ICS 13.020.40

CCS Z 10

XX

团体标准

T/ XXXX—XXXX

|  |
| --- |
|       |

水质 16种磺胺类抗生素的测定 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法

Water quality-Determination of 16 sulfonamide antibiotics

- Solid phase extraction -High performance liquid chromatography -Tandem mass spectrometry

|  |
| --- |
|  |
|       |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

新疆维吾尔自治区生态环境保护产业协会发布

|  |
| --- |
|       |

目  次

[前  言 II](#_Toc14607)

[1 适用范围 1](#_Toc30203)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc6314)

[3 方法原理 1](#_Toc21045)

[4 干扰和消除 1](#_Toc30462)

[5 试剂和材料 1](#_Toc12762)

[6 仪器和设备 3](#_Toc27986)

[7 样品 3](#_Toc32688)

[8 分析步骤 3](#_Toc8048)

[9 结果计算与表示 4](#_Toc3092)

[10 检出限和定量限 5](#_Toc12588)

[11 准确度和精密度 5](#_Toc21704)

[12 质量保证和质量控制 5](#_Toc30075)

[13 废物处置 6](#_Toc25663)

[附 录 A 7](#_Toc2827)

[附 录 B 9](#_Toc19537)

[附 录 C 10](#_Toc31407)

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。

本文件的附录A和附录B为资料性附录，附录C为规范性附录。

本文件由新疆维吾尔自治区生态环境保护产业协会提出并归口。

本文件主编单位：生态环境部南京环境科学研究所。

本文件参编单位：新疆天熙环保科技有限公司。

本文件主要起草人：张圣虎、漆丹、康国栋、王宁、王灵、雷荣荣。

水质16种磺胺类抗生素的测定

 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法

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. 适用范围

本文件规定了测定水中16种磺胺类抗生素的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于地表水和城市污水处理厂废水中磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲嘧啶、磺胺甲二唑、甲氧苄啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺甲噁唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺邻二甲嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺苯酰、磺胺间二甲氧嘧啶等16种磺胺类抗生素类化合物的测定。

1. 规范性引用文件

本文件引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是未注日期的引用文件，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 91.2-2022 地表水环境质量监测技术规范

HJ 91.1-2019 污水监测技术规范

1. 方法原理

样品过滤后经固相萃取柱富集和净化后进样，用固相萃取-高效液相色谱-串联质谱分离检测磺胺类抗生素。根据保留时间和特征离子定性，内标法定量。

1. 干扰和消除
	1. 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。采用固相萃取法时，还可以通过减少取样体积或增加试样的稀释倍数降低基质干扰。
	2. 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子离子消除干扰。
2. 试剂和材料

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

* 1. 甲醇（CH3OH）：色谱纯。
	2. 乙腈（CH3CN）：色谱纯。
	3. 氨水（NH3·H20）：色谱纯。
	4. 甲酸（CH3COOH）：色谱纯。
	5. 磷酸（H3PO4）：分析纯。
	6. EDTA·Na2：分析纯。
	7. 磷酸二氢钠（NaH2PO4）：分析纯。
	8. 磺胺类抗生素标准品：纯度不低于99.0%。
	9. 磺胺甲噁唑-d4标准品：纯度不低于 99.0%。
	10. 磷酸溶液：1+9。

用磷酸（5.5）和水按 1:1 的体积比混合。

* 1. EDTA·Na2溶液：*ρ* = 100 mg/L。

称取 0.05 g EDTA·Na2（5.6）溶于少量水中，定容至 500 mL，混匀。

* 1. 磷酸二氢钠溶液：*ρ* = 100 g/L。

称取 50 g NaH2PO4（5.7）溶于少量水中，定容至 500 mL，混匀。

* 1. 氨水-甲醇混合溶液：*φ*(NH3·H20) = 2%。

用氨水（5.3）和甲醇（5.1）按 2:98 的体积比混合。

* 1. 氨水溶液：*φ*(NH3·H20) = 0.2%。

用氨水（5.3）和水按 0.2 : 99.8 的体积比混合。

* 1. 甲酸水溶液：*φ*(CH3COOH) = 0.2%。

用甲酸（5.4）和水按 0.2 : 99.8 的体积比混合。

* 1. 抗生素标准贮备液：*ρ* =1000 mg/L。

磺胺类抗生素标准品（5.8）用甲醇（5.1）配制成浓度为1000 mg/L的磺胺类抗生素标准贮备液，保存于棕色样品瓶中，密封，-10℃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。

