

ICS 13.020.40
Z 10
备案号: 73748-2020

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/T 3286—2020

水质 5 种磺胺类抗生素的测定
固相萃取/高效液相色谱-三重四极杆串联
质谱法

DB21

2020 - 08 - 30 发布

2020 - 09 - 30 实施

辽宁省市场监督管理局 发布

目 次

前 言 II

1 适用范围 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 1

6 仪器和设备 2

7 样品 2

8 分析步骤 3

9 结果计算与表示 5

10 精密度和准确度 6

11 质量保证和质量控制 7

12 废物处理 7

附录 A （资料性附录） 方法的精密度和准确度 8



前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写。

本标准附录A为资料性附录。

本标准由大连市市场监督管理局提出。

本标准由辽宁省生态环境厅归口。

本标准主要起草单位：辽宁省大连生态环境监测中心。

本标准主要起草人：付晓燕、刘莲莲、杨硕、杨萌。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省生态环境厅（沈阳市浑南区双园路30甲），联系电话：024-62788517。

标准起草单位通讯地址：辽宁省大连生态环境监测中心（辽宁省大连市沙河口区连山街58号），联系电话：0411-84691900。

辽宁省地方标准全文公开
DB21

水质 5 种磺胺类抗生素的测定 固相萃取/高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法

警告：实验中所使用的甲醇、磺胺类抗生素属于有毒有机物，实验操作时应避免接触皮肤和衣物，溶液配制过程应在通风橱内进行。

1 适用范围

本标准规定了测定水中磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺甲恶唑等 5 种磺胺类抗生素的高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法。

本标准适用于地表水、地下水、海水、工业废水和生活污水中 5 种磺胺类抗生素的测定。

当样品体积为 100 mL，浓缩定容至 1.0 mL，进样体积为 10.0 μ L 时，本方法磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺甲恶唑的检出限分别为 0.01 μ g/L、0.01 μ g/L、0.01 μ g/L、0.009 μ g/L 和 0.01 μ g/L，测定下限分别为 0.04 μ g/L、0.04 μ g/L、0.04 μ g/L、0.036 μ g/L 和 0.04 μ g/L，测定上限均为 100 μ g/L。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 14581 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ 91.1 污水监测技术规范（部分代替 HJ/T 91 污水监测技术规范）

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ/T 164 地下水环境监测技术规范

HJ 442 近岸海域环境监测规范

HJ 493 水质 样品的保存和管理技术规定

3 方法原理

水样经固相萃取后，水中磺胺类抗生素经液相色谱仪分离，用串联质谱仪在多反应监测（MRM）条件下测定，根据保留时间和特征离子对定性，内标法以峰面积（或峰高）定量。

4 干扰和消除

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。

5 试剂

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的优级纯试剂，实验用水符合 GB/T 6682，一级。

5.1 甲醇 (CH_3OH)：液相色谱纯。

5.2 甲酸 (HCOOH)。

5.3 甲酸溶液：1+1000 (V/V)。

量取1.0 ml甲酸 (5.2) 缓慢加入1 L实验用水中，混匀。

5.4 标准物质

5.4.1 磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑标准物质：纯度 $\geq 99\%$ 。

5.4.2 磺胺甲基嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 内标标准物质：纯度 $\geq 99\%$ 。

5.5 标准溶液

5.5.1 磺胺类抗生素标准贮备液： $\rho=100.0 \text{ mg/L}$ 。

准确称取适量的每种磺胺类标准物质 (5.4.1)，用甲醇配成100.0 mg/L的标准贮备液，或直接购买有证标准溶液，贮备液在0~4℃冷藏避光保存，可稳定保存20天，或参照制造商的产品说明保存。

5.5.2 磺胺类抗生素标准使用液： $\rho=1.00 \text{ mg/L}$ 。

将磺胺类抗生素标准贮备液 (5.5.1) 用甲醇稀释至1.0 mg/L，现用现配。

5.5.3 磺胺甲基嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 标准贮备液： $\rho=100.0 \text{ mg/L}$ 。

准确称取适量的磺胺甲基嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 标准物质 (5.4.2)，用甲醇 (5.1) 配成100.0 mg/L的标准贮备液，或直接购买有证标准溶液，贮备液在0~4℃冷藏避光保存或参照制造商的产品说明保存使用。

5.5.4 磺胺甲基嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 标准使用液： $\rho=1.0 \text{ mg/L}$ 。

将磺胺甲基嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 标准贮备液 (5.5.3) 用甲醇 (5.1) 稀释至1.0 mg/L，现用现配。

