

XX

X X X X 标 准

HJ XX/ XXXX—XXXX

水质 37 种抗生素类化合物的测定 固相萃 取法-高效液相色谱-三重四级杆质谱法

Water quality—Determination of 37 antibiotics—Solid phase extraction-high
performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

XXXXX 发 布

目 次

前 言II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 方法原理 1

4 干扰和消除 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 3

7 样品 3

8 分析步骤 4

9 结果计算与表示 5

10 准确度 6

11 质量保证和质量控制 6

12 废物处置 7

附录 A（规范性）方法检出限和测定下限 8

附录 B（资料性）质谱参考条件 10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由生态环境部南京环境科学研究所提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：生态环境部南京环境科学研究所、成都理工大学、河北工程大学、江苏省环境监测中心、重庆市生态环境监测中心

本文件主要起草人：郭欣妍、王娜、施玛丽、张晓辉、许淑霞、汪庆、张蓓蓓、郑旋、倪妮、朱长青、张腾

水质 37 种抗生素类化合物的测定

固相萃取法-高效液相色谱-三重四级杆质谱法

警告:实验中使用的部分溶剂及标准品具有一定的毒性,试剂配制和样品前处理应在通风橱中进行,操作时应按规定要求佩戴防护器具,避免接触皮肤和衣物。

1 范围

本标准规定了测定水中37种抗生素类化合物的固相萃取法-高效液相色谱-三重四级杆质谱法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水、农业废水和海水中泰乐菌素、克拉霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素、阿奇霉素、螺旋霉素、替美考星、吉他霉素、克林霉素、林可霉素、恩诺沙星、氟罗沙星、沙拉沙星、环丙沙星、氧氟沙星、洛美沙星、诺氟沙星、麻保沙星、培氟沙星、四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、磺胺甲恶唑、磺胺二甲(基)嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡嗪、磺胺噻唑、磺胺间二甲氧基嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、甲氧苄啶、阿莫西林、氨苄西林等37种抗生素类化合物的测定。

取样量为1 L,试样定容体积为1.0 ml,进样体积为5 μ l时,37种抗生素的方法检出限为2 ng/L~8 ng/L,测定下限为8 ng/L~32 ng/L,见附录A。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 17378.3 海洋监测规范 第3部分:样品采集、贮存与运输

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 442.3 近岸海域环境监测技术规范 第三部分 近岸海域水质监测

3 方法原理

在pH值为2条件下,样品中的多类抗生素经亲水性反相固相萃取柱富集净化,用高效液相色谱-三重四级杆质谱仪分离检测。根据保留时间和特征离子峰定性,内标法定量。

4 干扰和消除

4.1 当样品中存在余氯等氧化性物质时,可在样品采集和保存(7.1)时加入抗坏血酸(5.6)消除干扰。

4.2 当样品基质较复杂时,可通过减少取样体积、QuEChERS方法净化定容液等方法降低基质影响。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，实验用水为新制备的不含目标化合物的纯水。

5.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.3 盐酸（HCl）： $\rho=1.19\text{ g/ml}$ ， $w\in[36.0\%\sim38.0\%]$ 。

