

广东省地方标准

《土壤 抗生素类化合物的测定 超声提取-固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法》

（征求意见稿）

编制说明

标准编制工作组

2020 年 11 月 10 日

目 录

1. 项目背景.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
1.2.1 成立标准编制工作小组.....	1
1.2.2 查询国内外相关标准和文献资料.....	1
1.2.3 确定标准制订技术路线，制订原则.....	2
1.2.4 实验室内部方法开发.....	2
1.2.5 编写标准文本和编制说明初稿.....	2
1.2.6 开展方法验证工作.....	2
1.2.7 编写标准文本（征求意见稿）和编制说明.....	2
2. 标准制修订的必要性.....	2
2.1 目标污染物的环境危害.....	2
2.1.1 目标污染物的基本性质.....	2
2.1.2 抗生素的环境危害.....	6
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	6
2.3 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在问题.....	6
2.3.1 现行污染物分析方法标准的局限性.....	6
2.3.2 污染物分析仪器、设备、方法等的最新进展.....	6
3. 国内外相关分析方法研究.....	7
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	7
3.2 本标准与美国 EPA 1694 方法的异同之处.....	7
4. 标准制修订的基本原则和技术路线.....	8
4.1 标准制修订的基本原则.....	8
4.2 标准的适用范围和主要技术内容.....	8
4.3 标准制修订的技术路线.....	9
5. 方法研究报告.....	9
5.1 方法研究的目标.....	9
5.2 方法原理.....	10
5.3 试剂和材料.....	10
5.3.1 实验用水.....	10
5.3.2 试剂.....	10

5.3.3 标准物质.....	11
5.3.4 实验器皿.....	12
5.3.5 实验用气.....	12
5.4 仪器和设备.....	12
5.5 样品采集和预处理.....	12
5.5.1 样品采集.....	12
5.5.2 样品预处理.....	13
5.6 样品处理和仪器分析步骤.....	13
5.6.1 提取方法比较.....	13
5.6.2 提取条件优化.....	15
5.6.3 固相萃取条件选择.....	17
5.6.4 仪器分析方法条件优化.....	19
5.6.5 标准曲线.....	22
5.6.6 实验室空白测试.....	23
5.6.7 方法检出限.....	23
5.6.8 方法精密度.....	24
5.6.9 方法准确度.....	28
5.8 结果计算和表示.....	35
5.8.1 定性分析.....	35
5.8.2 定量分析.....	35
5.8.3 结果表示.....	36
6. 方法验证.....	36
6.1 参与方法验证的实验室基本情况.....	36
6.2 方法验证方案.....	36
6.2.1 方法验证内容.....	36
6.2.2 样品准备.....	37
6.3 方法验证过程.....	37
6.4 方法验证结果.....	37
6.4.1 检出限、测定下限数据.....	37
6.4.2 精密度数据.....	38
6.4.3 准确度数据.....	40
参考文献.....	44

《土壤 抗生素类化合物的测定 超声提取-固相萃取- 高效液相色谱-串联质谱法》编制说明

1. 项目背景

1.1 任务来源

近年来，土壤环境中抗生素的污染问题受到研究人员、政府部门和大众的广泛关注。广东省政府对土壤中抗生素的污染非常重视，为配合贯彻《广东省土壤污染防治行动计划实施方案》，规范土壤环境中抗生素的检测方法，特制定本标准。

根据《广东省市场监督管理局关于批准下达省地方标准制修订计划项目的通告》(2019年第7号)，广东省环境监测中心、华南师范大学环境研究院负责起草《土壤 抗生素类化合物的测定 超声提取-固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法》。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制工作小组

根据2019年1月7日发布的《广东省市场监督管理局关于批准下达省地方标准制修订计划项目的通告》(2019年第7号)，广东省环境监测中心和华南师范大学环境研究院接到制定《土壤 抗生素类化合物的测定 超声提取-固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法》的任务后，成立标准编制工作小组，由从事多年抗生素研究经验、熟悉样品前处理、液相色谱-质谱联用仪的技术人员承担本工作。

1.2.2 查询国内外相关标准和文献资料

2019年1月，标准编制工作组根据有关标准制修订工作管理办法的相关规定，检索、查询和收集国内外相关标准和文献资料。调研发现，国内外抗生素的检测方法有微生物法、酶联免疫吸附法、气相色谱法、毛细管电泳检测技术法、液相色谱法、液相色谱与质谱联用技术等。微生物法和酶联免疫吸附法等检测技术存在费时、抗体制备不易、敏感性差、假阳性率高等缺点；气相色谱法和毛细管电泳检测技术则受限于抗生素的非挥发或热不稳定性以及不同环境中电荷性质的差异性而不适宜于抗生素的大量检测。近来越来越多的文献研究结果表明，高效液相色谱-串联质谱法(以下简称LC-MS/MS)是一种高效、准确和灵敏的抗生素检测方法。但是，目前国内暂无采用LC-MS/MS测定土壤环境中抗生素的相关标准。

1.2.3 确定标准制订技术路线，制订原则

2019年1月至3月，确定了本标准的具体内容、原则、技术路线等内容。根据我国抗生素的使用量、土壤中常见抗生素的检出情况等资料，确定了我国常用的17种抗生素为目标物质，包括6种磺胺类、2种氟喹诺酮类、5种大环内酯类、2种四环素类、林可霉素和甲氧苄氨嘧啶，采用超声辅助提取-固相萃取柱净化-LC-MS/MS法分析的技术方案，实现对不同性质土壤中痕量抗生素的高效、准确测定。

1.2.4 实验室内部方法开发

2019年4月至9月，标准编制组采用超声辅助提取-固相萃取柱净化-LC-MS/MS分析的方法，在华南师范大学环境研究院广东省化学品污染与环境安全重点实验室内部开展了检出限、精密度、准确度、方法适用性等系列的方法开发工作。实验结果表明，当土壤干重为2.0 g，经提取、净化和浓缩后定容体积为1.0 ml，进样体积为10 μ l时，17种抗生素的方法检出限为0.6 μ g/kg ~ 4.7 μ g/kg，测定下限为2.4 μ g/kg ~ 19 μ g/kg。可实现土壤中痕量抗生素的定量分析。

1.2.5 编写标准文本和编制说明初稿

2019年10月至12月，标准编制工作小组汇整前期研究成果，编写标准草案及编制说明。

1.2.6 开展方法验证工作

2020年5月至8月，标准编制工作组确定了外部6家实验室进行方法验证，于2020年9月收回全部的验证报告，在此基础上进行了数据的汇总和分析整理工作，并编写完成了验证汇总报告。

1.2.7 编写标准文本（征求意见稿）和编制说明

2020年9月至11月，标准编制工作组编写《土壤 抗生素类化合物的测定 超声提取-固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法（讨论稿）》的标准文本及编制说明，并于2020年11月3日组织专家对标准文本（讨论稿）及编制说明进行了初步论证。根据专家意见进一步修改，形成标准文本（征求意见稿）及编制说明。

2. 标准制修订的必要性

2.1 目标污染物的环境危害

2.1.1 目标污染物的基本性质

抗生素是由微生物(细菌、真菌和放线菌) 在生长代谢过程中产生或由人工合成

或半合成的，能抑制微生物生长的小分子化合物。由于抗生素在人类临床疾病治疗和畜牧水产业中的广泛应用，自 1929 年英国科学家弗莱明发现青霉素以来，随着科技的进步，不断有新的抗生素被发现或合成，抗生素队伍得以不断壮大，至今已达上万种，不仅包括微生物产生的，也包括高等动植物产生的代谢物以及用化学方法合成和半合成的化合物；不仅包括抗细菌的物质，也包括抗肿瘤、抗原虫、抗病毒、抗真菌、抗藻类、抗寄生虫等的物质。

目前常见的抗生素类型主要有：

(1) **磺胺类**：磺胺类药物是应用最早的一类人工合成抗菌药物。磺胺类药物属于广谱抗菌药物，因其抗菌谱广、疗效强、方便安全等优点被广泛用于人体和动物(各种畜禽、水产和宠物)。常见的磺胺类药物主要有磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、复方新诺明(磺胺甲噁唑+甲氧苄氨嘧啶)等。磺胺的分子中含有一个苯环，一个对位氨基和一个磺酰胺基。磺胺类化学物主要是通过通过各种化学基团来取代磺酰胺基上的氢原子制备的有效衍生物(图 1)。

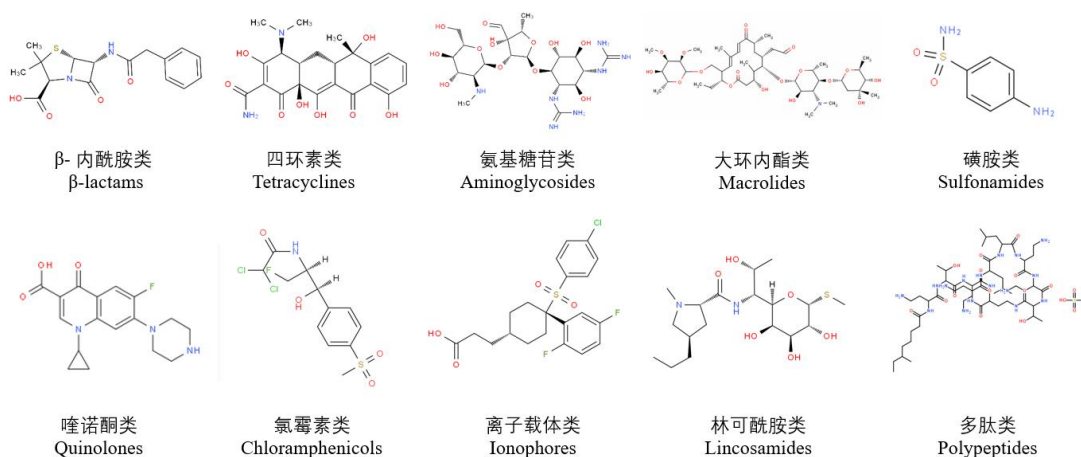


图 1 主要的抗生素种类

(2) **四环素类**：四环素是一类被广泛使用的广谱抗生素，能与核糖体 30S 亚基结合，阻止氨酰-*t*RNA 与核糖体结合而抑制细菌蛋白质的合成。四环素类抗生素可与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Al^{3+} 等金属离子形成络合物，影响药效。同时与 Ca^{2+} 形成的不溶络合物会影响小儿的牙齿变黄和骨骼发育，因此小孩和孕妇禁用四环素类抗生素。常见的四环素类抗生素有金霉素、土霉素、强力霉素、甲烯土霉素、甘氨酸环素等。目前，四环素类抗生素多用于养殖业，如养猪、养鸡和水产养殖等。

(3) **喹诺酮类**：喹诺酮类药物是一类 4-氧-1,4-二氢喹诺酮为原始骨架的人工合成抗生素。喹诺酮类药物通过在 DNA 解链阶段俘获细菌型 IIA 拓扑异构酶、DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 而对染色体拓扑异构化产生干扰，阻滞 DNA 单链部分的复性，

从而抑制细菌 DNA 的复制而发挥抑菌作用。自 20 世纪 60 年代萘啶酸、吡咯酸、恶喹酸等的发现开始，喹诺酮药物已发展至第四代，抗菌活性逐渐增强，副作用降低。现已被广泛用于人畜疾病治疗，常用的主要为第三代喹诺酮类，如环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺氟沙星和培氟沙星等。该类物质相对较稳定，水溶性偏低。

(4) **β -内酰胺类**： β -内酰胺类是一类含有 β -内酰胺环的抗生素，其通过抑制革兰氏阴性细菌细胞壁合成的最后一步而对细菌产生抑制作用。该类抗生素具有杀菌活性强、药物代谢动力学性质良好、低宿主毒性以及与其它种类抗生素(例如氨基糖苷类)协同增效等优点，因此被广泛应运于临床和畜牧业中。青霉素类水溶液不稳定，极易失效；不耐热；酸、碱、重金属及青霉素酶可使其 β -内酰胺环破裂，导致失效。常用的有青霉素、苯唑西林、氨苄西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑林、头孢他啶、头孢噻肟等。

(5) **大环内酯类**：大环内酯类抗生素是一类具有大环内脂结构，可抑制大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的广谱一线抗生素。大环内酯类通过与细菌核糖体 50S 亚基可逆性结合，抑制蛋白质的合成，发挥抑菌活性。常见的大环内酯类抗生素有红霉素 A、阿奇霉素、泰乐菌素、竹桃霉素和北里霉素。

(7) **多肽类**：多肽类抗生素是一类具多肽结构特征的抗生素，通过作用于细菌的渗透压屏障，损伤细胞质膜而对细菌产生抑制，可分为多黏菌素类、糖肽类和杆菌肽类。通常被用作抵抗革兰氏阳性菌的最后一道防线。常见的多肽类抗生素有多黏菌素 B、杆菌肽、短杆菌肽、万古霉素、替考拉宁、奥利万星、达巴万星、特拉万星、氯依瑞霉素等。

(8) **林可酰胺类**：林可酰胺类化学结构主要由氨基酸和寡糖构成，其主要作用机制为与核糖体 50S 亚基结合抑制肽链的生成，主要针对厌氧细菌和原生动感染。易引发恶心、呕吐、腹泻、皮疹、发烧等不良反应，很少用于临床医疗，主要与大观霉素联合用于反刍动物、猪和禽类。该类抗生素中的细菌自然代谢生成的代表有林可霉素和天青霉素，其半合成的代表有克林霉素和吡利霉素。

