

水产养殖环境（水体、底泥）中大环内酯类抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of macrolide antibiotics in water and sediment from aquaculture environment—Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

地方标准信息服务平台

2024 - 05 - 13 发布

2024 - 07 - 13 实施

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 试剂与材料..... | 1 |
| 6 仪器与设备..... | 2 |
| 7 样品..... | 2 |
| 8 测定步骤..... | 3 |
| 9 结果计算和表述..... | 5 |
| 10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度..... | 6 |
| 附录 A（资料性） 大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号..... | 7 |
| 附录 B（资料性） 标准溶液特征离子质量色谱图..... | 8 |

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。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省水产科学研究所、农业农村部渔业产品质量检验检测中心（长沙）、澧县农产品质量安全检测中心、长沙市雨花区农业农村局。

本文件主要起草人：万译文、杨霄、何咏、李小玲、谢仲桂、崔先锋、曾春芳、索纹纹、陈湘艺、刘伶俐、雷琴、肖维、洪波、尹升福、谢玉昆、黄向荣、黄华伟、杨宇。

地方标准信息服务平台

水产养殖环境（水体、底泥）中大环内酯类抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了水产养殖环境（水体、底泥）中大环内酯类抗生素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于水产养殖环境（水体、底泥）中脱水红霉素、罗红霉素、克拉霉素、竹桃霉素、吉他霉素、交沙霉素、泰乐菌素、替米考星的测定。

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。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析
- SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分：淡水

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

水试样中的大环内酯类抗生素经 HLB 固相萃取柱富集和净化，底泥试样中的大环内酯类抗生素经氨化乙腈提取，PSA 和 C_{18} 吸附剂净化。净化后的溶液用带有电喷雾离子源的液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

- 5.1.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。
- 5.1.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。
- 5.1.3 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。
- 5.1.4 甲酸（ $HCOOH$ ）：色谱纯。
- 5.1.5 氯化钠（ $NaCl$ ）：分析纯。
- 5.1.6 氨水（ $NH_3 \cdot H_2O$ ）：分析纯，浓度为 25%~28%。
- 5.1.7 无水硫酸镁（ $MgSO_4$ ）：分析纯。
- 5.1.8 乙二胺四乙酸二钠（ Na_2EDTA ）：分析纯。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 0.5 mL，用水稀释至 500 mL。
- 5.2.2 甲酸-乙腈溶液：取乙腈 30 mL，用 0.1%甲酸水溶液稀释至 100 mL。
- 5.2.3 1%氨化乙腈：取氨水 5 mL，用乙腈稀释至 500 mL。

5.3 标准品

- 5.3.1 大环内酯类抗生素：脱水红霉素、罗红霉素、克拉霉素、竹桃霉素、吉他霉素、交沙霉素、泰乐菌素、替米考星，纯度均大于等于 95.0%，具体内容见附录 A。
- 5.3.2 内标：罗红霉素-D₇，纯度大于等于 95.0%，具体内容见附录 A。

5.4 标准溶液配制

- 5.4.1 标准储备液（100 μg/mL）：取大环内酯类抗生素标准品各约 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并稀释至 100 mL，配制成浓度均为 100 μg/mL 的标准储备液。4℃避光保存，有效期 3 个月。
- 5.4.2 内标标准储备液（100 μg/mL）：取罗红霉素-D₇ 标准品约 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并稀释至 100 mL，配制成浓度为 100 μg/mL 的内标标准储备液。4℃避光保存，有效期 3 个月。
- 5.4.3 混合标准工作液（1.0 μg/mL）：分别精密量取标准储备液各 1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μg/mL 的混合标准工作液。4℃避光保存，有效期 1 个月。
- 5.4.4 内标标准工作液（1.0 μg/mL）：精密量取内标标准储备液 1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μg/mL 的内标标准工作液。4℃避光保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 HLB（二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物）固相萃取柱：500 mg/6 mL，或相当者。
- 5.5.2 PSA（N-丙基乙二胺）吸附剂：粒径 40 μm~63 μm，或相当者。
- 5.5.3 C₁₈（十八烷基键合硅胶）吸附剂：粒径 40 μm~63 μm，或相当者。
- 5.5.4 玻璃纤维滤膜：0.45 μm。
- 5.5.5 尼龙滤膜：0.22 μm。

