

高效液相色谱-串联质谱法测定蜂王浆中红霉素及其代谢物

张晓燕*, 朱文君, 刘艳, 陈磊, 殷耀, 黄娟, 陈惠兰, 吴斌, 沈崇钰

(江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 国家蜂产品基准实验室, 南京 210001)

摘要: **目的** 建立蜂王浆中红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A 和 N-脱甲基红霉素 A 的高效液相色谱-串联质谱检测方法。**方法** 以 pH 6.0 磷酸盐缓冲液为提取剂, 经 HLB 小柱净化富集后, 采用高效液相色谱-串联质谱仪分析。采用 Agilent Polaris C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.0 mm, 5 μm), 以甲醇和 0.1% 甲酸为流动相, 质谱模式为电喷雾正离子监测。**结果** 该方法前处理简单, 线性范围为 2.0~100 μg/L, 相关系数在 0.99 以上, 四种化合物的检出限和定量限分别为 0.5 μg/kg 和 5.0 μg/kg。方法采用内标法定量, 回收率范围为 70.0~118.1%, 相对标准偏差小于 10%。**结论** 方法回收率稳定且重现性较好, 能够满足日常检测工作的需要。

关键词: 蜂王浆; 红霉素; 代谢物; 液相色谱-串联质谱法

Determination of erythromycin A and its metabolites in royal jelly by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Xiao-Yan*, ZHU Wen-Jun, LIU Yan, CHEN Lei, YIN Yao, HUANG Juan, CHEN Hui-Lan, WU Bin, SHEN Chong-Yu

(National Honey Reference Laboratory, Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT: Objective To established a method for determination of erythromycin A, erythromycin A enol ether, anhydroerythromycin A and N-demethyl erythromycin A by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was extracted with pH 6.0 phosphate buffer and cleaned-up by HLB column and then analyzed by LC-MS with electrospray positive ionization. Separations were performed on an Agilent Polaris C₁₈ column (100 mm × 2.0 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.1% formic acid. **Results** Under the optimal conditions, the calibration curves were linear in the ranges of 2.0~100.0 μg/L with the correlation coefficients more than 0.99 while the limit of detection and limit of quantitation were 0.5 and 5.0 μg/kg, respectively. The internal standard was used for quantitative analysis. The recoveries ranged from 70.0 % to 118.1 % with RSDs less than 10%. **Conclusion** The method with higher recoveries and better precision could meet the needs of practical analysis.

基金项目: 江苏省大型科学仪器服务平台项目(BZ201302), 江苏省“333 工程”科研项目(BRA2013276)

Fund: Supported by the Program of Large Scientific Instrument Service Platform in Jiangsu Province (BZ201302) and the Research Program of 333 Engineering in Jiangsu Province (BRA2013276)

*通讯作者: 张晓燕, 工程师, 主要研究方向为食品兽药残留检测。E-mail: zhangxy@jsciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHANG Xiao-Yan, Engineer, Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 99 Zhonghua Road, Nanjing 210001, China. E-mail: zhangxy@jsciq.gov.cn

KEY WORDS: royal jelly; erythromycin; metabolite; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

美洲幼虫腐臭病(american foulbrood, AFB)是蜜蜂的一种严重细菌性传染病, 这种病一旦感染, 不易治愈而且容易复发。土霉素被认为是治疗 AFB 的有效药物, 并被广泛使用。但是, 随着细菌对土霉素耐药性的增加, 如何控制已经对土霉素产生了抗性的美洲幼虫腐臭病成为蜂病防治的新课题, 很多人将注意力投向使用其他抗生素来代替土霉素。目前大环内酯类抗生素已成为防治美洲幼虫腐臭病的新方向, 研究发现红霉素对于有土霉素耐受性的美洲幼虫腐臭病有较好的效果^[1]。红霉素的大量使用或使用后停药期不够长均可能导致红霉素在蜂产品中的残留, 从而使人体产生过敏反应等副作用。

