

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB 50/T 1363—2023

水质 四环素类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

地方标准信息服务平台

2023 - 02 - 20 发布

2023 - 04 - 20 实施

重庆市市场监督管理局 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.....	2
8 样品.....	2
9 分析步骤.....	3
10 结果计算与表示.....	5
11 精密度和正确度.....	6
12 质量保证和质量控制.....	7
13 废弃物的处理.....	7
附录 A （规范性） 方法的检出限和测定下限.....	8
附录 B （资料性） 方法的精密度和正确度.....	9

地方标准信息服务平台

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。

本文件由重庆市生态环境监测中心提出。

本文件由重庆市生态环境局归口并组织实施。

本文件主要起草单位：重庆市生态环境监测中心。

本文件主要起草人：张晓岭、郑璇、李新宇、张文斌、邹家素、李莉、李晓、张君、蹇川、刘敏、汪小艳、邹素兰、郭志顺、孙静、熊强、刘海立、肖霏。

地方标准信息服务平台

水质 四环素类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本文件规定了液相色谱-串联质谱法对水中5种四环素类抗生素进行测定的方法。

本文件适用于地表水、地下水、生活污水和工业废水中四环素、土霉素、金霉素、甲烯土霉素、强力霉素等5种四环素类抗生素的测定。

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。

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 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

水中的四环素类抗生素经固相萃取柱富集，用液相色谱-串联质谱分离检测。根据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

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。

6.1 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超纯水。

6.2 氢氧化钠（NaOH）：分析纯。

6.3 盐酸（HCl）：1 mol/L，分析纯。

6.4 甲醇（CH₃OH）：农残级或等同规格。

6.5 甲酸 (HCOOH) :色谱纯或等同规格。

6.6 乙二胺四乙酸二钠 (Na₂EDTA) : 分析纯。

6.7 甲酸溶液 (0.1%) : 取 1ml 甲酸 (6.5) 溶于 1000 ml 实验用水中。

6.8 甲酸/甲醇溶液: 取 95 ml 甲酸溶液(6.5)和 5 ml 甲醇 (6.4) 混合, 摇匀。

6.9 标准贮备液: $\rho=1.00 \text{ g/L}$

可直接购买有证标准溶液, 也可用标准物质配制, 标准物质纯度大于99.0%, 用甲醇 (6.4) 溶解, 贮备液在-10℃以下冷冻、避光保存不超过6个月或参照制造商的产品说明。

6.10 混合标准中间液: $\rho=100 \mu\text{g/ml}$

移取适量5种四环素类抗生素标准贮备液 (6.9) 按需要用甲醇 (6.4) 稀释, 中间液于-10℃以下冷冻、避光保存不超过1个月。

6.11 混合标准使用液: $\rho=1.00 \mu\text{g/ml}$ (参考浓度)

将四环素类抗生素混合标准中间液 (5.7) 按需要用甲醇 (5.1) 稀释, -10℃以下冷冻、避光保存不超过4天。。

6.12 内标贮备液: $\rho=1.00 \text{ g/L}$

内标: 四环素-D₆ (Tetracycline-D₆)。可直接购买有证标准溶液, 也可用标准物质溶于甲醇 (6.4)。贮备液在-10℃以下冷冻、避光保存不超过6个月或参照制造商的产品说明。

6.13 内标中间液 $\rho=100 \mu\text{g/ml}$

将内标贮备液 (6.12) 按需用甲醇 (6.4) 稀释, -10℃以下冷冻、避光保存不超过1个月。

6.14 内标使用液: $\rho=10.0 \mu\text{g/ml}$ (参考浓度)

将内标中间液 (6.13) 按需要用甲醇 (6.4) 稀释, -10℃以下冷冻、避光保存不超过4天。

6.15 固相萃取柱:

填料为二乙烯苯和N-乙烯基吡咯烷酮共聚物 (HLB) 或同等柱效的萃取柱, 规格为6 ml/150 mg。

6.16 滤膜: 0.22 μm 和 0.45 μm 玻璃纤维聚膜或其他材质等效滤膜。

6.17 氮气: 纯度 $\geq 99.99\%$ 。

6.18 氩气: 纯度 $\geq 99.99\%$ 。

7 仪器和设备

7.1 液相色谱/串联质谱仪: 配有电喷雾离子化源(ESI)。

7.2 色谱柱: C18 柱或等效反相高效液相色谱柱, 参考规格为 100 mm×2.1 mm 1.9 μm 。

7.3 浓缩装置: K-D 浓缩器或氮吹浓缩仪等性能相当的设备。

7.4 固相萃取装置: 自动或手动, 流速可调节。

7.5 一般实验室常用仪器。

8 样品

8.1 采集与保存

参照HJ 91.1、HJ 91.2和HJ 164的相关规定采集样品于4 000 ml磨口棕色玻璃瓶中, 水样应充满采样瓶, 不留液上空间。

样品采集后应尽快进行分析。如暂不能分析, 应在0℃~4℃避光保存, 2天内完成萃取, 4天内完成分析。

8.2 样品制备

将固相萃取柱(6.15)固定在固相萃取装置(7.4)上,分别用10 ml甲醇(6.4)和10 ml实验用水活化,保证小柱柱头浸润。水样经0.45 μm 滤膜(6.16)过滤,取1 000 ml水样,加入1 g Na_2EDTA (6.6),用氢氧化钠(6.2)和盐酸(6.3)调节pH值为至6.0,水样以低于10 ml/min(约3滴/秒~4滴/秒)的流速通过小柱,用10 ml实验用水洗涤小柱,用氮气(6.17)吹干小柱,再用10 ml甲醇(6.4)洗脱,收集洗脱液于洁净试管中,洗脱液经浓缩装置(7.3)浓缩至干,加入内标使用液(6.14) 5.00 μl ,用甲酸/甲醇溶液(6.8)定容至1 ml,经0.22 μm 滤膜(6.16)过滤,置于样品瓶中,待测。

当样品体积为1 000 ml,浓缩后定容体积为1.0 ml,进样体积为10 μl ,5种四环素的检出限为2 ng/L,测定下限为8 ng/L,详见附录A。

8.3 空白样品的制备

以实验用水代替样品,按照样品制备(8.2)相同操作步骤,制备直接进样法空白样品。

9 分析步骤

9.1 仪器参考条件

9.1.1 液相色谱分析条件

流动相A:甲酸溶液(6.7),流动相B:甲醇(6.4),梯度洗脱程序见表1,流速:250.0 $\mu\text{l}/\text{min}$;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μl ;具体参数见表1。

表1 液相色谱流动相梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	95	5
1.50	95	5
2.00	35	65
7.50	65	35
8.00	95	5
10.00	95	5

9.1.2 质谱分析条件

正离子模式:ESI

喷雾电压(spray voltage): 3 000 V

毛细管温度:350 $^{\circ}\text{C}$

鞘气(N_2)流速:45 L/min

辅助气(N_2)流速:15 L/min

碰撞气(Ar)压力:200 mPa

选择反应监测(SRM),具体参数见表2。

表 2 目标化合物的选择反应监测条件

序号	化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV	锥孔电压 V
1	四环素-D ₆	451.1	416.1 ^a	21	79
		451.1	433.0	5	79
2	四环素	445.1	410.0 ^a	17	82
		445.1	428.0	19	82
3	土霉素	461.1	426.0 ^a	18	73
		461.1	443.1	5	73
4	金霉素	479.1	461.8 ^a	20	80
		479.1	444.1	18	80
5	甲烯土霉素	443.2	201.0 ^a	30	80
		443.2	426.1	18	80
6	强力霉素	445.1	410.0 ^a	17	82
		445.1	428.1	19	82

注：^a为定量离子

9.1.3 仪器调谐

按照仪器使用说明书在规定时间和频次内对液相色谱-串联质谱仪进行仪器质量数和灵敏度校正，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大幅度下降时，应立即对仪器重新进行质量数和灵敏度校正。

9.2 校准

9.2.1 标准曲线的绘制

取一定量四环素类混合标准使用液（6.11）于甲酸/甲醇溶液（6.8）中，制备至少5个浓度点的标准系列，5种四环素类抗生素的质量浓度均分别为2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100.0 μg/L（此为参考浓度），于每毫升标准系列中加入5.00 μl内标使用液（6.14），使内标的质量浓度为50.0 μg/L，贮存在棕色进样小瓶中，待测。