6 仪器与设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.00001 g。
- 6.3 冷冻干燥机。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 高速离心机：转速大于等于 10000 r/min。
- 6.6 超声波清洗器。
- 6.7 固相萃取装置。
- 6.8 氮吹仪。
- 6.9 旋转蒸发仪。
- 6.10 pH 计。

7 样品

7.1 样品采集

水样和底泥样品按照 SC/T 9102.3 规定的方法进行采集。

7.2 试样制备

水样采样量应不少于 1 L，经 0.45 μm 玻璃纤维滤膜过滤，置于棕色样品瓶中，0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，一周内完成分析。底泥样品采样量应不少于 500 g，于-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷冻 24 h，经冷冻干燥机（-50 $^{\circ}\text{C}$ ，真空度小于 20 Pa，冷冻干燥 10 h）冻干，剔除石块和植物体等异物，用研钵研磨后过孔径 0.25 mm 网筛，置于棕色样品瓶中，0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，一个月内完成分析。

7.3 空白试样制备

选取不含大环内酯类抗生素的同类样品，按照 7.2 进行制备。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 水

准确移取 100 mL 试样，用甲酸调节 pH 至 6.0 (± 0.2)，加入 50 μL 内标标准工作液，再加入 0.1 g 乙二酸四乙酸二钠，混合均匀。无需提取，待净化。

8.1.2 底泥

称取 2 g（准确至 ± 0.02 g）试样于 50 mL 离心管中，加入 2 mL 水润湿，加入 200 μL 内标标准工作液，加入 1% 氯化乙腈 10 mL，涡旋混合 1 min，超声提取 10 min，加入氯化钠 2 g，涡旋混合 1 min，6000 r/min 离心 8 min，取上清液并转移至 20 mL 具塞刻度试管中，残渣用 10 mL 1% 氯化乙腈重复提取一次，合并上清液，用乙腈定容至 20 mL，混匀，备用。

8.2 净化

8.2.1 水

HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化。取水样过柱，控制流速不超过 5 mL/min。待水样全部通过小柱后，用 10 mL 水淋洗，减压抽干，用 8 mL 甲醇洗脱。收集洗脱液，于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹至近干。加入 1 mL 甲酸-乙腈溶液溶解残渣，过 0.22 μm 尼龙滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.2.2 底泥

移取 10.00 mL 上述备用液至 50 mL 离心管中，加入无水硫酸镁 600 mg，PSA 吸附剂 100 mg， C_{18} 吸附剂 40 mg，涡旋振荡 1 min，10000 r/min 离心 5 min，转移上清液至 50 mL 茄形瓶中，于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩至近干，加入 2 mL 甲酸-乙腈溶液溶解残渣，过 0.22 μm 尼龙滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 底泥试样含水率测定

按照 GB 17378.5 规定的方法进行测定。

8.4 标准曲线制备

精密量取混合标准工作液、内标标准工作液适量，用甲酸-乙腈溶液配制成大环内酯类抗生素浓度为 0.5 μg/L、1.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L 和 50.0 μg/L 的系列混合标准工作液，其中内标溶液的浓度均为 50 μg/L，供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物和内标物特征离子质量色谱峰面积比值为纵坐标、对应的待测物标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，计算回归方程和相关系数。

8.5 测定

8.5.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C₁₈ (100 mm×2.1 mm，粒径 2.6 μm)，或相当者；
- 流动相：A 为乙腈，B 为 0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱条件见表 1；
- 进样量：5 μL；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40 °C。

表1 流动相梯度洗脱条件

| 时间 min | A % | B % |
|-----------|--------|--------|
| 0 | 10 | 90 |
| 1.0 | 10 | 90 |
| 7.0 | 85 | 15 |
| 8.0 | 85 | 15 |
| 8.1 | 10 | 90 |
| 10.0 | 10 | 90 |

8.5.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子源：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测 (MRM)；
- 喷雾电压：5.5 kV；
- 脱溶剂气温度：550 °C；
- 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表2 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量

| 化合物名称 | 母离子 m/z | 子离子 m/z | 去簇电压 V | 碰撞能量 eV |
|-------|------------|--------------------|-----------|------------|
| 脱水红霉素 | 716.5 | 558.4 ^a | 100 | 24 |
| | | 158.1 | 100 | 40 |
| 罗红霉素 | 837.5 | 679.5 ^a | 106 | 32 |
| | | 158.1 | 106 | 42 |