5.6 氮气：纯度 $\geq 99.9\%$ 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱/三重四极杆质谱仪：高效液相色谱仪具备梯度洗脱功能；三重四极杆质谱仪配有电喷雾离子化源 (ESI)。

6.2 色谱柱：填料为硅胶基质 C_{18} ，粒径1.8 μm ，柱长100 mm，内径2.1 mm，或其他等效色谱柱。

6.3 固相萃取装置。

6.4 浓缩装置：K-D 浓缩器、氮吹仪等性能相当的设备。

6.5 滤膜：针式有机相过滤器，孔径0.22 μm ，直径13 mm，玻璃纤维、亲水性聚丙烯、亲水性聚四氟乙烯 (PTFE) 或其它等效材质。

6.6 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 6 ml/500 mg。

6.7 棕色样品瓶：2.0 ml。

6.8 采样瓶：500 ml棕色玻璃瓶，螺旋盖（具聚四氟乙烯涂层的密封垫）。

6.9 微量注射器：10 μl 、50 μl 、100 μl 、1 ml。

7 样品

7.1 样品采集与保存

按照GB/T 14581、HJ 91.1、HJ/T 91、HJ/T 164、HJ 442和HJ 493的相关规定进行样品的采集和保存。

采集样品时，向采样瓶（6.8）中加入甲酸（5.2）500 μl，然后采集样品至满瓶，拧紧螺旋盖密封，摇匀。水样0~4℃冷藏避光保存，48 h内完成分析。

7.2 试样制备

活化：用10 ml甲醇（5.1）活化固相萃取柱，保证固相萃取柱柱头浸润。再用10 ml实验用水活化固相萃取柱，保证固相萃取柱柱头浸润。

上样：水样上样前放置至室温，准确量取100 ml水样，水样以3~5 ml/min的流速通过固相萃取柱。

淋洗：用10 ml实验用水淋洗固相萃取柱，将在固相萃取柱上保留较弱的杂质淋洗下来，弃去淋洗液。

洗脱：用10 ml甲醇（5.1）洗脱富集后的固相萃取柱，并用接收管接收甲醇洗脱液。

浓缩：将上述提取溶液浓缩至低于1.0 ml近干，加甲酸溶液（5.3）定容到1.0 ml，最后加入内标使用液10.0 μl，经0.22 μm滤膜（6.5）过滤，置于棕色样品瓶（6.7）中，待测定。

7.3 空白试样的制备

用实验用水代替样品按照试样制备（7.2）相同操作步骤，制备空白试样。

8 分析步骤

8.1 仪器参考条件

8.1.1 液相色谱仪参考条件

流动相：流动相A为甲醇（5.1），流动相B为甲酸溶液（5.3），线性梯度洗脱程序见表1。

柱温：40℃；

进样体积：10 μl；

流速：0.2 ml/min；

表1 液相色谱流动相线性梯度洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	5	95
0.5	5	95
5.0	30	70
7.0	30	70
7.5	90	10
8.5	90	10
9.0	5	95
10.0	5	95

8.1.2 质谱仪参考条件

正离子模式（ESI⁺）；
离子化电压：3000 V；
离子源温度：120℃；
检测方式：MRM，多反应监测条件见表2。

表2 目标化合物的多反应监测条件

目标化合物	检测离子对（m/z）	驻留时间（ms）	锥孔电压（V）	碰撞电压（V）
磺胺嘧啶	251.0→92.0*	20	30	30
	251.0→156.0			15
磺胺甲基嘧啶	265.1→156.1	20	35	28
	265.1→108.1*			16
磺胺二甲嘧啶	279.1→92.2*	20	30	28
	279.1→186.1			15
磺胺间甲氧嘧啶	281.1→92.1*	20	30	28
	281.1→156.1			15
磺胺甲恶唑	254.0→92.2*	20	30	30
	254.0→156.2			20
磺胺甲基嘧啶- ¹³ C ₆	271.0→162.0*	20	35	28

注：带*的为定量离子对

8.2 校准

8.2.1 校准曲线的建立

取一定量磺胺类抗生素标准使用液（5.5.2）于甲酸（5.3）水溶液中，制备至少5个浓度点的标准系列，磺胺类抗生素的质量浓度分别为4.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L和100 μg/L，每毫升标准系列溶液中加入10.0 μl内标使用液（5.5.4），贮存在棕色样品瓶（6.7）中。

将标准系列溶液按浓度由低到高的顺序依次进样，以标准系列溶液中磺胺类抗生素的质量浓度为横坐标，磺胺类抗生素的峰面积（或峰高）与内标物的峰面积（或峰高）比值和内标物浓度的乘积为纵坐标，绘制校准曲线。