* 1. 抗生素标准使用液：*ρ* =20 mg/L

将抗生素标准贮备液（5.16）按需要用甲醇稀释。标准使用液于4℃避光保存。使用时应恢复至室温，并摇匀。存放期限30天。

* 1. 内标贮备液： ρ = 100 mg/L。

 称取 10.0 mg磺胺甲噁唑-d4标准品（5.9），用甲醇（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，−10℃以下冷冻避光保存或参照制造商的产品说明保存。也可直接购买有证标准溶液，按标准溶液证书要求保存。使用时应恢复至室温，并摇匀。

* 1. 内标使用液： ρ = 0.50 mg/L。

移取适量内标贮备液（5.18），用甲醇溶液（5.1）稀释， 4℃以下冷藏避光保存或参照制造商的产品说明保存。也可直接购买有证标准溶液，按标准溶液证书要求保存。使用时应恢复至室温，并摇匀。

* 1. 固相萃取柱：填料为二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物，或同等柱效的萃取柱，规格为 500 mg/6 mL。
	2. 滤膜：0.45 μm玻璃纤维滤膜。
	3. 针头滤膜：0.22 μm针头滤膜。
1. 仪器和设备
	1. 高效液相色谱/串联质谱仪：配有电喷雾离子化源（ESI）。
	2. 色谱柱：填料粒径为3.5μm，柱长150 mm，内径 2.1 mm 的C18色谱柱，或其他性能相近的色谱柱。
	3. 浓缩装置：氮吹浓缩仪、旋转蒸发仪或其他同等性能的设备。
	4. 棕色采样瓶： 500 mL 带聚四氟乙烯衬垫的螺旋盖玻璃瓶或具塞磨口瓶
	5. 棕色样品瓶： 2.0 mL 带聚四氟乙烯衬垫的螺旋盖玻璃瓶。
	6. 微量注射器： 10 μl、 50 μl、 100 μl、 250 μl、 1.0 ml。
	7. 一般实验室常用仪器和设备。
2. 样品

样品采集和保存

按照 HJ/T 91和HJ 91.1 的相关要求进行样品的采集。

用棕色采样瓶（6.4）采集样品，样品满瓶采集。样品采集后应于4 ℃冷藏、避光运输，及时分析。若不能及时分析，应置于4 ℃冷藏避光保存，保存期为3 d。

试样的制备

取0.5-1.0 L待测水样，经滤膜过滤（5.20）后，加入 10.0 μl 内标使用液（5.18），添加5 mL EDTA·Na2溶液（5.11），再用磷酸溶液（5.10）调节待测水样pH值至3.0左右，最后以4 mL/min的流速通过固相萃取小柱（5.19）进行固相萃取。在固相萃取之前，依次用6 mL甲醇、3 mL超纯水、6 mL磷酸二氢钠溶液（5.12）活化固相小柱；固相萃取完成后，用6 mL超纯水淋洗，之后弃去淋洗液，将小柱置于负压下真空抽30.0 min以上，使其干燥。依次使用6 mL甲醇、6 mL氨水甲醇-混合溶液（5.13）洗脱小柱，洗脱速度为1 mL/min。洗脱液经浓缩装置（6.3）浓缩至近干，用甲醇溶剂定容至1 mL，过针头滤膜（5.21）后取1.0 ml滤液于棕色样品瓶（6.5）中，混匀待测。

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）相同的步骤进行空白试样的制备。

1. 分析步骤

仪器参考条件

高效液相色谱参考条件

采用正离子模式（ESI+），流动相为A：甲酸水溶液（5.15），B：乙腈（5.2），洗脱程序梯度见表1。流速：0.3 mL/min，柱温：40℃，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 | 99 | 1 |
| 5 | 90 | 10 |
| 22 | 50 | 50 |
| 23 | 40 | 60 |
| 24.5 | 99 | 1 |
| 26 | 99 | 1 |

质谱参考条件

离子源采用电喷雾离子源（ESI），扫描方式为正离子模式，监测方式为多反应监测（MRM）。由于测试结果受到所用仪器影响，不能给出质谱仪普遍参数。附录 A 提供参考质谱参数。