表2 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量 (续)

| 化合物名称 | 母离子 m/z | 子离子 m/z | 去簇电压 V | 碰撞能量 eV |
|---------------------|------------|--------------------|-----------|------------|
| 克拉霉素 | 748.4 | 158.1 ^a | 88 | 38 |
| | | 590.3 | 88 | 29 |
| 竹桃霉素 | 688.4 | 544.4 ^a | 107 | 25 |
| | | 158.1 | 107 | 38 |
| 吉他霉素 | 772.4 | 174.3 ^a | 72 | 43 |
| | | 109.3 | 72 | 60 |
| 交沙霉素 | 828.4 | 174.1 ^a | 90 | 43 |
| | | 109.3 | 90 | 60 |
| 泰乐菌素 | 916.4 | 174.1 ^a | 81 | 50 |
| | | 772.2 | 81 | 45 |
| 替米考星 | 869.5 | 696.4 ^a | 112 | 58 |
| | | 174.1 | 112 | 57 |
| 罗红霉素-D ₇ | 844.5 | 158.1 ^a | 106 | 42 |
| ^a 定量离子。 | | | | |

8.5.3 定性测定

在相同测试条件下,试样中待测物的保留时间与标准工作液中待测物的保留时间一致,偏差在±2.5%以内,且试样中待测物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液对应的定性离子的相对丰度一致。其允许偏差见表3。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

| 相对离子丰度/% | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
|----------|-----|--------|--------|-----|
| 允许偏差/% | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

8.5.4 定量测定

按8.5.1和8.5.2设定仪器条件,取标准工作溶液、试样溶液、空白试样溶液等体积进样测定,内标法定量,其中脱水红霉素、罗红霉素、克拉霉素、竹桃霉素、吉他霉素、交沙霉素、泰乐菌素、替米考星以罗红霉素-D₇为内标。标准工作溶液和试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测线性范围内。大环内酯类抗生素标准溶液特征离子质量色谱图参见附录B。

8.6 空白实验

按照8.1~8.5相同的测定步骤进行空白试样(见7.3)的测定。

9 结果计算和表述

9.1 水样中待测物含量

水样中待测物含量按式（1）计算。计算结果应扣除空白值，保留 2 位有效数字。

$$X_1 = \frac{C_i \times V}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_1 ——试样中待测物的含量，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_0 ——试样体积，单位为毫升（mL）；

9.2 底泥中待测物含量

底泥中待测物含量按式（2）计算。计算结果应扣除空白值，保留 2 位有效数字。

$$X_2 = \frac{C_i \times V_1 \times V}{V_2 \times m \times (1-w)} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_2 ——试样中待测物的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——准确移取的备用液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

w ——试样含水率，单位为质量分数（%）。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在水产养殖环境水中 8 种大环内酯类抗生素的检出限均为 0.002 $\mu\text{g/L}$ ，定量限均为 0.005 $\mu\text{g/L}$ ；在水产养殖环境底泥中 8 种大环内酯类抗生素的检出限均为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限均为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法水在 0.005 $\mu\text{g/L}$ ~0.5 $\mu\text{g/L}$ 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%；底泥在 1 $\mu\text{g/kg}$ ~100 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 60%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差小于等于 15%，批间相对标准偏差小于等于 15%。

附录 A

(资料性)

大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表A.1。

表A.1 大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

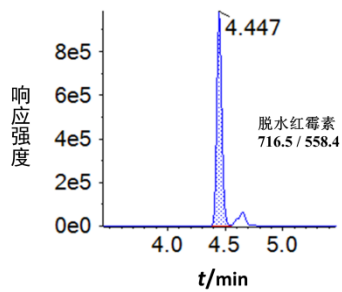
| 中文通用名称 | 英文通用名称 | 化学分子式 | CAS号 |
|---------------------|------------------------------|----------------------------|--------------|
| 脱水红霉素 | Anhydroerythromycin A | $C_{37}H_{65}NO_{12}$ | 23893-13-2 |
| 罗红霉素 | Roxithromycin | $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ | 80214-83-1 |
| 克拉霉素 | Clarithromycin | $C_{38}H_{69}NO_{13}$ | 81103-11-9 |
| 竹桃霉素 | Oleandomycin | $C_{35}H_{61}NO_{12}$ | 3922-90-5 |
| 吉他霉素 | Kitasamycin | $C_{40}H_{67}NO_{14}$ | 1392-21-8 |
| 交沙霉素 | Josamycin | $C_{42}H_{69}NO_{15}$ | 16846-24-5 |
| 泰乐菌素 | Tylosin | $C_{46}H_{77}NO_{17}$ | 1401-69-0 |
| 替米考星 | Tilmicosin | $C_{46}H_{80}N_2O_{13}$ | 108050-54-0 |
| 罗红霉素-D ₇ | Roxithromycin-D ₇ | $C_{41}H_{69}D_7N_2O_{15}$ | 2095110-69-1 |