5.4 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.5 氢氧化钠（NaOH）。

5.6 抗坏血酸（C₆H₈O₆）。

5.7 二水合乙二胺四乙酸二钠（C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O）。

5.8 分散固相萃取材料：N-丙基乙二胺（PSA）、石墨化炭黑（CarbonS）。

5.9 盐酸溶液。

量取适量盐酸（5.3）缓慢加入到水中，调节溶液pH值至 2 ± 0.5 。

5.10 甲酸溶液。

用甲酸（5.4）和水按1:999体积比进行混合。

5.11 甲酸乙腈溶液I。

用甲酸溶液（5.10）和乙腈（5.1）按1:1体积比进行混合。

5.12 甲酸乙腈溶液II。

用甲酸（5.4）和乙腈（5.1）按5:95体积比进行混合。

5.13 氢氧化钠溶液： $\rho(\text{NaOH})=40\text{ g/L}$ 。

取4.0 g氢氧化钠（5.5）溶于少量水中，稀释至100 ml。

5.14 目标化合物标准贮备液： $\rho=100.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

可购买有证标准溶液，组分包括泰乐菌素、克拉霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素、阿奇霉素、螺旋霉素、替美考星、吉他霉素、克林霉素、林可霉素、恩诺沙星、氟罗沙星、沙拉沙星、环丙沙星、氧氟沙星、洛美沙星、诺氟沙星、麻保沙星、培氟沙星、四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、磺胺甲恶唑、磺胺二甲(基)嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺吡啶、磺胺氯哒嗪、磺胺噻唑、磺胺间二甲氧基嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、甲氧苄啶、阿莫西林、氨苄西林按标准溶液证书要求保存。也可用纯度大于99.0%的有证标准物质配制，用甲醇（5.2）溶解，制备的标准贮备液于-20℃以下冷冻、密封、避光保存，保存期为180 d。

5.15 目标化合物标准使用液： $\rho=10.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

移取适量目标化合物标准贮备液（5.14），用甲醇（5.2）稀释，于-20℃以下冷冻、密封、避光保存，保存期为90 d。

5.16 内标贮备液： $\rho=100.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

内标物推荐阿特拉津-d5标准品，也可使用其他同位素物质。可购买有证标准溶液，按标准溶液证书要求保存。也可用有证标准物质制备，标准物质纯度大于99.0%，用少量甲醇（5.1）溶解，转移至100 ml容量瓶中，用甲醇（5.1）定容至标线，混匀。分装于棕色样品瓶中，密封，-20℃以下冷冻避光保存，保存期为180 d。

5.17 内标使用液： $\rho=1.00\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

移取适量内标贮备液（5.16），用甲醇（5.2）稀释，于-20℃以下冷冻、密封、避光保存，保存期为90 d。

5.18 固相萃取柱：填料为二乙烯苯和 *N*-乙烯基吡咯烷酮共聚物，规格为 200 mg/6 ml，或其他等效固相萃取柱。

5.19 氮气：纯度 $\geq 99.99\%$ 。

5.20 氩气：纯度 $\geq 99.999\%$

5.21 滤膜I：0.22 μm ，玻璃纤维或其他材质等效滤膜。

5.22 滤膜II：0.45 μm ，玻璃纤维或其他材质等效滤膜。

6 仪器和设备

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的A级玻璃容器。

6.1 采样瓶：具塞玻璃瓶，>1 L。

6.2 高效液相色谱-三重四级杆质谱仪：具备梯度洗脱和多反应监测功能。

6.3 色谱柱：100 mm（柱长） $\times$ 2.1 mm（内径） $\times$ 1.8 μm （粒径）的 C18 的色谱柱，或其他等效色谱柱

6.4 固相萃取装置：手动或自动，流速可调节。

6.5 浓缩装置：氮吹仪或其他功能相当的浓缩装置。

6.6 pH 计：pH 值测定范围为 0~14。

6.7 微量注射器或移液器：10 μl 、50 μl 、100 μl 、1000 μl 。

6.8 进样瓶：2.0 ml 带聚四氟乙烯内衬垫的螺旋盖棕色玻璃瓶。

6.9 一般实验室常用仪器和设备。

7 样品

7.1 样品的采集和保存

参照 GB 17378.3、HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164和HJ 442.3的相关规定采集和运输样品。样品充满采样瓶（6.1），根据余氯试纸指导在样品中可能含有余氯的情况下，每1 L样品中加入100 mg抗坏血酸（5.6），在4℃以下冷藏、密封、避光保存，7 d内完成萃取。

7.2 试样的制备

萃取前用盐酸溶液（5.9）或氢氧化钠溶液（5.13）调节水样pH $\approx$ 2。萃取液应于4℃以下冷藏、密封、避光保存，14 d内完成分析。

将固相萃取柱（5.18）固定在固相萃取装置（6.4）上，依次使用10 ml甲醇（5.2）和10 ml 实验用水活化，在整个萃取的过程中应确保小柱中填料表面不露出液面。取1L样品，经滤膜II（5.21）过滤后，加入100 mgNa₂EDTA（5.7），混匀后以10 ml/min~15 ml/min（约3~5滴/秒）的流速通过固相萃取柱。用10 ml实验用水淋洗小柱，然后用真空泵干燥小柱30 min或用氮气（5.19）吹干。再用10 ml甲醇（5.2）以3 ml/min（约1滴/秒）的流速洗脱，收集洗脱液即为萃取液。萃取液经浓缩装置（6.5）浓缩至近干，用甲酸乙腈溶液I（5.11）定容至1.0 ml，对基质复杂的样品加入用甲酸乙腈溶液II（5.12）定容至1.0 ml，