8.2.2 标准样品谱图

磺胺类抗生素和内标物的总离子流图，见图1。

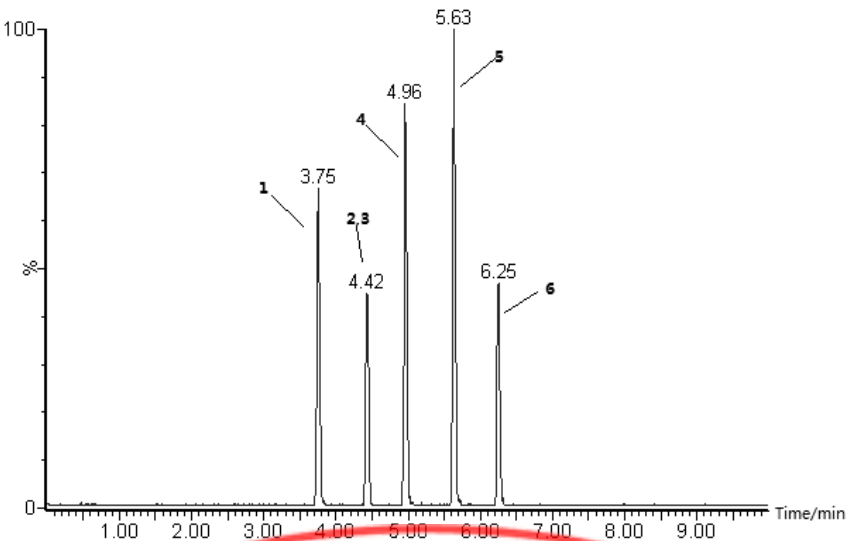


图1 磺胺类抗生素和内标物的总离子流图

（注：1：磺胺嘧啶、2：磺胺甲基嘧啶、3：磺胺甲基嘧啶-¹³C、4：磺胺二甲嘧啶、5：磺胺间甲氧嘧啶、6：磺胺甲恶唑）

8.3 测定

8.3.1 试样测定

按照与校准曲线的建立（8.1）相同的参考条件，进样 10 μl，进行试样（7.2）的测定。

注：若样品中磺胺类抗生素浓度过高，超出校准曲线范围，应稀释后测定，采用甲酸（5.3）水溶液进行稀释。

8.3.2 空白试验

按照与校准曲线的建立（8.1）相同的参考条件，进样 10 μl，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

按照表2中确定的母离子和子离子进行检测，在相同实验条件下，试样中磺胺类抗生素的保留时间与标准样品中磺胺类抗生素的保留时间相对偏差的绝对值应小于2.5%；且待测样品中定性离子的相对丰度（ K_{sam} ）与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子相对丰度（ K_{std} ）进行比较，所得偏差在表3规定的最大允许偏差范围内，则可判定为样品中存在磺胺类抗生素。

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

式中：

- K_{sam} ——样品中磺胺类抗生素定性离子的相对丰度，%；
- A_2 ——样品中磺胺类抗生素定性离子的峰面积（或峰高）；

A_I ——样品中磺胺类抗生素定量离子的峰面积（或峰高）。

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

式中：

- K_{std} ——标准样品中磺胺类抗生素定性离子的相对丰度，%；
- A_{std2} ——标准样品中磺胺类抗生素定性离子的峰面积（或峰高）；
- A_{std1} ——标准样品中磺胺类抗生素定量离子的峰面积（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} 相对于 K_{std} 的最大允许偏差
$K_{std} > 50$	$\pm 20\%$
$20 < K_{std} \leq 50$	$\pm 25\%$
$10 < K_{std} \leq 20$	$\pm 30\%$
$K_{std} \leq 10$	$\pm 50\%$

9.2 定量分析

当磺胺类抗生素采用标准曲线法进行定量时，样品中磺胺类抗生素的质量浓度 ρ_x 按公式（3）计算：

$$\rho_x = \frac{\rho_1 \times V_i}{V} \times D \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- ρ_x ——样品中磺胺类抗生素的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- ρ_1 ——计算磺胺类抗生素的峰面积（或峰高）与内标物的峰面积（或峰高）比值和内标物浓度的乘积后，由标准曲线（8.2.1）所得试样中磺胺类抗生素的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- V_i ——萃取液浓缩后的体积，ml；
- V ——水样体积，ml；
- D ——样品稀释倍数。

9.3 结果表示

当测定结果小于 1 mg/L 时，保留至小数点后三位；当测定结果大于或等于 1 mg/L 时，保留三位有效数字。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

