

ICS 13.060

CCS Z 16

DB 54

西 藏 自 治 区 地 方 标 准

DB54/T 0487—2025

水质 11 种抗生素类化合物的测定 高效液
相色谱串联质谱法

2025 - 07 - 23 发布

2025 - 08 - 23 实施

西藏自治区市场监督管理局 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 方法原理 1

5 干扰与消除 1

6 试剂和材料 1

7 仪器和设备 3

8 样品制备 3

9 分析步骤 4

10 结果计算与表示 5

11 精密度和正确度 7

12 质量保证和质量控制 7

13 废物处理 7

附 录 A （规范性） A.1 方法的检出限和测定下限 8

附 录 B （资料性） B.1 目标化合物、内标物的多离子反应监测条件 9

附 录 C （资料性） C.1 方法的精密度和正确度 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。

本文件由西藏自治区生态环境监测中心提出。

本文件由西藏自治区生态环境保护厅归口。

本文件起草单位：西藏自治区生态环境监测中心，中国科学院青藏高原研究所，西藏大学。

本文件主要起草人：索娜卓嘎，袁跃甫，央金拉姆，边巴卓玛，周云桥，贾小华，王彩红，晋美占堆，次仁央金，张惠芳，赵矿，王小萍，董慧科，张继峰，童银栋。

水质 11 种抗生素类化合物的测定 高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件规定了使用高效液相色谱串联质谱法测定11种抗生素类化合物的规范性引用文件、术语和定义、方法原理、干扰与消除、试剂和材料、仪器和设备、样品制备、分析步骤、结果计算与表示、精密度与正确度、质量保证和质量控制和废物处理等基本要求。

本文件适用于地表水和污水中11种抗生素类化合物的测定。

当取样量为1000 ml，定容体积为1.0 ml，进样体积为5 μ l时，本文件的方法检出限为0.003 μ g/L～0.006 μ g/L，测定下限为0.010 μ g/L～0.023 μ g/L。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 493 水质 样品的保存和管理技术规定

HJ 494 水质 采样技术指导

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

水中的11种抗生素类化合物经固相萃取法富集、净化后，用液相色谱串联质谱法分离检测。根据化合物的保留时间和特征离子峰定性，内标法定量。

5 干扰与消除

金属离子与目标化合物能形成络合物，使固相萃取效率降低，可向水样中加入乙二胺四乙酸二钠抑制络合物的形成。

6 试剂和材料¹⁾

6.1 试剂。

1) 警告——本方法所使用的有机溶剂对人体健康有害，试剂配制和样品前处理过程应在通风橱内进行，操作时应按规定要求佩戴防护器具，避免接触皮肤和衣服。

除非另有说明,分析时均使用符合国家标准分析纯试剂,实验所用纯水为 GB/T 6682中规定的一级水。

6.1.1 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。

6.1.2 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。

6.1.3 甲酸(HCOOH): 色谱纯。

6.1.4 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$): 色谱纯。

6.1.5 盐酸: $c(\text{HCl})=12\text{ mol/L}$: 优级纯。

6.1.6 硫酸: $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=18.4\text{ mol/L}$: 优级纯。

6.1.7 抗坏血酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$): 分析纯。

6.1.8 乙二胺四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$): 分析纯。

6.1.9 氢氧化钠(NaOH): 分析纯。

6.1.10 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.5\text{ mol/L}$: 量取 4 ml 盐酸 (6.1.5), 缓慢加入到水中并定容至 100 ml。

6.1.11 硫酸溶液: $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=4.0\text{ mol/L}$: 量取 22 ml 硫酸 (6.1.6), 缓慢加入到水中, 待温度降低至室温后, 用水定容至 100 ml。

6.1.12 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})=1.0\text{ mol/L}$: 称取 4 g NaOH (6.2.9), 用水溶解后, 转移到 100 ml 容量瓶中, 定容至标线。

6.1.13 2 mmol/L 乙酸铵/0.2%甲酸水溶液: 称取 154 mg 乙酸铵 (6.1.4), 用水溶解后加入 2 ml 甲酸 (6.1.3), 转移到 1 L 容量瓶中, 定容至标线。