采用10 mg PSA和5 mg CarbonS（5.8）涡旋2 min净化，定容液加入50 µl内标使用液（5.17），过滤膜I（5.22）后待测。

7.3 空白试样的制备

用实验用水代替样品，按照与试样的制备（7.2）相同步骤制备实验室空白试样。

8 分析步骤

8.1 仪器参考条件

8.1.1 液相色谱参考条件

流动相A：甲酸水溶液（5.10），流动相B：乙腈（5.1）；梯度洗脱程序见表1；
流速：0.3 ml/min；
柱温：35 °C；
进样体积：5 µl。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相	
	A/%	B/%
0	95	5
5	90	10
10	50	50
15	40	60
20	95	5
22	95	5

8.1.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI），正离子模式。
监测方式：多反应监测（MRM）。
其余条件参见附录B。

8.2 校准

按照仪器使用说明书在规定时间和频次内校正高效液相色谱-三重四极杆质谱仪的质量数和分辨率，以确保仪器处于最佳测试状态。

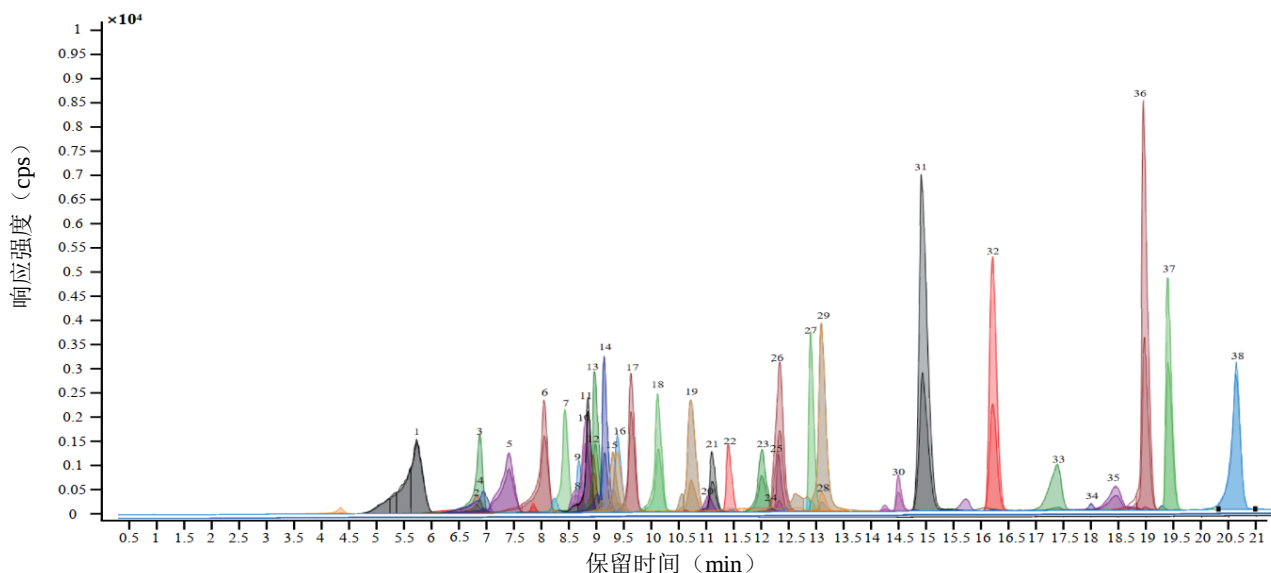
8.2.1 标准曲线的建立

取一定量目标化合物标准使用液（5.15），用甲酸乙腈溶液I（5.11）或甲酸乙腈溶液II（5.12）配制至少5个浓度点的标准系列，目标化合物的质量浓度分别为2.00 µg/L、5.00 µg/L、10.0 µg/L、50.0 µg/L、100 µg/L和200 µg/L（此为参考浓度），分别取1.0 ml制备好的标准系列，加入内标使用液（5.17）50 µl，混匀待测。

