

# 联和层析

## 应用文章精选

2017 | 08



联和层析致力于提供无限可能的色谱解决方案。十多年来，我们与全球多家专业色谱厂商保持良好合作伙伴关系，并将他们优势产品引进到国内。本着诚恳、实在、专业、负责的理念，联合层析在样品前处理及自动化的领域已占据领先地位。

为服务广大客户对于了解国际间最新色谱应用方向的需求，联和层析定期精选并翻译应用文章，为国内的科技服务提升，略尽绵薄之力！

### 《水体中 11 种抗生素的测定》

抗生素(antibiotics)是生物包括微生物、植物和动物在内在其生命活动过程中所产生的(或由其他方法获得的)，能在低微浓度下有选择地抑制或影响它种生物功能的有机物质。抗生素的生态影响主要表现在两方面：一方面将导致环境中耐药菌的出现，并大量繁殖和传播，最终人类健康造成影响；另一方面通过影响水生生物、动植物的营养传递方式和种群结构以及微生物的种群数量，生态环境中固有的食物链将会遭到破坏，进而打破生态系统的平衡。本文介绍了采用在线 SPE 的方法测定水体中 11 种抗生素的含量。

#### 【应用背景介绍】

本文采用在线 SPE 富集净化的前处理、联用 LC-MS/MS 检测的方法，在优化后的实验条件下，用基质空白水溶液配制系列浓度的标准溶液，以每种目标物定量例子的峰面积与浓度来绘制标准曲线。

#### 【实际应用与亮点】

- 实现在线 SPE 和自动进样功能，大大节省人力劳动
- 实现在线富集，节省脱机 SPE 耗材，节省成本
- 上一个样品在 LC-MS/MS 分析时，自动完成下一个样品 SPE 柱的再生、上样、净化、富集，大大提高了系统的通量。

### 与我们联系



联和层析贸易(上海)有限公司  
www.unichrom.cn

上海市浦东新区向城路 19 号 10A  
电话: 86-21-64479550  
传真: 86-21-20227695  
邮箱: info@unichrom.cn

北京市昌平区回龙观镇  
枫丹西路 2 号楼 315B  
电话: 86-10-84869268  
传真: 86-10-84869268  
邮箱: james-jiang@unichrom.cn

广州市天河区天坤三路和美街 11 号  
1706 室  
电话: 15217202438  
邮箱: gz@unichrom.cn

## 1、实验仪器与耗材

1.1 AB QTRAP 5500 LC/MS/MS

1.2 联和层析双SPE柱串联多维Online SPE系统HighSPEed

1.3 在线SPE柱: HLB 2.1\*20mm,2.5um;

1.4 11种抗生素标准品: 阿奇霉素, 红霉素, 罗红霉素, 克拉霉素, 林可霉素, 维吉尼霉素M1, 维吉尼霉素S1, 克林霉素, 奥美普林, 竹桃霉素, 替米考星, 纯度≥95%。

## 2、联和层析双SPE柱串联多维Online SPE系统HighSPEed (单柱在线SPE)

2.1 进样量:1mL

2.2 取样速度: 200uL/s

2.3 SPE柱活化条件: 用纯甲醇以1.0mL/min的流速活化2min

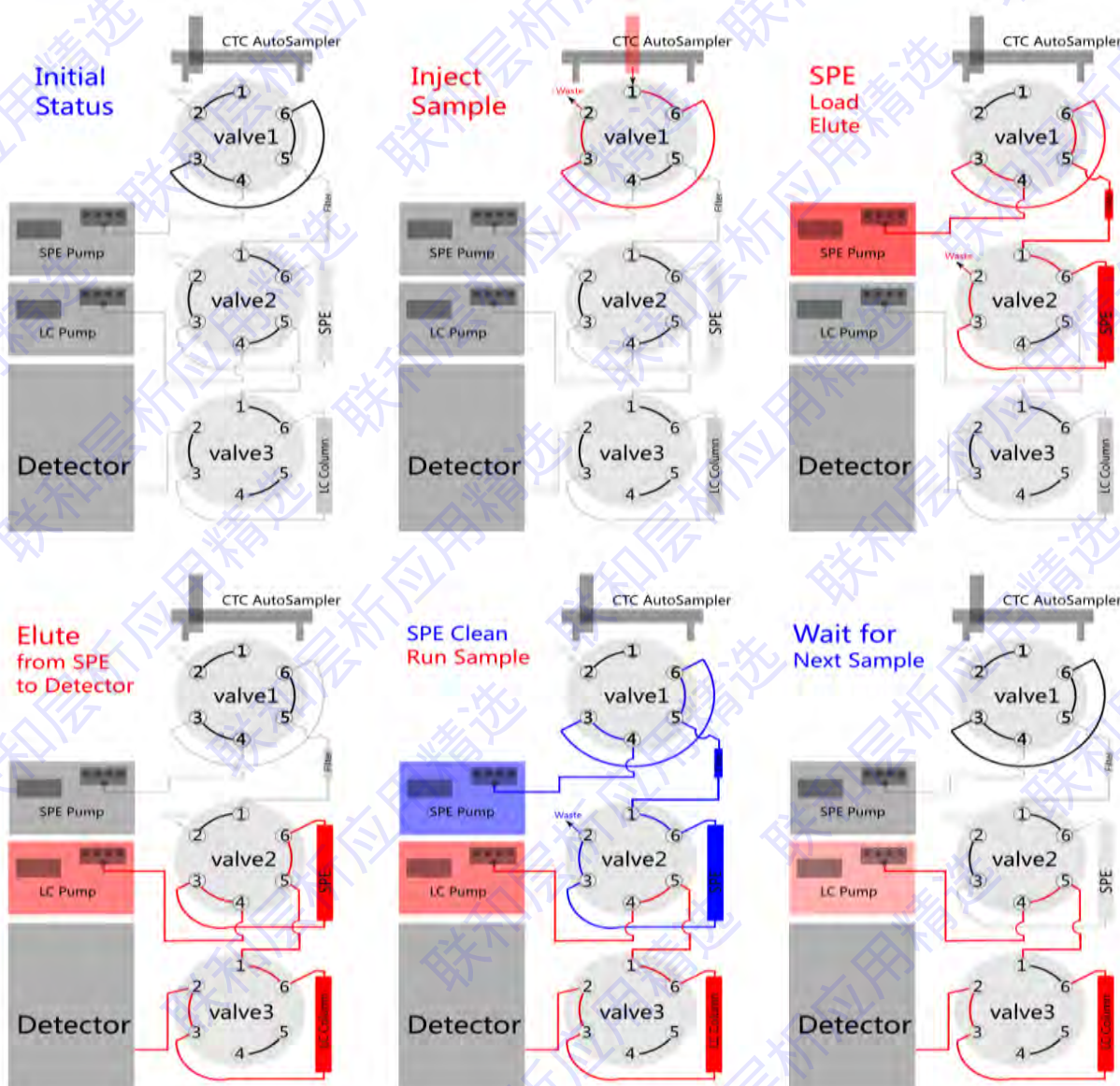
2.4 SPE柱平衡条件: 用纯水以1.0mL/min的流速活化1min

2.5 SPE柱上样条件: 用纯水以2.0mL/min的流速上样3min

2.6 SPE柱淋洗条件: 用纯水以0.5mL/min的流速淋洗1min

2.7 SPE柱再生条件: 用纯甲醇以1.0mL/min的流速再生1min

2.8 管路清洗条件: 用纯甲醇以1.0mL/min的流速清洗1min



### 3、色谱-质谱条件

3.1 色谱柱: Kineter 50\*3.0mm 2.6um;

3.2 流动相: A为0.1%甲酸, 5mmol/L甲酸铵水溶液, B为乙腈;

3.3 流动相洗脱程序:

表1 液相色谱流动性梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	0.1%甲酸/5mmol 甲酸铵水溶液 (%)	乙腈 (%)
0.00	0.5	80.0	20.0
5.00	0.5	5.0	95.0
11.00	0.5	5.0	95.0
11.50	0.5	80.0	20.0

备注: 在流动相中加入适量甲酸和甲酸铵可以增加抗生素的保留, 并改善峰形, 促进离子化。因此本实验采用 0.1%甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵混合溶液和乙腈作为流动相, 大部分化合物都得以较好分离, 峰形良好。

3.4 质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI), 多反应监测 (MRM) 离子模式, 11种抗生素定量离子对、裂解电压、碰撞能量见表2。