由低浓度到高浓度依次对标准系列溶液进样，以标准系列溶液中目标组分的浓度为横坐标，以其对应的峰面积（或峰高）与内标物峰面积(或峰高)的比值和内标物浓度的乘积为纵坐标，建立校准曲线。如式（1）：

$$y = ax + b \dots\dots\dots (1)$$

式中：

x ——目标组分浓度的数值，单位为微克每升（μg/L）；

y ——目标组分和内标物的峰面积（或峰高）比值与内标物浓度乘积的数值；

a ——校准曲线斜率的数值；

b ——校准曲线截距的数值。

9.2.2 标准参考谱图

在本标准推荐的仪器参考条件下，目标化合物的提取离子流色谱图见图1。

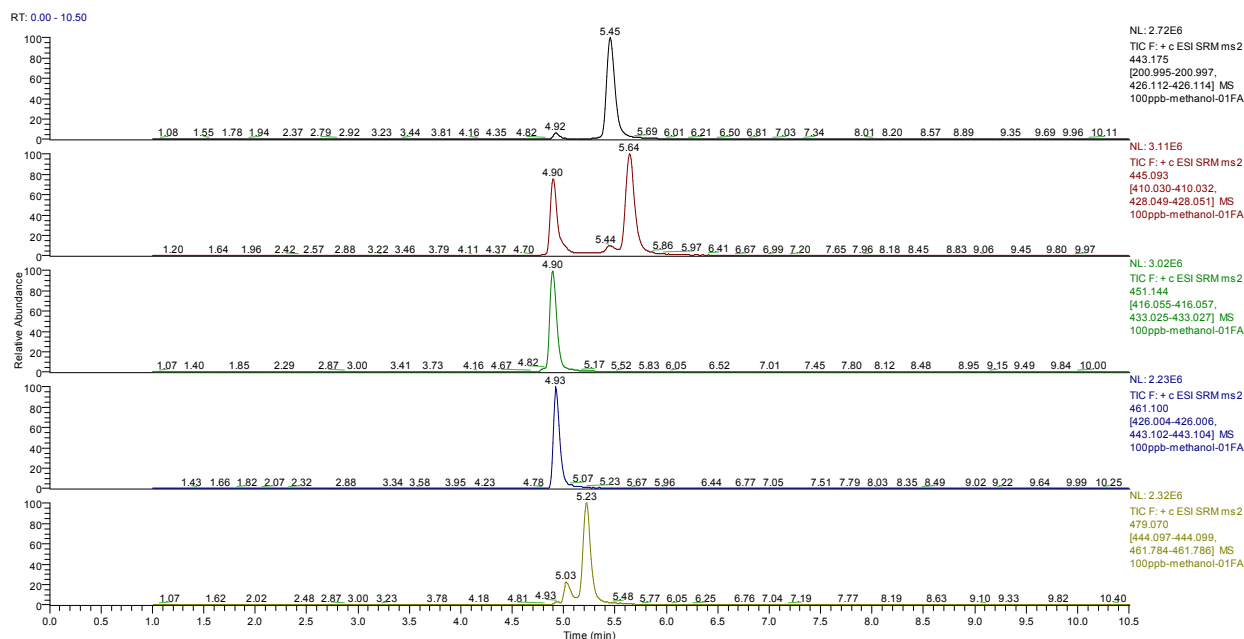


图 1 5 种四环素类抗生素和内标物的提取离子流色谱图

9.3 测定

9.3.1 样品测定

按照与绘制校准曲线相同的仪器分析条件进行测定。

9.3.2 空白试验

按与样品测定相同的仪器分析条件进行空白样品的测定。

10 结果计算与表示

10.1 定性分析

每种被测组分选择1个母离子和2个子离子进行监测。在相同的实验条件下，样品中待测组分的保留时间与标准样品中目标组分的保留时间比较，相对标准偏差的绝对值应小于2.5%；且待测样品谱图中，各组分定性离子的相对丰度（ K_{sam} , 见式2）与浓度接近的标准溶液谱图中对应的定性离子相对丰度（ K_{std} , 见式3）进行比较，偏差在表3规定的最大允许偏差范围内，则可判定为样品中存在对应的待测物。

$$K_{sam} = \frac{A_2}{A_1} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

K_{sam} ——样品中某组分定性离子的相对丰度的数值，单位为百分比（%）；

A_2 ——样品中某组分二级质谱定性离子的峰面积（或峰高）；

A_1 ——样品中某组分二级质谱定量离子的峰面积(或峰高)。

$$K_{std} = \frac{A_{std2}}{A_{std1}} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

K_{std} ——标准样品中某组分定性离子的相对丰度,单位为百分比（%）；

A_{std2} ——标准样品中某组分二级质谱定性离子的峰面积（或峰高）；

A_{std1} ——标准样品中某组分二级质谱定量离子的峰面积(或峰高)。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

K_{std} %	K_{sam} 最大允许偏差 %
$K_{std} > 50$	20
$20 < K_{std} \leq 50$	25
$10 < K_{std} \leq 20$	30
$K_{std} \leq 10$	50