仪器调谐

不同厂家的仪器调谐参数存在一定差异，应按照仪器使用说明书在规定时间和频次内对质谱仪进行仪器质量数和分辨率的校正，以确保仪器处于最佳测试状态。

校准

标准曲线的建立

移取适量的磺胺类抗生素标准使用液（5.17），逐级稀释，配制至少5个浓度点的标准系列，各组分质量浓度分别为1、2、5、10、20、50、100、200 μg/L（此为参考浓度）。移取1.0 ml 配制好的标准系列溶液于棕色样品瓶（6.5）中，加入10.0 μl内标使用液（5.18），混匀待测。

按照仪器参考条件（8.1），由低浓度到高浓度依次对标准系列溶液进行测定。以标准系列溶液中目标组分的质量浓度（μg/L）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，建立标准曲线。

注：为保证定量统一，标准曲线稀释时所使用的溶剂应与制备的试样一致。

标准参考谱图

在本文件的仪器参考条件（8.1）下，目标化合物（200 μg/L）的总离子流图见附图B。

试样测定

按照与标准曲线的建立（8.2.1）相同的仪器条件进行试样（7.2）的测定。

空白试验

按照与试样测定（8.3）相同的仪器条件进行空白试样（7.3）的测定。

1. 结果计算与表示

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3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：

 $K\_{sam}=\frac{A\_{2}}{A\_{1}}$ （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）。

 $K\_{std}=\frac{A\_{std2}}{A\_{std1}}$ （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 3 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≤50 | 10＜*K*std≤20 | *K*std≤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 |

结果计算

样品中目标化合物的质量浓度，按照式（4）计算：

$ρ i =\frac{ρ1 ×V\_{1}}{V} ×D$ （4）

式中： *ρi* ——样品中目标化合物的质量浓度，μg/L；

 *ρ*1 ——由标准曲线得到的试样中目标化合物的质量浓度，μg/L；

 V1 ——试样体积，ml；

 V ——取样体积，ml；

 D ——样品的稀释倍数。

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。

1. 检出限和定量限

方法检出限和定量限见附录 C。

1. 准确度和精密度

在添加浓度10~100 ng/L范围内，回收率为61.1%~123.8%，相对标准偏差为1.1%~12.5%。

1. 质量保证和质量控制

空白试验

每20个样品或每批次（少于20个样品）应至少做一个空白试验，测定结果应低于方法检出限。

校准

分析样品之前，应建立能够覆盖样品浓度范围的至少5个浓度点的标准曲线，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）应测定一个标准曲线中间浓度点，其测定结果与标准曲线该点浓度的相对误差应在±20%以内，否则，应建立新的标准曲线。

平行样

每20个样品或每批次（少于20个样品）应分析一个平行样，实验室内平行样的相对偏差应≤20%。

基体加标

每20个样品或每批次（少于20个样品）应进行一个基体加标样的分析，基体加标回收率应在60%～130%之间。

1. 废物处置

实验中产生的废物应集中收集，并做好相应标识，依法委托有资质的单位进行处理。

附 录 A

（资料性）

参考质谱条件

A.1 目标化学物的质谱条件

1. 毛细管高压：4.8 kv;
2. 去溶剂气温度：450 ºC;
3. 雾化气流速：1.5 L/Min;
4. 去溶剂气流速：8 L/Min;
5. 反吹气流速：1 L/Min。
6. 目标化学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 | 母离子*（m/z）* | 子离子*（m/z）* | 碰撞能量/V | 去簇电压/V | 入口电压/V | 出口电压/V |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 磺胺醋酰 | 215.1 | 156.0\* | 11 | 50 | 50 | 50 |
| 107.9 | 23 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺嘧啶 | 251.0 | 156.0\* | 16 | 50 | 50 | 50 |
| 108.0 | 27 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺噻唑 | 255.8 | 156.0\* | 24 | 50 | 50 | 50 |
| 108.0 | 35 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺吡啶 | 250.2 | 156.1\* | 24 | 50 | 50 | 50 |
| 184.1 | 24 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺甲嘧啶 | 265.0 | 107.9\* | 18 | 50 | 50 | 50 |
| 156.0 | 15 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺甲二唑 | 271.1 | 156.2\* | 22 | 50 | 50 | 50 |
| 108.2 | 35 | 50 | 50 | 50 |
| 甲氧苄啶 | 291.0 | 230.0\* | 28 | 50 | 50 | 50 |
| 261.0 | 26 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 278.9 | 186.1\* | 19 | 50 | 50 | 50 |
| 155.9 | 18 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺甲氧哒嗪 | 280.9 | 155.9\* | 17 | 50 | 50 | 50 |
| 92.0 | 31 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺甲噁唑 | 253.8 | 155.9\* | 23 | 50 | 50 | 50 |
| 108.1 | 35 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 281.0 | 156.1\* | 19 | 50 | 50 | 50 |
| 107.8 | 28 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺对甲氧嘧啶 | 280.9 | 156.1\* | 25 | 50 | 50 | 50 |
| 108.0 | 37 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺邻二甲嘧啶 | 311.1 | 155.9\* | 19 | 50 | 50 | 50 |
| 107.7 | 30 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺异噁唑 | 268.1 | 155.9\* | 22 | 50 | 50 | 50 |
| 113 | 24 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺苯酰 | 277.1 | 155.8\* | 20 | 50 | 50 | 50 |
| 108.1 | 35 | 50 | 50 | 50 |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 310.9 | 156.0\* | 32 | 50 | 50 | 50 |
| 108.0 | 25 | 50 | 50 | 50 |