表2 11种抗生素的相关质谱参数

化合物名称	离子对 (m/z)	裂解电压 (v)	碰撞能量 (v)
替米考星	869.5/174.1	110	62
Tilmicosin	869.5/132.1		70
竹桃霉素	688.4/158.0	141	39
Oleandomycin	688.4/544.3		23
红霉素	734.4/158.0	141	39
Erythromycin	734.4/576.2		23
林可霉素	407.2/126.0	121	37
Lincomycin	407.2/359.1		25
克林霉素	425.1/126.0	121	39
Clindamycin	425.1/377.0		27
罗红霉素	837.5/679.2	156	29
Roxithromycin	837.5/158.0		47
阿奇霉素	749.6/591.5	120	38
Azithromycin	749.6/158.1		46
维吉尼霉素 M1	526.2/508.3	90	18
VirginiamycinsM1	526.2/355.1		25
维吉尼霉素 S1	824.3/205.0	130	57
VirginiamycinsS1	824.3/663.2		36
克拉霉素	748.5/590.4	40	29
Clarithromycin	748.5/158.0		40
奥美普林	275.2/259.1	40	38
Ometoprim	275.2/123.0		31



#### 4. 试验图谱

- Calibration for AQMS1:  $y = 1.51544e5 x + -6.40925e4$  ( $r = 0.99921$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for HMS1:  $y = 1.04023e5 x + -2926.88056$  ( $r = 0.99986$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for LHMS1:  $y = 4.10076e5 x + 14530.08957$  ( $r = 0.99953$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for KLMS1:  $y = 8.12895e4 x + -8565.10721$  ( $r = 0.99889$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for HMS-H2O1:  $y = 1.61697e5 x + -1962.61792$  ( $r = 0.99981$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for LKMS1:  $y = 6.78096e4 x + -12347.18425$  ( $r = 0.99899$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for VJMS-M1-1:  $y = 5.97348e4 x + 713.09919$  ( $r = 0.99958$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for LKMS1-1:  $y = 6.57415e4 x + -11361.95289$  ( $r = 0.99966$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for EJYJJBAMD1:  $y = 2.59997e5 x + -24047.05416$  ( $r = 0.99939$ ) (weighting:  $1/x^2$ )
- Calibration for LSZTMS1:  $y = 5.06984e4 x + -6952.26460$  ( $r = 0.99935$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for KLMS-1:  $y = 3.36167e5 x + 3.36839e4$  ( $r = 0.99915$ ) (weighting:  $1/x$ )
- Calibration for TMKX1:  $y = 3.00749e4 x + -7405.51793$  ( $r = 0.99801$ ) (weighting:  $1/x^2$ )

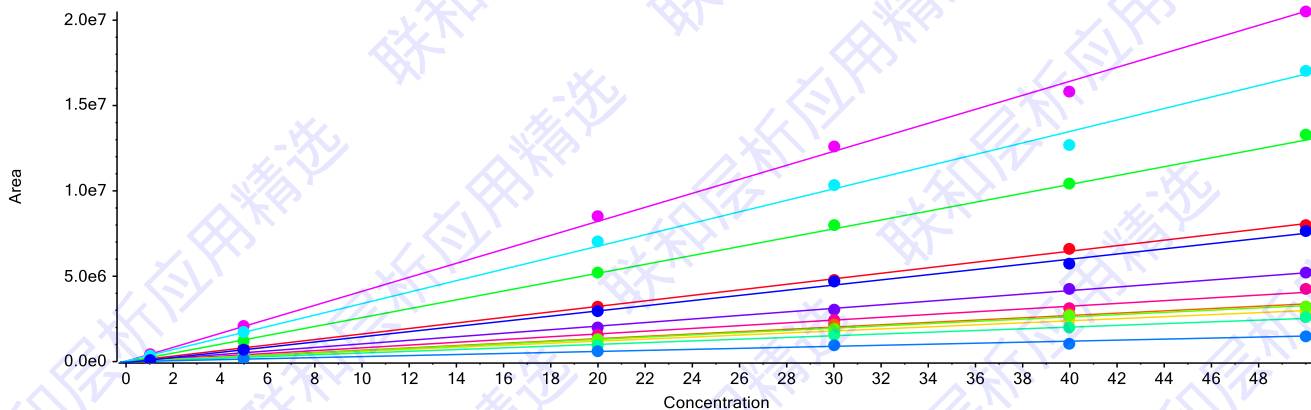


图1 11种抗生素标准曲线以及线性汇总图

Calibration for AQMS1:  $y = 1.51544e5 x + -6.40925e4$  ( $r = 0.99921$ ) (weighting:  $1/x$ )

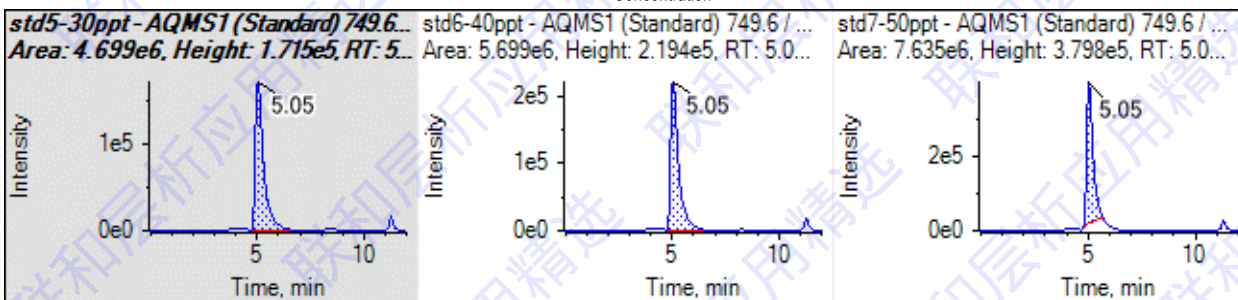
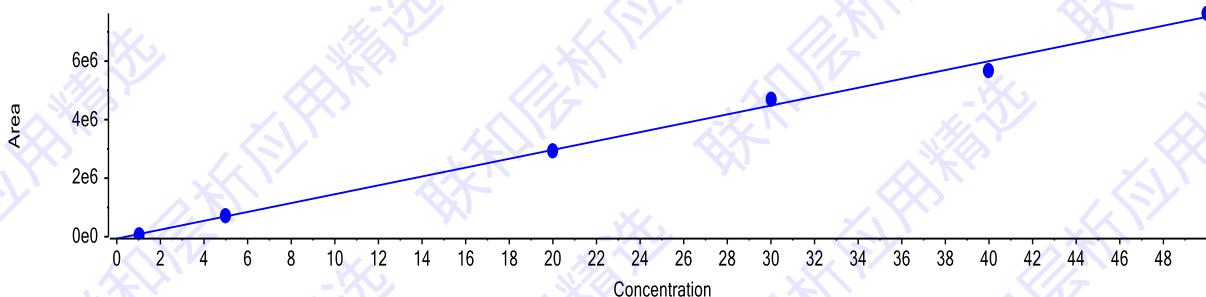


图2 阿奇霉素标准曲线以及MRM图

Calibration for HMS1:  $y = 1.04023e5 x + -2926.88056$  ( $r = 0.99986$ ) (weighting:  $1/x$ )

