

# 解决方案 水产品中大环内脂类化合物的测定解决方案

## 关键词

全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；高效液相色谱-串联质谱；大环内脂类抗生素

## 介绍

大环内酯类（Macrolides）（图1）是由链霉菌产生的一类弱碱性抗生素、因分子中含有一个内酯结构的十四员或十六员大环而得名。属十四员大环的抗生素有红霉素、罗红霉素和竹桃霉素；属十六员大环的有吉他霉素、替米考星、泰乐霉素、螺旋霉素和交沙霉素等。过多地使用大环内脂类药物会对人体消化道产生极强的副作用，使人恶心，干呕，腹胀腹泻等，严重的可致人不可逆的耳聋。大环内脂类药物在养殖业中的应用较为普遍，然而近年来多起抗生素药物残留超标事件使得水产品的安全性也遭到了质疑。各国制定的食品药物残留标准要求对我国水产品进出口造成了一定的影响，也对我国的水产养殖提出了更高的要求。

本方法参考GB/T20762-2006方法中对大环内脂的检测，采用乙腈对目标化合物进行提取，以HLB柱对样品进行净化，最终采用液质联用实现对大环内脂的检测。

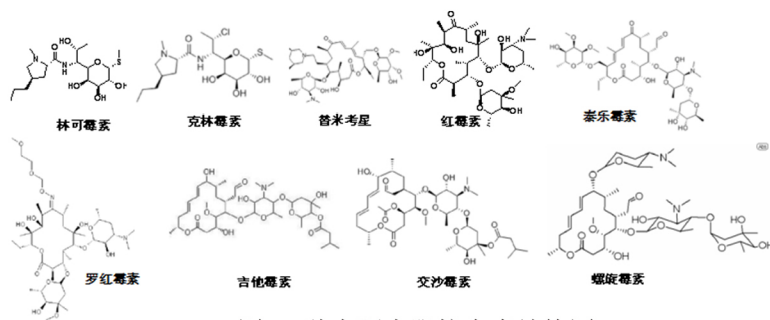


图1. 9种大环内脂抗生素结构图

## 1. 仪器与试剂

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol MPE 16 高通量真空平行浓缩仪

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

Agilent 1260 高效液相色谱 (HPLC), Agilent 6410 质谱检测器 (MS)

HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 500 mg/6 mL,

RC-204-36477)

甲醇 (优级纯), 水

0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液: 取 6 g 磷酸氢二钠溶解于 450 mL 水中, 用氢氧化钠溶液调节 pH=8, 用水定容至 500 mL。

## 2. 标准溶液的配制

将 1000.0 µg/mL 的单标储备液取出, 于室温平衡后用 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站配成浓度为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.50 µg/mL 的标准工作曲线。



序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积(mL)	目标位	目标浓度	目标体积(mL)	溶剂	洗针溶剂
1	填充管路						3.00	50%乙腈水	
2	配液	A1-9	1000.00	1.50	A21	10.00	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
3	直接稀释	A21	10.00	1.00	A22	1.00	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
4	直接稀释	A22	1.00	1.00	A31	0.01	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
5	直接稀释	A22	1.00	1.00	A32	0.02	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
6	直接稀释	A22	1.00	1.00	A33	0.05	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
7	直接稀释	A21	10.00	1.00	A34	0.10	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
8	直接稀释	A21	10.00	1.00	A35	0.50	1.00	50%乙腈水	50%乙腈水
9	方法结束								

## 3. 样品前处理

### 3.1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪
固相萃取柱	HLB (RayCure, 500 mg/6 mL)
活化	甲醇
淋洗	水、30%甲醇水溶液
洗脱	甲醇

### 3.2 提取

准确称取搅碎后的罗非鱼样品 5.0 g 于 50 mL 离心瓶中, 加入 2.0 g 无水硫酸钠, 加入 20 mL 乙腈, 用 AH-30 全自动均质器均质 1.0 min, 3800 rpm