3家实验室分别对磺胺类抗生素的加标浓度为0.050 $\mu\text{g/L}$ 和0.500 $\mu\text{g/L}$ 的地表水、废水和海水进行了6次重复测定。

地表水实验室内相对标准偏差分别在5.9%~10%、4.3%~12%之间，实验室间相对标准偏差分别在1.5%~4.2%、0.6%~1.6%之间，重复性限分别在0.009 $\mu\text{g/L}$ ~0.011 $\mu\text{g/L}$ 、0.065 $\mu\text{g/L}$ ~0.078 $\mu\text{g/L}$ 之间，再现性限分别在0.009 $\mu\text{g/L}$ ~0.012 $\mu\text{g/L}$ 、0.065 $\mu\text{g/L}$ ~0.078 $\mu\text{g/L}$ 之间。

废水实验室内相对标准偏差分别在5.0%~10%、3.4%~8.4%之间，实验室间相对标准偏差分别在1.3%~4.5%、0.7%~2.9%之间，重复性限分别在0.009 $\mu\text{g/L}$ ~0.011 $\mu\text{g/L}$ 、0.066 $\mu\text{g/L}$ ~0.077 $\mu\text{g/L}$ 之间，再现性限分别在0.010 $\mu\text{g/L}$ ~0.011 $\mu\text{g/L}$ 、0.066 $\mu\text{g/L}$ ~0.077 $\mu\text{g/L}$ 之间。

海水实验室内相对标准偏差分别在5.1%~10%、4.3%~7.4%之间，实验室间相对标准偏差分别在0.6%~4.1%、0.3%~1.3%之间，重复性限分别在0.008 $\mu\text{g/L}$ ~0.010 $\mu\text{g/L}$ 、0.070 $\mu\text{g/L}$ ~0.079 $\mu\text{g/L}$ 之间，再现性限分别在0.008 $\mu\text{g/L}$ ~0.010 $\mu\text{g/L}$ 、0.071 $\mu\text{g/L}$ ~0.079 $\mu\text{g/L}$ 之间，具体见附录A中表A.1。

10.2 准确度

3家实验室分别对磺胺类抗生素的加标浓度为0.050 $\mu\text{g/L}$ 和0.500 $\mu\text{g/L}$ 的地表水、废水和海水进行了6次重复测定，其中地表水加标回收率范围在80.2%~87.3%、86.8%~90.7%之间；废水加标回收率范围在79.1%~87.9%、84.1%~93.8%之间；海水加标回收率范围在81.8%~87.9%、88.2%~92.1%之间，具体见附录A中表A.2。

11 质量保证和质量控制

11.1 空白试验

每批样品（ ≤ 20 个/批）至少做一个空白实验，空白试样值低于方法检出限。

11.2 校准

校准曲线的相关系数 $r \geq 0.995$ ，否则应重新绘制校准曲线；每批样品（ ≤ 20 个）应测定一个曲线中间校核点，其测定结果与校准曲线相应点浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内。

11.3 精密度控制

每批样品应至少测定10%的平行双样，样品数量少于10个时，应至少测定一个平行双样，平行双样测定结果的相对偏差应在 $\pm 20\%$ 以内。

11.4 准确度控制

每批样品应至少测定5%的基体加标样品，样品数量少于20个时，应至少测定一个基体加标样品，加标回收率应在75%~110%之间。

12 废物处理

实验过程中产生的废液和废物应分类收集和保管，委托有资质的单位进行处理。

附录 A

(资料性附录)