(9) **氯霉素类**：氯霉素是一种对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的广谱抗生素，氯霉素主要抑菌机理为通过与原核细胞中 50S 核糖体亚基结合，抑制蛋白质的合成而阻止细菌繁殖。氯霉素分子主要由对硝基苯基、丙二醇与二氯乙酰胺三个部分组成，性质稳定。氯霉素类能引发多种严重的副作用，例如骨髓抑制、再生性障碍贫血、血小板减少症和粒细胞减少等，故中国、日本、加拿大、美国和澳大利亚等国家现已明令禁止其使用。常见的氯霉素类抗生素有氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考等。

(10) **氨基糖苷脂类**：氨基糖苷类的活性结构是一类由 1 个或多个氨基糖分子和糖苷通过氧桥接而成的环醇，该类抗生素通过与核糖体 16SrRNA 的氨酰基位点和 50SrRNA 亚基以及 tRNA 结合而抑制蛋白质翻译和核糖体的循环利用，从而发挥抗

菌作用。常见的氨基糖苷类包括链霉素、庆大霉素、卡那霉素、西索米星以及人工半合成的妥布霉素、阿米卡星和奈替米星等。因具协同杀菌活性，氨基糖苷类经常与 β -内酰胺类和万古霉素联合使用。然而该类抗生素具有独特的耳毒性和肾毒性，因此其发展应用受到限制。

此外，还包括硝基咪唑类、硝基呋喃类、磷霉素、卷霉素、黄连素、丝裂霉素等。

可以看出，抗生素包括的种类多种多样，而土壤的基质复杂，难以对全部抗生素进行有效测定。鉴于此，本标准依据我国抗生素的使用量、各类型土壤中检出情况及方法的有效检测情况，选取常见抗生素。据项目负责人所在的研究组调研资料，常见36种抗生素总使用量为92665吨，年使用量依次为喹诺酮类 > β -内酰胺类 > 大环内酯类 > 磺胺类 > 四环素类^[1]。其中兽用抗生素占总量的84.3%，人用抗生素占总量的15.6%。其中 β -内酰胺类虽然使用量巨大，然而其易于水解，在环境中很少检出。此外，莫能菌素、盐霉素等离子载体类抗生素检测中绝对回收率较低，难以满足有效检测，也没有包含在本标准的目标化合物中。因此最终选取了17种抗生素类化合物作为目标物质，包括6种磺胺类、2种氟喹诺酮类、5种大环内酯类、2种四环素类、林可霉素以及甲氧苄氨嘧啶。17种目标化合物的基本信息详见表1。

表1 目标抗生素的基本性质

化合物 中文名称	英文名称	所属种类	CAS号	分子量	分子式	Log Kow	pKa
磺胺氯哒嗪	Sulfachloropyridazine	磺胺类	80-32-0	284.7	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S		1.87, 5.45
磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	磺胺类	127-79-7	264.3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S		
磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	磺胺类	651-06-9	280.3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	0.41	
磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	磺胺类	57-68-1	278.3	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	0.80	2.07, 7.49
磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	磺胺类	723-46-6	253.3	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	0.89	1.85, 5.6
磺胺吡啶	Sulfapyridine	磺胺类	144-83-2	249.3	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	0.35	2.58, 8.43
克拉霉素	Clarithromycin	大环内酯类	81103-11-9	748	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	3.16	8.99
脱水红霉素	Erythromycin-H ₂ O	大环内酯类	23893-13-2	715.9	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂		
北里霉素	Leucomycin	大环内酯类	1392-21-8	771	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄		
罗红霉素	Roxithromycin	大环内酯类	80214-83-1	837	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	2.75	9.17
泰乐菌素	Tylosin	大环内酯类	1401-69-0	916.1	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	1.63	7.73
金霉素	Chlortetracycline	四环素类	57-62-5	478	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	-0.62	3.33, 7.55, 9.33
土霉素	Oxytetracycline	四环素类	79-57-2	460.4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	-1.22	3.22/7.46/8.94
环丙沙星	Ciprofloxacin	氟喹诺酮类	85721-33-1	331.3	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	0.4	3.01, 6.14, 8.70, 10.58
诺氟沙星	Norfloxacin	氟喹诺酮类	70458-96-7	319.3	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	-1.03	3.1, 8.6
甲氧苄氨嘧啶	Trimethoprim	其他	738-70-5	290.3	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	0.91	3.23, 6.76
林可霉素	Lincomycin	其他	154-21-2	406.5	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	0.56	

2.1.2 抗生素的环境危害

我国抗生素生产量巨大，抗生素滥用突出，2013年使用量高达16万吨^[1]，其中多半用于畜禽养殖业，抗生素的大量使用导致了畜禽养殖污水和粪便中抗生素高浓度残留，随着废水和粪便入田进入土壤环境，抗生素可在土壤介质和种植植物中迁移转化。土壤抗生素污染将直接和间接影响农产品质量和生态环境，影响食品安全，威胁公众健康。

此外，土壤环境中抗生素残留可诱导微生物通过基因突变、基因组融合和基因的水平转移，获得了对各类抗生素的抗性，并通过基因水平转移向人畜致病菌转移，严重威胁到人类疾病治疗和畜牧养殖业。当下细菌耐药性问题已引起国际和国内社会的高度重视，成为全球性环境与人体健康问题。世界卫生组织将细菌耐药性作为21世纪人类面临的最严峻的问题之一，号召全球共同抑制耐药性的发展，并于2015年提出了全球行动计划，号召各成员国也制定相应的控制抗生素耐药行动计划。我国也于2016年9月由14个部委联合发布了《遏制细菌耐药国家行动计划》，旨在控制抗生素的使用和抗生素耐药性的传播。前期对珠三角地区农田土壤研究工作已发现畜禽养殖厂周边土壤中抗生素污染严重，有必要加强抗生素污染的监控工作。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

我国土壤抗生素污染问题，已引起了社会公众的广泛关注。尤其是经济发达地区科研单位已开展了很多的土壤抗生素污染调查工作，但通常调查的抗生素种类单一，提取方法等前处理过程方法差异较大，缺乏相关技术标准，数据难以统一比对分析。随着抗生素的环境危害受到越来越多的重视，以及我国《遏制细菌耐药国家行动计划》的出台，有必要建立土壤环境中抗生素的监测方法和土壤环境质量等相关标准，为抗生素的管理提供技术支撑。

2.3 现行环境监测分析方法标准的实施情况和存在问题

2.3.1 现行污染物分析方法标准的局限性

国内外现行的抗生素检测方法有酶联免疫吸附法、液相色谱紫外技术、荧光检测技术以及LC-MS/MS等。然而紫外、酶联免疫吸附和荧光检测技术存在抗体制备较难、假阳性和灵敏度较低的问题，限制了检测结果的精确性和重现性。

2.3.2 污染物分析仪器、设备、方法等的最新进展

LC-MS/MS是继气质联用(GC-MS)和液质联用(LC-MS)以后发展起来的又一新型分离检测技术。其具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高、易排除杂质干扰、定

性定量精准等众多特点，非常适合于复杂组分的快速检测。近年来，国内外众多学者也开始选用LC-MS/MS进行各种环境样品中抗生素的分析检测，灵敏度高，选择性和特异性较好，能有效地去除基质的干扰，定性定量准确。

3. 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

抗生素作为一类备受关注的新兴环境污染物质，全球仅有少数国家、地区及国际组织开展了对其检测分析方法和标准的制定(表2)，与抗生素在化学品库中日益受关注的地位不匹配。

表2 主要国家和地区及国际组织相关标准检测方法

方法出处	方法号	目标化合物	前处理方法	分析方法	检出限	适用范围
中国石油和化学工业联合会	GB/T 32951-2016	四环素类抗生素	甲醇-McIlvaine缓冲液提取-C ₁₈ 柱净化	LC	0.75~1.0 mg/kg	有机肥料、有机-无机复合肥料
中华人民共和国农业部	GB/T 21108-2007	氯霉素	乙酸乙酯提取-液液分配和C ₁₈ 柱净化	LC-MS/MS	5 μg/kg	饲料
美国环保署 (USEPA)	Method 1694	约40种抗生素	超声辅助提取-HLB柱净化	LC-MS/MS	0.22~48 μg/kg	固体和半固体基质

3.2 本标准与美国 EPA 1694 方法的异同之处

由表2可知，我国目前尚无关于土壤中抗生素检测的标准方法。而美国EPA 1694方法(水、土壤、沉积物和污泥中药物和个人护理品的LC-MS/MS测定方法)是采用超声辅助提取-固相萃取柱净化结合LC-MS/MS进行固体和半固体样品中药物和个人护理品(PPCPs)的检测^[2]。该方法主要针对45种抗生素和其他29种药物和个人护理品活性成分的检测，方法采用LC-MS/MS中的多反应监测模式(MRM)以提高检测灵敏度，并从样品保存、内标物选择、固相萃取条件、液相条件、质谱条件以及质控措施等方面进行了大量的验证实验。结果表明，各抗生素类目标化合物的检出限(MDL)为0.22~48 μg/kg，回收率范围在50%~214%。美国EPA方法为指导性文件，目的为分析不同环境介质中的常见PPCPs类化合物提供方法文件。

本标准则针对我国土壤中抗生素污染严重的特点，以土壤环境中常见抗生素为研究对象，制定土壤中抗生素的监测方法标准，为国家开展抗生素化学品的管理提供支撑。因此，在本标准制定过程中，一方面，参考了美国EPA 1694中样品保存、内标物选择、质控措施等相关研究成果和要求；另一方面，根据我国抗生素的使用情况，选择了各类抗生素中具有代表性种类，建立土壤中不同种类抗生素的检测方法标准。在方法优化过程中，对提取方法和条件、固相萃取条件、LC流动相、质谱

条件等重要方面均进行了全新的探索和试验，建立一套适用于我国不同性质土壤中抗生素同时检测的超声波辅助提取-固相萃取-液相色谱-串联质谱标准检测方法。

4. 标准制修订的基本原则和技术路线

4.1 标准制修订的基本原则

标准在编写过程中满足以下几个原则：

(1) 方法的检出限和测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求。

(2) 方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求。

(3) 方法具有普遍适用性，易于推广使用。

(4) 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》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》和HJ 168-2010《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》的要求编写。

4.2 标准的适用范围和主要技术内容

本标准适用于砂土、粘土和壤土中17种抗生素类化合物的测定。首先，优化金属离子螯合剂(乙二胺四乙酸四钠或乙二胺四乙酸二钠)加入量、缓冲液种类及其与提取溶剂(乙腈)的比例，并比较超声波辅助提取、QuEChERS和加压流体萃取(PLE)三种最常用的提取方法，从而建立合适的土壤中抗生素提取方法。然后，根据目标组分的化学性质选择合适的固相萃取小柱，优化上样pH值和洗脱溶剂，建立其固相萃取净化方法。

最后，通过对色谱柱、流动相、梯度分离程序以及质谱中毛细管电压、离子源、锥孔电压、碰撞能量等关键参数进行筛选和调节，建立合适的液相和质谱方法。固相萃取洗脱液经浓缩后采用C₁₈色谱分析柱分离，通过LC-MS/MS的多重反应监测模式(MRM)进行测定，以实现不同土壤中17种抗生素的同时、高效、灵敏、准确的测定。