6.1.14 甲醇/水溶液($\psi=5\%$): 量取 50 ml 甲醇 (6.1.2), 用水定容至 1 L。

6.1.15 甲酸/甲醇溶液($\psi=0.1\%$): 量取 1 ml 甲酸 (6.1.3), 用甲醇 (6.1.2) 定容至 1 L。

6.1.16 氮气: 纯度 $\geq 99.99\%$ 。

6.2 标准溶液

6.2.1 标准储备液 ($c=100\text{ mg/L}$)

准确称取10.0 mg抗生素类化合物标准物质(纯度大于95%), 用甲醇(6.1.2)溶解后, 转移到100 ml棕色容量瓶中定容至标线, 此溶液可在 -10°C 下避光可保存1年。对于氟喹诺酮类抗生素, 溶于含0.5% 1.0 mol/L NaOH (6.1.12) 的甲醇溶液中。也可以直接购买有证标准溶液, 参照制造商的产品说明书保存。

6.2.2 脱水红霉素 ($c=2\text{ mg/L}$)

取400 μl 100 mg/L红霉素储备液于20 ml棕色瓶中, 加入19.6 ml甲醇, 然后加入约10 μl 硫酸溶液(6.1.11)调pH至3.0, 室温下震荡4 h, 于 -10°C 避光可保存2个月。

6.2.3 标准使用液 ($c=1\text{ mg/L}$)

将标准储备液（6.2.1）用适量的甲醇（5.1.2）稀释，现用现配。

6.2.4 内标储备液（ $c=100$ mg/L）

准确称取10.0 mg内标标准物质（纯度大于95%），用甲醇（6.1.2）溶解后，转移到100 ml棕色容量瓶中，定容至标线。此溶液在-10℃下避光可保存1年。也可以直接购买有证标准溶液，参照制造商的产品说明书保存。

6.2.5 内标使用液（ $c=1$ mg/L）

将内标储备液（6.2.4）用适量的甲醇（6.1.2）稀释，现用现配。

7 仪器和设备

7.1 仪器

高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪：配有电喷雾离子化源（ESI），具备梯度洗脱和多反应监测功能。

7.2 设备

7.2.1 色谱柱：填料粒径为 1.8 μm 、柱长 100 mm、内径 2.1 mm 的 C_{18} 反相色谱柱或其他等效色谱柱。

7.2.2 固相萃取装置：自动或手动，流速可调节，配有真空系统和缓冲瓶。

7.2.3 浓缩装置：自动氮吹浓缩仪等性能相当的设备。

7.2.4 玻璃纤维滤膜：孔径为 0.7 μm 。

7.2.5 固相萃取柱：6 ml，500 mg，60 μm 亲水亲油平衡反相吸附固相萃取柱，亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烯基吡咯烷酮聚合物填料（或其他等效填料），聚丙烯外壳。

7.2.6 玻璃离心管：10 ml。

7.2.7 针式过滤器：0.22 μm 孔径聚醚砜滤膜（有机系滤膜），聚丙烯外壳。

7.2.8 一般实验室常用仪器和设备。

8 样品制备

8.1 样品采集与保存

按照HJ 91.1和HJ 494中相关规定采集、运输和保存样品。样品采集前，向1 L棕色玻璃采样瓶中加入150 mg抗坏血酸（6.1.7）和0.2 g乙二胺四乙酸二钠（6.1.8），采样时使样品充满样品瓶，不留液上空间，并详细记录样品编号、来源和周边情况等信息。样品采集后于现场立即加入硫酸溶液（6.11）调节样品pH至2-3。