目前测定红霉素的方法主要为液相色谱-串联质谱法, 涉及的蜂产品基质主要是蜂蜜^[2-5], 这些方法具有较好的灵敏度和重现性, 对于检出蜂蜜样品中的红霉素残留十分有效。但是, 目前还没有关于蜂王浆中红霉素检测的相关报道。由于蜂王浆呈酸性, pH 为 3.9~4.1, 而红霉素在酸性条件下不稳定, 易降解成红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A, 这些酸性降解产物被认为是红霉素使人体产生胃肠道反应的主要原因^[6]。此外, 红霉素在动物体内的代谢除了酸降解, 还有脱甲基化。N-脱甲基红霉素 A 是红霉素 A 脱甲基化后的产物, Kibwaqe 等^[7]于 1988 年在饲喂红霉素 A 的 Wister 大鼠中检测到了该代谢物。目前还没有关于蜂王浆中红霉素代谢物的研究, 也无相关国家标准和行业标准。本方法以红霉素在动物中的代谢产物为参考, 研究了蜂王浆中红霉素的主要降解产物, 并建立了红霉素及其主要代谢物的液相色谱串联质谱检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan Surveyor 液相色谱系统和 TSQ Vantage 串联四级杆质谱仪, 配有电喷雾离子源(Electron Spray Ionization, ESI); 2-16PK 离心机(德国 Sigma 公司); N-EVAPTM111 氮吹仪(美国

Organomation Associates 公司); 超纯水器(MILLIPORE 公司)。

红霉素 A(97%, USP)、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A、N-脱甲基红霉素 A、伪红霉素 A 烯醇醚和 ¹³C,D3-红霉素 A 标准品(纯度均在 95%以上, Toronto Research Chemicals Inc.)。磷酸二氢钾、氢氧化钠均为国产分析纯, 甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司), 甲酸为色谱纯(美国 ACS 恩科化学)。

0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0): 称取 13.6 g KH₂PO₄, 用 300 mL 水溶解, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0, 用水定容至 500 mL。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

蜂王浆样品来源于国家残留监控样品以及日常检测样品。

称取蜂王浆样品 2.00(±0.05) g 于 50 mL 具塞聚丙烯离心管中, 加入 50 μL 0.5 μg/mL 的 ¹³C, D3-红霉素 A 和伪红霉素 A 烯醇醚溶液, 加入磷酸盐缓冲液 15 mL, 涡旋混匀 1 min, 于 8000 r/min 离心 3 min, 上清液过滤于一干净玻璃离心管中, 过 HLB 小柱(预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水处理)净化。上样后用 3 mL 水淋洗, 用 5 mL 甲醇洗脱。洗脱液于 45 °C 水浴氮气吹干, 残渣用 1.0 mL 甲醇-水(v:v=3:7)溶解, 供液相色谱串联质谱仪测定。

2.2.2 标准溶液及内标溶液的配制

将红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A 和 N-脱甲基红霉素 A 用甲醇溶解并配成 0.5 mg/mL 的单标储备液。分别吸取上述标准溶液, 用甲醇逐级稀释并配成 0.5 μg/mL 的混合溶液。根据实际检测需求, 按照 2、5、10、25、50 和 100 μg/L 的浓度配成 6 点标准工作溶液。将伪红霉素 A 烯醇醚和 ¹³C,D3-红霉素 A 用甲醇溶解并配成 0.5 mg/mL 的标准溶液, 在分析测定时加入到标准溶液和样品提取液中, 保持内标的质量浓度为 25 μg/L。

2.2.3 分析测定条件

HPLC 条件: Varian Polaris C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: A, 0.1%甲酸水溶液, B, 甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1 min 10%A, 1.1~2 min

10~60%A, 2~7 min 60%A, 7~8 min 60~90% A, 8~9 min 90%A, 9.1~11 min 10%A; 流速: 0.25 mL/min; 柱温为室温, 进样体积为 25 μ L。

MS/MS 条件: 采用 ESI 源, 正离子方式检测; 喷射电压: 2500 V; 鞘气 (Sheath Gas) 55, 辅助气 (Auxiliary Gas) 6。其他质谱条件见表 1。

3 结果与讨论

3.1 提取液的选择

由于红霉素 A 在酸性 (pH<4) 条件下不稳定, 在 pH 6~8 的中性溶液中较稳定, 所以对提取液的 pH 值进行了优化, 选择了 pH 5.0~9.0 的磷酸盐缓冲液, 考察了不同 pH 值缓冲溶液对几种化合物的提取效率, 结果如图 1 所示。

由图可知, 对于红霉素 A 和 N-脱甲基红霉素 A, 采用 pH 5.0 的提取液时峰面积较小, 采用 pH 6.0 至 pH 9.0 的提取液峰面积类似; 而对于红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A, 采用 pH 6.0 以下的提取液峰面积较高, 随着 pH 值升高, 峰面积减小。所以最终选择了 pH 值为 6.0 的磷酸盐缓冲液作为提取溶液, 四种化合物的提取效率均较好。