离心 5.0 min, 残渣再用 20mL 乙腈提取一次。合并 2 次上清液于 250 mL 分液漏斗中, 加入 20 mL 乙腈饱和的正己烷, 振摇 20 s, 静置取下层乙腈溶液。将所得乙腈溶液于 MPE 16 高通量真空平行浓缩仪浓缩至近干, 加入 10 mL 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L), 摇匀备用。

### 3.3 净化

分别以 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化 HLB 柱 (Oasis 500 mg, 6 mL) 后, 将上述的样品液以 2 mL/min 的速度进行上样, 并用 3 mL 的水溶液清洗样品瓶。以 10 mL 水对固相萃取柱进行淋洗除去残留的无机盐; 以 30% 的甲醇水溶液对固相萃取柱上的杂质进行淋洗。在 20 psi 的氮气流下吹干 HLB 柱, 最后以 10 mL 的甲醇洗脱目标化合物 (具体的净化步骤

请见图 2)。将所得洗脱液在 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪上浓缩至近干，温度为 40 °C，加入 50 % 乙腈水溶液定容至 1 mL，上机测试。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH3OH		40	5	1.7
2	活化	CH3OH	废液1	10	5	0.9
3	活化	H2O	废液1	10	5	0.9
4	上样		废液1	2	10	5.8
5	清洗样品瓶	H2O	废液1	100	3	2.3
6	淋洗	H2O	废液1	20	10	1.1
7	淋洗	30%甲醇水溶液	废液1	10	5	0.9
8	气推		废液1	40	10	1.1
9	吹干					15
10	清洗注射泵	CH3OH		10	5	0.9
11	洗脱	CH3OH	收集	2	10	5.8
12	气推		收集	10	5	1.1
13	结束					
14						

图 2. Fotector Plus 大环内脂类化合物固相萃取方法

## 4. 检测条件

### 4.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×2.1 mm×50 mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: 10mM ammonium acetic (0.1% formic acid), B: Methanol
柱温	35 °C
进样体积	10 μL
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI <sup>+</sup>
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 °C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	0.0-1.5 min, 93%流动相 A; 1.5-3.0 min, 60%的流动相 A; 3.0-3.5 min 10%流动相 A, 保持 2 min; 5.50-6.0 min, 93%的流动相 A; 6.00-10.0 min, 93%的流动相 A。

### 4.2 MRM 参数

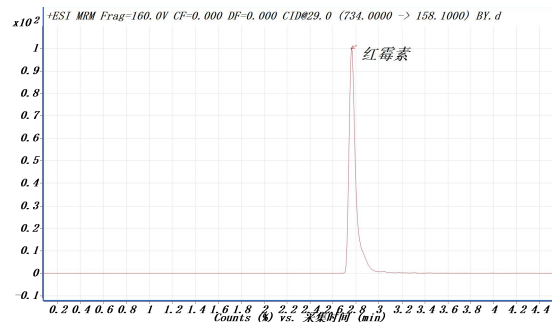
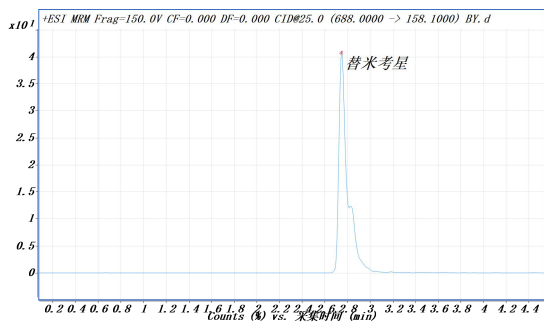
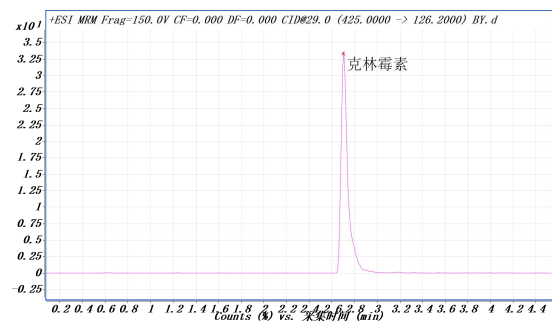
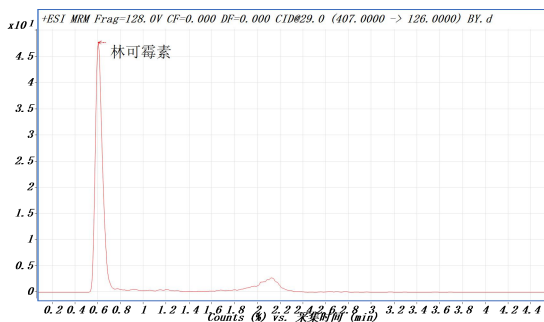
表 1. 9 种大环内脂的串联质谱检测参数

