

DB 65

新疆维吾尔自治区地方标准

DB 65/T 4370—2021

水质 红霉素和青霉素的测定 液相色谱-三重四级杆质谱法

Water quality - Determination of erythromycin and penicillin G - Liquid chromatography - Triple quadrupole mass spectrometry

2021 - 06 - 22 发布

2021 - 09 - 01 实施

新疆维吾尔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 试剂和材料 1

6 仪器设备 2

7 样品 2

8 分析步骤 2

9 结果计算与表示 3

10 质量保证和质量控制 4

11 废物的处理 5

12 注意事项 5

附录 A （资料性） 质谱参考条件 6

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。

本文件由新疆维吾尔自治区生态环境厅提出。

本文件由新疆维吾尔自治区生态环境厅归口并组织实施。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

本文件主要起草人：李欣、吴丽、李刚、李新琪、陈静、李媛、王琳琳、管雪丽、郑琦、董雷、尤斌、綦振华、冷冰冰、李晏、李晓丽、贾叶叶、张建平、董院生、王树鹏、彭静怡、翟银成。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区生态环境监测总站。

对本文件的修改意见建议，请反馈至新疆维吾尔自治区市场监督管理局（新疆乌鲁木齐市天山区新华南路167号）、新疆维吾尔自治区生态环境厅（乌鲁木齐市南湖西路215号）、新疆维吾尔自治区生态环境监测总站（乌鲁木齐市科学一街428号）。

新疆维吾尔自治区市场监督管理局 联系电话：0991-2817197；传真：0991-2311250；邮编：830004

新疆维吾尔自治区生态环境厅 联系电话：0991-4165377；传真：0991-4165385；邮编：830063

新疆维吾尔自治区生态环境监测总站 联系电话：0991-3830929；传真：0991-3843405；邮编：830011

水质 红霉素和青霉素的测定 液相色谱-三重四级杆质谱法

1 范围

本文件规定了液相色谱-三重四级杆质谱法测定水中红霉素和青霉素方法的术语和定义、方法原理、试剂和材料、仪器设备、样品的采集、保存和制备、分析步骤、结果计算与表示、质量保证和质量控制、废物处理和注意事项的要求。

本文件适用于地下水、地表水、生活污水和工业废水中红霉素和青霉素的测定。

注：当水样与乙腈1:1混合后，混合样进样体积为10 μL 时，红霉素在地下水和地表水中的检出限和测定下限分别为0.04 $\mu\text{g/L}$ 和0.16 $\mu\text{g/L}$ ，在生活污水和工业废水中的检出限和测定下限分别为0.08 $\mu\text{g/L}$ 和0.32 $\mu\text{g/L}$ ；青霉素在地下水和地表水中的检出限和测定下限分别为0.10 $\mu\text{g/L}$ 和0.40 $\mu\text{g/L}$ ，在生活污水和工业废水中的检出限和测定下限分别为0.20 $\mu\text{g/L}$ 和0.80 $\mu\text{g/L}$ 。

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 分析实验用水规格和试验方法

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ/T 164 地下水环境监测技术规范

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

样品经0.22 μm 滤膜过滤，与乙腈1:1混合后进样，用液相色谱-三重四级杆质谱仪测定。根据保留时间和特征离子定性，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 实验用水：应符合 GB/T 6682 规定中要求的一级水。

5.1.2 乙腈（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ ）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

5.1.4 50%乙腈溶液：取 50 mL 乙腈，用水稀释至 100 mL。

5.1.5 0.1%甲酸水溶液：取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL。

5.1.6 标准品：红霉素（Erythromycin, $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{13}$, CAS: 114-07-8），含量 $\geq 97.0\%$ ；青霉素（Penicillin

G, $C_{16}H_{18}N_2O_4S$, CAS: 61-33-6), 含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.1.7 红霉素标准贮备液, 浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 。准确称取 $10.0\ \text{mg}$ 红霉素标准品, 用乙腈溶解并稀释成浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的标准贮备液; 也可直接购买有证标准溶液, 在 $-10\ ^\circ\text{C}$ 以下冷冻、避光保存; 或参照制造商的产品说明保存, 使用时应恢复至室温并摇匀。

5.1.8 青霉素标准贮备液, 浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 。准确称取 $10.0\ \text{mg}$ 青霉素标准品, 用 50% 乙腈溶液溶解并稀释成浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的标准贮备液; 也可直接购买有证标准溶液, 在 $-10\ ^\circ\text{C}$ 以下冷冻、避光保存; 或参照制造商的产品说明保存, 使用时应恢复至室温并摇匀。