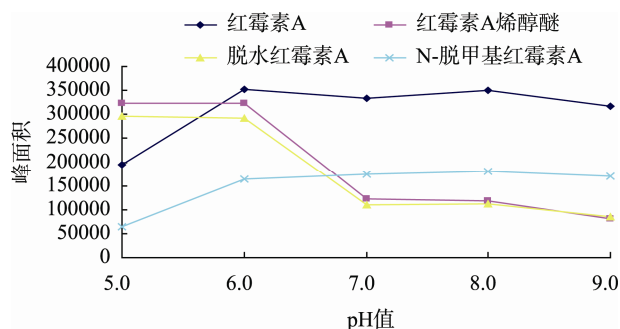


图 1 缓冲液 pH 值对目标物的影响

Fig. 1 The effect on compounds when extracted by buffer solution with different pH values

3.2 内标的选择

LC-MS 普遍存在基质效应, 基质效应会影响检测结果的准确性^[8], 所以评价了蜂王浆基质对 4 种化合物的影响: 在按照“2.2.1”步骤处理好的阴性样品溶液中添加红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、N-脱甲基红霉素 A 和脱水红霉素 A (添加水平为 20.0 μ g/kg) (Sp-jelly1), 同时在阴性样品中加入相同浓度的上述 4 种化合物后, 按照“2.2.1”步骤处理 (Sp-jelly2), 比较样品基质及前处理过程对测定结果的影响, 结果见表 2。

表 1 6 种化合物的母离子、子离子和碰撞能量

Table 1 Parent ions, daughter ions and collision energies of six compounds

化合物 Compounds	母离子 Parent ions	子离子 Daughter ions	碰撞能量 Collision energy
红霉素 A	734.3	158.0*	32
		576.0	17
N-脱甲基红霉素 A	720.5	144.1*	26
		562.5	18
		158.1*	29
红霉素 A 烯醇醚	716.5	522.4	19
		558.4	14
		158.1*	29
脱水红霉素 A	716.5	522.4	19
		558.4	14
		158.1*	29
伪红霉素 A 烯醇醚	716.5	522.4	19
		558.4	14
		158.1*	29
¹³ C,D3-红霉素 A	738.6	161.9*	32
		580.4	17

*quantitation ions

表 2 样品基质及前处理过程对测定结果的影响
Table 2 The effect of matrix and pretreatment on compounds

	峰面积($\times 10^4$) Peak areas($\times 10^4$)			
	红霉素 A	红霉素 A 烯醇醚	脱水红霉素 A	N-脱甲基红霉素 A
标准溶液(20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	47.2	50.3	12.2	26.3
Sp-jelly1(20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	62.6	77.0	30.7	31.4
Sp-jelly2(20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	18.3	21.3	16.5	8.1

由表可知, Sp-jelly1 的响应高于相同浓度的标准溶液, 表明蜂王浆基质对目标物信号有明显增强作用; Sp-jelly2 中红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A、N-脱甲基红霉素 A 四种化合物的峰面积分别为 Sp-jelly1 的 29%、28%、54% 和 26%, 表明在前处理过程中有部分损失。通过引入内标可以校正前处理的损失, 并消除基质效应的影响, 实验发现以 $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -红霉素 A 为内标可以使红霉素 A、N-脱甲基红霉素 A 和红霉素 A 烯醇醚 3 种目标物得到满意的回收率, 而脱水红霉素 A 的回收率仍偏高。伪红霉素 A 烯醇醚是红霉素 A 水溶液在弱碱性条件下, 通过伪一阶动力学产生的另外一种代谢产物^[9], 实验发现在阴性蜂王浆和检出红霉素阳性的蜂王浆中均不存在该化合物, 将其添加到蜂王浆中作为脱水红霉素 A 内标, 可以使脱水红霉素 A 获得满意的回收率。

3.3 蜂王浆中红霉素 A 的稳定性

在蜂王浆样品中添加红霉素 A 标准溶液, 添加水平为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 选择了 4 $^\circ\text{C}$ 和 -18 $^\circ\text{C}$ 两种温度, 即添加红霉素 A 的蜂王浆样品分别放置于 4 $^\circ\text{C}$ 和 -18 $^\circ\text{C}$ 冰箱。样品制好后于不同时间检测蜂王浆中红霉素 A 的含量, 具体见图 2。由图可知, 在两种温度下放置的蜂王浆中红霉素 A 均会出现不同程度的降解, 储存于 4 $^\circ\text{C}$ 的蜂王浆红霉素降解较快, 储存于 -18 $^\circ\text{C}$ 的蜂王浆红霉素降解稍慢。