方法的精密度和准确度

三家实验室分别对2种不同浓度的样品进行了测定。精密度和准确度结果见表A.1和表A.2。

表A.1 方法的精密度

样品类型	精密度统计结果					
	化合物名称	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	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 ($\mu\text{g/L}$)	再现性限 R ($\mu\text{g/L}$)
地表水	磺胺嘧啶	0.050	6.5~10	3.6	0.009	0.009
		0.500	4.6~5.7	0.7	0.065	0.065
	磺胺甲基嘧啶	0.050	6.7~10	3.9	0.010	0.010
		0.500	5.7~7.2	0.8	0.078	0.078
	磺胺二甲嘧啶	0.050	7.8~12	4.2	0.011	0.012
		0.500	5.2~6.3	1.3	0.073	0.073
	磺胺对甲氧嘧啶	0.050	5.9~9.6	1.5	0.009	0.009
		0.500	4.3~5.8	0.6	0.066	0.066
	磺胺甲恶唑	0.050	6.2~9.8	4.0	0.009	0.010
		0.500	5.5~6.7	1.6	0.074	0.074
废水	磺胺嘧啶	0.050	7.2~9.5	2.7	0.010	0.010
		0.500	3.4~7.2	2.6	0.076	0.077
	磺胺甲基嘧啶	0.050	5.1~9.6	1.3	0.010	0.010
		0.500	3.5~8.4	2.9	0.077	0.079
	磺胺二甲嘧啶	0.050	5.8~10	3.0	0.010	0.010
		0.500	4.2~7.2	1.7	0.069	0.069
	磺胺对甲氧嘧啶	0.050	5.7~8.4	4.5	0.009	0.010
		0.500	5.0~6.7	0.7	0.077	0.077
	磺胺甲恶唑	0.050	5.0~9.6	1.8	0.011	0.011
		0.500	4.7~6.2	1.0	0.066	0.066
海水	磺胺嘧啶	0.050	5.1~9.1	3.7	0.009	0.009
		0.500	4.3~6.8	0.3	0.073	0.073
	磺胺甲基嘧啶	0.050	6.4~8.8	3.6	0.009	0.009
		0.500	4.7~7.4	1.1	0.077	0.077
	磺胺二甲嘧啶	0.050	5.2~9.2	4.1	0.008	0.008
		0.500	4.7~6.4	0.6	0.071	0.071
	磺胺对甲氧嘧啶	0.050	6.7~8.5	1.6	0.009	0.009
		0.500	6.0~6.7	0.6	0.079	0.079

	磺胺甲恶唑	0.050	6.0~10	4.1	0.010	0.010
		0.500	4.9~6.6	1.3	0.070	0.070

表A.2 方法的准确度

样品类型	准确度统计结果				
	化合物名称	实际样品浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率范围 (%)	加标回收率最终 值 (%) $\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}}$
地表水	磺胺嘧啶	ND	0.050	80.2~85.6	83.7 $\pm$ 6.0
		ND	0.500	87.7~88.8	88.4 $\pm$ 1.2
	磺胺甲基嘧啶	ND	0.050	80.9~86.7	84.7 $\pm$ 6.6
		ND	0.500	86.8~88.2	87.7 $\pm$ 1.6
	磺胺二甲嘧啶	ND	0.050	80.1~87.2	83.5 $\pm$ 7.2
		ND	0.500	87.6~89.8	88.9 $\pm$ 2.4
	磺胺对甲氧嘧啶	ND	0.050	84.2~86.6	85.6 $\pm$ 2.6
		ND	0.500	88.5~89.6	88.9 $\pm$ 1.2
	磺胺甲恶唑	ND	0.050	81.0~87.3	84.8 $\pm$ 6.6
		ND	0.500	88.0~90.7	89.0 $\pm$ 3.0
废水	磺胺嘧啶	ND	0.050	84.2~87.9	85.3 $\pm$ 4.4
		ND	0.500	89.1~93.8	91.1 $\pm$ 4.8
	磺胺甲基嘧啶	0.012	0.050	80.1~84.3	82.5 $\pm$ 4.4
		0.012	0.500	84.1~89.2	87.0 $\pm$ 5.2
	磺胺二甲嘧啶	ND	0.050	81.7~86.8	84.2 $\pm$ 5.2
		ND	0.500	86.0~88.8	87.6 $\pm$ 2.8
	磺胺对甲氧嘧啶	ND	0.050	80.6~87.5	84.9 $\pm$ 7.6
		ND	0.500	88.7~89.8	89.3 $\pm$ 1.2
	磺胺甲恶唑	0.012	0.050	79.1~83.7	82.0 $\pm$ 5.0
		0.012	0.500	86.3~87.4	87.3 $\pm$ 2.0
海水	磺胺嘧啶	ND	0.050	82.4~84.7	84.4 $\pm$ 3.8
		ND	0.500	88.2~91.5	89.3 $\pm$ 3.8
	磺胺甲基嘧啶	ND	0.050	81.8~86.7	84.7 $\pm$ 5.2
		ND	0.500	88.5~90.9	89.3 $\pm$ 2.8
	磺胺二甲嘧啶	ND	0.050	83.3~86.8	85.2 $\pm$ 3.6
		ND	0.500	89.4~92.1	90.7 $\pm$ 2.8
	磺胺对甲氧嘧啶	ND	0.050	84.7~86.8	85.7 $\pm$ 2.2
		ND	0.500	88.8~89.7	89.4 $\pm$ 1.0
	磺胺甲恶唑	ND	0.050	83.2~87.9	85.6 $\pm$ 4.8
		ND	0.500	89.3~90.3	90.0 $\pm$ 1.2