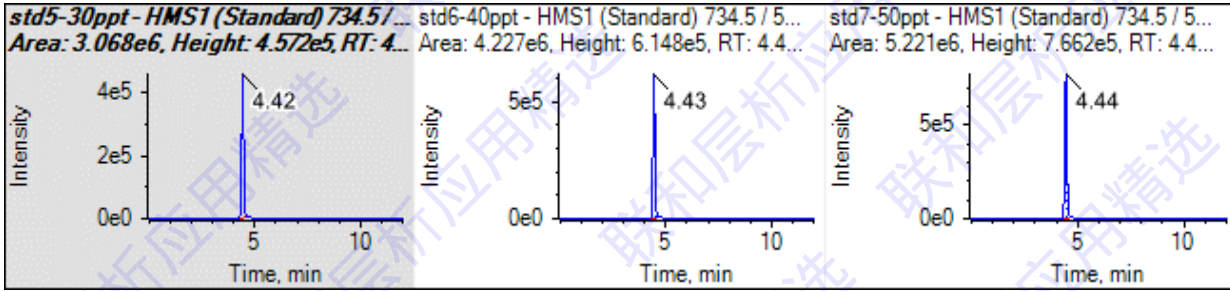
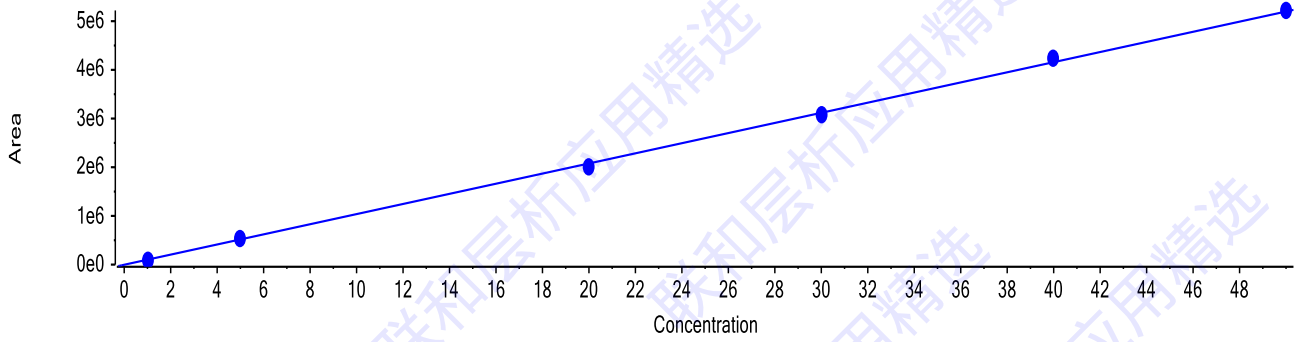


图3 红霉素标准曲线图以及MRM图

Calibration for LHMS1:  $y = 4.10076e5 x + 14530.08957$  ( $r = 0.99953$ ) (weighting:  $1/x$ )

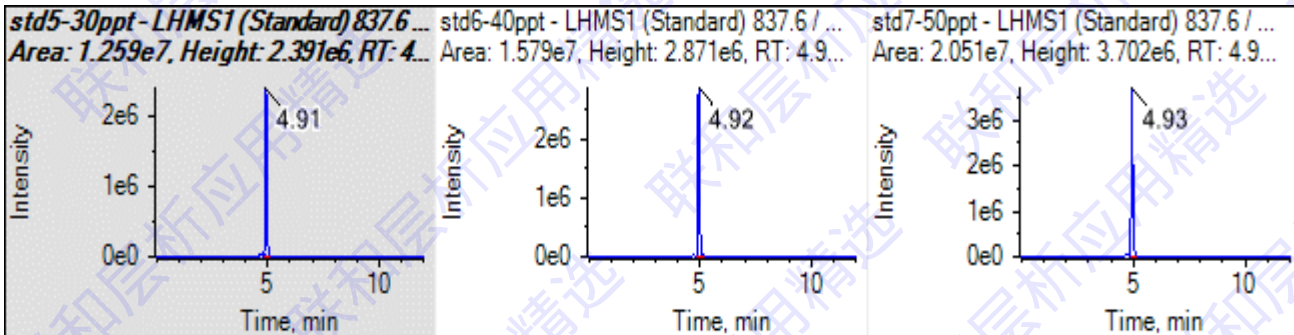
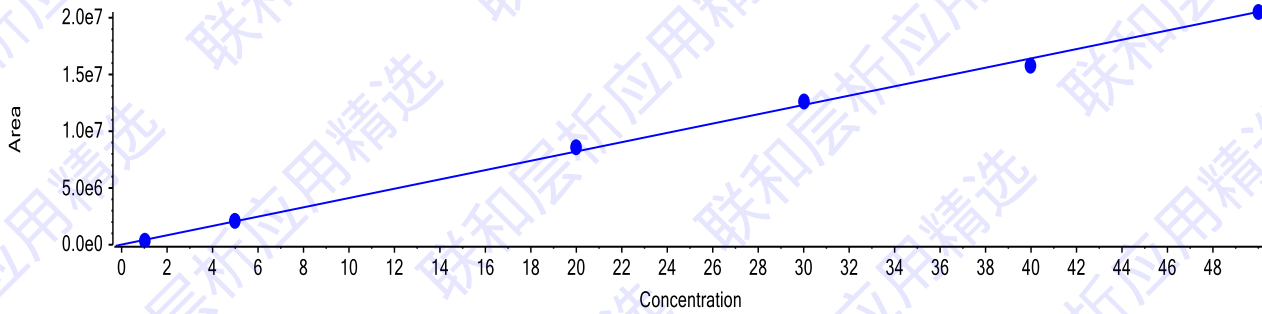


图4 罗红霉素标准曲线图以及MRM图

Calibration for KLMS1:  $y = 8.128954x + -8565.10721$  ( $r = 0.99889$ ) (weighting:  $1/x$ )

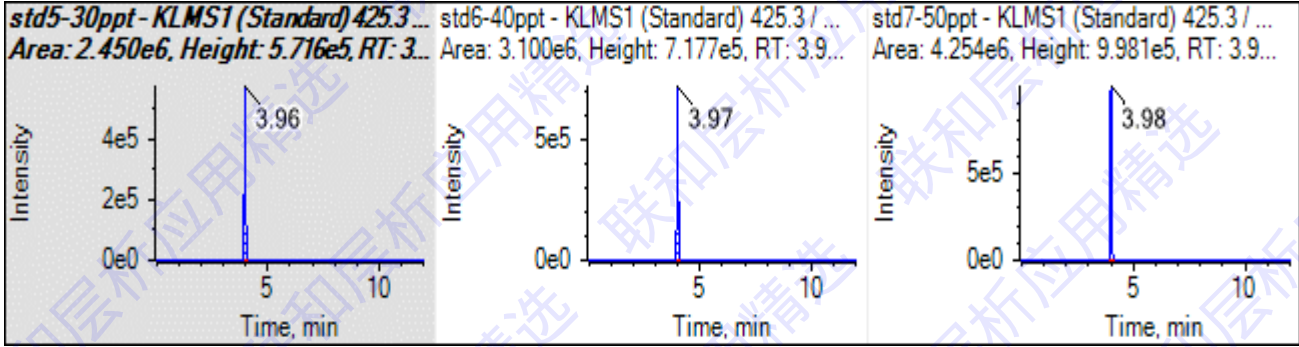
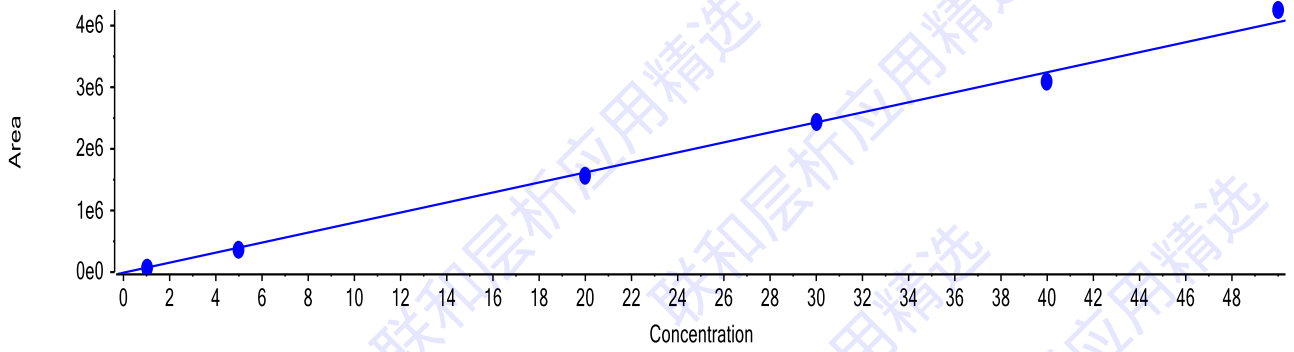


图5 克拉霉素标准曲线图以及MRM图

Calibration for LKMS1:  $y = 6.780964x + -12347.18425$  ( $r = 0.99899$ ) (weighting:  $1/x$ )