3.4 蜂王浆中红霉素 A 的代谢物

红霉素在酸性条件下, C_6 上的羟基与 C_9 上的酮羰基形成半缩酮, 其羟基与 C_8 上的氢消去一分子水, 形成 8,9-脱水-6,9-半缩酮, 即红霉素 A 烯醇醚; 然后 C_{12} 上的羟基与 C_8 、 C_9 双键加成, 分子内环合, 生成 6,9-脱水-9,12-螺缩酮, 即脱水红霉素 A^[10,11]。此外, Thomas 等^[12]对蜂蜜中的红霉素降解产物进行了研究, 发现红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A 也是红霉素在蜂蜜中的降解产物。对检出红霉素的蜂王浆样品进行

分析后发现, 蜂王浆中主要存在红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A 两种代谢产物, 未检测到 N-脱甲基红霉素 A, 标准溶液、阴性及阳性蜂王浆样品的色谱图见图 3。

3.5 分析方法的评价

3.5.1 线性方程、相关系数、检出限和定量限

配制质量浓度在 2.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间的系列标准溶液, 以待测物与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标, 待测物的质量浓度(X, $\mu\text{g}/\text{L}$)为横坐标进行线性回归, 线性方程、相关系数见表 3, 4 种化合物线性关系良好, 相关系数均大于 0.99。

根据标准品的信噪比($S/N=3$), 确定方法的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在阴性蜂王浆样品中添加待测物标准溶液, 提取净化后进行测定, 确定定量限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.5.2 方法学考察

在阴性蜂王浆中添加 3 个水平(5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A 和 N-脱甲基红霉素 A, 每个水平做 6 个平行, 按照“2.2.1”方法处理, 进行回收率实验, 结果见表 3。由表可知, 4 种化合物的回收率范围为 70.0~118.1%,

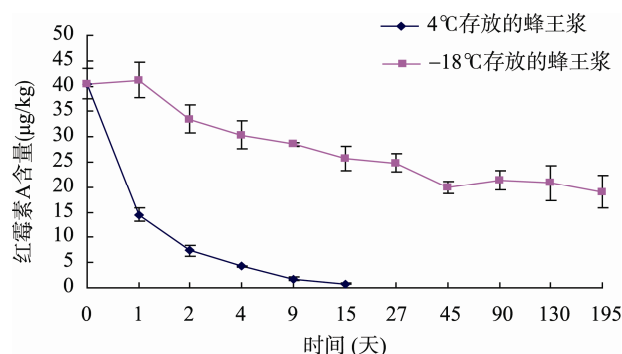


图 2 蜂王浆放置过程中红霉素 A 含量的变化
Fig. 2 Content Variation of erythromycin A in royal jelly during reseration