地方标准信息服务平台

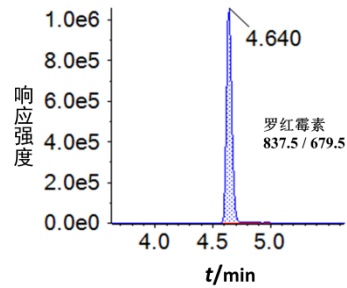
附录 B
(资料性)

标准溶液特征离子质量色谱图

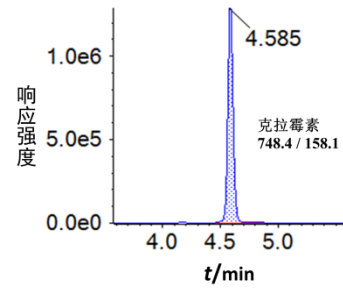
标准溶液特征离子质量色谱图见图B.1。



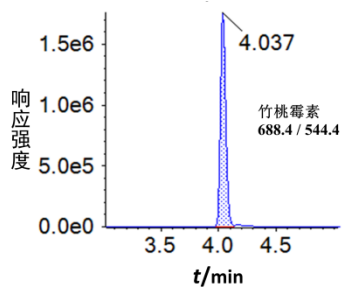
a) 脱水红霉素定量离子色谱图



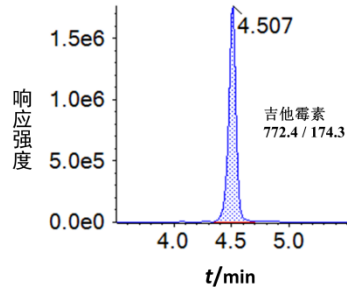
b) 罗红霉素定量离子色谱图



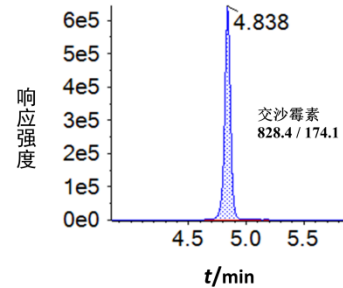
c) 克拉霉素定量离子色谱图



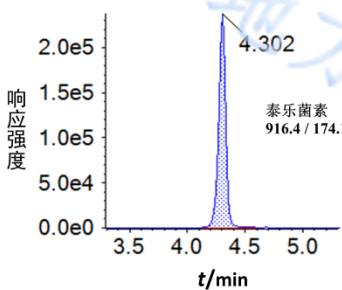
d) 竹桃霉素定量离子色谱图



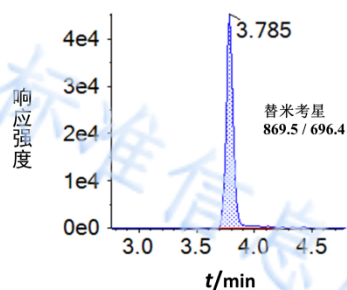
e) 吉他霉素定量离子色谱图



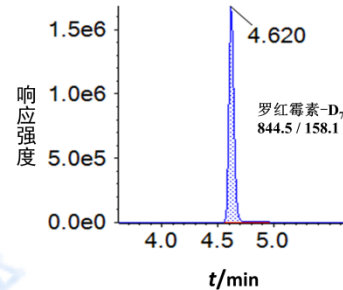
f) 交沙霉素定量离子色谱图



g) 泰乐菌素定量离子色谱图



h) 替米考星定量离子色谱图



i) 罗红霉素-D₇定量离子色谱图

图B.1 大环内酯类抗生素标准溶液特征离子质量色谱图 (10.0 μg/L)