4.3 标准制修订的技术路线

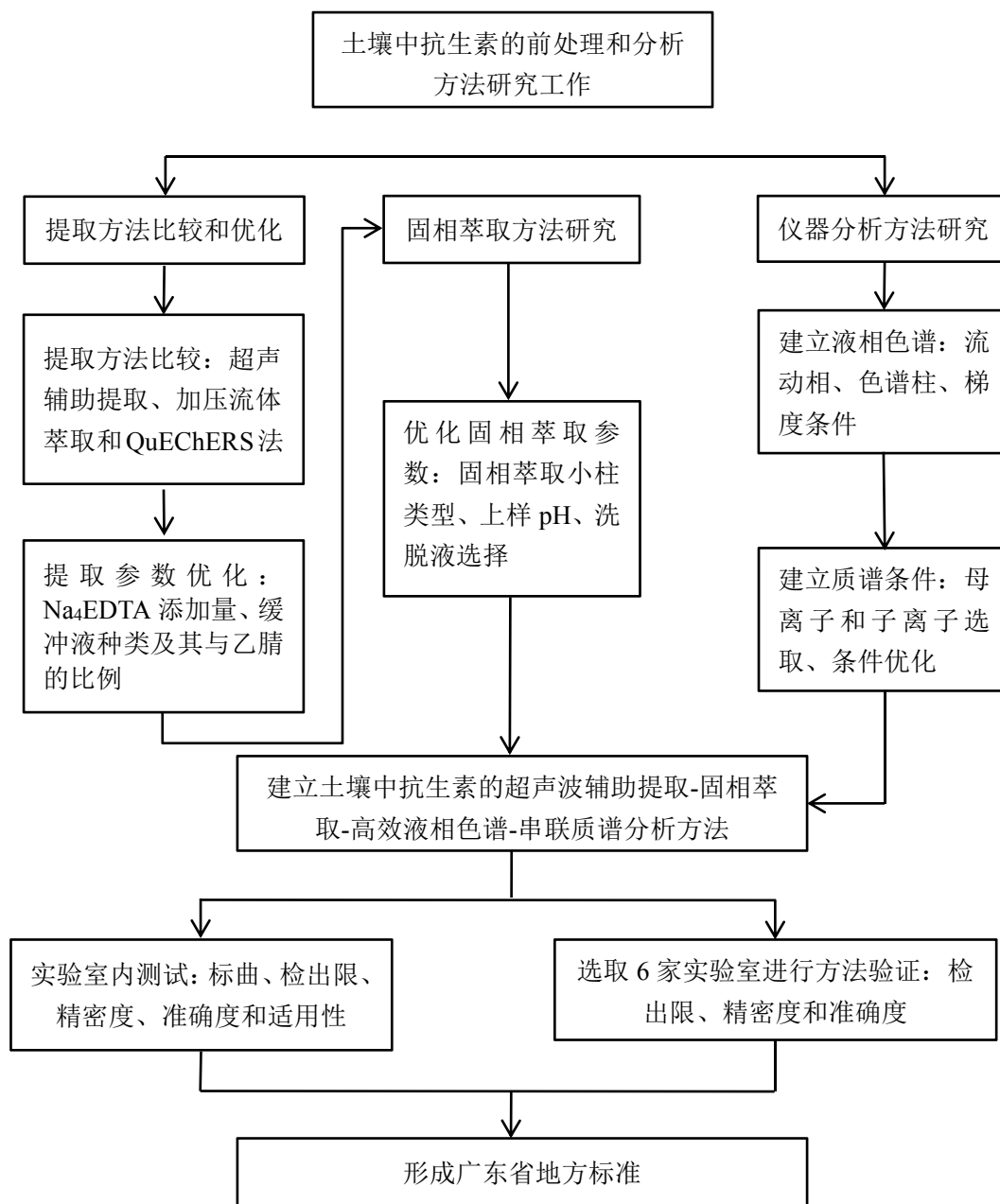


图 2 本标准制定过程的技术路线

5. 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

(1) 制定广东省土壤中抗生素监测方法标准，规范土壤中抗生素的监测技术。建立的标准监测方法将适用于不同性质土壤中抗生素的监测和污染控制，填补国内土壤中抗生素的监测方法标准的空白。

(2) 提高土壤中抗生素的检测分析技术，加强环境管理技术支撑的能力，提升广东省土壤环境中抗生素的环境监管能力。土壤中抗生素监测方法标准可以分析不同性质土壤中四环素类、磺胺类、喹诺酮类、大环内脂类等多种类型抗生素。

5.2 方法原理

过筛土壤以乙腈-McIlvaine 缓冲液的混合溶液为提取剂，采用超声波辅助提取目标抗生素。提取液经固相萃取富集、净化、定容后，采用 LC-MS/MS 检测。根据保留时间和特征离子峰定性，采用内标法进行定量。

5.3 试剂和材料

5.3.1 实验用水

实验用水为新制备的不含目标物的超纯水。本实验室采用空白水进行测试的结果表明，未检出任何待测目标物。

5.3.2 试剂

- (1) 甲醇：色谱纯。
- (2) 乙腈：色谱纯。
- (3) 甲酸：色谱纯。
- (4) 乙酸铵：色谱纯。
- (5) 硫酸： $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1.84 \text{ g/ml}$ ，分析纯。
- (6) NaOH溶液：1.0 mol/L；
- (7) 硫酸溶液：4.0 mol/L；
- (8) 磷酸氢二钠十二水化合物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：分析纯。
- (9) 柠檬酸一水化合物($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)：分析纯。
- (10) 甲酸-乙酸铵/乙腈混合液：0.20%(V/V) 甲酸-2.0 mmol/L乙酸铵水溶液:甲醇(9:1, V/V)。
- (11) 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L)：称取71.628 g磷酸氢二钠十二水化合物溶于纯水中，定容至1000 ml。
- (12) 柠檬酸溶液(0.1 mol/L)：称取21.014 g柠檬酸一水化合物溶于纯水中，定容至1000 ml。
- (13) McIlvaine缓冲液(pH = 4)：分别量取380 ml磷酸氢二钠溶液和620 ml柠檬酸溶液，混合并摇匀。
- (14) 石英砂：用于空白试样的制备，粒径在 150 μm ~250 μm (100目~60目) 之间，要求不含影响目标物测定的干扰物，同时目标物含量应该低于方法检出限，使用前

应置于马弗炉中400 °C烘4 h，检验确认无干扰。

5.3.3 标准物质

(1) 本标准中所用的标准物质购于 Dr Ehrenstorfer(德国)、Sigma-Aldrich(美国) US Pharmacopoeia(美国) 的有证标准溶液，为粉末状物质。参照美国 EPA 1694 方法要求^[2]，对于纯度大于 98%的固体物质，可直接称量，无需进行额外的校正。准确称取相应的标准物质，溶解于甲醇中，配制成 100 mg/L 的单标储液。对于喹诺酮类抗生素，则溶于含 0.5% 1.0 mol/L NaOH 的甲醇溶液中。该储备液可于-18 °C 以下避光保存至少 3 个月^[3]。

(2) 1.0 mg/L 脱水红霉素单标溶液：参照 Mc Ardell 等人报道的方法进行制备^[4]。推荐的制备方法为：取 200 µl 100 mg/L 红霉素储液于 20 ml 棕色瓶中，加入 19.8 ml 甲醇，向其中加入 10 µl 的 4 mol/L 硫酸至 pH 为 3，室温静止 4 h。可于-18 °C 下保存至少 3 个月^[3]。

(3) 1.0 mg/L 氟喹诺酮类 2 种混标溶液：采用 100 mg/L 的氟喹诺酮类单标储液，以甲醇稀释，配制混标储液，于-18 °C 下可稳定保存至少 3 个月^[3]。

(4) 1.0 mg/L 磺胺类、大环内酯类 and 四环素类等其他 14 种混标溶液：采用 100 mg/L 的单标储液，以甲醇稀释，配制混标储液，于-18 °C 下可稳定保存至少 3 个月^[3]。

(5) 内标物的选择：本实验选用美国 EPA 1694 方法中建议的内标，并结合文献中报道的常用内标，最终确定环丙沙星-d₈、脱水红霉素-¹³C-d₃、林可霉素-d₃、磺胺甲噁啉-d₄、磺胺二甲噁啉-¹³C₆、磺胺甲噁啉-d₄、噻苯咪唑-d₄、甲氧苄氨嘧啶-d₃ 作为内标。标准物质对应的内标见表 3。

表 3 17 种抗生素的英文名称、CAS 号及其对应的内标物质

序号	化合物	英文名称	CAS号	分子式	所属类别	内标物质
1	磺胺氯哒嗪	Sulfachloropyridazine	80-32-0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	磺胺类	磺胺甲噁啉-d ₄
2	磺胺甲噁啉	Sulfamerazine	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	磺胺类	磺胺甲噁啉-d ₄
3	磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	651-06-9	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	磺胺类	磺胺二甲噁啉- ¹³ C ₆
4	磺胺二甲噁啉	Sulfamethazine	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	磺胺类	磺胺二甲噁啉- ¹³ C ₆
5	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	磺胺类	磺胺甲噁啉-d ₄
6	磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	磺胺类	磺胺二甲噁啉- ¹³ C ₆
7	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	氟喹诺酮类	环丙沙星-d ₈
8	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	氟喹诺酮类	环丙沙星-d ₈
9	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	大环内酯类	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃
10	脱水红霉素	Erythromycin-H ₂ O	23893-13-2	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂	大环内酯类	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃
11	北里霉素	Leucomycin	1392-21-8	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	大环内酯类	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃

12	罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	大环内酯类	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃
13	泰乐菌素	Tylosin	1401-69-0	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	大环内酯类	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃
14	金霉素	Chlotetracycline	57-62-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	四环素类	噻苯咪唑-d ₄
15	土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	四环素类	噻苯咪唑-d ₄
16	甲氧苄氨嘧啶	Trimethoprim	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	其他类	甲氧苄氨嘧啶-d ₃
17	林可霉素	Lincomycin	154-21-2	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	其他类	林可霉素-d ₃

5.3.4 实验器皿

本实验过程中，非定量的玻璃器皿使用前均在 450 °C 的马弗炉中烘烤 4 h；定量使用的玻璃器皿清洗干净后，使用前均用甲醇和丙酮分别冲洗 3 遍，以确保以去除背景有机物的干扰。

5.3.5 实验用气

本实验用的普通氮气纯度(V/V) ≥ 99.99%，其它仪器用高纯气体则按照仪器厂家的纯度要求进行准备。

5.4 仪器和设备

本标准编制组采用型号为 Agilent 1290 系列高压液相色谱串联 6495B QQQ MS/MS 的液质联用仪对方法进行优化，采用电喷雾离子化源(ESI) 和多重反应模式(MRM)。土壤前处理设备主要为冷冻干燥机、超声机、加压流体萃取仪、高速离心机、固相萃取装置和氮吹浓缩装置等。

5.5 样品采集和预处理

5.5.1 样品采集

按照《土壤环境监测技术规范》(HJ/T 166-2004)的相关规定进行土壤样品的采集和保存。每份土壤样品均由 5 个按对角线法采取的小样混合而成。采样深度为 0~20 cm，重量为 5 kg 左右。样品保存于洁净的具塞磨口棕色玻璃瓶中。运输过程中密封、避光冷藏。运至实验室后，若不能及时分析，应于 4 °C 以下冷藏、密封、避光保存。最终，编制组通过调研和筛选确定了表 4 所示三种实际土壤样品作为方法开发和验证用的基体。

表 4 不同类型土壤样品

土壤类型	采样地点	经纬度	采集时间
砂土	广州市南沙湿地公园周边	E113°37'18", N22°37'41"	2019 年 5 月
粘土	广州市南沙湿地公园内	E113°38'1", N22°36'32"	2019 年 5 月
壤土	广州市南沙区某蔬菜地	E113°34'37", N22°40'13"	2019 年 5 月

5.5.2 样品预处理

将新鲜土壤置于不锈钢或聚四氟乙烯盘中，除去树枝、叶子和石子等异物，混匀。取适量的混匀土样，放入冷冻干燥机中脱水。冻干后的样品研磨充分后，过 60 目标准筛。

预处理后的土样应置于洁净的棕色玻璃瓶中或用锡箔纸包裹，在 0~4 °C 避光可稳定保存。经测试，样品保存期为一周(图 3)。

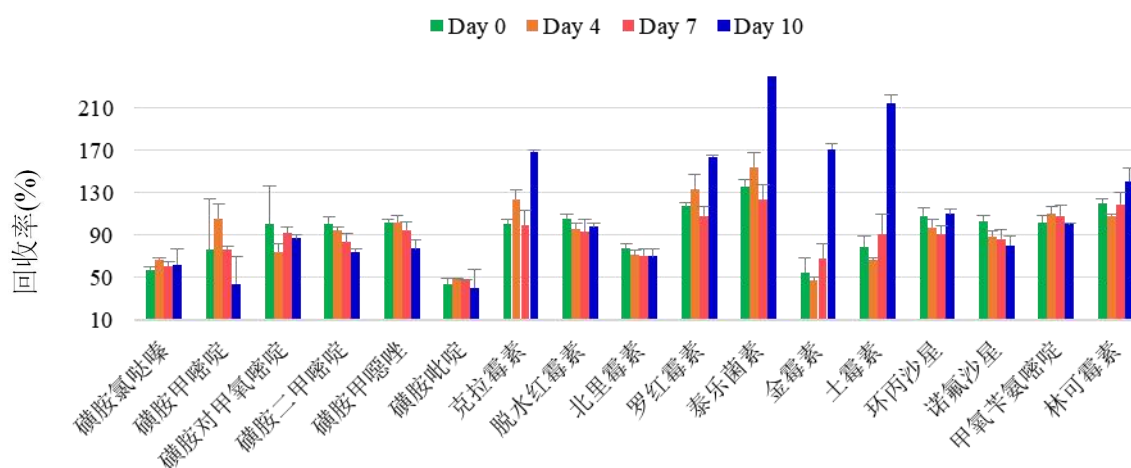


图 3 浓度为 50 µg/kg 的统一加标土壤样品稳定性

5.6 样品处理和仪器分析步骤

5.6.1 提取方法比较

本实验对比了加压流体萃取(PLE)、QuEChERS 和超声辅助提取三种主要的土壤中抗生素提取方法。实验步骤参照前人方法^[5-7]，略有改动。具体如下：

加压流体萃取(PLE)：将 2 g 统一土壤加标样品装填入 10 ml 萃取池，加入适量活化后的硅藻土填满；将萃取池放到加压流体萃取仪(PLE) 上，进行加温加压萃取。PLE 操作参数：萃取溶剂乙腈；萃取温度 80 °C；萃取压力 140 bar；预热阶段 5min；

静态萃取阶段10 min；氮气冲洗180 s；冲洗体积为萃取池体积的70%；萃取周期2遍。收集提取液，采用HLB固相萃取柱净化。

QuEChERS: 2 g 统一土壤加标样品加入 0.5 g Na₄EDTA 和 20 ml 乙腈-McIlvaine 缓冲液的混合液，涡旋振荡 3 min。加入 1.0 g 氯化钠，涡旋 1 min，8000 r/min 离心 5 min，转移上清液。重复提取一次，合并两次上清液。预先加入 200 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA 和 20 mg C18，涡旋 1 min，5000 r/min 离心 3 min，取上清液于 40 °C 轻柔吹干；重溶过 0.22 μm 有机相滤膜，待测。