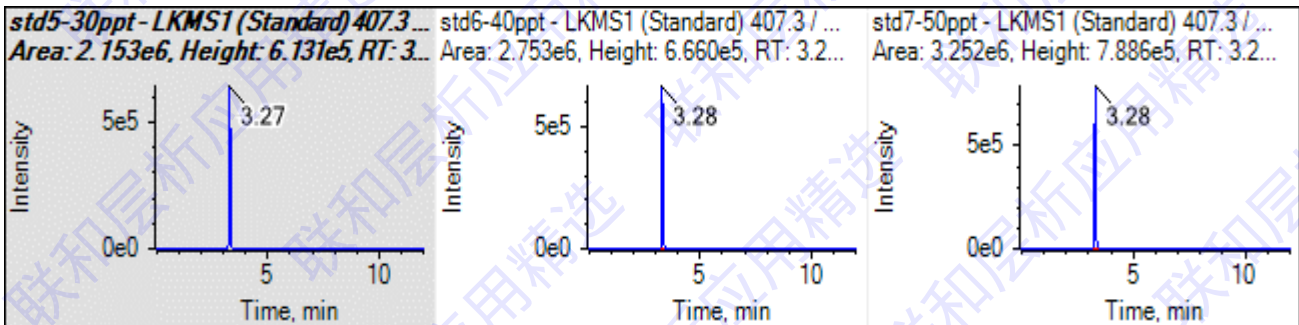
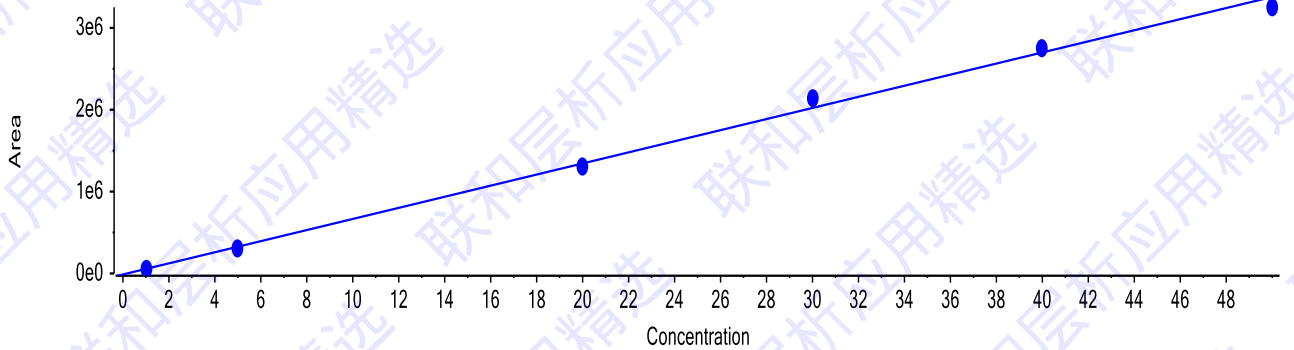


图6 林可霉素标准曲线图以及MRM图

Calibration for VJMS-M1-1:  $y = 5.97348e4 x + 713.09919$  ( $r = 0.99958$ ) (weighting:  $1/x$ )

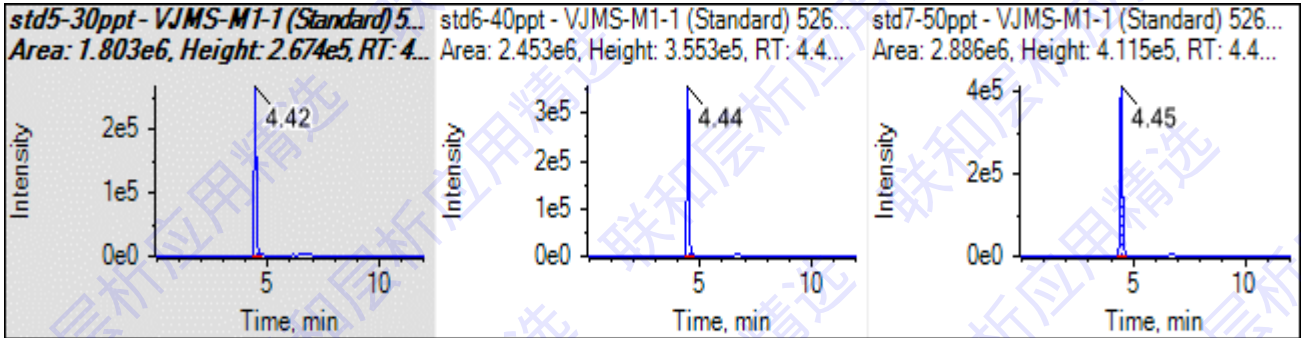
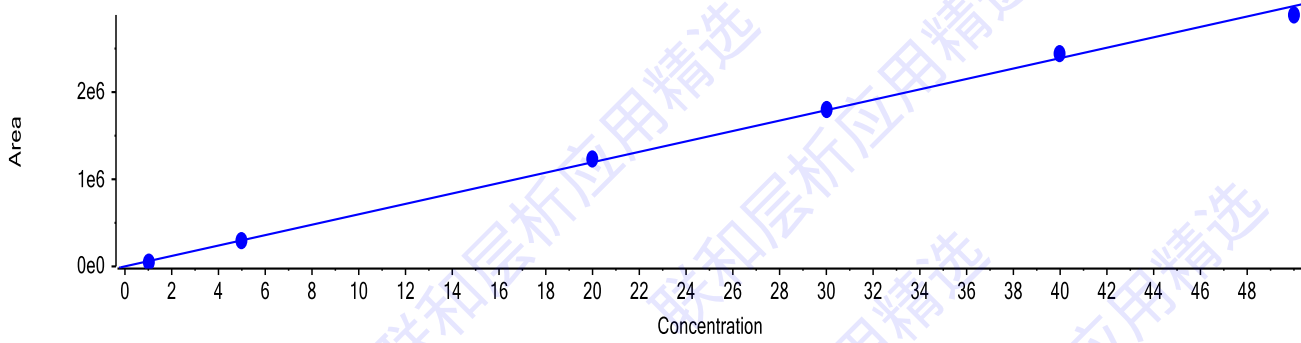


图7 维吉尼霉素M1标准曲线图以及MRM图

Calibration for VJMS-S1-1:  $y = 6.57415e4 x + -11361.95289$  ( $r = 0.99966$ ) (weighting:  $1/x$ )

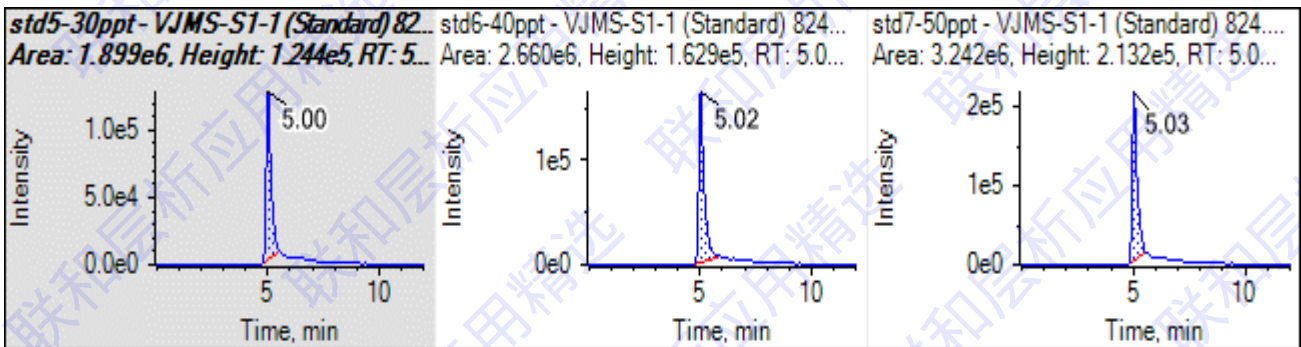
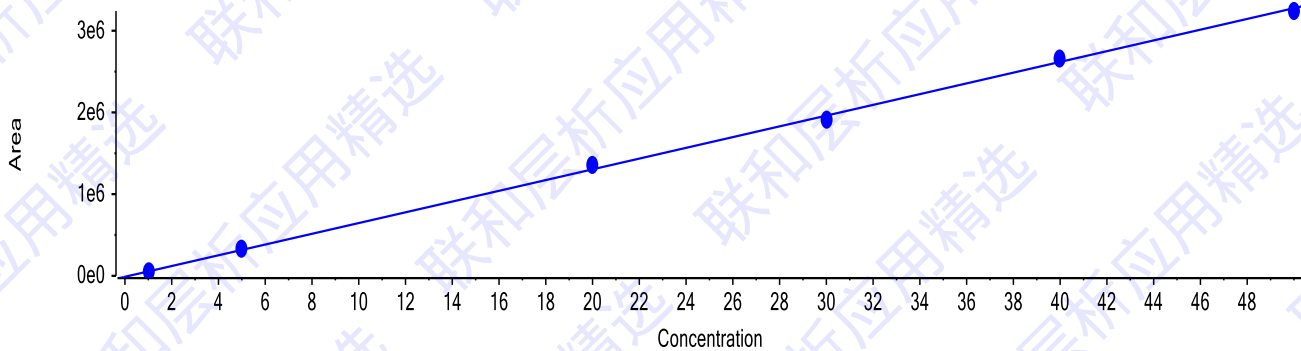