按照仪器参考条件（8.1），从低浓度到高浓度的顺序，依次测定标准系列溶液，以目标化合物的质量浓度为横坐标，以其对应响应值与内标物响应值的比值和内标物浓度的乘积为纵坐标，建立标准曲线。

8.2.2 标准参考谱图

在本标准仪器参考条件下，所有化合物的总离子色谱图见图 1。



1.磺胺嘧啶；2.林可霉素；3.磺胺噻唑；4.磺胺吡啶；5.磺胺甲基嘧啶；6.甲氧苄啶；7.麻保沙星；8.土霉素；9.阿莫西林；10.磺胺二甲(基)嘧啶；11.氟罗沙星；12.诺氟沙星；13.氧氟沙星；14.培氟沙星；15.环丙沙星；16.洛美沙星；17.恩诺沙星；18.磺胺对甲氧嘧啶；19.磺胺间甲氧嘧啶；20.沙拉沙星；21.磺胺氯哒唑；22.氨苄西林；23.磺胺甲恶唑；24.金霉素；25.阿奇霉素；26.螺旋霉素；27.克林霉素；28.强力霉素；29.四环素；30.替美考星；31.磺胺间二甲氧基嘧啶；32.红霉素；33.泰乐菌素；34.吉他霉素；35.克拉霉素；36.去水红霉素；37.罗红霉素；38.交沙霉素

图 1 抗生素的多离子反应监测总离子流图 (100 $\mu\text{g/L}$)

8.3 试样测定

按照与标准曲线测定相同的仪器参考条件（8.1）进行试样（7.2）的测定。

8.3.1 空白试验

按照与试样测定（8.3）相同的仪器参考条件（8.1）进行空白试样（7.3）的测定。

9 结果计算与表示

9.1 定性分析

每个目标化合物选择1个母离子和2个子离子进行定性分析。在相同的实验条件下，试样中目标化合物的保留时间与标准样品中该目标化合物的保留时间比较，相对偏差的绝对值应小于2.5%；样品谱图中各目标化合物定性离子的相对离子丰度（ K_{sam} ）与浓度接近的标准溶液谱图中对应的定性离子的相对离子丰度（ K_{std} ）进行比较，偏差不超过表2规定的范围，则可判定为样品中存在对应的目标化合物。定性离子的相对离子丰度分别按照式（1）、式（2）计算：

$$K_{sam} = \frac{A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中： K_{sam} ——样品中某组分定性离子的相对离子丰度，%；
 A_2 ——样品中某组分定性离子对的峰面积（或峰高）；
 A_1 ——样品中某组分定量离子对的峰面积（或峰高）。

$$K_{std} = \frac{A_{std2}}{A_{std1}} \times 100\% \quad (2)$$

式中： K_{std} ——标准样品中某组分定性离子的相对离子丰度，%；
 A_{std2} ——标准样品中某组分定性离子对的峰面积（或峰高）；
 A_{std1} ——标准样品中某组分定量离子对的峰面积（或峰高）。

表 2 定性确认时相对离子丰度的最大允许偏差 单位： %

标准样品中某组分定性离子的相对 离子丰度（ K_{std} ）	$K_{std} > 50$	$20 < K_{std} \leq 50$	$10 < K_{std} \leq 20$	$K_{std} \leq 10$
样品中某组分定性离子的相对离子 丰度（ K_{sam} ）允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

9.2 定量分析

样品中目标化合物的质量浓度，按照式（4）计算：

$$\rho_i = \frac{\rho_1 \times V_1}{V} \times D$$

(4)

式中： ρ_i ——样品中目标化合物的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
 ρ_1 ——由标准曲线得到的试样中目标化合物的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
 V_1 ——试样体积， ml ；
 V ——取样体积， ml ；
 D ——样品的稀释倍数。

9.3 结果表示

测定结果小数点后位数的保留与方法检出限一致，最多保留3位有效数字。

10 准确度

10.1 精密度

2家实验室对加标浓度为10.0 ng/L、100 ng/L和200 ng/L统一空白加标样品进行了6次重复测定:实验室内相对标准偏差分别为2.3%~23%、1.5%~18%和0.8%~11%；实验室间相对标准偏差分别为0.6%~27%、0.1%~31%和0.2%~40%；重复性限分别为0.9 ng/L~4.5 ng/L、4.7 ng/L~ 41 ng/L和13 ng/L~ 47 ng/L；再现性限分别为0 ng/L~ 8.7 ng/L、0 ng/L~ 88 ng/L和0 ng/L~ 239 ng/L。