样品采集后应尽快进行分析。如暂不能分析，需在0~4℃冷藏避光保存，3天内分析完毕。

8.2 试样的制备

准确量取1 L样品，加入100 μl内标使用液（6.2.5），用玻璃纤维膜（7.2.4）过滤样品。将固相萃取柱（7.2.5）安装在固相萃取装置（7.2.2）上。依次用5 ml甲醇（6.1.2）、5 ml盐酸溶液（6.1.10）和5 ml纯水活化萃取柱。待萃取柱上超纯水剩余约2 ml时，通过管路在负压下使水样以10～15 ml/min的流速全部通过萃取柱后，依次用5 ml 5%甲醇水溶液（6.1.14）和5 ml超纯水淋洗小柱，再真空抽干小柱使其完全干燥。然后依次加入5 ml甲醇和5 ml甲酸/甲醇溶液（6.1.15），以1-2滴/秒的流速洗脱，玻璃离心管（7.2.6）收集洗脱液。洗脱液经氮吹仪（7.2.3）浓缩至近干，加入1 ml甲醇（7.1.2）和2 mmol/L 乙酸铵/0.2%甲酸水溶液（6.1.13）（V:V= 4:6）复溶，过0.22 μm有机滤膜（7.2.7）后装于1.5 ml棕色进样瓶，待测。

8.3 空白试样的制备

以实验用水代替样品，按照与试样制备相同步骤（8.2）进行实验室空白试样的制备。

9 分析步骤

9.1 仪器参考条件

9.1.1 液相色谱参考条件

- a) 流动相A：2 mmol/L 乙酸铵/0.2%甲酸混合溶液（6.1.13）。
- b) 流动相B：乙腈（6.1.1）。
- c) 梯度洗脱程序参考见表1。
- d) 运行时间：12分钟。
- e) 流速：0.3 ml/min。
- f) 柱温：35℃。
- g) 进样体积：5 μl。

表 1 液相色谱流动相梯度洗脱程序

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
0.00	90.00	10.00
4.00	85.00	15.00
6.00	60.00	40.00
9.00	60.00	40.00
9.01	10.00	90.00
12.00	10.00	90.00

注：设置2分钟后运行时间（Posttime）平衡至初始流动相比比例。

9.1.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI），正离子模式。
- b) 监测方式：多离子反应监测（MRM），具体条件参数见附录B。
- c) 毛细管电压：4000 V。
- d) 干燥气温度：350℃
- e) 干燥器流速：10 L/min。
- f) 雾化器压力：35 psi。

9.1.3 仪器调谐

按照仪器使用说明书的要求在规定时间内和频次内对高效液相色谱串联质谱仪进行仪器质量轴和分辨率调谐，以确保仪器处于最佳测试状态。

在仪器使用过程中，如发现仪器质量数出现明显偏差或灵敏度明显下降时，应立即重新对仪器进行质量轴和分辨率调谐。

9.2 校准曲线的建立

取一定量抗生素混合标准使用液（6.2.3）和内标使用液（6.2.5），用甲醇（6.1.2）和2 mmol/L 乙酸铵/0.2%甲酸水溶液（6.1.13）（*V*:*V*= 4:6）稀释，配置至少5个非零浓度点的标准工作曲线，参考浓度梯度为：1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L和200 μg/L，内标的质量浓度均为100 μg/L。

按照仪器参考条件（9.1），由低浓度到高浓度的顺序依次对标准工作溶液进行测定。以标准工作溶液中目标组分的质量浓度为横坐标，其对应的峰面积（或峰高）与内标物峰面积（或峰高）的比值乘以内标物浓度的乘积为纵坐标，建立校准曲线。

9.3 试样测定

按照与校准曲线的建立（9.2）相同的仪器条件进行试样（8.2）的测定。试样中目标化合物响应值应在标准曲线的线性范围内，超出线性范围最高点则重新制备样品并测定。重新制备样品时可减少样品量或用纯水稀释样品。

9.4 空白试验

按照与试样测定（9.3）相同的仪器条件进行空白试样（8.3）的测定。

10 结果计算与表示

10.1 定性分析

每种被测抗生素选择1个母离子和2个子离子进行监测。在相同的实验条件下，某待测组分在样品中的保留时间与标准溶液中的保留时间的相对标准偏差小于2.5%，且在试样谱图中的定性离子的相对丰度（*K_{sam}*）与浓度相近的标准溶液谱图中对应的定性离子相对丰度（*K_{std}*）偏差不超过表2规定的范围，则可判定样品中存在该待测物。11种抗生素类化合物和3种内标物的总离子流色谱图见图1。

$$K_{sam} = \frac{A_2}{A_1} \cdots \cdots \cdots (1)$$

式中：

K_{sam}——样品中目标化合物定性离子的相对丰度（%）；

A₂ ——样品中目标化合物定性离子对的峰面积（或峰高）；

A₁ ——样品中目标化合物定量离子对的峰面积（或峰高）。

$$K_{std} = \frac{A_{std2}}{A_{std1}} \cdots \cdots \cdots (2)$$

式中：

K_{std}——标准溶液中目标化合物定性离子的相对丰度比（%）；

A_{std2}——标准溶液中目标化合物定性离子对的峰面积（或峰高）；

A_{std1}——标准溶液中目标化合物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比的最大允许偏差