图8 维吉尼霉素S1标准曲线图以及MRM图



Calibration for EJYJJBAMD1:  $y = 2.59997e5 x + -24047.05416$  ( $r = 0.99939$ ) (weighting:  $1 / x^2$ )

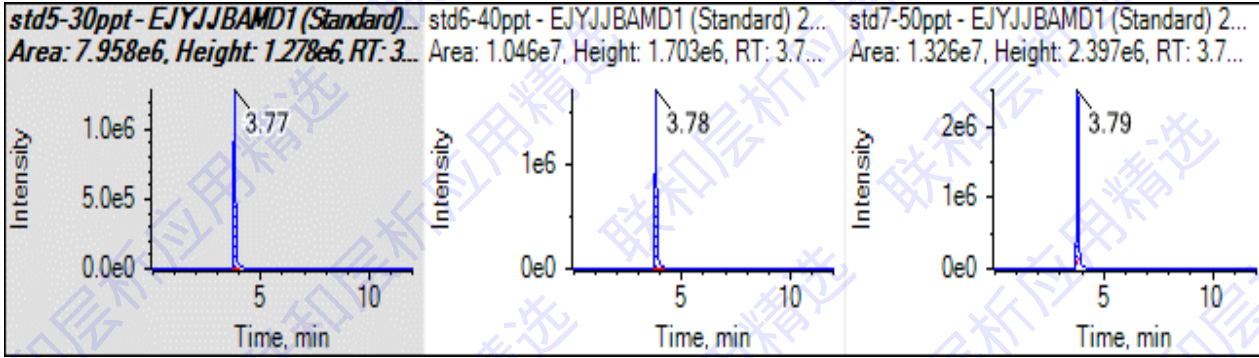
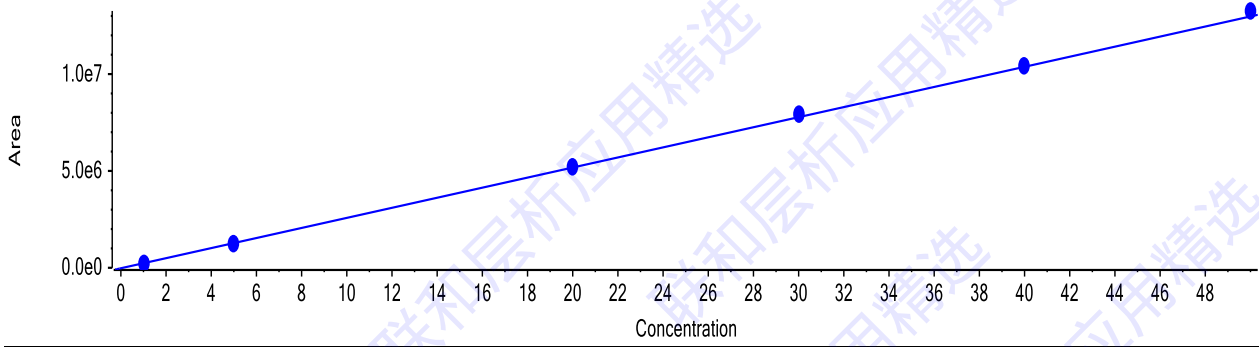


图9 奥美普林标准曲线图以及MRM图

Calibration for LSZTMS1:  $y = 5.06984e4 x + -6952.26460$  ( $r = 0.99935$ ) (weighting:  $1 / x$ )

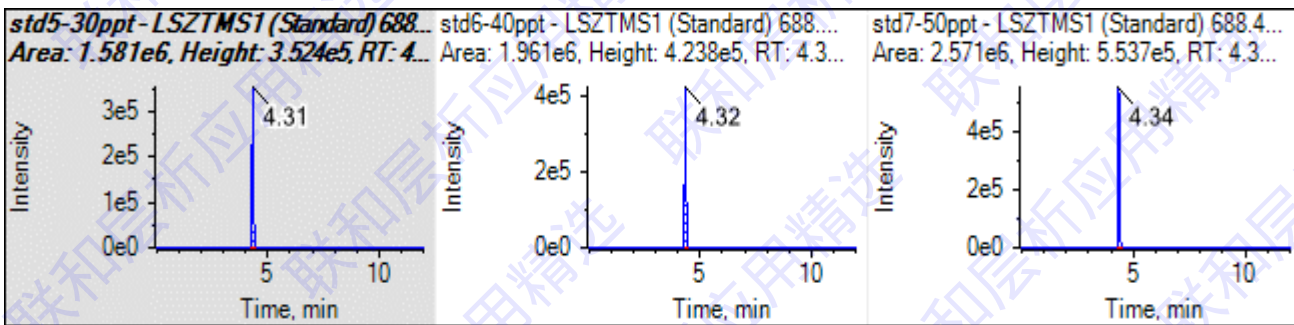
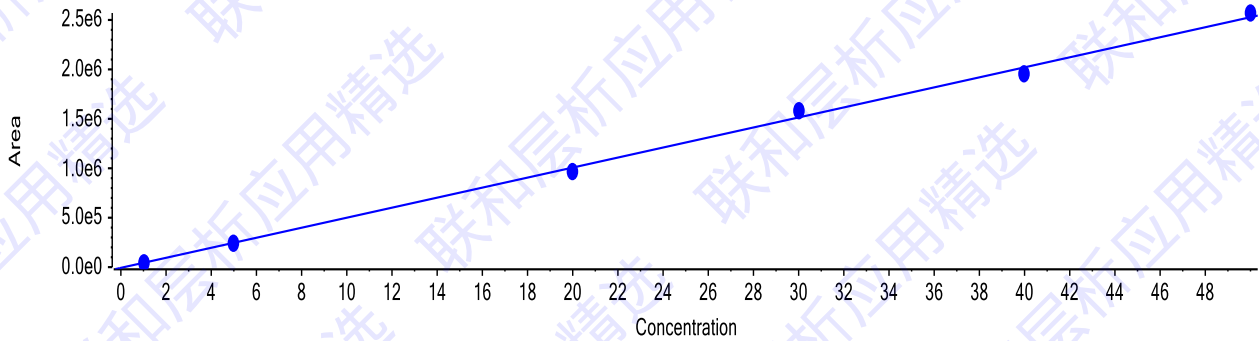


图10 竹桃霉素标准曲线图以及MRM图



Calibration for KLMS-1:  $y = 3.36167e5 x + 3.36839e4$  ( $r = 0.99915$ ) (weighting:  $1/x$ )

