分别准确称取 10.0 mg 喹诺酮标准品（4.11），用甲醇（4.2）溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，配制成浓度均为 1.00 mg/mL 的标准储备液。-20℃以下避光保存，有效期 3 个月。

4.14 内标标准储备溶液：分别准确称取 10.0 mg 内标物质（4.12），用甲醇（4.12）溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，配制成浓度均为 1.0 mg/ml 的内标标准储备液。-20℃以下避光保存，有效期 3 个月。

4.15 混合标准工作溶液：分别准确量取 0.10 mL 标准储备溶液（4.13）于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释配定容制成浓度为 1.0 μg/mL 的混合标准工作溶液。4℃下冰箱中保存，有效期 1 个月。

4.16 混合内标标准工作溶液：分别准确量取 0.10 mL 内标标准储备溶液（4.14）于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释定容配制成浓度为 1.0 μg/mL 的混合内标标准工作溶液。4℃下冰箱中保存，有效期 1 个月。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪（LC-MS/MS）：配电喷雾离子源(ESI)。

5.2 天平：感量 0.01 g。

5.3 分析天平：感量 0.000 01g。

5.4 涡旋混合器。

5.5 氮吹仪。

5.6 pH 计。

5.7 固相萃取装置。

5.8 固相萃取柱：500 mg/6mL，Oasis HLB 柱或性能相当者。

5.9 醋酸纤维滤膜：0.45 μm。

5.10 水相和有机相滤膜：0.22 μm。

5.11 尖底玻璃离心管：具刻度，10 mL。

5.12 棕色容量瓶：10 mL 、100 mL 和 500 mL。

6 样品采集

样品的采集、贮存与运输等要求执行 GB 17378.3 的规定。采集海水置于棕色瓶中，4℃以下密封保存，一周内完成测试。

7 分析步骤

7.1 提取和净化

固相萃取柱（5.9）置固相萃取装置（5.7）上，依次用6 mL甲醇和6 mL乙酸铵溶液（4.8）进行平衡活化，备用。

准确量取500 mL经0.45 μm醋酸纤维膜过滤后的海水样品，加入适量盐酸溶液（4.7）调节pH至3，准确加入1 μg/mL混合内标标准工作溶液50 μL（4.16），摇匀，以约5 mL/min的流速通过活化后的固相萃取柱。然后用10 mL乙酸铵溶液（4.8）淋洗，用氮气吹至近干，用6 mL甲醇（4.2）洗脱，收集洗脱液于10 mL尖底玻璃离心管（5.11）中，尖底玻璃离心管置于氮吹仪（5.5）内，40℃水浴下用氮气吹至近干，残留物用0.1%甲酸水-乙腈（4.10）稀释至1 mL，用涡旋混合器（5.4）涡旋混匀1 min，经0.22 μm水相和有机相滤膜（5.10）过滤至进样瓶中，待测。

7.2 样品测定

7.2.1 仪器条件

参考仪器分析条件：

——色谱柱：C_{18}柱，MGⅡ (2.1 mm x150 mm，5μm)，或性能相当者。
——流动相：A：0.1%甲酸水溶液 (4.9)，B：乙腈(4.3)，梯度洗脱程序见表 1；
——流速：0.20 mL/min；
——柱温：30℃；
——进样量：10 μL；
——离子源：电喷雾，正离子模式；
——扫描方式：选择反应监测，选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 2；
——喷雾电压：4.5 kV；
——鞘气流量：12 L/min；
——辅助气流量：2 L/min；
——源内碰撞诱导解离电压：10 V；

——碰撞气压力：氩气，1.5 mTorr；
——离子传输管温度：350 ℃；
——Q1半峰宽：0.7 Da；
——Q3半峰宽：0.7 Da。

表1 流动相梯度洗脱程序

开始时间（min）	流动相 A 比例（%）	流动相 B 比例（%）
0	90	10
0.50	90	10
3.00	30	70
5.00	10	90
8.00	10	90
9.00	90	10
10.00	90	10

表2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

目标化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 (ev)
氟罗沙星 FLE	370	269	26
		326*	19
氧氟沙星 OFL	362	261	27
		318*	18
诺氟沙星 NOR	320	233	24
		276*	16
依诺沙星 ENX	321	232	34
		303*	21
环丙沙星 CIP	332	245	22
		288*	17
恩诺沙星 ENR	360	245	26
		316*	9
洛美沙星 LOM	352	265	22
		308*	16
丹诺沙星 DAN	358	283	22
		340*	22
奥比沙星 ORB	396	295	24
		352*	17
双氟沙星 DIF	400	299	28
		356*	19
沙拉沙星 SAR	386	299	26
		342*	18
司帕沙星 SPX	393	292	25
		349*	19