超声波辅助提取: 2 g 统一土壤加标样品加入 0.5 g Na₄EDTA 和 20 ml 乙腈-McIlvaine 缓冲液的混合液，涡旋振荡 20 s，再置于超声波中 15 min(注意：目标抗生素在短时间超声过程中热稳定性较好^[8,9]，因此超声过程中不需要控制温度)，以 4000 r/min 在室温下离心 10 min，收集上清液。重复提取一次，合并两次提取液，采用 HLB 固相萃取柱净化。

表 5 采用不同提取方法时抗生素的平均回收率和标准偏差($n = 3, \%$)

化合物类别	化合物	加压流体萃取 (PLE)	QuEChERS	超声波辅助提取
磺胺类	磺胺氯哒嗪	70±11	76±1	73±2
	磺胺甲噁唑	24±26	85±8	61±14
	磺胺对甲氧嘧啶	169±20	146±4	112±5
	磺胺二甲嘧啶	103±7	96±10	96±8
	磺胺甲噁唑	108±11	97±1	98±3
	磺胺吡啶	85±9	92±4	67±24
大环内酯类	克拉霉素	71±17	86±3	68±1
	脱水红霉素	93±5	107±1	103±6
	北里霉素	179±9	109±1	123±7
	罗红霉素	72±16	103±1	75±4
	泰乐菌素	142±17	91±2	87±6
四环素类	金霉素	310±110	16±19	82±27
	土霉素	10±46	8±1	61±23
氟喹诺酮类	环丙沙星	46±20	18±14	81±4
	诺氟沙星	10±0.5	17±10	61±15
其他类	甲氧苄氨嘧啶	86±17	84±1	104±3
	林可霉素	64±21	100±7	119±4

各条件下的回收率和相对标准偏差数据结果见表 5。结果表明，采用超声波辅助提取法的 17 种抗生素加标回收率均在 50%~150% 范围内。相比 QuEChERS 和 PLE，超声波辅助提取法对四环素类和氟喹诺酮类抗生素具有更高的回收率；此外，超声波辅助提取法相比其他提取方法也更成熟，更易推广。因此，本标准最终选取超声波辅助提取法作为土壤中抗生素的提取方法。

5.6.2 提取条件优化

有研究表明，乙腈对抗生素的提取效果比甲醇好^[10,11]。因为乙腈极性比甲醇弱，接近中性，对大分子基质的沉降作用强，溶出杂质少。用乙腈提取时提取液清澈，利于浓缩和净化。因此，本实验确定乙腈作为提取溶剂。

加入少量缓冲液溶液将提取溶液调节为酸性，可以使抗生素质子化，从而保证其在提取过程中保持形态不改变，有助于提高提取效率。此外，四环素类抗生素可以与土壤中的金属离子结合形成络合物，干扰提取过程，降低此类化合物的提取效率。在提取过程中，加入离子螯合剂Na₄EDTA，可抑制金属离子的干扰^[12]。

为了确定最佳的缓冲液及其与乙腈的最优比例、Na₄EDTA最佳添加量，本实验以 2 g 统一土壤样品为加标基质，加标浓度为 50 μg/kg，进行加标回收实验。各条件下的回收率和相对标准偏差数据结果见表 6-8。结果表明，McIlvaine 盐缓冲液对土霉素的提取效率明显高于其他两种缓冲液；当缓冲液与乙腈比例为 1: 1(V/V) 时，氟喹诺酮类抗生素的回收率较高；当 Na₄EDTA 添加量为 0.5 g 时，四环素类和氟喹诺酮类抗生素的回收率较高，金属离子的干扰作用受到明显抑制。因此，本标准中缓冲液最终选择 McIlvaine 盐缓冲液，缓冲液与乙腈比例为 1: 1(V/V)，Na₄EDTA 添加量为 0.5 g。在该最优条件下，17 种抗生素的回收率范围在 61%~123%，相对标准偏差小于 23%。

表 6 不同缓冲液提取时抗生素的平均回收率和标准偏差($n = 3, \%$)

化合物类别	化合物	柠檬酸盐缓冲液 (pH = 3)	磷酸盐缓冲液 (pH = 2)	McIlvaine 盐缓冲液 (pH = 4)
磺胺类	磺胺氯哒嗪	83±1	78±1	73±2
	磺胺甲噁唑	71±2	51±4	61±14
	磺胺对甲氧嘧啶	119±4	143±19	112±5
	磺胺二甲嘧啶	91±5	97±5	96±8
	磺胺甲噁唑	95±3	100±4	98±3
	磺胺吡啶	52±4	45±1	67±24
大环内酯类	克拉霉素	56±1	69±6	68±1

化合物类别	化合物	柠檬酸盐缓冲液	磷酸盐缓冲液	McIlvaine 盐缓冲液
		(pH = 3)	(pH = 2)	(pH = 4)
	脱水红霉素	99±5	96±0	103±6
	北里霉素	124±3	109±10	123±7
	罗红霉素	58±23	87±5	75±4
	泰乐菌素	58±1	87±5	87±6
四环素类	金霉素	83±21	126±22	82±27
	土霉素	22±11	29±3	61±23
氟喹诺酮类	环丙沙星	211±30	54±6	81±4
	诺氟沙星	114±38	40±4	61±15
其他类	甲氧苄氨嘧啶	82±10	98±4	104±3
	林可霉素	110±4	109±8	119±4

注：缓冲液与乙腈的比例均为 1: 1(V/V)，Na₄EDTA 加入量为 0.5 g。

表 7 不同比例的缓冲液与乙腈混合液提取时抗生素的平均回收率和标准偏差($n = 3, \%$)

化合物类别	化合物	1: 7	1: 3	1: 1
磺胺类	磺胺氯哒嗪	72±2	68±1	73±2
	磺胺甲嘧啶	28±3	28±4	61±14
	磺胺对甲氧嘧啶	206±29	176±19	112±5
	磺胺二甲嘧啶	99±3	97±5	96±8
	磺胺甲噁唑	103±5	102±4	98±3
	磺胺吡啶	52±1	42±1	67±24
大环内酯类	克拉霉素	74±4	80±6	68±1
	脱水红霉素	114±8	111±0	103±6
	北里霉素	157±7	119±10	123±7
	罗红霉素	69±1	85±5	75±4
	泰乐菌素	137±8	119±5	87±6
四环素类	金霉素	138±35	137±22	82±27
	土霉素	14±2	27±3	61±23
氟喹诺酮类	环丙沙星	16±5	23±6	81±4
	诺氟沙星	15±3	20±4	61±15
其他类	甲氧苄氨嘧啶	96±3	98±4	104±3
	林可霉素	126±18	116±8	119±4

注：缓冲液均为 McIlvaine 盐缓冲液，Na₄EDTA 加入量为 0.5 g。

表 8 不同 Na₄EDTA 加入量下抗生素的平均回收率和标准偏差(*n* = 3, %)

化合物类别	化合物	0.3 g	0.5 g	1.0 g
磺胺类	磺胺氯哒嗪	76±4	73±2	78±1
	磺胺甲噁啉	27±3	61±14	36±1
	磺胺对甲氧嘧啶	209±9	112±5	180±2
	磺胺二甲嘧啶	91±4	96±8	99±3
	磺胺甲噻唑	94±1	98±3	91±3
	磺胺吡啶	43±2	67±24	45±1
大环内酯类	克拉霉素	62±2	68±1	63±3
	脱水红霉素	116±2	103±6	108±4
	北里霉素	157±10	123±7	124±5
	罗红霉素	72±3	75±4	83±7
	泰乐菌素	83±4	87±6	69±5
四环素类	金霉素	57±8	82±27	99±16
	土霉素	25±5	61±23	32±4
氟喹诺酮类	环丙沙星	21±5	81±4	58±11
	诺氟沙星	19±3	61±15	44±7
其他类	甲氧苄氨嘧啶	85±6	104±3	86±5
	林可霉素	80±9	119±4	138±24

注：缓冲液均为 McIlvaine 盐缓冲液，缓冲液与乙腈的比例均为 1: 1(V/V)。

5.6.3 固相萃取条件选择

根据已有的报道，采用固相萃取柱富集和净化土壤中富集和净化土壤中的抗生素是最常用的方法^[2,5,7,10]。通过考察10种不同的SPE柱净化效果，包括非极性的C18柱（填料为键合硅胶）、阳离子交换柱（填料为磺酸基键合硅胶柱）和亲水亲脂平衡柱（填料为二乙烯苯/N-乙烯基吡咯烷酮共聚物）等，发现Oasis HLB小柱对5类抗生素类物质的保留最好，5类抗生素的净化回收率水平在80%~120%之间（图4）^[13]。因此，本标准选用HLB柱富集和净化土壤中抗生素。为了进一步去除土壤样品中带负电的腐殖酸和黄腐酸，降低基质效应，根据文献方法选用强阴离子交换柱(SAX)与HLB柱串联使用，并通过优化上样pH值来使目标抗生素保持中性或阳离子形态^[7]。

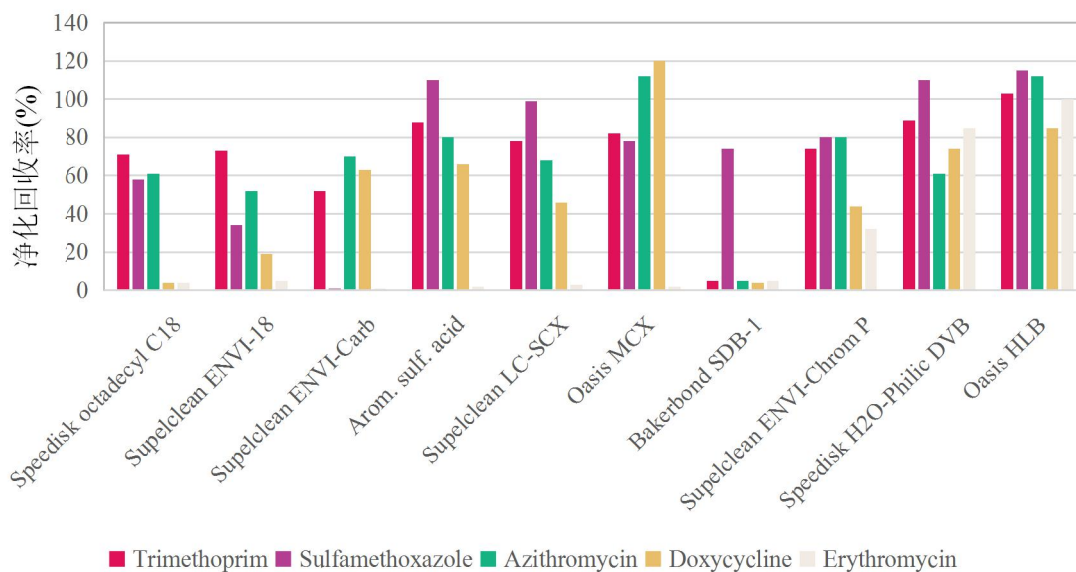


图4 10种固相萃取柱对抗生素的净化效果对比

固相萃取过程主要优化了上样pH值(3和7) 和洗脱溶剂(甲醇和含有体积分数为0.1%甲酸的甲醇) 两个关键条件。各条件下的回收率数据结果见表9-10。总体而言, 当上样pH在3左右和以甲醇洗脱时, 绝大部分目标化合物在50%~150%范围内。因此, 选择上样pH调至3左右+甲醇洗脱作为固相萃取富集净化的最优条件。

表9 抗生素在不同上样 pH 条件下的平均回收率和标准偏差($n = 3, \%$)

化合物类别	化合物	上样 pH 调至 3 左右	上样 pH 调至 7 左右
磺胺类	磺胺氯哒嗪	74±5	70±4
	磺胺对甲氧嘧啶	102±5	98±3
	磺胺甲嘧啶	109±2	87±2
	磺胺甲恶唑	90±1	79±1
	磺胺二甲嘧啶	95±8	119±9
	磺胺吡啶	82±2	78±3
氟喹诺酮类	环丙沙星	95±1	113±4
	诺氟沙星	98±3	102±1
四环素类	金霉素	95±5	65±10
	土霉素	168±19	40±3
大环内酯类	克拉霉素	82±2	78±3
	脱水红霉素	119±13	85±3
	北里霉素	137±3	115±3
	罗红霉素	142±4	149±3
	泰乐霉素	115±2	134±0.7
其他类	甲氧苄氨嘧啶	103±1	97±0.3
	林可霉素	123±9	92±3

表 10 抗生素在不同洗脱条件下的平均回收率和标准偏差($n = 3, \%$)

化合物类别	化合物	甲醇洗脱	0.1%甲酸-甲醇(V/V)洗脱
磺胺类	磺胺氯哒嗪	74±5	79±13
	磺胺对甲氧嘧啶	102±5	120±5
	磺胺甲嘧啶	109±2	106±2
	磺胺甲恶唑	90±1	93±1
	磺胺二甲嘧啶	95±8	90±4
	磺胺吡啶	82±2	82±0.5
氟喹诺酮类	环丙沙星	95±1	102±2
	诺氟沙星	98±3	107±3
四环素类	金霉素	95±5	95±7
	土霉素	168±19	203±15
大环内酯类	克拉霉素	82±2	91±5
	脱水红霉素	119±13	94±4
	北里霉素	137±3	152±3
	罗红霉素	142±4	156±6
	泰乐霉素	115±2	147±1
其他类	甲氧苄氨嘧啶	103±1	113±1
	林可霉素	123±9	149±9