2家实验室分别对加标浓度为20.0 ng/L的地表水、地下水、生活污水、农业废水、工业废水和海水统一样品进行6次重复定，实验室内相对标准偏差分别为1.2%~36%、1.2%~24%、1.9%~18%、1.8%~19%、1.3%~24%、1.5%~24%；实验室间相对标准偏差分别为0%~25%、0.2%~22%、1.0%~34%、1.4%~36%、0.3%~34%、0%~26%；重复性限分别为1.6 ng/L~14 ng/L、3.4 ng/L~11 ng/L、1.3 ng/L~9.5 ng/L、2.5 ng/L~13 ng/L、2.5 ng/L~12 ng/L、6.8 ng/L~58 ng/L；再现性限分别为0 ng/L~17 ng/L、0 ng/L~15 ng/L、0 ng/L~21 ng/L、0 ng/L~24 ng/L、0 ng/L~22 ng/L、0 ng/L~23 ng/L。

10.2 正确度

2家实验室对加标浓度为10.0 ng/L、100 ng/L和200 ng/L统一空白加标样品进行了6次重复加标分析测定：加标回收率范围分别为61.9%~140%、68.5%~150%、64.7%~146%；加标回收率最终值为68.8%±13.9%~121%±35.6%、80.0%±23.0%~146%±6.91%、80.9%±2.89%~121%±25.6%。2家实验室分别对加标浓度为20.0 ng/L的地表水、地下水、生活污水、农业废水、工业废水和海水统一样品进行6次重复定：加标回收率范围分别为76.0%~149%、63.8%~147%、68.1%~143%、58.6%~148%、62.8%~145%、68.4%~148%；加标回收率最终值为78.1%±4.29%~131%±34%、68.5%±9.34%~132.6%±19.3%、76.2%±16.2%~131%±11.5%、67.7%±18.3%~137%±21.9%、79.2%±32.9%~126.9%±44.8%、78.6%±19.8%~137%±13.1%。

11 质量保证和质量控制

11.1 空白试验

每20个样品或每批次(少于20个样品/批)至少测定1个实验室空白,其测定结果应低于方法检出限。

11.2 校准

每批样品应建立标准曲线,线性相关系数应 ≥ 0.995 ,否则重新建立标准曲线。每20个样品或每批次(少于20个样品/批)至少测定1个曲线中间浓度点标准溶液,测定结果与该点浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内,否则应重新建立标准曲线。

11.3 平行样

每20个样品或每批次(少于20个样品/批)至少测定1个平行样,测定结果大于等于测定下限时,平行双样测定结果的相对偏差应在 $\pm 30\%$ 以内。

11.4 基体加标

每20个样品或每批次(少于20个样品/批)至少测定1个基体加标样,基体加标回收率应在50%~160%之间。

12 废物处置

实验中产生的废物应集中收集,分类保存,并做好相应的标识,依法处置。

附 录 A
(规范性)
方法检出限和测定下限

各目标化合物的方法检出限和测定下限见表B. 1。

表 B.1 方法检出限和测定下限

抗生素种类	抗生素名称	方法检出限 MDL	测定下限 LOQ
大环内酯类	泰乐菌素	3	12
	克拉霉素	4	16
	红霉素	4	16
	去水红霉素	3	12
	交沙霉素	4	16
	罗红霉素	3	12
	阿奇霉素	4	16
	螺旋霉素	4	16
	替美考星	6	24
	吉他霉素	3	12
	克林霉素	4	16
	林可霉素	3	12
喹诺酮类	恩诺沙星	3	12
	氟罗沙星	4	16
	沙拉沙星	4	16
	环丙沙星	3	12
	氧氟沙星	3	12
	洛美沙星	3	12
	诺氟沙星	3	12
	麻保沙星	6	24
	培氟沙星	7	28
四环素类	四环素	6	24
	土霉素	5	20
	金霉素	6	24
	强力霉素	5	20
磺胺类及磺胺增效剂	磺胺甲恶唑	3	12
	磺胺二甲(基) 嘧啶	3	12
	磺胺嘧啶	4	16
	磺胺甲基嘧啶	4	16
	磺胺间甲氧嘧啶	2	8
	磺胺对甲氧嘧啶	4	16
	磺胺吡啶	4	16
	磺胺氯哒嗪	3	12
	磺胺噻唑	3	12
	磺胺间二甲氧基嘧啶	4	16
	甲氧苄啶	8	32
β 内酰胺类	阿莫西林	4	16