噁喹酸 OA	262	216	29
		244*	18
氟甲喹 FLU	262	202	32
		244*	18
培氟沙星 PEF	334	290	18
		316*	20
麻保沙星 MAR	363	320	23
		345*	29
萘啶酸 NA	233.3	215.2	19
		187.4*	35
氘代诺氟沙星 D5-NOR	325	307*	22
氘代环丙沙星 D8-CIP	340	322*	21
氘代恩诺沙星 D5-ENR	365	321*	19
注：* 为定量碎片离子			

7.2.2 定性分析

通过比较标准溶液和样品的保留时间及离子碎片丰度比进行目标化合物的定性，阳性样品保留时间与标准物质保留时间相对标准偏差在±5%以内，且检测到的离子的相对丰度，用与最强离子（基峰）的强度百分比表示，应当与浓度相当的校正标准相对丰度一致。基峰与次强碎片离子丰度比应符合表3要求。17种喹诺酮类药物液相色谱图参见附录A。

表 3 基峰与次强碎片离子丰度比要求

次强碎片离子相对丰度(%)	允许偏差(%)
＞50	±20
＞20～50	±25
＞10～20	±30
≤10	±50

7.2.3 定量分析

7.2.3.1 标准曲线绘制

准确吸取混合标准工作溶液（4.15）适量，用 0.1%甲酸水-乙腈（4.10）逐级稀释，配制成浓度为 1、2、5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的标准系列溶液，同时加入混合内标标准工作溶液（4.16），使内标浓度均为 50 ng/mL。以被测组分与其对应内标的峰面积比值为纵坐标，以系列标准溶液中各个组分含量与对应内标含量比值为横坐标，绘制标准曲线，计算回归方程和相关系数。

7.2.3.2 试样测定

参照 7.2.1 仪器条件，对进样瓶中待测样（7.1）进行测定。

8 结果计算

以试样溶液和相应的标准工作液，作多点校准，按内标法定量。标准溶液及试样溶液中喹诺酮类药物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。根据式（1）计算出试样溶液中喹诺酮类药物的浓度，根据式（2）计算海水中喹诺酮类药物的浓度，保留三位有效数字：

$$Ci = \frac{Cis}{a}\left(\frac{Ai}{Ais} - b\right) \quad \text{……（1）}$$

Ci——试样溶液中喹诺酮类药物的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
Cis——试样溶液中喹诺酮类内标物的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
Ai——试样溶液中喹诺酮类药物的峰面积；
Ais——试样溶液中喹诺酮类内标物的峰面积；

$$\omega = \frac{C_i \times V}{V1} \quad \text{……（2）}$$

ω——海水中喹诺酮类药物的含量，单位为纳克每升(ng/L)；
V——定容体积，单位为毫升（mL）；
V1——试样体积，单位为升(L)。

9 精密度和准确度

6家实验室对10.0 ng/mL、50.0 ng/mL和100.0 ng/mL三个加标水平的海水样品分别进行了5次重复测定：在10.0ng/m添加水平下，六家实验室相对标准偏差为3.67%～5.41%；实验室间再现性相对标准偏差为4.28%；在20.0ng/m添加水平下，六家实验室相对标准偏差为3.67%～5.41%；实验室间再现性相对标准偏差为4.28%；在50.0ng/m添加水平下，六家实验室相对标准偏差为3.67%～5.41%；实验室间再现性相对标准偏差为4.28%。