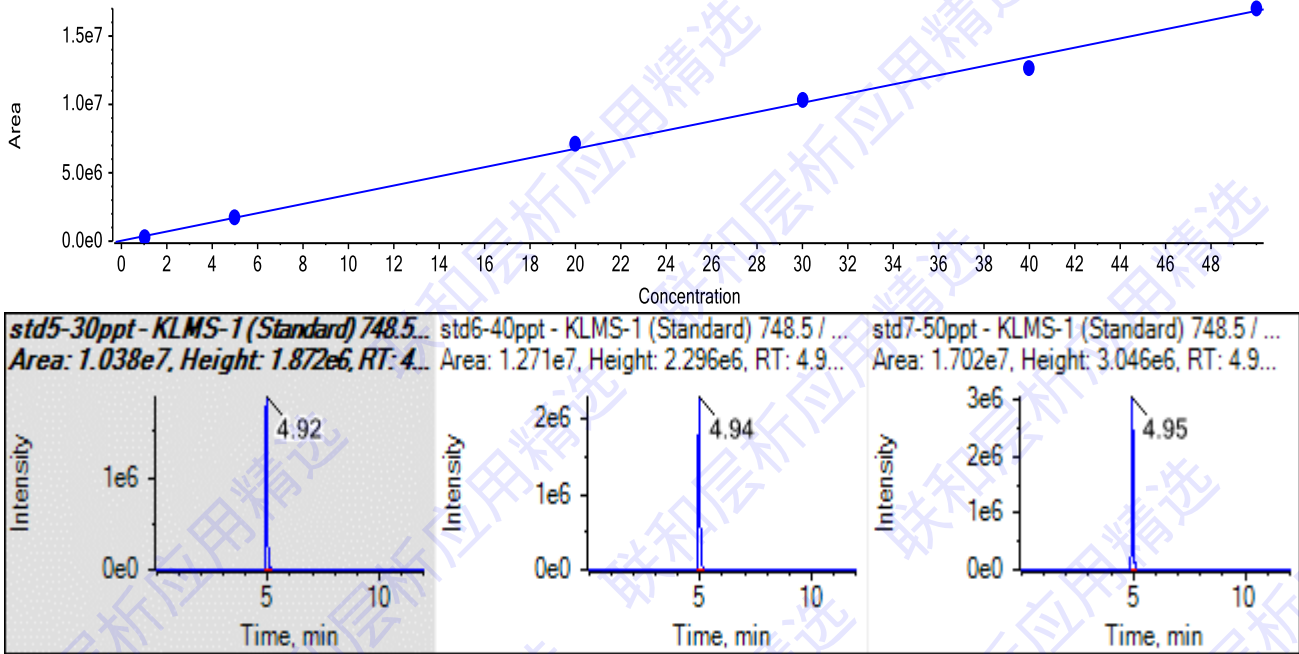


图11 克拉霉素标准曲线图以及MRM图

Calibration for TMKX1:  $y = 3.00749e4 x + -7405.51793$  ( $r = 0.99801$ ) (weighting:  $1/x^2$ )