10.2 结果计算

样品中的目标物的质量浓度按公式（4）

$$\rho = \frac{\rho_1 \times 1}{1000} \times f \dots\dots\dots (4)$$

式中：

ρ ——样品中目标物的质量浓度的数值，单位为纳克每升（ng/L）；

ρ_1 ——从标准曲线上查得的样品中目标物的浓度的数值，单位为微克每升(μg/L)；

f ——稀释倍数。

10.3 结果表示

测定结果小数位数的保留应与方法检出限一致，最多保留三位有效数字。

11 精密度和正确度

11.1 精密度

11.1.1 6家实验室对含四环素类抗生素浓度为 5.00 ng/L、10.0 ng/L 和 20.0 ng/L 的统一空白加标样进行了 6 次重复测定：

实验室内相对标准偏差分别为：4%~11.4%，1.5%~9.9%，2.4%~11.1%；

实验室间相对标准偏差分别为：9.0%~18.0%，7.1%~10.9%，4.8%~9.5%；

重复性限范围为：0.70ng/L~0.89ng/L，0.97ng/L~1.96ng/L，3.00ng/L~4.11ng/L；

再现性范围为：1.18ng/L~1.79ng/L，2.03ng/L~3.33ng/L，4.72ng/L~6.02ng/L。

11.1.2 6家实验室统一对地表水样品进行重复 6 次加标测定，抗生素加标浓度为 5.00 ng/L 和 10.0 ng/L：

实验室内相对标准偏差分别为：5.1%~26.1%和6.5%~25.2%；

实验室间相对标准偏差分别为：15.1%~17.2%和14.0%~17.5%；

重复性限范围为：2.16 ng/L~2.64 ng/L和3.87 ng/L~5.24 ng/L；

再现性范围为：2.78 ng/L~3.36 ng/L和4.63 ng/L~6.31 ng/L。

11.1.3 6家实验室统一对废水样品进行重复6次加标测定，抗生素加标浓度为10.0 ng/L和20.0 ng/L：

实验室内相对标准偏差分别为：7.2%~27.5%和8.3%~24.1%；

实验室间相对标准偏差分别为：16.5%~22.8%和14.8%~17.8%；

重复性限范围为：5.18 ng/L~7.11 ng/L和8.85 ng/L~11.8 ng/L；

再现性范围为：5.98 ng/L~7.50 ng/L和10.7 ng/L~14.5 ng/L。

11.2 正确度

11.2.1 6家实验室对地表水进行加标回收实验，加标浓度为分别为5.00 ng/L、10.0 ng/L，加标回收率分别为：76.2%~129%、73.4%~124%。

11.2.2 6家实验室对废水进行加标回收实验，加标浓度为分别为10.0 ng/L、20.0 ng/L，加标回收率分别为：74.2%~137%、66.2%~135%。

12 质量保证和质量控制

12.1 空白分析

每次分析至少做一个实验室空白，实验室空白中目标化合物的浓度应低于方法检出限。

12.2 校准

每批样品应建立标准曲线，相关系数应 ≥ 0.990 。

每20个样品或每批次（ ≤ 20 个样品/批）应测定一个校准曲线中间浓度点标准溶液，其测定结果与该点浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内。

12.3 平行样的测定

每20个样品或每批次（少于20个样品/批）应分析一个平行样品。平行样的相对标准偏差应控制在25%以内。

12.4 基体加标

每20个样品或每批次（少于20个样品/批）应做1个基体加标，加标回收率应在5%~150%。

13 废弃物的处理

实验中产生的废物应分类收集、统一保管，并做好相应标识，依法委托有资质的单位进行处理。

附 录 A
(规范性)
方法的检出限和测定下限

本方法中目标化合物的检出限、测定下限和保留时间见表A.1。

表 A.1 方法的检出限、测定下限和保留时间

序号	化合物名称	英文名称	CAS 号	检出限 ng/L	测定下限 ng/L	保留时间 min
1	四环素	Tetracycline	60-54-8	2	8	4.90
2	土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	2	8	4.93
3	金霉素	Chlortetracycline	57-62-5	2	8	5.23
4	甲烯 土霉素	methacycline hydrochloride	396 3-45-9	2	8	5.45
5	强力霉素	Doxycycline	564-25-0	2	8	5.64

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性)
方法的精密度和正确度

B.1 本方法的重复性、再现性等精密度指标见表B.1~表B.3。

表 B.1 方法的精密度 (空白加标)