10 质量保证和质量控制

10.1 校准曲线

每批样品应配制标准曲线，相关系数不小于0.99；每个工作日应测定一种或几种浓度的标准溶液以检验标准曲线，测定值与标准值的相对标准偏差不大于10%。

10.2 空白

10.2.1 试剂空白

所有试剂空白测试结果应低于方法检出限。

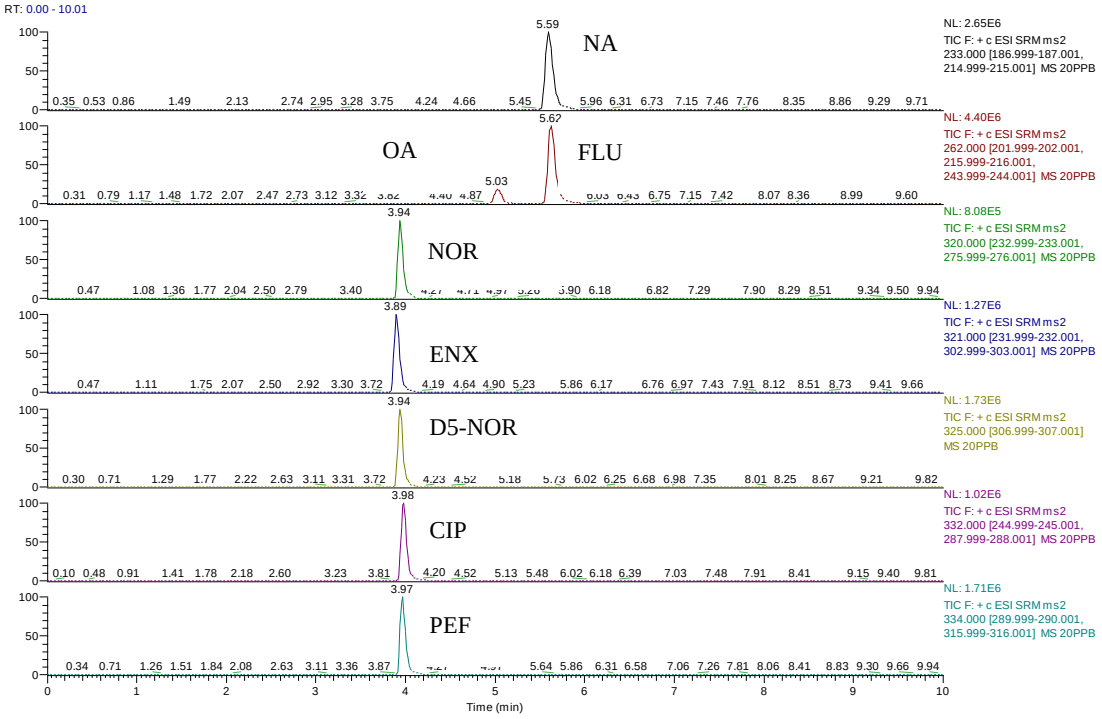
10.2.2 全过程空白

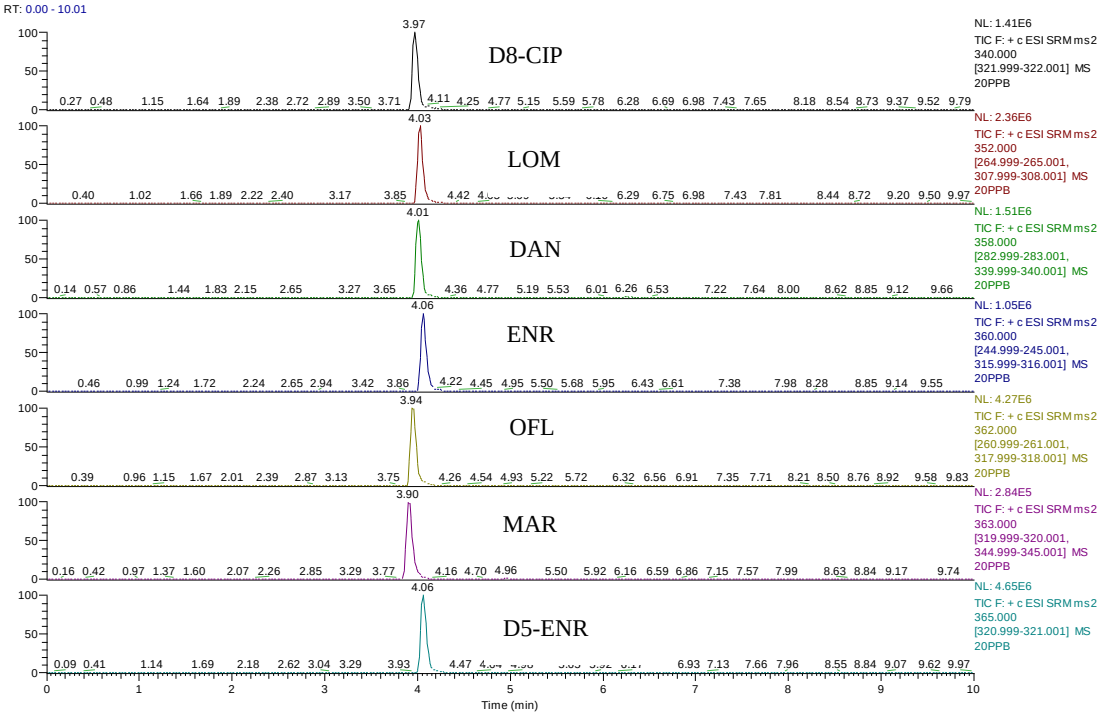
以人工海水或经检测不含喹诺酮类药物的海水作为空白样品，按照7 规定进行空白试验。每批样品全过程空白的样品数量不少于该批样品总数的10%。