5.6.4 仪器分析方法条件优化

本实验中采用Agilent Zorbax Eclipse Plus-C₁₈色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)为分析柱, 各组分均获得了良好的分离效果。由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态下进行的, 因此流动相的组成和配比不但影响目标化合物的色谱行为, 而且影响目标化合物的离子化效率, 从而影响灵敏度。

仪器条件优化主要针对 6 类 17 种抗生素的仪器测试方法, 包括磺胺类、四环素类、喹诺酮类、大环内酯类、林可霉素、甲氧苄氨嘧啶。

正模式下, 选用乙腈作为有机相; 为了最大程度地获取较好的抗生素峰型和灵敏度, 水相流动相尝试了 5 mM 草酸、0.1%甲酸、0.5%甲酸、0.1%甲酸和 5 mM 乙酸胺、0.1%甲酸和 2 mM 乙酸胺、0.2%甲酸和 2 mM 乙酸胺。金霉素和土霉素在草酸条件下可以产生较好的灵敏度、分离度、重复性和较低的基质效应, 这可能于草酸能够络合色谱柱及样品中的重金属有关^[14]。然而, 草酸不利于挥发, 很容易在 LC-MS/MS 毛细管端口累积, 堵塞毛细管, 因此不建议使用。0.2%甲酸和 2 mM 乙酸胺作为水相流动相时, 喹诺酮类和大环内酯类抗生素可以获取较好的分离度和灵敏度, 四环素类抗生素也可以获得可以接受的灵敏度。因此, 仪器流动相最终选取

乙腈(有机相) 和 0.2%甲酸和 2 mM 乙酸氨(水相)。

为了更好地分离多种抗生素并获取满意的峰型，实验过程中在正模式条件下尝试多种色谱柱。Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (100 mm×3 mm, 1.8 μm) 在乙腈(有机相) 和 0.2%甲酸和 5 mM 乙酸铵(水相) 流动相条件下，可以满足除四环素类之外的其他抗生素的分离。对于四环素类抗生素而言，Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(100 mm×3 mm, 1.8 μm; 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm; doubly end-capped) 相对于 Agilent Zorbax SB-C₁₈ columns (100 mm×3 mm, 1.8 μm; and 50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 和 Agilent Zorbax XDB column(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 可以获取更好的峰型和灵敏度；特别是 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 相对于 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(100 mm×3.0 mm, 1.8 μm) 柱效更高，可以获得更窄的峰型，更高的灵敏度和更好的线性。实验过程中发现，较短的保留时间(<4 min) 可以完全消除四环素类的拖尾问题，但快速出峰过程中大量杂质同步进入离子源，造成严重的基质干扰。因此，实验过程中，综合考虑峰型及目标化合物和杂质的分离情况，设定浓度梯度。四环素类抗生素在硅胶柱上进行分离时容易出现拖尾和分离度及灵敏度差的情况，主要是因为四环素类抗生素容易与金属离子和硅醇基团发生络合^[15]。合适的填料和较高的柱效可以有效地减少四环素类的吸附，获得较好的峰型、线性和重现性。基于实验结果，Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 最终用于抗生素的分离。

最终优化后的液相色谱条件为：色谱柱为 C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 或等效色谱柱，在色谱柱前段连接在线过滤器，以去除流动相和样品中细小颗粒物。流动相流速为 0.3 ml/min；柱温箱的温度设为 40 °C，进样量为 10 μl。流动相为缓冲液 (0.2%甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵) (A) 和乙腈(B)，梯度洗脱程序如下：0 min 10% B，5 min 15% B，7 min 20% B，11 min 40% B，15 min 60% B。

抗生素标准样品的总离子流图见图 5，提取离子流图见标准文本附录 E。

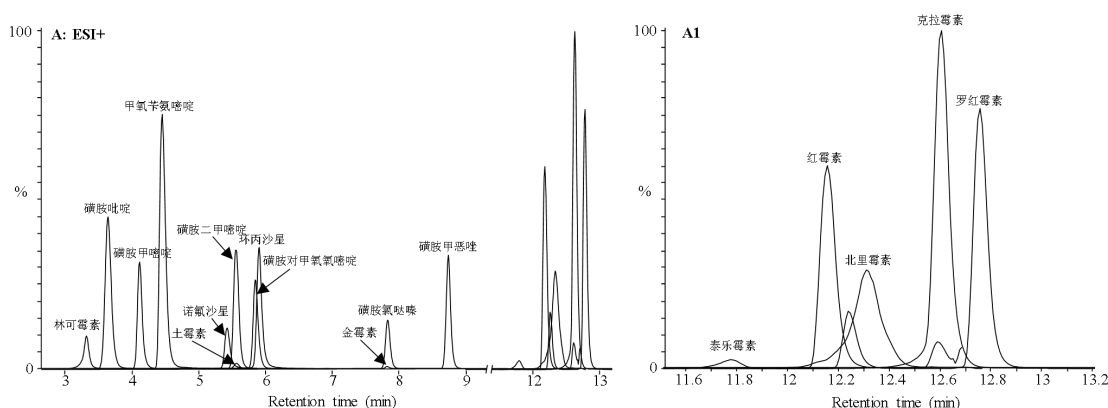


图 5 目标抗生素的总离子流图

对于质谱分析, 采用 Agilent 公司的 Optimizer 软件对碰撞能、碎裂电压、母离子和子离子进行优化, 结果见表 11。质谱参考条件设为: 干燥气温度和流速分别为 280 °C 和 11 L/min, 雾化器压力 20 psi, 鞘气温度和流速分别为 250 °C 和 11 L/min, 毛细管电压和喷嘴电压分别为 3000 V 和 0 V。正模式下, 目标化合物的母离子均为 [M+H]⁺。

表 11 17 种抗生素及 8 种内标的质谱条件

序号	化合物	保留时间 (min)	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电压 (V)	碰撞能 (eV)	相对丰度 (%) ^b
1	磺胺氯吡嗪	7.82	285.0	155.9 ^a 91.9	380	17 29	66
2	磺胺甲噁唑	4.12	265.1	156.0 ^a 108	380	37 17	61
3	磺胺对甲氧嘧啶	5.85	281.1	156.0 ^a 91.9	380	17 37	91
4	磺胺二甲嘧啶	5.56	279.1	186 ^a 92	380	17 33	59
5	磺胺甲噁唑	8.74	254.1	155.9 ^a 92.1	380	17 37	85
6	磺胺吡啶	3.64	250.1	155.9 ^a 92.1	380	17 37	81
7	克拉霉素	12.6	748.5	157.9 ^a 590.3	380	33 21	42
8	脱水红霉素	12.2	716.5	158 ^a 115.9	380	29 49	28
9	北里霉素	12.3	772.5	109 ^a 174	380	50 37	83
10	罗红霉素	12.8	837.5	158.1 ^a 679.2	380	37 25	83
11	泰乐菌素	11.7	916.5	173.8 ^a 43.1	380	41 50	18
12	金霉素	7.81	479.1	462 ^a 444	380	17 17	0.4
13	土霉素	5.26	461.2	426.2 ^a 201.1	380	17 41	22
14	环丙沙星	5.91	332.1	314.3 ^a 230.8	380	25 45	69
15	诺氟沙星	5.43	320.1	302 ^a 231	380	21 45	26
16	甲氧苄氨嘧啶	4.46	291.2	230 ^a 261	380	25 25	66
17	林可霉素	3.32	407.2	126.1 ^a 359.3	380	41 17	8.5
18	环丙沙星-d ₈	5.84	340.2	322.2 ^a 235	380	21 41	69
19	脱水红霉素- ¹³ C-d ₃	12.15	720.6	162 ^a 562.3	380	17 33	72
20	林可霉素-d ₃	3.32	410.6	129.1 ^a 73.1	380	29 69	2.7
21	磺胺甲噁唑-d ₄	4.14	269.1	160 ^a 112	380	12 16	93

序号	化合物	保留时间 (min)	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电压 (V)	碰撞能 (eV)	相对丰度 (%) ^b
22	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆	5.56	285.3	186.1 ^a 97.9	380	17 33	57
23	磺胺甲噁唑-d ₄	8.68	258.1	160.1 ^a 95.9	380	17 29	93
24	噻苯咪唑-d ₄	3.41	206.1	178.7 ^a 135	380	33 45	92
25	甲氧苄氨嘧啶-d ₃	4.38	294.4	230 ^a 123	380	21 49	71

^a 为定量离子。

^b 相对丰度(%)=(定性离子峰面积/定量离子峰面积)×100。

^c 对于不同的质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

5.6.5 标准曲线

配制浓度依次为 1.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L 的抗生素类标准使用液系列(此为参考浓度序列)。在该浓度范围内 17 种化合物的相关系数(*R*²)均大于 0.99，如表 12 所示。

表 12 17 种抗生素类化合物的标准曲线线性方程、线性范围和相关系数

序号	化合物	线性方程	线性范围(μg/L)	相关系数 <i>R</i> ²
1	磺胺氯哒嗪	$Y=0.74*X-0.156$	2.0 ~ 500	0.992
2	磺胺甲嘧啶	$Y=1.30*X-0.009$	1.8 ~ 500	0.996
3	磺胺对甲氧嘧啶	$Y=0.47*X-0.038$	2.6 ~ 500	0.999
4	磺胺二甲嘧啶	$Y=0.89*X+0.020$	3.6 ~ 500	0.993
5	磺胺甲噁唑	$Y=1.10*X-0.059$	2.4 ~ 500	0.999
6	磺胺吡啶	$Y=0.96*X-0.079$	3.0 ~ 500	0.998
7	克拉霉素	$Y=0.72*X+0.010$	3.0 ~ 500	0.999
8	脱水红霉素	$Y=0.56*X+0.008$	4.8 ~ 500	0.996
9	北里霉素	$Y=0.49*X-0.052$	1.8 ~ 500	0.996
10	罗红霉素	$Y=0.58*X+0.11$	3.6 ~ 500	0.999
11	泰乐菌素	$Y=0.12*X+0.016$	4.6 ~ 500	0.997
12	金霉素	$Y=0.70X-4.98$	5.6 ~ 500	0.999
13	土霉素	$Y=0.17X-1.79$	9.0 ~ 500	0.999
14	环丙沙星	$Y=0.93*X-0.078$	4.2 ~ 500	0.999
15	诺氟沙星	$Y=0.90*X-0.077$	7.2 ~ 500	0.997
16	甲氧苄氨嘧啶	$Y=0.97*X+0.111$	3.4 ~ 500	0.999

序号	化合物	线性方程	线性范围($\mu\text{g/L}$)	相关系数 R^2
17	林可霉素	$Y=1.14*X+0.023$	6.0 ~ 500	0.996

注：Y为目标物面积与其对应内标面积之比，X为目标物浓度与其对应内标浓度之比。

5.6.6 实验室空白测试

为保证实验用水、试剂、器具以及检测过程中所接触的仪器设备各部件不会对样品测试带来干扰和影响，本实验以石英砂为空白样品，配制6份实验室空白平行样品，经超声波提取和固相萃取富集、净化后上机测试，未发现实验室空白中含有任何待测目标物。

5.6.7 方法检出限

按照 HJ 168-2010 标准中空白实验中未检出目标物质的检出限测定方法，依据仪器灵敏度情况，以 2 g 石英砂为空白基质，金霉素和土霉素加标量为 10 ng，其他抗生素的加标量为 5 ng，配制 7 份平行加标样品，经全过程前处理和仪器分析，进行方法检出限和下限测定。本方法检出限范围为 0.6 $\mu\text{g/kg}$ ~4.5 $\mu\text{g/kg}$ ，测定下限范围为 2.4 $\mu\text{g/kg}$ ~18 $\mu\text{g/kg}$ 。每种化合物的具体数据详见表 13。

表 13 方法检出限、测定下限计算结果

抗生素	测量值 (ng)							平均值 (ng)	SD (ng)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	测定下限 ($\mu\text{g/kg}$)
	1	2	3	4	5	6	7				
磺胺氯哒嗪	4.4	4.2	4.5	4.6	4.2	4.3	4.5	4.4	0.2	0.6	2.4
磺胺甲噁啉	5.2	5.5	5.4	6.0	4.9	5.1	5.6	5.4	0.3	0.9	3.6
磺胺对甲氧嘧啶	7.1	6.4	6.9	7.0	7.1	6.8	6.8	6.9	0.2	0.6	2.4
磺胺二甲嘧啶	5.6	5.2	6.4	6.3	6.1	5.0	5.6	5.7	0.6	1.9	7.6
磺胺甲噁唑	6.1	6.0	6.2	6.5	6.7	6.5	6.2	6.3	0.3	0.9	3.6
磺胺吡啶	3.2	3.6	3.6	4.0	3.1	4.4	3.1	3.6	0.5	1.6	6.4
克拉霉素	6.6	6.3	6.7	7.1	7.2	6.0	6.4	6.6	0.4	1.2	4.8
脱水红霉素	5.5	4.8	5.8	5.3	4.6	6.5	6.8	5.6	0.8	2.5	10
北里霉素	4.3	4.3	4.8	4.9	4.3	4.3	4.6	4.5	0.3	0.9	3.6
罗红霉素	6.8	6.2	7.8	7.3	7.4	6.1	6.8	6.9	0.6	1.9	7.6
泰乐菌素	9.5	10	11	9.4	10	9.5	9.9	9.9	0.4	1.2	4.8
金霉素	4.8	4.1	5.0	4.9	4.6	4.2	4.2	4.5	0.4	1.2	4.8
土霉素	8.6	5.6	8.0	5.8	5.5	5.2	4.9	6.2	1.5	4.7	19
环丙沙星	0.8	1.4	0.5	0.9	2.4	0.9	1.7	0.8	0.7	2.2	8.8