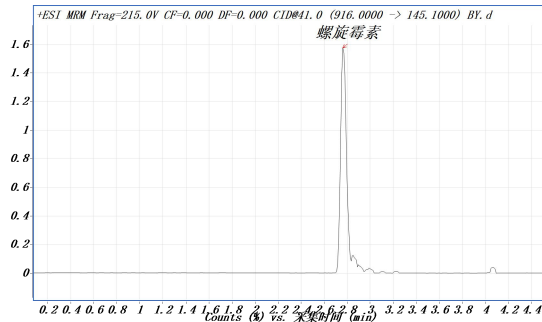
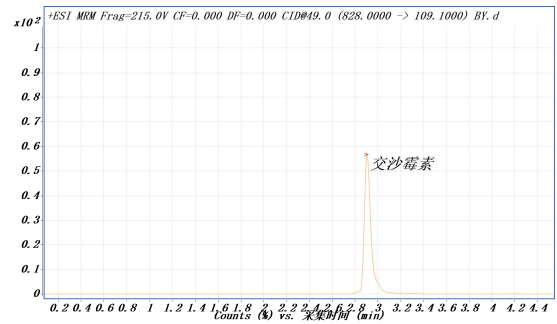
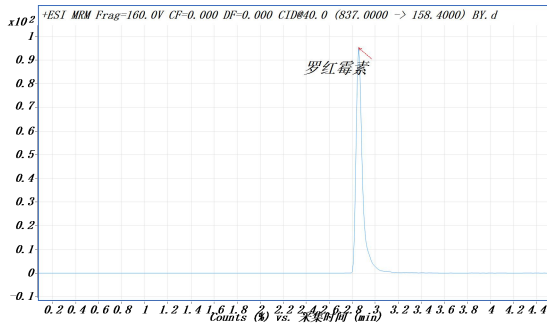
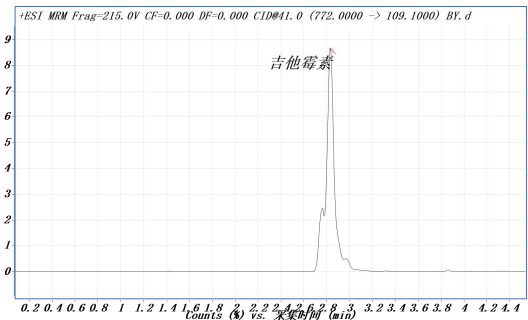
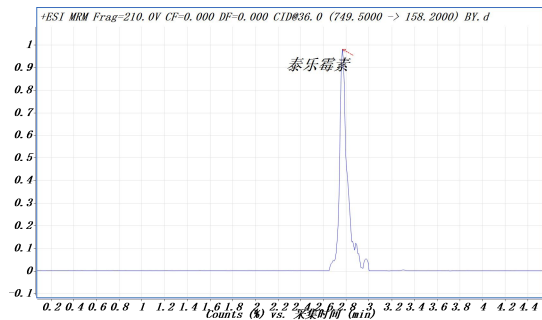
Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
林可霉素	407	359.1	20	128	13	7
		126	20	128	29	7