10.3 平行样

本方法中平行样的数量不小于样品数的10%，平行双样相对偏差应符合GB 17378.2的规定。

附录 A
（资料性附录）


RT: 0.00 - 10.01
NA
OA
FLU
NOR
ENX
D5-NOR
CIP
PEF
NL: 2.65E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 233.000 [186.999-187.001, 214.999-215.001] MS 20PPB
NL: 4.40E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 262.000 [201.999-202.001, 215.999-216.001, 243.999-244.001] MS 20PPB
NL: 8.08E5
TIC F: + c ESI SRM ms2 320.000 [232.999-233.001, 275.999-276.001] MS 20PPB
NL: 1.27E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 321.000 [231.999-232.001, 302.999-303.001] MS 20PPB
NL: 1.73E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 325.000 [306.999-307.001] MS 20PPB
NL: 1.02E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 332.000 [244.999-245.001, 287.999-288.001] MS 20PPB
NL: 1.71E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 334.000 [289.999-290.001, 315.999-316.001] MS 20PPB
Time (min)


RT: 0.00 - 10.01
D8-CIP
LOM
DAN
ENR
OFL
MAR
D5-ENR
NL: 1.41E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 340.000 [321.999-322.001] MS 20PPB
NL: 2.36E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 352.000 [264.999-265.001, 307.999-308.001] MS 20PPB
NL: 1.51E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 358.000 [282.999-283.001, 339.999-340.001] MS 20PPB
NL: 1.05E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 360.000 [244.999-245.001, 315.999-316.001] MS 20PPB
NL: 4.27E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 362.000 [260.999-261.001, 317.999-318.001] MS 20PPB
NL: 2.84E5
TIC F: + c ESI SRM ms2 363.000 [319.999-320.001, 344.999-345.001] MS 20PPB
NL: 4.65E6
TIC F: + c ESI SRM ms2 365.000 [320.999-321.001] MS 20PPB
Time (min)

…

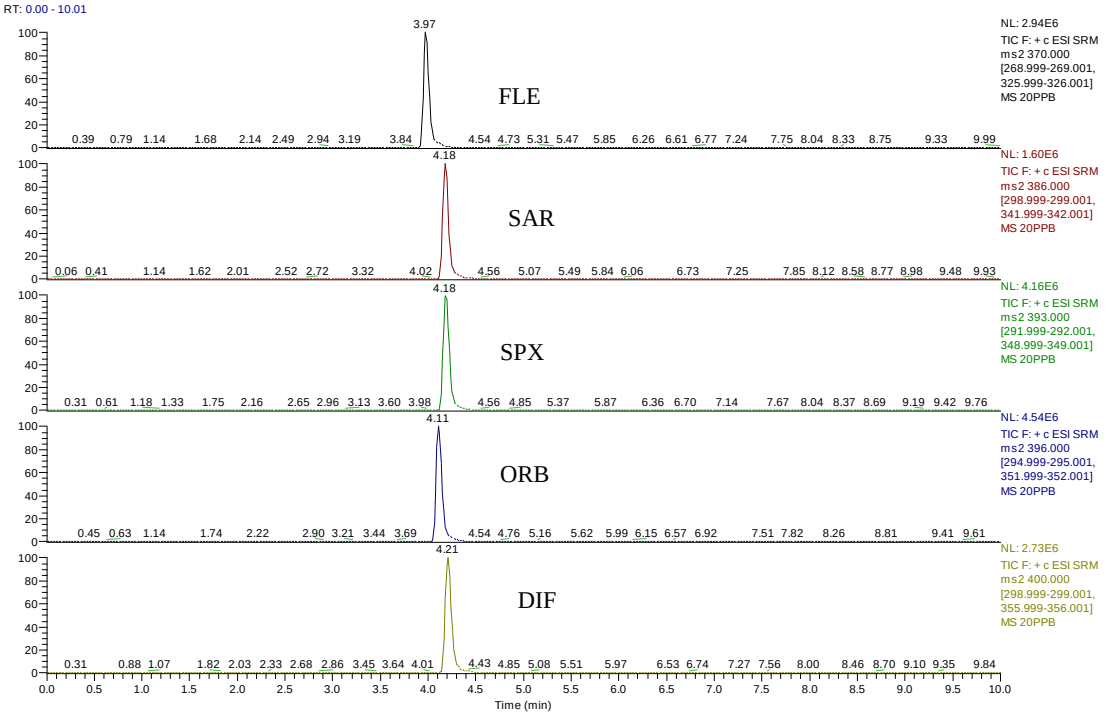


图 A.1 17 种喹诺酮以及 3 种内标物标准溶液的色谱图（20.0 ng/mL）