5.1.9 红霉素和青霉素混合标准使用液: 浓度为 $10.0\ \mu\text{g/mL}$ 。分别取红霉素和青霉素标准储备液各 $1.00\ \text{mL}$ 于 $10.0\ \text{mL}$ 容量瓶中, 用 50% 乙腈溶液定容, 可得到红霉素和青霉素混合标准使用液。

5.2 材料

5.2.1 滤膜: 一次性针头式过滤器, $0.22\ \mu\text{m}$, 混合纤维素酯 (MCE) 材质。

5.2.2 一次性聚丙烯针管。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-三重四级杆质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI), 具备梯度洗脱和多反应监测功能。

6.2 分析天平: 感量为 $0.0001\ \text{g}$ 。

6.3 样品瓶: $100\ \text{mL}$ 磨口或带聚四氟乙烯内衬垫瓶盖的棕色玻璃瓶。

6.4 微量注射器或移液器: $10\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $500\ \mu\text{L}$ 、 $1.0\ \text{mL}$ 。

7 样品

7.1 样品的采集和保存

按照 HJ/T 91、HJ 91.1 和 HJ/T 164 的相关规定进行样品的采集。样品采集时应充满样品瓶, 不留空隙。在 $4\ ^\circ\text{C}$ 以下冷藏、避光保存。2 d 内完成分析。

7.2 试样的制备

样品需充分混匀, 取约 $10\ \text{mL}$ 样品经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 弃去至少 $1\ \text{mL}$ 初滤液后, 准确移取 $500\ \mu\text{L}$ 过滤后的样品于棕色进样瓶中, 再加入 $500\ \mu\text{L}$ 乙腈, 混匀后待测。

7.3 空白试样的制备

用实验用水代替样品, 按照 7.2 中规定的步骤制备空白试样。

8 分析步骤

8.1 仪器条件

8.1.1 液相色谱条件

色谱柱为 C_{18} ($100\ \text{mm} \times 2.1\ \text{mm}$, 粒径 $1.7\ \mu\text{m}$), 或相当者; 流动相为 A: 乙腈, B: 0.1% 甲酸水溶液; 流速为 $0.25\ \text{mL/min}$; 柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$; 进样体积为 $10\ \mu\text{L}$; 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A (%)	B (%)
0.0	10	90
0.9	10	90
2.0	95	5
3.5	95	5
4.0	10	90
5.0	10	90

8.1.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源（ESI）；扫描方式为正离子模式；监测方式为多反应监测（MRM）；去溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体；其余条件参见附录A。

8.2 校准

8.2.1 标准曲线的建立

移取适量的红霉素和青霉素混合标准使用液，用50%乙腈溶液稀释，配制至少5个浓度点的标准系列溶液，标准溶液中红霉素和青霉素的参考浓度质量浓度分别为0.100 μg/L、0.200 μg/L、0.500 μg/L、1.00 μg/L、2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L和20.0 μg/L，移取1.0 mL标准系列溶液于棕色进样瓶中，待测。按照8.1中规定的仪器条件，由低浓度到高浓度依次对标准系列溶液进行测定。以目标化合物的质量浓度（μg/L）为横坐标，以其对应的响应值为纵坐标，建立标准曲线。

注：测试时可根据实际样品的含量高低，选择以上范围的的标准曲线浓度。

8.2.2 标准参考谱图

在上述色谱-质谱条件下，目标化合物的总离子流色谱图见附录B，图中红霉素和青霉素的质量浓度为20.0 μg/L。

8.3 试样测定

试样按照8.1中规定的仪器条件进行测定。

8.4 空白试验

空白试验按照8.1中规定的仪器条件进行测定。

9 结果计算与表示

9.1 定性分析

在同一色谱/质谱条件下对标准溶液和试样进行测定，根据标准溶液色谱图的保留时间与试样的保留时间、标准溶液各色谱峰的特征离子与试样各色谱峰的特征离子相对照定性。试样与标准物质保留时间的相对偏差不大于5%。试样中目标化合物定性离子的相对丰度（ K_{sam} ），见公式（1）。与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度（ K_{std} ）进行比较，见公式（2），相对丰度偏差不超过表2规定的范围，则可判定样品中存在对应的目标化合物。

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

式中：

K_{sam} ——样品中目标化合物定性离子的相对丰度，单位为%；
 A_2 ——样品中目标化合物二级质谱定性离子的响应值；
 A_1 ——样品中目标化合物二级质谱定量离子的响应值。

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

式中：

K_{std} ——标准样品中目标化合物定性离子的相对丰度，单位为%；
 A_{std2} ——标准样品中目标化合物二级质谱定性离子的响应值；
 A_{std1} ——标准样品中目标化合物二级质谱定量离子的响应值。

表2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

$K_{std}/\%$	K_{sam} 允许的偏差/%
$K_{std}>50$	±20
$20<K_{std}\leq 50$	±25
$10<K_{std}\leq 20$	±30
$K_{std}\leq 10$	±50