克林霉素	425	174.1	20	215	37	7
		377.2	20	150	17	7
		126.2	20	150	29	7
替米考星	869	696.5	20	215	41	7
		174.3	20	215	49	7
红霉素	734	576.4	20	160	13	7
		158.1	20	160	29	7
泰乐霉素	916	145.1	20	215	41	7
		174.1	20	215	37	7
吉他霉素	772	215.2	20	215	22	7
		174.2	20	215	29	7
		109.1	20	215	41	7
罗红霉素	837	158.4	20	160	40	7
		158.4	20	160	40	7
交沙霉素	828	174.1	20	215	33	7
		109.1	20	215	49	7
螺旋霉素	843	174.2	20	185	25	7
		109.1	20	185	41	7

### 4.3 MRM 色谱图

以下为 9 种大环内脂类化合物的标准溶液 (50 ppb) 在液相色谱质谱联用仪上的质谱图:





## 5. 样品测试

### 5.1 基质效应验证

为了消除基质带来的离子抑制对定量测定的影响，需用空白样品提取液来配制标准工作曲线。如果基质加标浓度准确，则可以直接用标准曲线对样品进行定量；如果不准确，请使用基质加标做工作曲线进行定量。

选择定量离子的峰面积作为纵坐标，浓度作为横坐标，做相关曲线，曲线为线性回归，各点权重

相等，拟合出工作曲线，要求  $R^2 > 0.995$ ；此曲线两周需要重新配置一次。

### 5.2 样品基质加标测试

取罗非鱼样品 (5.0 g)，加入上述 9 种大环内脂类标准品 (20 uL, 1 ug/mL)，进行加标回收验证 (n=3)。测试结果如表-2 所示，9 种大环内脂的平均回收率在 77.66–113.38% 之间，RSD 值均控制在 10% 以内，说明该方法能够很好地运用于水产品中 9 种大环内脂的检测。

表 2.9 种化合物的加标回收率及 RSD 值 (20 ug/kg)

化合物 (Compound)	回收率 (%)			平均回收率 Average Recoveries (%)	RSD (%)
	样品-1 Sample-1	样品-2 Sample-2	样品-3 Sample-3		
林可霉素	74.33	77.96	80.71	77.66	4.12
替米考星	90.09	94.17	93.17	92.48	2.30

克林霉素	115.39	113.06	111.71	113.38	1.64
红霉素	88.83	88.58	91.37	89.59	1.72
泰乐霉素	86.40	82.98	96.29	88.56	7.81
吉他霉素	88.78	94.03	99.90	94.24	5.90
罗红霉素	90.13	79.34	82.28	83.92	6.65
交沙霉素	94.66	89.77	81.86	95.43	7.28
螺旋霉素	108.98	110.40	113.71	111.03	2.18

## 6. 结果与结论

7.1 大环内脂类化合物对酸碱性较敏感，在固相萃取净化前需要用磷酸盐缓冲液溶解残渣，控制样品液的 pH 值在合适范围内。

7.2 洗脱液在氮吹步骤时应以吹至近干为宜，不可过于干燥，否则会导致回收率偏低。

## 7. 解决方案的优势

睿科 AH-30 全自动均质器实现多任务的高通量均质，完全取代了手动均质的过程。一次最多处理 32 个样品，大大提高工作效率。

睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站能够实现混标制备、标准曲线制备、样品添加和

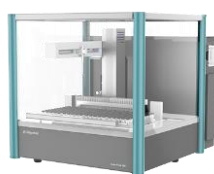
分液等液体样品处理功能，全程无需人员值守，极大减轻工作量并且保护实验人员的身体健康；同时仪器程序化运行可以有效避免人为误差，保证曲线的精密性和准确性。

Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。

MPE 真空平行浓缩仪/AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪，大大地提高了样品前处理效率，真正完全解放实验室人员劳动。



全自动均质器  
均质



全自动液体样品处理工作站  
标曲配制



高通量真空平行浓缩仪  
预浓缩



全自动固相萃取仪  
净化



全自动平行浓缩仪  
浓缩



睿科集团股份有限公司  
RayKol Group Corp., Ltd.

## 自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: [www.raykol.com](http://www.raykol.com)

电话: 400-885-1816

邮箱: [info@raykol.com](mailto:info@raykol.com)



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020年5月版