抗生素	测量值 (ng)							平均值 (ng)	SD (ng)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	1	2	3	4	5	6	7				
诺氟沙星	0.3	2.5	1.9	0.8	0.5	3.2	3	0.3	1.2	3.8	15
甲氧苄氨嘧啶	6.0	6.1	5.9	5.8	5.7	5.5	6.2	5.9	0.3	0.9	3.6
林可霉素	5.6	5.9	6.1	6.2	5.1	5.3	6.2	5.8	0.4	1.2	4.8

5.6.8 方法精密度

对三个浓度水平分别为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的空白石英砂进行了精密度测试(见表 14-16), 每个浓度水平配制 6 份平行样品, 经全过程前处理和仪器分析。从表中可以看出, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 不同浓度的空白石英砂的相对标准偏差(RSD)分别为 3.7%~25%、3.6%~40%、2.0%~39%, 说明方法的精密度良好。

对浓度范围为 10~150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的高、中、低 3 种不同含量水平的统一土壤样品进行了精密度测试(见表 17), 每个浓度水平配制 6 份平行样品, 经全过程前处理和仪器分析。从表中可以看出, 低、中、高三个浓度水平下实验室内相对标准偏差范围分为 2.9%~30%、2.5%~39%、5.6%~35%, 说明方法对三种类型土壤的精密度较好。

表 14 低添加浓度(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的空白石英砂精密度数据

抗生素	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标量						平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
磺胺氯哒唑	7.8	7.7	7.9	6.7	6.9	7.1	7.4	0.5	6.8
磺胺甲嘧啶	5.8	4.4	3.7	5.1	5.4	5.3	5.0	0.8	15
磺胺对甲氧嘧啶	18	18	18	11	12	11	15	3.6	25
磺胺二甲嘧啶	9.8	10.3	9.8	9.0	9.9	8.9	9.6	0.5	5.4
磺胺甲噁唑	9.5	9.1	8.8	9.7	9.6	9.6	9.4	0.3	3.7
磺胺吡啶	4.6	4.6	4.5	4.9	5.4	5.3	4.9	0.4	8.5
克拉霉素	6.6	6.3	8.2	6.8	7.1	6.8	7.0	0.7	9.6
脱水红霉素	11	10	11	10	10	10	11	0.4	4.1
北里霉素	13	12	12	11	12	13	12	0.7	5.5
罗红霉素	8.9	8.6	7.4	7.8	7.5	7.6	8.0	0.6	7.6
泰乐菌素	7.3	7.1	6.4	8.9	9.4	9.4	8.1	1.3	16
金霉素	8.4	7.7	9.2	9.5	12	13	9.9	2.0	20
土霉素	3.6	5.0	3.1	3.6	4.0	4.8	4.0	0.8	19
环丙沙星	4.8	6.2	5.0	6.9	7.7	7.7	6.4	1.3	20

抗生素	10 µg/kg 加标量						平均值 (µg/kg)	SD (µg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
诺氟沙星	5.1	4.6	3.7	4.9	4.9	5.0	4.7	0.5	11
甲氧苄氨嘧啶	8.2	8.5	9.2	9.9	9.4	11	9.3	0.9	9.4
林可霉素	11	11	12	12	13	12	12	0.8	6.7

表 15 中添加浓度(25 µg/kg)的空白石英砂精密度数据

抗生素	25 µg/kg 加标量						平均值 (µg/kg)	SD (µg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
磺胺氯哒嗪	19	18	17	18	20	18	18	0.8	4.1
磺胺甲嘧啶	19	13	12	12	13	13	14	2.8	20
磺胺对甲氧嘧啶	28	29	27	28	24	29	28	2.0	7.2
磺胺二甲嘧啶	26	24	24	23	23	26	24	1.4	5.6
磺胺甲噁唑	25	24	25	25	23	23	24	1.1	4.5
磺胺吡啶	24	13	12	11	13	13	14	4.6	32
克拉霉素	17	17	24	23	21	20	20	3.1	15
脱水红霉素	27	24	24	22	25	25	25	1.5	6.0
北里霉素	29	31	27	27	29	26	28	1.9	6.6
罗红霉素	18	19	24	24	22	20	21	2.6	12
泰乐菌素	21	21	34	32	30	28	28	5.5	20
金霉素	15	14	21	17	18	20	18	2.7	15
土霉素	22	11	10	10	8	14	13	5.1	40
环丙沙星	21	20	20	21	21	14	20	2.7	14
诺氟沙星	19	14	16	17	15	9	15	3.4	23
甲氧苄氨嘧啶	27	25	22	27	28	25	26	1.9	7.5
林可霉素	31	29	28	30	28	29	29	1.1	3.6

表 16 高添加浓度(50 µg/kg)的空白石英砂精密度数据

抗生素	50 µg/kg 加标量						平均值 (µg/kg)	SD (µg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
磺胺氯哒嗪	37	36	39	42	38	41	39	2.4	6.1
磺胺甲嘧啶	27	24	31	32	23	24	27	3.6	13
磺胺对甲氧嘧啶	56	55	67	65	75	63	64	7.5	12
磺胺二甲嘧啶	48	48	50	52	48	48	49	1.7	3.4

抗生素	50 µg/kg 加标量						平均值 (µg/kg)	SD (µg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6			
磺胺甲噁唑	49	50	48	49	49	50	49	1.0	2.0
磺胺吡啶	25	24	26	24	21	26	24	2.1	8.6
克拉霉素	41	40	39	35	35	40	38	2.6	6.7
脱水红霉素	48	49	92	43	50	52	56	18	33
北里霉素	51	51	59	51	54	58	54	3.4	6.3
罗红霉素	42	44	46	9	42	43	38	14	38
泰乐菌素	59	54	47	42	38	58	50	8.9	18
金霉素	28	28	32	69	44	55	43	17	39
土霉素	27	27	20	19	10	27	22	6.7	31
环丙沙星	29	24	29	25	23	39	28	5.8	21
诺氟沙星	20	17	21	21	23	25	21	2.6	12
甲氧苄氨嘧啶	50	45	52	49	50	50	49	2.3	4.7
林可霉素	54	55	57	57	52	64	57	4.3	7.6

表17 实际土壤基体加标精密度数据

序号	化合物	本底值 (µg/kg)	加标量 (µg/kg)	平均值 (µg/kg)	标准偏差 (mg/kg)	相对偏差 (%)
1	磺胺吡啶	ND	10	4.4	0.6	14
		ND	150	83	5.1	6
		ND	50	30	3.5	12
2	磺胺甲噁唑	7.2±2.1	-	9.0	1.5	15
		ND	150	142	10	7.4
		ND	50	47	6.9	15
3	磺胺甲嘧啶	13±1	-	12	1.4	11
		ND	150	145	11	7.0
		37±12	-	43	3.0	7.0
4	磺胺二甲嘧啶	126±17.6	-	127	11	9.0
		52±5	-	47	3.4	7.3
		ND	10	10	0.3	2.9
5	磺胺对甲氧嘧啶	116±18	-	78	20	25
		16±1.1	-	17	1.9	11

		138±14	-	125	9.3	7.5
6	磺胺氯吡嗪	ND	10	10.6	1.4	13
		ND	150	145	27	18
		ND	50	48	16	34
7	甲氧苄氨嘧啶	ND	20	20	1.0	5.0
		ND	150	152	22	14
		43±3.8	-	41	4.8	12
8	诺氟沙星	ND	10	12	0.7	6.0
		75±5.1	-	41	5.8	14
		ND	100	69	8.3	12
9	环丙沙星	ND	10	8.2	0.5	6.0
		42±0.3	-	48	3.4	7.0
		ND	100	138	12	8.3
10	林可霉素	ND	10	12	2.5	22
		ND	150	141	12	9.0
		66±4.6	-	72	1.8	2.0
11	土霉素	54±5.2	-	77	13	17
		ND	150	171	10	6.0
		22±3.1	-	20	4.9	25
12	金霉素	107±15.1	-	102	8.0	8.0
		ND	150	160	55	34
		18±11	-	13	1.2	9.0
13	脱水红霉素	77±4.9	-	57	7.0	12
		8.4±0.3	-	12	2.2	18
		ND	100	99	35	35
14	克拉霉素	ND	10	14	4.1	30
		83±6.7	-	75	29	38
		ND	150	146	24	16
15	北里霉素	ND	10	12	1.2	10
		ND	150	131	10	7.4
		ND	50	36	2.9	8.0
16	罗红霉素	ND	20	20	5.2	26
		69±5.0	-	62	16	26

		ND	150	111	12	11
17	泰乐菌素	26±6.1	-	35	2.0	6.0
		46±8.3	-	56	5.0	9.0
		ND	10	12	1.9	16

注：ND 表示未检出。

5.6.9 方法准确度

对三个浓度水平分别为 10 µg/kg、25 µg/kg 和 50 µg/kg 的空白石英砂进行了准确度测试(见表 18)，每个浓度水平配制 6 份平行样品，经全过程前处理和仪器分析。从表中可以看出，17 种抗生素在低、中、高三个浓度水平下的平均加标回收率范围分别为 40%~147%、50%~117%、42%~127%，说明方法的准确度良好。

对浓度范围为 10~150 µg/kg 的高、中、低 3 种不同含量水平的三种类型加标土壤分别进行了准确度测试(见表 19)，每个浓度水平配制 6 份平行样品，经全过程前处理和仪器分析。从表中可以看出，17 种抗生素在不同类型土壤中的加标回收率范围为：壤土样品低、中、高加标回收率分别为 54%~151%、72%~142%、73%~167%；砂土样品低、中、高浓度加标回收率分别为 52%~163%、61%~150%、57%~154%；粘土样品低、中、高浓度加标回收率分别为 44%~164%、61%~137%、58%~141%。由此可见，本标准中绝大部分物质对不同类型土壤样品适用性均较好。

表 18 空白石英砂加标回收率数据

抗生素	加标值 (µg/kg)	回收率 (%)						平均值 (%)
		1	2	3	4	5	6	
磺胺氯哒嗪	10	78	77	79	67	69	71	74
	25	75	74	69	73	79	73	74
	50	75	71	78	85	77	82	78
磺胺甲噁唑	10	58	44	37	51	54	53	50
	25	76	52	47	48	51	51	54
	50	55	49	61	63	47	48	54
磺胺对甲氧嘧啶	10	179	182	178	114	120	107	147
	25	112	116	109	112	95	115	110
	50	113	109	134	130	151	127	127
磺胺二甲嘧啶	10	98	103	98	90	99	89	96
	25	104	95	97	92	92	103	97

抗生素	加标值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)
		1	2	3	4	5	6	
	50	96	95	100	103	95	96	98
磺胺甲噁唑	10	95	91	88	97	96	96	94
	25	101	98	100	102	93	92	98
	50	97	100	95	99	99	100	98
磺胺吡啶	10	46	46	45	49	54	53	49
	25	95	53	48	46	52	54	58
	50	51	48	53	48	41	51	49
克拉霉素	10	66	63	82	68	71	68	70
	25	66	69	98	92	86	79	82
	50	82	80	78	71	69	79	76
脱水红霉素	10	112	104	108	104	99	103	105
	25	108	96	97	90	100	98	98
	50	96	99	184	85	99	105	111
北里霉素	10	130	122	122	112	118	129	122
	25	116	123	107	106	117	105	112
	50	102	103	117	103	107	115	108
罗红霉素	10	89	86	74	78	75	76	80
	25	71	78	96	96	88	81	85
	50	84	87	91	18	84	86	75
泰乐菌素	10	73	71	64	89	94	94	81
	25	84	84	136	129	118	112	110
	50	118	108	94	85	75	117	99
金霉素	10	84	77	92	95	117	129	99
	25	61	55	84	70	73	78	70
	50	57	56	64	138	89	110	86
土霉素	10	36	50	31	36	40	48	40
	25	88	46	42	39	31	56	50
	50	53	54	39	39	20	54	43
环丙沙星	10	48	62	50	69	77	77	64
	25	85	81	78	86	85	58	79

抗生素	加标值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)						平均值 (%)
		1	2	3	4	5	6	
	50	58	47	58	51	46	77	56
诺氟沙星	10	51	46	37	49	49	50	47
	25	78	55	63	67	61	37	60
	50	40	34	42	41	45	49	42
甲氧苄氨嘧啶	10	82	85	92	99	94	105	93
	25	106	101	89	107	111	100	102
	50	99	91	105	97	100	100	99
林可霉素	10	106	107	120	116	125	119	115
	25	124	115	113	121	114	117	117
	50	108	110	115	114	104	129	113