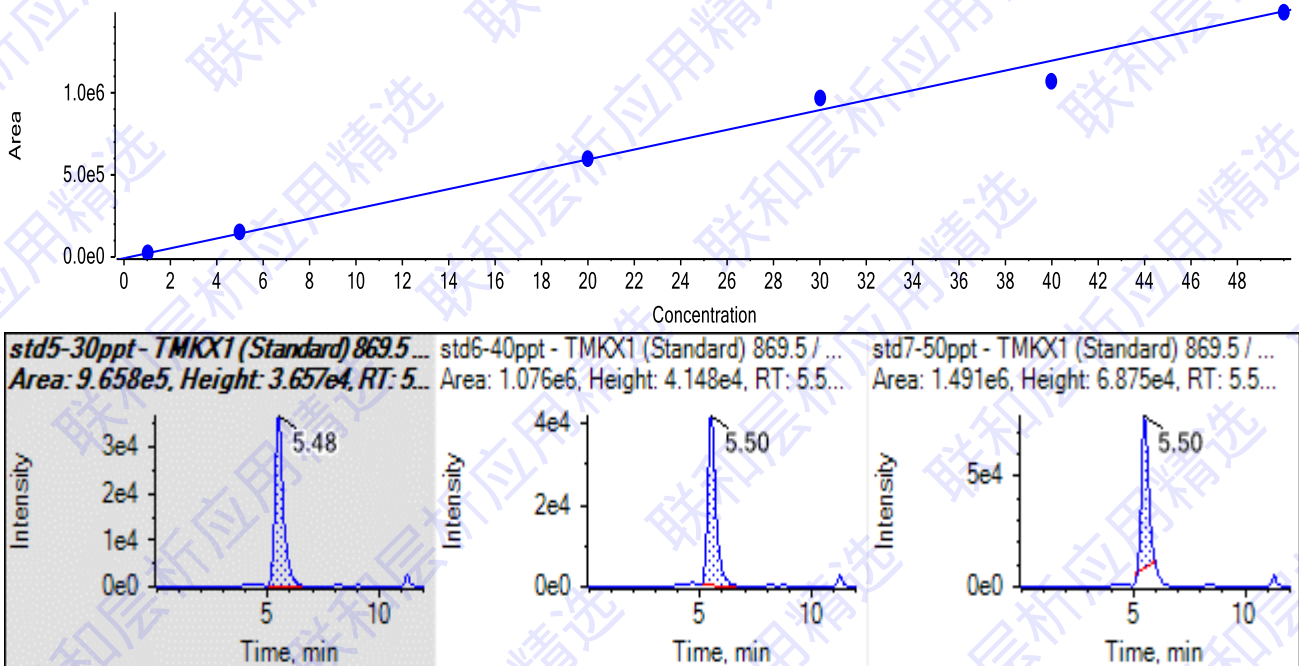


图12 替米考星标准曲线图以及MRM图

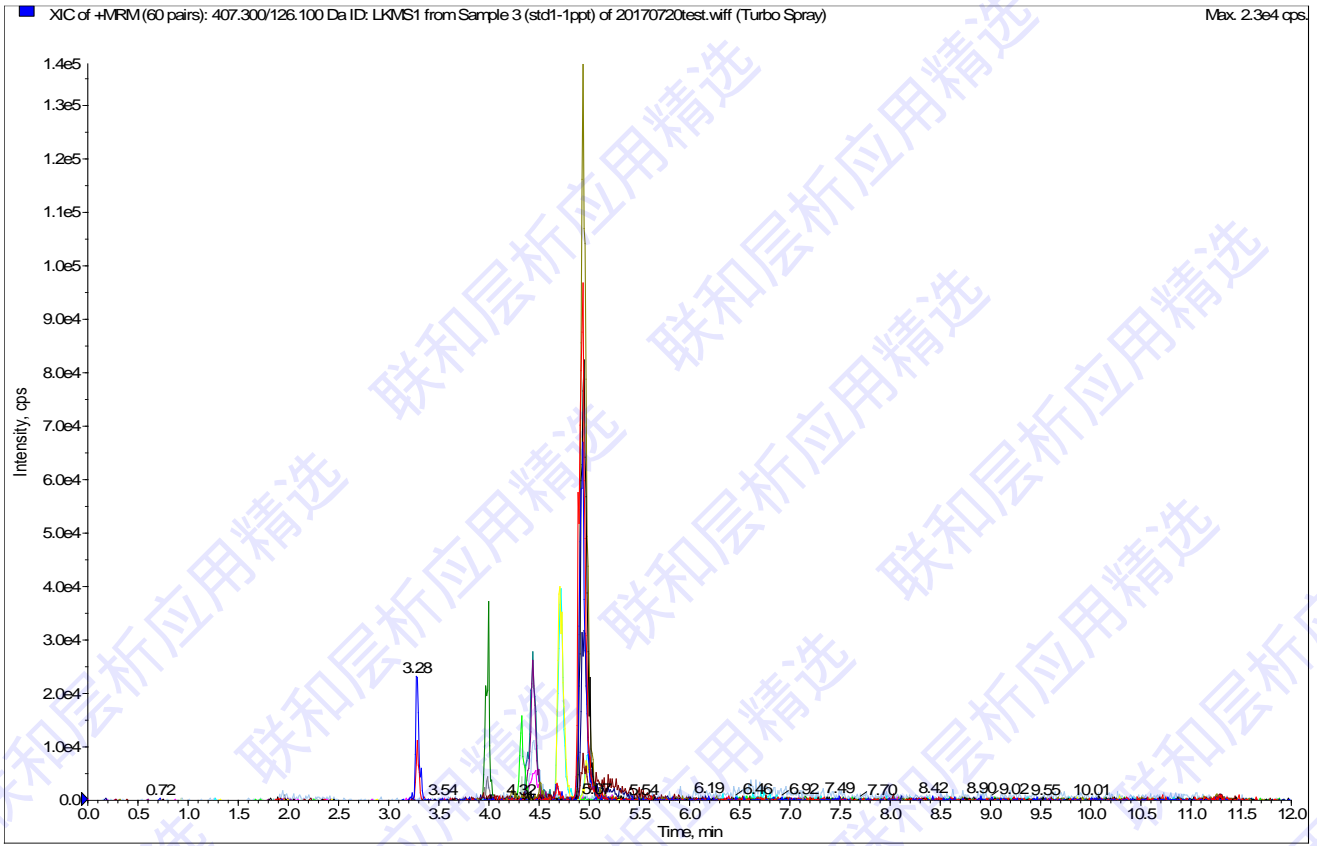


图13 11种抗生素混标 (1.0ng/L) MRM图

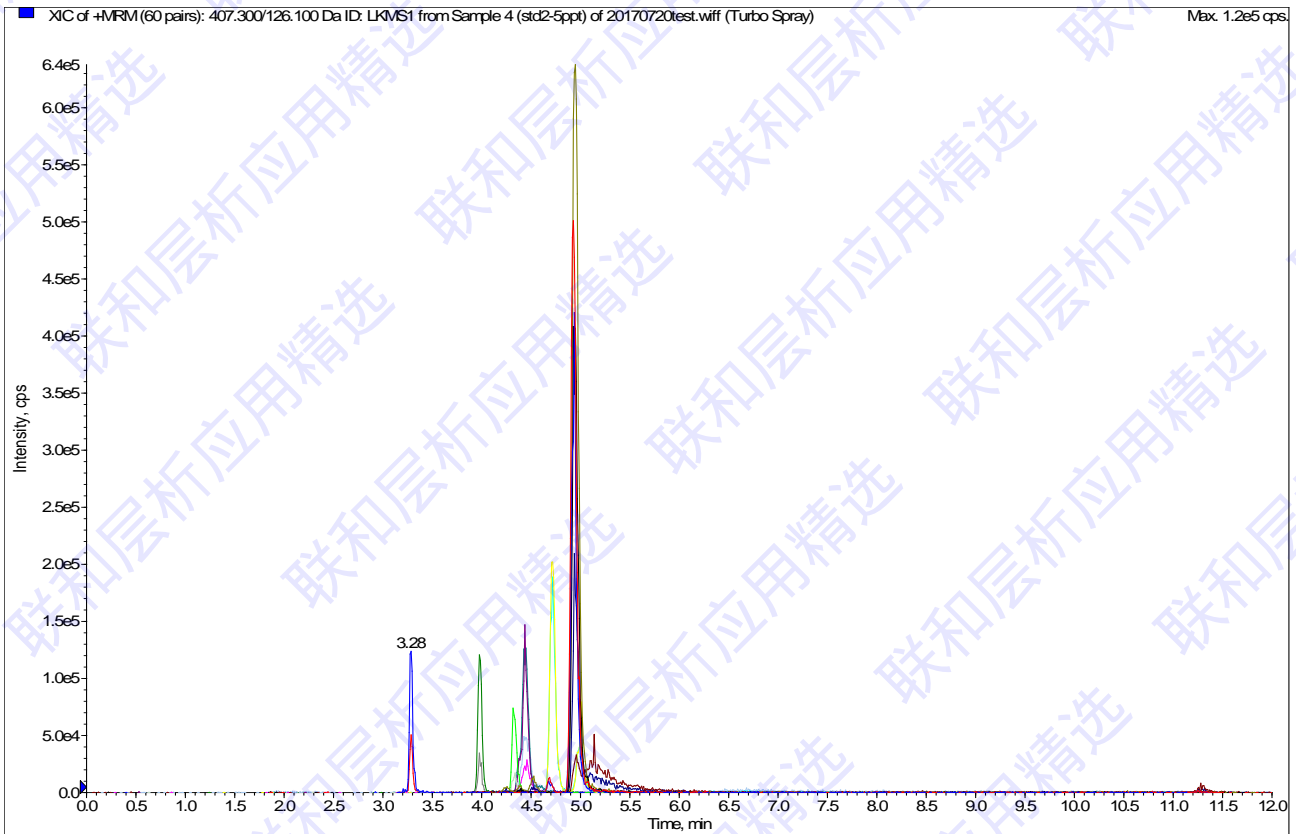


图14 11种抗生素混标 (5.0ng/L) MRM图

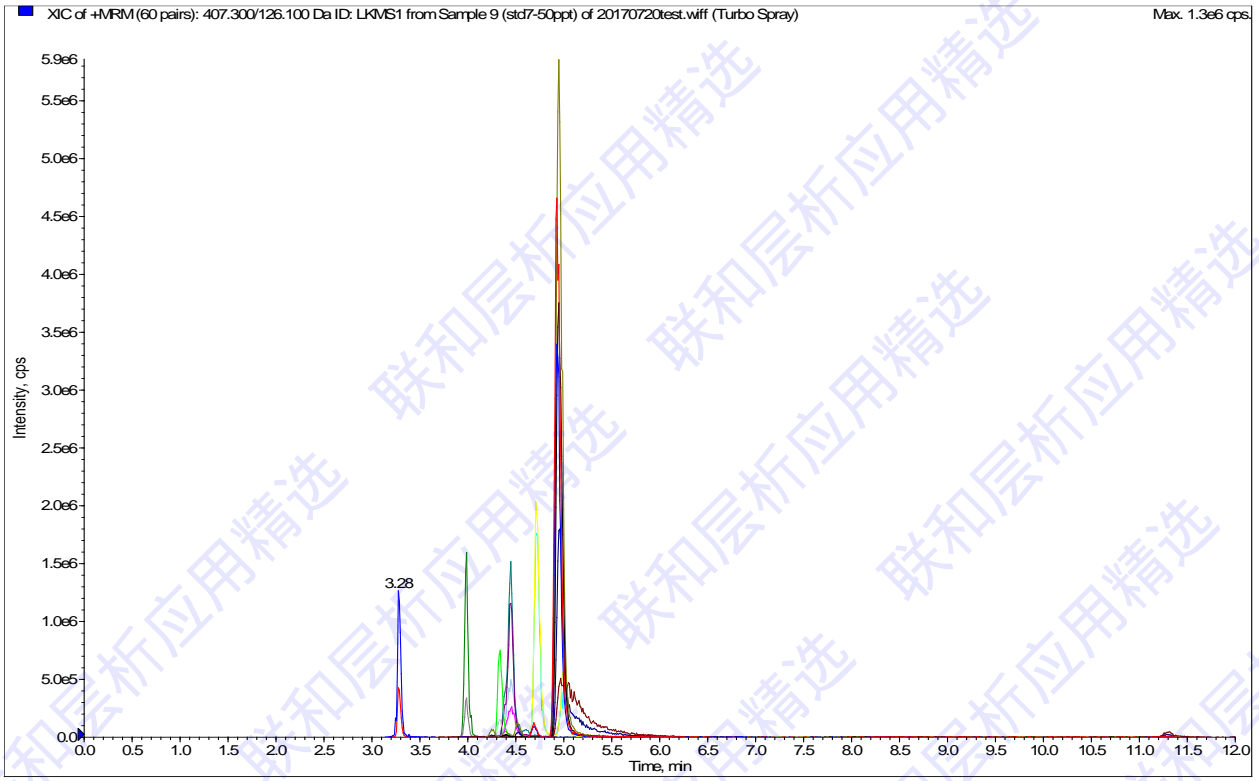


图15 11种抗生素混标 (50.0ng/L) MRM图

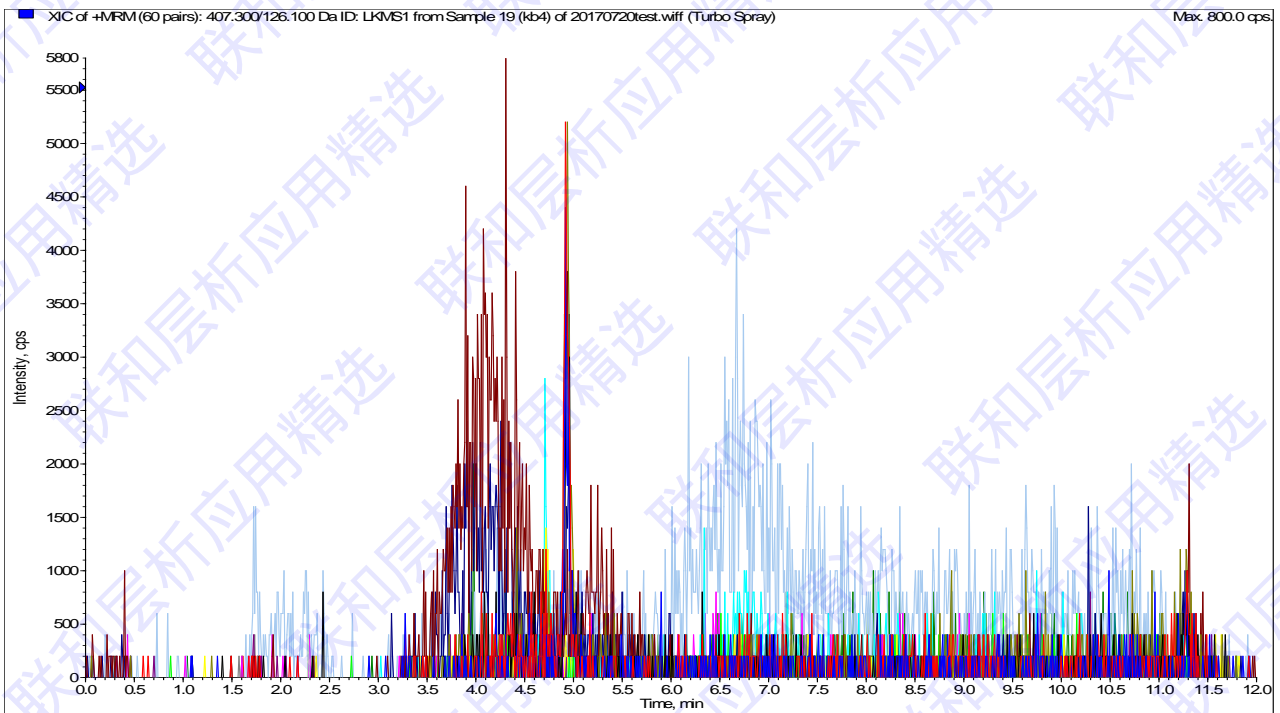


图16 某空白水样MRM图

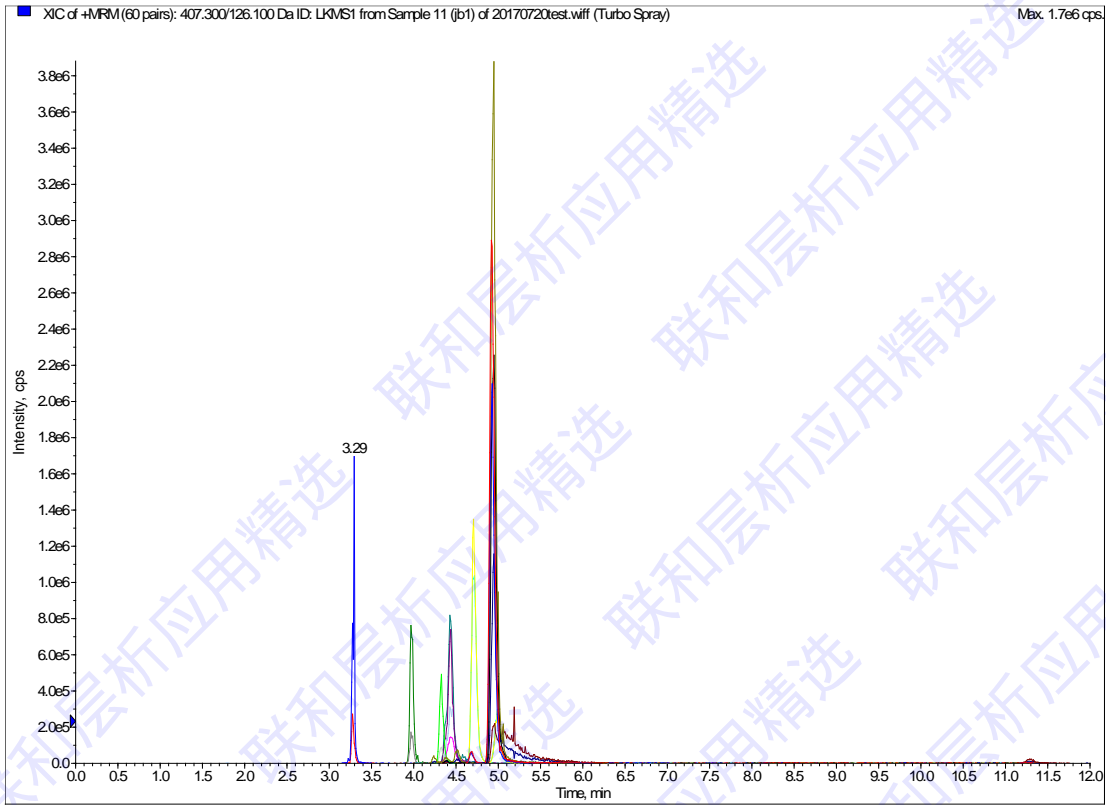


图17 某空白水样11种抗生素加标 (30.0ng/L) MRM图

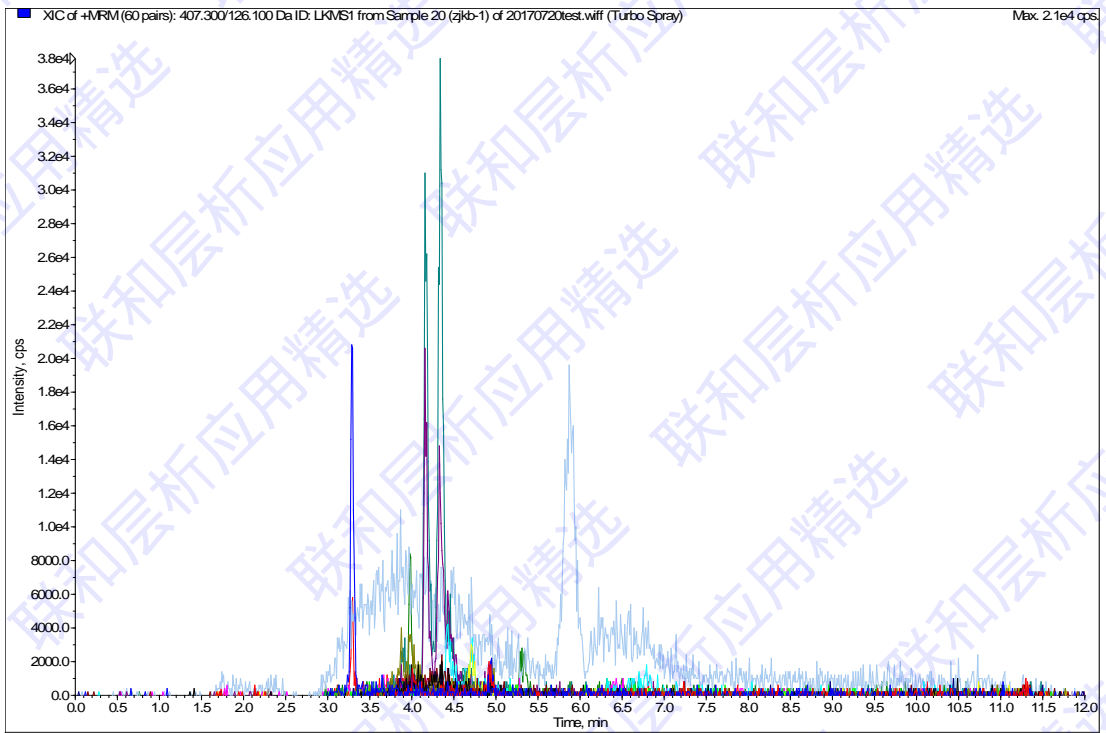


图18 某基质阳性水样MRM图

(其中检出阿奇霉素: 0.4ng/L,红霉素0.83ng/L,克林霉素0.38ng/L)



## 5、重复性、检出限、回收率

表3 某空白水样加标11种抗生素的回收试验 (n=6)

Compounds	Linear Range(ng/L)	Correlation coefficients	Added(n g/L)	Recoveries(%)	RSD (%)	LOD(ng/L)
Azithromycin	1.0-50.0	0.9992	30.0	96.52	3.17	0.1