序号	化合物名称	精密度统计结果					
		加标浓度 ng/L	总均值 ng/L	实验室内相 对标准偏差 %	实验室间相 对标准偏差 %	重复性限 r ng/L	再现性限 R ng/L
1	四环素	5.00	2.96	4.0 ~11.0	18.0	0.70	1.63
		10.0	9.86	2.1~ 8.8	10.9	1.55	3.33
		20.0	23.8	3.2~ 10.5	4.8	4.11	4.93
2	土霉素	5.00	3.46	6.3~ 10.7	16.5	0.79	1.76
		10.0	7.25	3.0~ 8.4	9.8	1.11	2.23
		20.0	16.8	3.1~ 11.1	9.5	3.00	5.22
3	金霉素	5.00	3.73	6.7~ 10.6	12.4	0.89	1.53
		10.0	9.14	1.5~ 5.6	7.1	0.97	2.03
		20.0	20.7	2.4~ 11.1	8.5	3.80	6.02
4	甲烯 土霉素	5.00	3.56	5.8~11.4	9.0	0.85	1.18
		10.0	10.3	2.7~9.9	8.8	1.96	3.10
		20.0	22.7	2.6~6.4	5.8	3.22	4.72
5	强力霉素	5.00	3.39	6.8~10.6	17.2	0.80	1.79
		10.0	11.0	2.2~8.0	7.6	1.71	2.83
		20.0	17.9	3.2~9.2	7.9	3.01	4.80

表 B.2 方法的精密度(地表水样品加标)

序号	化合物名称	精密度统计结果					
		加标浓度 ng/L	总均值 ng/L	实验室内相 对标准偏差 %	实验室间相 对标准偏差 %	重复性限 r ng/L	再现性限 R ng/L
1	四环素	5.00	4.61	10.6~26.1	17.1	2.26	2.78
		10.0	9.08	7.2~20.4	14.0	3.87	6.31
2	土霉素	5.00	5.30	6.4~23.7	15.1	2.42	2.81
		10.0	10.3	9.5~24.9	14.2	4.33	5.21
3	金霉素	5.00	5.53	8.5~23.8	17.2	2.64	3.04
		10.0	10.5	8.1~25.2	17.5	5.24	6.02
4	甲烯 土霉素	5.00	4.55	5.9~23.9	15.9	2.16	2.93
		10.0	8.78	6.5~24.7	14.9	3.96	5.47
5	强力霉素	5.00	5.72	5.1~19.7	16.1	2.48	3.36
		10.0	11.0	7.0~23.2	14.0	4.50	4.63

表 B.3 方法的精密度(废水样品加标)

序号	化合物名称	精密度统计结果					
		加标浓度 ng/L	总均值 ng/L	实验室内相 对标准偏差 %	实验室间相 对标准偏差 %	重复性限 r ng/L	再现性限 R ng/L
1	四环素	10.0	10.8	7.2~22.9	16.5	5.29	5.98
		20.0	19.7	8.8~19.4	15.5	9.11	12.8
2	土霉素	10.0	10.4	13.6~23.4	17.9	5.60	7.49
		20.0	21.8	10.2~23.9	16.0	10.1	11.6
3	金霉素	10.0	10.9	15.3~27.5	22.8	7.11	7.11
		20.0	22.2	9.2~23.5	17.5	11.8	14.5
4	甲烯 土霉素	10.0	10.5	11.6~20.6	16.9	5.18	7.17
		20.0	21.5	10.1~23.2	14.8	8.85	10.7
5	强力霉素	10.0	10.2	11.4~26.9	18.7	5.33	7.50
		20.0	19.0	8.3~24.1	17.8	9.28	14.1

B.2 本方法的正确度指标见表B.4。

表 B.4 方法的正确度

序号	化合物名称	样品类型	加标浓度 ng/L	回收率范围 %
1	四环素	地表水	5.00	77.1 ~109
			10.0	74.2~ 124
		废水	10.0	94.2~ 125
			20.0	66.2~ 116
2	土霉素	地表水	5.00	90.0~ 125
			10.0	82.2~ 117
		废水	10.0	78.7~ 124
			20.0	92.3~ 119
3	金霉素	地表水	5.00	92.3~ 126
			10.0	93.4~124
		废水	10.0	93.3~ 121
			20.0	86.7~ 135
4	甲烯土霉素	地表水	5.00	76.2~117
			10.0	73.4~115
		废水	10.0	74.2~129
			20.0	86.2~119
5	强力霉素	地表水	5.00	89.0~129
			10.0	101~119
		废水	10.0	80.2~137
			20.0	66.7~116

地方标准信息服务平台