Kstd (%)	Ksam允许的偏差 (%)
Kstd>50	±20
20<Kstd≤50	±25
10<Kstd≤20	±30
Kstd≤10	±50

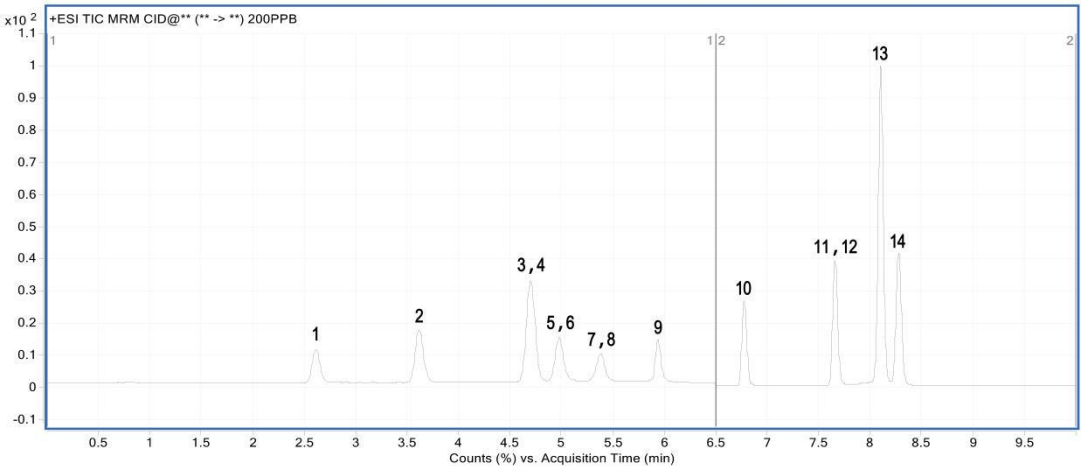


图 1 目标物及内标的总离子流图（目标物 200 μg/L，内标 100 μg/L）

- 说明：
- 1——磺胺嘧啶
 - 2——磺胺甲基嘧啶
 - 3——磺胺二甲嘧啶
 - 4——磺胺二甲嘧啶-¹³C₆
 - 5——氧氟沙星
 - 6——诺氟沙星
 - 7——环丙沙星
 - 8——环丙沙星-d₈
 - 9——恩诺沙星
 - 10——磺胺甲噁唑
 - 11——脱水红霉素
 - 12——红霉素-¹³C-d₃
 - 13——克拉霉素
 - 14——罗红霉素

10.2 定量分析

目标化合物经定性鉴别后，根据定量离子的峰面积（或峰高），用内标法计算。按照公式（3）计算样品中各目标抗生素的质量浓度。

$$\rho_i = \frac{\left(\frac{A_i \times \rho_{is}}{A_{is}} - a\right) \times V_i}{b \times V} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ_i ——样品中目标化合物i的质量浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）；

A_i ——样品中目标化合物i的峰面积（或峰高）；

A_{is} ——样品中内标物的峰面积（或峰高）；

ρ_{is} ——样品中内标物的质量浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）；

a ——校准曲线的截距；

b ——校准曲线的斜率；

V_i ——提取液定容后的体积（ml）；

V ——水样体积（ml）。

10.3 结果表示

测定结果小数位数与检出限一致。当测定结果大于或等于 $0.1 \mu\text{g/L}$ 时，保留三位有效数字。

11 精密度和正确度

实验室内和实验室间进行方法验证，相对标准偏差为1.0%~14.9%回收率为77.9%~128.1%，具体结果见附录C。

12 质量保证和质量控制

12.1 校准

校准曲线的相关系数应 ≥ 0.995 ；每20个样品或每批次（少于20个样品）应分析测定一个校准曲线中间浓度点的标准溶液，测定结果与曲线该浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内，否则需重新建立校准曲线。