Clarithromycin	1.0-50.0	0.9988	30.0	90.18	6.03	0.1
Erythromycin	1.0-50.0	0.9998	30.0	97.60	2.23	0.1
Lincomycin	1.0-50.0	0.9989	30.0	99.42	7.49	0.1
Roxithromycin	1.0-50.0	0.9995	30.0	98.45	2.87	0.1
VirginiamycinsM <sub>1</sub>	1.0-50.0	0.9995	30.0	98.86	2.81	0.5
VirginiamycinsS <sub>1</sub>	1.0-50.0	0.9996	30.0	101.4	4.98	0.5
Ometoprim	1.0-50.0	0.9993	30.0	96.49	3.52	0.1
Clindamycin	1.0-50.0	0.9991	30.0	99.06	2.09	0.1
Oleandomycin	1.0-50.0	0.9993	30.0	95.16	2.87	0.2
Tilmicosin	1.0-50.0	0.9980	30.0	94.31	7.48	0.5

本文采用在线SPE富集净化的前处理、联用LC-MS/MS检测的方法，在优化后的实验条件下，用基质空白水溶液配制系列浓度的标准溶液，以每种目标物定量例子的峰面积与浓度来绘制标准曲线。从表3可以看出11种抗生素的在对应的范围内线性关系良好，相关系数均大于0.995；并对某空白水样进行6次加标回收实验，回收率在85%-110%之间，相对标准偏差皆小于10%，对应的11种抗生素检出限（LOD，按S/N=3计算）在0.1-0.5ng/L之间，说明方法的灵敏度和精密度较好，适合水样中多种抗生素残留的同时检测。