表 19 实际土壤基体加标回收率测试数据

序号	化合物	样品类型	本底均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 (%)	标准偏差 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对标准 偏差(%)
1	磺胺吡啶	壤土	ND	10	54	1.0	9.1
				50	75	6.1	8.1
				150	73	19	8.4
		砂土	ND	10	52	1.1	10
				50	66	5.2	8.0
				150	57	14	8.1
		粘土	ND	10	44	0.8	8.6
				50	61	4.3	7.1
				150	58	6.1	3.5
2	磺胺甲噁唑	壤土	7.2 \pm 2.1	10	120	2.8	7.2
				50	110	4.2	3.4
				150	95	16	5.2
		砂土	ND	10	140	1.9	6.8
				50	97	2.8	2.9
				150	85	16	6.1
		粘土	ND	10	94	0.4	2.0

				50	89	4.7	5.2
				150	85	19	7.3
3	磺胺甲嘧啶	壤土	12.9±1	10	100	3.3	7.2
				50	86	15	13
				150	100	23	7.0
		砂土	ND	20	99	4.4	11
				50	95	10	11
				150	88	31	12
		粘土	37±12	20	140	6.5	5.0
				50	96	18	11
				150	89	33	9.6
4	磺胺二甲嘧啶	壤土	126±18	10	110	17	6.2
				50	110	32	8.8
				150	79	38	7.7
		砂土	51.5±5	20	80	13	9.8
				50	77	12	6.8
				150	97	23	5.7
		粘土	ND	10	100	1.0	5.0
				50	83	4.6	5.5
				150	80	38	16
5	磺胺对甲氧嘧啶	壤土	116±18	20	110	8.5	3.1
				50	88	45	14
				150	93	14	2.8
		砂土	16±1.1	20	120	8.9	11
				50	100	21	16
				150	76	49	19
		粘土	138±14	20	130	9.4	2.9
				50	90	20	5.4
				150	75	24	4.8
6	磺胺氯吡嗪	壤土	ND	10	150	2.2	7.3
				50	110	14	13
				150	100	12	3.9
		砂土	ND	10	130	2.9	11

				50	98	23	23		
				150	66	54	27		
				粘土	ND	10	140	1.9	7.0
						50	97	13	13
						150	84	84	33
7	甲氧苄氨嘧啶	壤土	ND	20	100	11	28		
				50	110	8.9	8.3		
				150	120	45	13		
		砂土	ND	20	96	6.1	16		
				50	100	13	12		
				150	89	55	21		
		粘土	43±3.8	20	140	8.4	6.0		
				50	96	19	10		
				150	85	100	30		
8	诺氟沙星	壤土	ND	10	120	2.7	11		
				50	140	31	22		
				100	170	38	11		
		砂土	75±5.1	20	73	29	16		
				50	61	20	9.7		
				100	90	59	18		
		粘土	ND	10	120	1.3	5.4		
				50	72	7.3	10		
				100	130	66	26		
9	环丙沙星	壤土	ND	10	86	1.2	6.9		
				50	90	4.2	4.6		
				100	150	20	6.7		
		砂土	42±0.3	10	66	13	13		
				50	92	7.8	4.4		
				100	95	14	5.1		
		粘土	ND	10	90	1.1	5.9		
				50	89	4.0	4.5		
				100	140	67	24		
10	林可霉素	壤土	ND	20	98	8.9	23		

				50	93	10	11	
				150	100	40	13	
				20	70	7.5	27	
		砂土	ND	50	97	5.6	5.8	
				150	100	42	14	
				20	110	2.9	1.7	
		粘土	66±4.6	50	140	22	8.3	
				150	100	27	6.1	
				20	120	16	10	
11	土霉素	壤土	54±5.2	50	110	36	16	
				150	120	27	5.6	
				20	160	13	20	
		砂土	ND	50	150	46	31	
				150	100	40	13	
				10	140	14	20	
		粘土	22±3.1	50	110	30	20	
				150	100	26	7.5	
				10	121	22	9.3	
12	金霉素	壤土	107±15	50	90	25	8.1	
				150	94	26	5.3	
				10	120	2.7	11	
		砂土	ND	50	100	7.3	7.3	
				150	150	17	3.6	
				10	99	14	26	
		粘土	18±11	50	120	19	12	
				150	97	30	9.1	
				10	95	11	6.3	
13	脱水红霉素	壤土	77±4.9	50	100	34	13	
				100	96	32	9.4	
				10	110	5.4	14	
		砂土	8.4±0.3	50	100	19	16	
				100	88	40	21	
				10	160	9.7	30	
		粘土	ND					

				50	110	19	17
				100	120	36	15
14	克拉霉素	壤土	ND	10	120	3.8	15
				50	80	23	28
				150	77	17	7.4
		砂土	83±6.7	10	160	24	12
				100	86	32.0	9.6
				150	70	56	15
		粘土	ND	10	67	2.0	15
				50	61	7.7	13
				150	83	27	11
15	北里霉素	壤土	ND	10	140	3.1	11
				50	110	30	27
				150	130	31	8
		砂土	ND	10	140	3.4	13
				50	110	32	30
				150	130	110	27
		粘土	ND	10	160	6.2	20
				50	100	12	12
				150	94	66	23
16	罗红霉素	壤土	ND	20	120	11	22
				50	72	19	27
				150	89	14	5.2
		砂土	69±5.0	10	82	52	34
				50	89	14	6.2
				150	91	15	3.7
		粘土	ND	20	140	8.1	14
				50	130	21	16
				150	83	64	26
17	泰乐菌素	壤土	26±6.1	10	120	2.8	3.6
				25	130	15	13
				50	99	29	19
		砂土	46±8.3	10	100	8.3	7.3

				25	110	20	14
				50	110	15	7.5
				10	150	8.9	30
		粘土	ND	25	120	13.0	23
				50	120	15	13

注：ND 表示未检出。

5.8 结果计算和表示

5.8.1 定性分析

参照欧盟非强制执行法案 2002-657-EC 的相关建议，每种目标化合物选择 1 个母离子和 2 个子离子进行监测^[16]。在相同的实验条件下，标准样品中色谱峰的保留时间和待分析样品中响应峰的保留时间，应满足两者的相对保留时间(RRT)在 2.5% 的误差范围内^[16]。

各组分定性离子相对丰度(K)与标准溶液谱图中对应的定性离子相对丰度，允许的相对偏差不超过表 20 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的目标组分^[16]。

表 20 定性分析时离子相对丰度的最大允许相对偏差^[16]

标准溶液中某组分定性离子的相对丰度 (K) 的范围	$K > 50\%$	$20 < K \leq 50\%$	$10 < K \leq 20\%$	$K \leq 10\%$
样品中某组分定性离子相对丰度 (K) 允许的最大相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

5.8.2 定量分析

目标化合物经定性鉴别后，根据定量离子的峰面积，用内标法定量。

目标化合物的定量分析可在相应的定量软件中进行分析，分析时选择内标法。用内标法按式(1)来定量计算土壤中抗生素的质量浓度。

$$w_i = \frac{\left(\frac{A_i}{A_{is}} - a\right) \cdot \rho_{is} \cdot V_i}{b \cdot M} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w_i ——土样中目标组分*i*的质量浓度， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

A_i ——土样中目标组分*i*的峰面积；

A_{is} ——土样中目标组分*i*对应内标物的峰面积；

ρ_{is} ——土样中目标组分*i*对应内标物的上机浓度， ng/ml ；

- a ——标准曲线的截距；
 b ——标准曲线的斜率；
 V_i ——定容体积，ml；
 M ——土样的干重质量，g。

5.8.3 结果表示

当测定结果大于或等于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时保留三位有效数字，当结果小于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 且大于或等于 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，保留两位有效数字；当结果小于 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，保留至小数点后一位。

6. 方法验证

6.1 参与方法验证的实验室基本情况

本标准编制组按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ/T168 - 2010) 和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》(环科函[2009]10 号) 的要求，通过筛选，最终选定 6 家实验室对本标准进行验证。参与本次标准验证的液质联用仪见表 21。

表 21 参与验证的实验室及其仪器型号

序号	单位名称	仪器品牌	液相系统型号	质谱系统型号
1	广州市环境监测中心站	安捷伦	Agilent 1200	Agilent QQQ 6420
2	佛山市环境监测中心站	赛默飞	ThermoFisher TSQ Endura/ 7QH-E/-0284	ThermoFisher TSQ Endura/ 7QH-E/-0284
3	中山市环境监测中心站	岛津/AB	岛津 Nexera X2	AB SCIEX Qtrap 4500
4	广州市自来水有限公司	岛津/AB	岛津 Nexera X2	AB SCIEX Qtrap 4500
5	广东工业大学环境科学与工程 学院	沃特世	Waters ACQUITY UPLC	Waters Xevo TQ-S
6	中国科学院广州地球化学研 究所	安捷伦	Agilent 1200	QQQ 6460

6.2 方法验证方案

6.2.1 方法验证内容

- (1) 方法检出限、测定下限：以 2 g 石英砂为空白基质，金霉素和土霉素加标量

为 10 ng，其他抗生素的加标量为 5 ng，配制 7 份平行加标样品，经全过程前处理和仪器分析，进行方法检出限和下限测定，计算其标准偏差(S)，此时方法检出限 $LOD = S \times 3.14$ 。测定下限 $LOQ = LOD \times 4$ ，即以 4 倍方法检出限确定为本方法目标物的测定下限。

(2) 方法精密度：采用浓度范围为 10 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的高、中、低 3 种不同含量水平的统一土壤样品，按照全程序每个样品平行测定 6 次，分别计算不同浓度样品的平均值、标准偏差和相对标准偏差。

(3) 方法准确度：对壤土、砂土、粘土三种类型土壤统一样品分别加入低、中、高三个不同含量水平，加标浓度范围为 10 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，按照全程序每个加标样品平行测定 6 次。分别计算样品本底值、平均值、标准偏差、相对标准偏差、加标回收率等。

6.2.2 样品准备

按照方法标准文本要求，准备样品、标准物质和实验设备。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤均符合方法相关要求。

本标准包含 17 种目标抗生素和 8 种内标，化合物种类较多，需要确定具有较强检测能力的实验室。本标准最终确定了 6 家参与验证的实验室，分别为广州市环境监测中心站、广州自来水公司、佛山市环境监测中心站、中山市环境监测中心站、广东工业大学环境与科学学院和中国科学院广州地球化学研究所。

参与验证实验室与方法编制单位同步采集了三种性质的土壤样品，并按照本标准的要求，采用超声波辅助提取-固相萃取法进行样品前处理，最后浓缩定容至 1 ml。

6.3 方法验证过程

在方法验证前，确保参加验证的操作人员熟悉和掌握仪器原理、操作步骤，上机所用的试剂和溶剂应符合方法相关要求。各参与验证单位采用标准物质对仪器进行方法调试，确定方法后，将准备好的样品按步骤上机，并进行数据分析。

6.4 方法验证结果

6.4.1 检出限、测定下限数据

按照全过程分析流程，6家实验室对浓度为 2.5 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的石英砂加标样品分别进行了 7 次重复测定。其中，55% 的测定含量在 3~5 倍计算出的方法检出限范围内；92.6% 的测定含量在 1~10 倍计算出的方法检出限范围内；没有测定含量超过 20 倍计算出的方法检出限，均满足 H168-2010 规定要求。17 种抗生素的方法检出限为 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 4.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，测定下限为 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

每种化合物的方法检出限与测定下限详见表22。

表 22 方法检出限及测定下限汇总表

序号	抗生素	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	磺胺吡啶	1.6	6.4
2	磺胺甲噁唑	1.2	4.8
3	磺胺甲嘧啶	0.9	3.6
4	磺胺二甲嘧啶	1.9	7.6
5	磺胺对甲氧嘧啶	1.3	5.2
6	磺胺氯哒嗪	1.0	4.0
7	甲氧苄氨嘧啶	1.7	6.8
8	诺氟沙星	3.8	15
9	环丙沙星	2.2	8.8
10	林可霉素	3.0	12
11	土霉素	4.7	19
12	金霉素	2.8	11
13	脱水红霉素	2.5	10
14	克拉霉素	1.5	6.0
15	北里霉素	0.9	3.6
16	罗红霉素	1.9	7.6
17	泰乐菌素	2.3	9.2

6.4.2 精密度数据

6家实验室对含17种抗生素浓度范围为10~150 g/kg三个不同浓度水平的统一土壤样品进行了6次平行测定。低、中、高三个浓度水平下实验室内相对标准偏差范围分为2.3%~46%、2.1%~32%、1.8%~33%，实验室间相对标准偏差分别为9.2%~48%、15%~39%、11%~39%。

每种化合物的具体数据详见表23。

表 23 方法精密度汇总表

序号	化合物	本底值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	总均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	再现性限 R ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	磺胺吡啶	ND	10	5.3	3.7~18	11	1.7	2.2
		ND	50	26	5.1~10	19	6.3	15