12.2 空白实验

每批次样品至少进行一个实验室空白，实验室空白中目标化合物的浓度应低于方法检出限。

12.3 平行实验

每10个样品或每批次（少于10个样品）需分析一个平行样。平行样的相对标准偏差应控制在25%以内。

12.4 基质加标

每10个样品或每批次（少于10个样品）需做一个基质加标样，加标回收率应在60%~130%之间。

13 废物处理

实验操作过程产生的有机溶剂废液及废物应集中收集，分类保存，并做好相应标识，委托有资质的单位进行处理。

附 录 A
(规范性)

A.1 方法的检出限和测定下限

本方法中目标化合物的检出限和测定下限见表A.1。

表 A.1 本方法中目标化合物的检出限和测定下限

序号	化合物	CAS	所属类别	方法检出限 (μg/L)	方法测定下限 (μg/L)
1	磺胺嘧啶	68-35-9	磺胺类	0.003	0.011
2	磺胺甲基嘧啶	127-79-7		0.004	0.015
3	磺胺二甲嘧啶	57-68-1		0.003	0.010
4	磺胺甲噁唑	723-46-6		0.003	0.012
5	氧氟沙星	82419-36-1	氟喹诺酮类	0.005	0.020
6	诺氟沙星	70458-96-7		0.005	0.020
7	环丙沙星	85721-33-1		0.003	0.012
8	恩诺沙星	93106-60-6		0.005	0.020
9	脱水红霉素	114-07-8	大环内酯类	0.004	0.017
10	罗红霉素	80214-83-1		0.004	0.017
11	克拉霉素	81103-11-9		0.006	0.023

附 录 B
(资料性)

B.1 目标化合物、内标物的多离子反应监测条件

目标化合物、内标物的多离子反应监测条件见表B.1。

表 B.1 目标化合物、内标物的多离子反应监测条件（带*为定量离子）

序号	名称	母离子	子离子	碎裂电压（V）	碰撞能（eV）
1	磺胺嘧啶	251.1	156*	80	12
			92.1	80	28
2	磺胺甲基嘧啶	265.1	92.1*	80	28
			65.2	80	56
3	磺胺二甲嘧啶	279.1	186*	85	12
			92.1	85	32
4	磺胺甲噁唑	254.1	92.1*	75	28
			156	75	12
5	氧氟沙星	362.2	318.1*	100	16
			261.1	100	28
6	诺氟沙星	320.1	302.1*	90	20
			276.1	90	12
7	环丙沙星	332.1	314.1*	95	20
			231	95	36
8	恩诺沙星	360.2	316.1*	95	16
			342.1	95	20
9	脱水红霉素	716.5	158*	98	28
			558.3	98	16
10	罗红霉素	837.5	158*	113	36
			679.4	113	20
11	克拉霉素	748.5	158.1*	113	32
			590.3	113	16
12	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆	285.3	186*	85	16
			124.1	85	24
13	环丙沙星-D ₈	340.2	322.1*	95	20
			296.1	95	16
14	红霉素- ¹³ C-D ₃	737.5	162.1*	103	32
			562.3	103	16

附 录 C
(资料性)

C.1 方法的精密度和正确度

方法精密度和正确度见表C.1。

表 C.1 方法精密度和正确度

序号	目标化合物	相对标准偏差 (%)	加标回收率 (%)
1	磺胺嘧啶	3.8-7.2	77.9-89.0
2	磺胺甲基嘧啶	3.0-10.5	78.0-90.0
3	磺胺二甲嘧啶	1.0-12.1	91.4-103.6
4	磺胺甲噁唑	2.7-9.9	78.9-105.3
5	氧氟沙星	2.2-13.2	87.0-127.9
6	诺氟沙星	4.4-13.2	78.6-105.0
7	环丙沙星	4.2-10.3	78.9-110.0
8	恩诺沙星	3.6-14.9	101.4-116.9
9	红霉素	1.9-10.1	90.9-126.9
10	罗红霉素	2.1-11.6	100.7-125.7
11	克拉霉素	2.6-13.2	105.7-128.1