附 录 B

（资料性）

目标化合物的总离子流色谱图



图 B.1 目标化合物的总离子流色谱图

附 录 C

（规范性附录）

方法的检出限和测定下限

表 C.1 给出了本方法中16种目标化合物的方法检出限和测定下限。

表 C.1 方法检出限和测定下限

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 抗生素 | LOQ (ng/L) | LOD (ng/L) |
| 磺胺醋酰 | 0.462 | 1.540 |
| 磺胺嘧啶 | 0.010 | 0.034 |
| 磺胺噻唑 | 0.045 | 0.150 |
| 磺胺吡啶 | 0.045 | 0.149 |
| 磺胺甲嘧啶 | 0.008 | 0.028 |
| 磺胺甲二唑 | 0.070 | 0.234 |
| 甲氧苄啶 | 0.001 | 0.003 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 0.012 | 0.039 |
| 磺胺甲氧哒嗪 | 0.028 | 0.095 |
| 磺胺甲噁唑 | 0.033 | 0.109 |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 0.048 | 0.159 |
| 磺胺对甲氧嘧啶 | 0.032 | 0.108 |
| 磺胺邻二甲嘧啶 | 0.107 | 0.356 |
| 磺胺异噁唑 | 0.013 | 0.042 |
| 磺胺苯酰 | 0.025 | 0.083 |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 0.025 | 0.082 |

附 录 D

（规范性附录）

方法的精密度和准确度

精密度和准确度的结果见表D.1和表D.2。

表 D.1 方法的精密度和准确度

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 抗生素 | 10 ng/L | 100 ng/L |
| 加标回收率（%） | 相对标准偏差（%） | 加标回收率（%） | 相对标准偏差（%） |
| 磺胺醋酰 | 83.4~90.1 | 3.8 | 101.1~108.6 | 3.6 |
| 磺胺嘧啶 | 83.9~102.4 | 9.9 | 91.8~104.3 | 6.4 |
| 磺胺噻唑 | 61.1~76.1 | 10.9 | 79.6~81.2 | 1.1 |
| 磺胺吡啶 | 78.3~88.0 | 5.9 | 94.7~108.0 | 7.0 |
| 磺胺甲嘧啶 | 72.3~98.5 | 12.5 | 82.1~91.3 | 5.3 |
| 磺胺甲二唑 | 96.8~123.8 | 12.2 | 91.9~96.7 | 2.8 |
| 甲氧苄啶 | 84.5~108.4 | 12.4 | 110.4~118.4 | 3.7 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 99.1~118.2 | 9.3 | 100.7~120.2 | 8.9 |
| 磺胺甲氧哒嗪 | 66.9~80.2 | 6.8 | 101.3~105.9 | 2.3 |
| 磺胺甲噁唑 | 83.8~89.3 | 3.5 | 100.4~104.8 | 2.3 |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 77.5~92.4 | 9.2 | 105.0~114.5 | 4.6 |
| 磺胺对甲氧嘧啶 | 90.8~102.7 | 6.7 | 83.7~93.1 | 5.4 |
| 磺胺邻二甲嘧啶 | 69.1~84.9 | 11.5 | 84.2~94.4 | 5.9 |
| 磺胺异噁唑 | 93.8~104.3 | 5.5 | 93.4~106.1 | 6.9 |
| 磺胺苯酰 | 80.8~89.4 | 5.4 | 87.7~96.3 | 4.7 |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 80.6~93.7 | 6.7 | 83.4~95.3 | 6.2 |