		ND	150	72	5.6~10	27	16	56
2	磺胺甲噁唑	7.2±2.1	-	11	7.6~13	9.2	3.3	4.2
		ND	50	50	3.8~10	15	8	23
		ND	150	144	3.0~11	15	24	64
3	磺胺甲噁啉	8.9±1.0	-	7.9	5.1~24	22	3.1	5.6
		37±12	-	43	5.0~13	22	11	29
		ND	150	151	2.2~15	13	38	64
4	磺胺二甲嘧啶	ND	10	11	3.5~10	15	2.3	5.1
		51±5	-	53	2.1~8.6	15	9.1	24
		126±18	-	115	8.4~11	21	32	74
5	磺胺对甲氧嘧啶	16±1.1	-	14	5.0~24	31	5.2	13
		86±17	-	96	5.4~13	15	24	46
		138±14	-	117	4.6~12	24	28	83
6	磺胺氯哒嗪	ND	10	7.4	5.2~10	21	1.4	4.5
		ND	50	44	3.7~11	19	9	24
		ND	150	134	3.9~13	13	38	61
7	甲氧苄氨嘧啶	ND	20	20	2.1~27	28	8.3	17
		43±3.8	-	37	5.1~24	26	16	31
		ND	150	161	1.8~30	12	55	73
8	诺氟沙星	ND	10	9.4	2.8~19	18	3	5.5
		45±5.1	-	44	3.2~18	32	14	41
		ND	100	74	6.8~25	39	22	84
9	环丙沙星	ND	10	10	5.0~24	27	4.2	8.5
		42±3.4	-	45	4.6~22	34	13	44
		ND	100	100	4.3~22	28	29	82
10	林可霉素	ND	10	11	10~23	19	5.1	7.5
		66±4.6	-	63	3.4~28	18	23	38
		ND	150	168	4.4~22	15	61	89
11	土霉素	22±7.1	-	16	8.3~15	18	4.8	9.2
		54±5.2	-	63	3.2~27	25	32	53
		ND	150	144	3.2~18	21	45	94
12	金霉素	7.7±1.4	-	10	11~29	29	6.1	10
		87±5.1	-	93	5.0~19	24	33	69
		ND	150	158	5.1~28	16	70	96
13	脱水红霉素	8.4±0.3	-	8.5	10~17	43	3.3	11
		67±4.9	-	49	4.5~15	39	13	54
		ND	100	79	2.9~8.6	24	13	47
14	克拉霉素	ND	10	12	11~22	21	5.5	8.8
		73±6.7	-	68	4.6~10	30	16	59
		ND	150	181	6.0~27	13	70	91
15	北里霉素	ND	10	9.4	8.5~15	24	2.9	6.7
		ND	50	56	5.4~11	29	14	48
		ND	150	160	4.8~15	20	41	97
16	罗红霉素	ND	20	19	4.2~8.1	12	3.4	7.2
		69±5	-	60	3.6~26	37	23	65
		ND	150	166	2.1~12	11	32	58
17	泰乐菌素	ND	10	10	2.3~46	48	4	14
		26±6.1	-	30	4.1~32	16	14	19
		53±8.3	-	50	4.3~33	18	19	30

注：ND 表示未检出。

6.4.3 准确度数据

6家实验室对壤土、砂土、粘土三种类型土壤统一样品分别加入低、中、高三个不同含量水平，加标浓度范围为10~150 μg/kg。按照全程序每个加标样品平行测定6次，分别计算每个统一样品的加标回收率。

17种抗生素在不同类型土壤中的加标回收率范围为：壤土样品低、中、高加标回收率分别为47%~232%、42%~198%、40%~188%；砂土样品低、中、高浓度加标回收率分别为44%~160%、38%~165%、38%~155%；粘土样品低、中、高浓度加标回收率分别为46%~177%、32%~165%、35%~165%。

每种化合物的准确度数据详见表24。

表24 方法准确度汇总表

序号	化合物	样品类型	样品浓度 (μg/kg)	加标浓度 (μg/kg)	加标回收率 范围 (%)	加标回收率 \bar{P} (%)	加标回收率最终值 $\bar{P} \pm 2S_p$ (%)
1	磺胺吡啶	壤土	ND	10	47~72	55	55±19
				50	42~65	52	52±19
				150	40~73	51	51±26
		砂土	ND	10	44~70	53	53±20
				50	39~58	51	51±16
				150	38~69	50	50±22
		粘土	ND	10	46~64	52	52±13
				50	37~55	48	48±14
				150	37~59	47	47±17
2	磺胺甲噁唑	壤土	7.2±2.1	10	79~105	92	92±21
				50	80~122	106	106±29
				150	64~130	102	102±44
		砂土	ND	10	73~99	87	87±23
				50	76~114	99	99±25
				150	64~120	97	97±38
		粘土	ND	10	70~99	86	86±22
				50	69~106	91	91±25
				150	59~107	89	89±33
3	磺胺甲噻啶	壤土	8.9±1.0	10	92~127	102	102±25
				50	85~117	105	105±23
				150	74~132	108	108±44
		砂土	ND	20	62~112	96	96±38
				50	62~112	96	96±38
				150	75~134	104	104±40
		粘土	37±12	20	53~112	88	88±42
				50	60~102	88	88±32
				150	60~98	85	85±29
4	磺胺二甲噻啶	壤土	126±18	10	48~125	90	90±53
				50	66~134	97	97±45
				150	74~113	94	94±32
		砂土	51±5	20	64~132	105	105±51
				50	80~114	95	95±28
				150	61~108	90	90±37
		粘土	ND	10	78~121	93	93±30

序号	化合物	样品类型	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 范围 (%)	加标回收率 \bar{P} (%)	加标回收率最终值 $\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}}$ (%)
5	磺胺对甲氧嘧啶	壤土	86 \pm 17	50	83~130	103	103 \pm 39
				150	83~136	108	108 \pm 47
				20	73~114	95	95 \pm 38
		砂土	16 \pm 1.1	50	60~131	101	101 \pm 53
				150	68~144	107	107 \pm 49
				20	85~155	117	117 \pm 54
		粘土	138 \pm 14	50	77~155	126	126 \pm 57
				150	88~144	130	130 \pm 43
				20	63~105	87	87 \pm 34
6	磺胺氯哒嗪	壤土	ND	20	63~144	96	96 \pm 56
				150	56~117	86	86 \pm 51
				10	66~122	88	88 \pm 44
		砂土	ND	50	72~166	109	109 \pm 66
				150	76~138	103	103 \pm 50
				10	61~109	86	86 \pm 37
		粘土	ND	50	55~115	86	86 \pm 44
				150	60~111	86	86 \pm 41
				10	60~167	89	89 \pm 79
7	甲氧苄氨嘧啶	壤土	ND	50	78~121	91	91 \pm 34
				150	61~102	81	81 \pm 29
				20	73~140	112	112 \pm 53
		砂土	ND	50	64~130	111	111 \pm 50
				150	63~151	109	109 \pm 65
				20	107~126	115	115 \pm 16
		粘土	43 \pm 3.8	50	62~118	99	99 \pm 41
				150	62~144	96	96 \pm 64
				20	94~141	115	115 \pm 40
8	诺氟沙星	壤土	ND	50	79~109	101	101 \pm 23
				100	76~113	93	93 \pm 27
				10	82~114	97	97 \pm 22
		砂土	45 \pm 5.1	50	69~133	112	112 \pm 51
				100	55~156	115	115 \pm 71
				20	67~138	111	111 \pm 49
		粘土	ND	50	78~121	101	101 \pm 28
				100	50~131	105	105 \pm 60
				10	53~108	88	88 \pm 40
9	环丙沙星	壤土	ND	50	32~107	85	85 \pm 54
				100	35~120	90	90 \pm 60
				10	73~147	97	97 \pm 55
		砂土	42 \pm 3.4	50	48~103	88	88 \pm 44
				100	57~169	114	114 \pm 78
				10	70~133	112	112 \pm 46
		粘土	ND	50	90~123	105	105 \pm 25
				100	68~155	117	117 \pm 62
				10	64~107	91	91 \pm 29
10	林可霉素	壤土	ND	50	44~118	89	89 \pm 49
				100	57~141	115	115 \pm 63
				20	91~125	109	109 \pm 30
				50	89~130	111	111 \pm 33
				150	75~139	120	120 \pm 47

序号	化合物	样品类型	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 范围 (%)	加标回收率 \bar{P} (%)	加标回收率最终值 $\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}}$ (%)		
		砂土	ND	20	79~160	117	117 \pm 53		
				50	65~129	105	105 \pm 46		
				150	87~155	125	125 \pm 47		
		粘土	66 \pm 4.6	20	90~123	101	101 \pm 27		
				50	94~143	113	113 \pm 42		
				150	96~122	110	110 \pm 17		
11	土霉素	壤土	54 \pm 5.2	20	85~126	105	105 \pm 27		
				50	77~149	115	115 \pm 54		
				150	79~116	93	93 \pm 30		
		砂土	ND	20	71~147	114	114 \pm 56		
				50	45~151	107	107 \pm 79		
				150	42~148	91	91 \pm 74		
		粘土	22 \pm 7.1	10	75~135	110	110 \pm 46		
				50	87~131	110	110 \pm 32		
				150	56~140	93	93 \pm 55		
		12	金霉素	壤土	87 \pm 5.1	10	81~159	120	120 \pm 59
						50	60~169	126	126 \pm 77
						150	47~149	101	101 \pm 71
砂土	ND			10	84~144	113	113 \pm 38		
				50	59~166	110	110 \pm 68		
				150	59~138	97	97 \pm 53		
粘土	7.7 \pm 1.4			10	92~124	107	107 \pm 28		
				50	76~134	104	104 \pm 43		
				150	69~121	94	94 \pm 36		
13	脱水红霉素	壤土	67 \pm 4.9	10	62~188	110	110 \pm 85		
				50	63~135	101	101 \pm 51		
				100	53~158	109	109 \pm 86		
		砂土	8.4 \pm 0.3	10	76~124	102	102 \pm 34		
				50	39~125	94	94 \pm 59		
				100	54~113	90	90 \pm 42		
		粘土	ND	10	99~154	119	119 \pm 54		
				50	43~105	82	82 \pm 42		
				100	52~116	94	94 \pm 45		
14	克拉霉素	壤土	ND	10	86~153	117	117 \pm 54		
				50	86~167	133	133 \pm 68		
				150	83~165	124	124 \pm 58		
		砂土	73 \pm 6.7	10	80~130	100	100 \pm 38		
				100	81~108	97	97 \pm 19		
				150	88~135	107	107 \pm 35		
		粘土	ND	10	95~149	116	116 \pm 40		
				50	83~144	123	123 \pm 55		
				150	71~146	120	120 \pm 59		
15	北里霉素	壤土	ND	10	75~123	99	99 \pm 31		
				50	76~162	121	121 \pm 59		
				150	79~156	112	112 \pm 64		
		砂土	ND	10	75~131	103	103 \pm 43		
				50	79~130	104	104 \pm 37		
				150	73~148	116	116 \pm 58		
粘土	ND	10	70~116	97	97 \pm 30				
		50	71~145	111	111 \pm 52				

序号	化合物	样品类型	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 范围 (%)	加标回收率 \bar{P} (%)	加标回收率最终值 $\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}}$ (%)
				150	70~130	108	108 \pm 45
16	罗红霉素	壤土	ND	20	95~136	110	110 \pm 29
				50	79~198	120	120 \pm 94
				150	72~188	106	106 \pm 91
		砂土	69 \pm 5	10	52~138	99	99 \pm 59
				50	93~144	112	112 \pm 39
				150	85~140	107	107 \pm 42
		粘土	ND	20	83~177	109	109 \pm 73
				50	70~165	109	109 \pm 78
				150	91~165	109	109 \pm 56
17	泰乐菌素	壤土	16 \pm 6.1	10	64~118	91	91 \pm 40
				25	55~115	91	91 \pm 49
				50	40~113	93	93 \pm 56
		砂土	53 \pm 8.3	10	85~153	116	116 \pm 44
				25	74~118	101	101 \pm 34
				50	82~138	114	114 \pm 38
		粘土	ND	10	48~140	108	108 \pm 68
				25	75~132	101	101 \pm 41
				50	38~140	105	105 \pm 70

注：ND 表示未检出。

参考文献

- [1] Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, et al. Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China: Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11):6772-6782.
- [2] USEPA. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. U.S. Environmental Protection Agency, 2007.
- [3] Berendsen BJA, Elbers IJW, Stolker AAM. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011, 28(12): 1657-1666.
- [4] McArdell CS, Molnar E, Suter MJF, et al. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental science & technology*, 2003, 37(24): 5479-5486.
- [5] Jacobsen AM, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, et al. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1038(1-2): 157-170.
- [6] Meng M, He Z, Xu Y, et al. Simultaneous extraction and determination of antibiotics in soils using a method based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(16): 3214-3220.
- [7] Zhou LJ, Ying GG, Liu S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2012, 1244: 123-138.
- [8] Ola S, Erland B. Thermal stability assessment of antibiotics in moderate temperature and subcritical water using a pressurized dynamic flow-through system. 2015, *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11(4): 872-880.
- [9] Doi AM, Stoskopf MK. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. *Journal of*

- Aquatic Animal Health, 2000, 12(3): 246-253.
- [10]Golet EM, Strehler A, Alder AC, et al. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(21): 5455-5462.
- [11]Martínez-Carballo E, González-Barreiro C, Scharf S, et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 2007, 148(2): 570-579.
- [12]Jia A, Xiao Y, Hu JY, Asami M, et al. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(22): 4655-4662.
- [13]Grujić S, Vasiljević T, Laušević M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(25): 4989-5000.
- [14]Nami Kartal S. Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-C treated wood by EDTA extraction. *Waste Management*, 2003, 23(6):537-546.
- [15]Petrović M, Hernando MD, Díaz-Cruz MS, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067(1–2):1-14.
- [16]European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, Official Journal of the European Community. 221 (2002) 8-36.