9.2 结果表示

样品中红霉素、青霉素的质量浓度（μg/L），按照公式（3）进行计算：

$$\rho=2\rho_i \times D \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ ——样品中红霉素和青霉素的质量浓度，单位为微克每升（μg/L）；
 ρ_i ——由标准曲线得到的试样中红霉素或青霉素的质量浓度，单位为微克每升（μg/L）；
 D ——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，最多保留三位有效数字。

10 质量保证和质量控制

10.1 空白试验

每20个样品或每批次小于等于20个样品时至少测定一个空白样品，其测定结果应低于方法检出限。

10.2 标准

每批样品应建立标准曲线，相关系数≥0.995。每20个样品或每批次小于等于20个样品时应测定一个标准曲线中间点标准溶液，其测定结果与该点浓度的相对误差应在±20%之内。

10.3 平行样

每20个样品或每批次小于等于20个样品时至少测定一个平行样，平行样的相对偏差应≤30%。

10.4 基体加标

每20个样品或每批次小于等于20个样品时至少测定一个基体加标样，加标回收率应在70%~130%之间。

11 废物的处理

实验中产生的废物应集中收集，分类保管，并做好相应标识，委托有资质的单位进行处理。

12 注意事项

12.1 实验中使用的乙腈等溶剂具有较高的毒性或致癌性，试剂配制和样品前处理过程应在通风橱内进行，操作时应按要求佩戴防护器具，避免接触皮肤和衣物。

12.2 当样品中存在基质干扰时，可通过优化色谱条件、稀释样品、减少进样体积以及对样品进行预处理等方式降低或消除。

12.3 当样品中存在同分异构体干扰测定时，可通过改变色谱条件提高分离度或选择不同的二级质谱离子消除干扰。

附 录 A
(资料性)
质谱参考条件

A.1 目标化合物的质谱条件

汇总如下：

- a) 毛细管电压：3000 V；
- b) 锥孔温度：150 °C；
- c) 锥孔气流量：50 L/h；
- d) 去溶剂气流量：800 L/h；
- e) 去溶剂气温度：350 °C；
- f) 目标化合物的多反应监测条件见表 A.1。

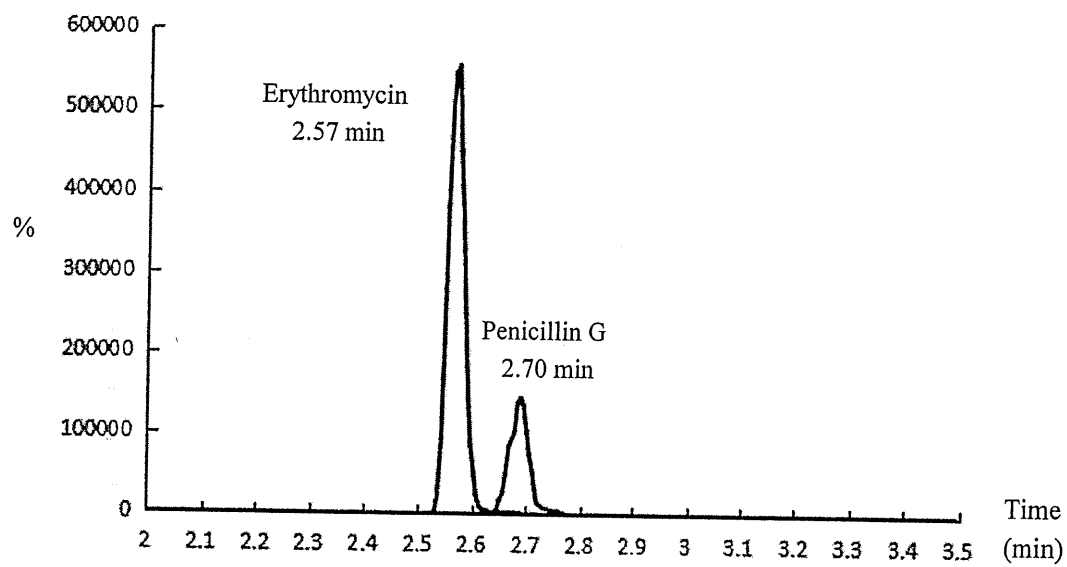
表A.1 红霉素和青霉素特征离子参考质谱条件

名称	定性离子对	定量离子对	锥孔电压	碰撞电压
红霉素	734.6>158.3	734.6>158.3	35 V	36 V
	734.6>576.5			21 V
青霉素	335>160	335>160	50 V	15 V
	335>176.1			13 V

附录 B

(资料性)

红霉素和青霉素的总离子流色谱图



图B.1 红霉素和青霉素的总离子流色谱图