	氨苄西林	3	12
--	------	---	----

附录 B
(资料性)
质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI），正离子模式；
监测方式：多反应监测（MRM）。
其他仪器条件如下：
a) 干燥气温度：350 °C；
b) 干燥气流速：8 L/min；
c) 鞘气温度：350 °C；
d) 鞘气流速：11 L/min；
e) 毛细管电压：3500 V；
f) 喷嘴电压：500 V；
g) 雾化器压力：2.41×10⁵ Pa（35psi）；
h) 目标化合物的多反应监测条件见表A.1。

表 A.1 目标化合物的多反应监测条件

抗生素种类	抗生素名称	母离子 Parent ion (m/s)	子离子 product ion (m/s)	碰撞能 CE/V
大环内酯类	泰乐菌素	916.2	772.3*/174.1	40/44
	克拉霉素	748.3	157.9*/590.3	33/15
	红霉素	734.3	157.9*/576.2	25/15
	去水红霉素*	716.0	158.2*/576.3	25/15
	交沙霉素	828.3	173.8*/108.8	33/41
	罗红霉素	837.4	157.9*/679.3	37/21
	阿奇霉素	749.5	591.4*/573.4	33/37
	螺旋霉素	422.4	174.1*/101.2	22/22
	替美考星	435.2	174.1*/126.1	26/36
	吉他霉素	772.4	174*/109.1	40/43
	克林霉素	425.1	125.8*/377.1	15/10
	林可霉素	407.3	126.0*/359.1	10/10

喹诺酮类	恩诺沙星	360.2	316.2*/254.2	20/18
	氟罗沙星	370.1	326.0*/268.9	21/29
	沙拉沙星	386.1	299.0*/342.1	30/10
	环丙沙星	332.1	288.1*/245.1	30/40
	氧氟沙星	362.1	318.1*/261.0	10/30
	洛美沙星	352.1	264.9*/308.0	30/10
	诺氟沙星	320.1	276.0*/232.8	17/25
	麻保沙星	363.0	71.9*/320.0	33/25
	培氟沙星	334.1	290.0*/316.1	17/21
四环素类	四环素	445.0	409.9*/427.0	20/16
	土霉素	461.1	425.9*/442.9	19/12
	金霉素	479.0	444.0*/154.0	21/24
	强力霉素	445.1	428.1*/154.1	24/35
磺胺类及磺胺增效剂	磺胺甲恶唑	254.0	91.8*/155.8	29/20
	磺胺二甲(基)嘧啶	278.9	185.8*/123.9	20/25
	磺胺嘧啶	251.1	155.8*/92.0	10/30
	磺胺甲基嘧啶	265.1	155.8*/171.7	19/15
	磺胺间甲氧嘧啶	281.1	155.9*/92.1	16/34
	磺胺对甲氧嘧啶	281.1	155.9*/92.1	17/17
	磺胺吡啶	250.1	183.8*/155.7	10/30
	磺胺氯哒嗪	285.0	155.9*/92.1	14/30
	磺胺噻唑	256.0	155.7*/107.7	25/30

XXXXX-XXXX

	磺胺间二甲氧基嘧啶	310.9	156*/108.0	25/33
	甲氧苄啶	291.1	229.8*/260.8	25/25
β 内酰胺类	阿莫西林	366.3	114.0*/208.0	30/17
	氨苄西林	350.3	160.2*/192.0	22/16
内标	莠去津同位素-D5	221.2	101.1*/69.1	30/46

*在本标准的酸性前处理体系内红霉素在酸性实验体系中发生分子内脱水环合大量转化为去水红霉素，因此以去水红霉素作为定量指标

XXXXX-XXXX