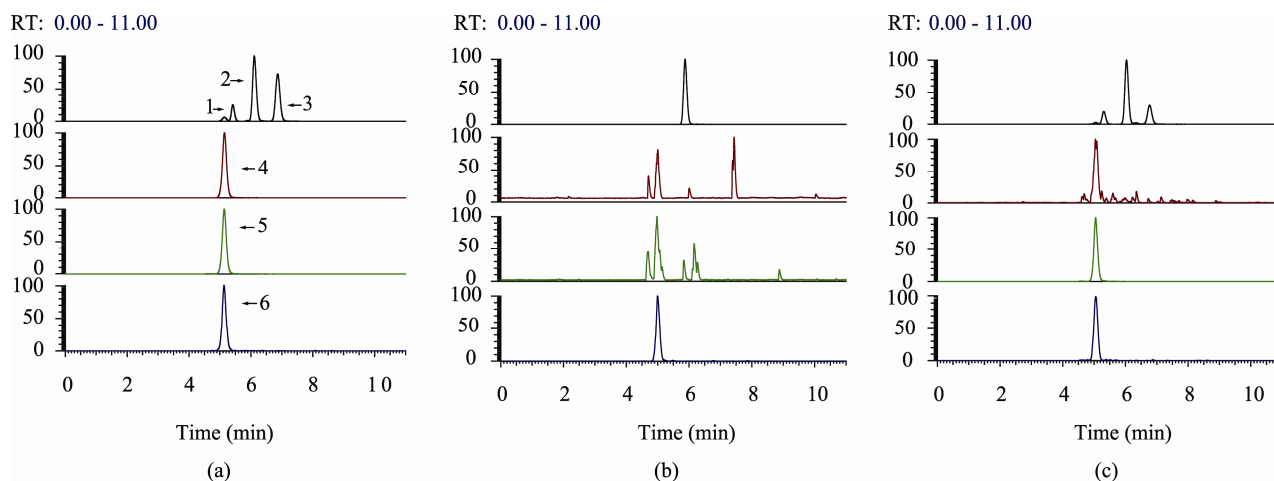


图3 (a)标准溶液色谱图; (b)阴性样品色谱图; (c)阳性样品色谱图

1 脱水红霉素 A、2 伪红霉素 A 烯醇醚、3 红霉素 A 烯醇醚、4 N-脱甲基红霉素 A、5 红霉素 A、6 ¹³C₃D₃-红霉素 A

Fig. 3 (a) Chromatography of standard solution; (b) Chromatography of negative samples; (c) Chromatography of positive samples

1 Anhydroerythromycin A, 2 Pseudoerythromycin, 3 Erythromycin A enol ether, 4 N-Demethylerythromycin A, 5 Erythromycin A, 6 ¹³C₃D₃- Erythromycin A

表3 线性方程和相关系数

Table 3 Linear equation and related coefficient

化合物 compound	线性方程 Linear equation	相关系数 related coefficient
红霉素 A	$Y=3.59257X+0.222592$	0.9997
红霉素 A 烯醇醚	$Y=3.43758X-0.53667$	0.9979
脱水红霉素 A	$Y=0.026205X+0.00664536$	0.9981
N-脱甲基红霉素 A	$Y=2.12829X+0.31783$	0.9997

表4 回收率和精密度数据

Table 4 Data for recovery and precision

化合物 Compounds	添加水平 Added levels (μg/kg)	检测值 Measured values (μg/kg, n=6)	回收率 Recovery (% , n=6)	RSD (% , n=6)
红霉素 A	5	4.34	86.8	6.6
	10	8.85	88.5	8.3
	20	17.79	89.0	4.2
红霉素 A 烯醇醚	5	5.07	101.5	9.8
	10	10.80	108.0	8.4
	20	23.62	118.1	8.5
脱水红霉素 A	5	5.21	104.2	6.8
	10	10.89	108.9	6.6
	20	22.95	114.8	3.7
N-脱甲基红霉素 A	5	3.58	71.6	5.3
	10	7.31	73.1	8.5
	20	14.00	70.0	2.3

相对标准偏差为 2.3~9.8 %, 方法的准确度和精密密度均达到残留分析方法的要求。

3.6 实际样品的测定

采用本方法检测了 30 个蜂王浆样品, 其中 1 个样品检出红霉素 A, 含量为 12.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2 个样品检出红霉素 A 烯醇醚, 含量在 8.7~13.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2 个检出脱水红霉素 A, 含量在 29.5~296.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4 结 论

本文采用高效液相色谱串联质谱法建立了蜂王浆中的红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚、脱水红霉素 A 和 N-脱甲基红霉素 A 的检测方法, 方法前处理简单, 回收率稳定且重现性较好。同时对蜂王浆中红霉素的稳定性进行了研究, 发现红霉素在蜂王浆中主要有两种代谢产物: 红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A。由于红霉素稳定性差, 易降解, 所以在测定蜂王浆中红霉素残留时, 不仅要检测原药, 也需要检测其代谢物。

参考文献

- [1] Kochansky J, Knox DA, Feldlaufer M, *et al.* Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and resistant *Paenibacillus larvae*[J]. *Apidologie*, 2001, 32: 215-222
- [2] Granja R, Niño AM, Zucchetti R, *et al.* Determination of erythromycin and tylosin residues in honey by LC/MS/MS [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(3): 975-980.
- [3] Gunes N, Cibik R, Gunes ME, *et al.* Erythromycin residue in honey from the Southern Marmara region of Turkey[J]. *Food Addit Contam A*. 2008, 25(11): 1313-1317.
- [4] 徐锦忠, 吴忠贤, 杨雯笈, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱测定蜂蜜中 8 种大环内酯类药物残留[J]. *分析化学*, 2007, 35(2): 166-170.
Xu JZ, Wu ZX, Yang WQ, *et al.* Determination of eight macrolide antibiotic residues in honey by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(2): 166-170.
- [5] 林洁, 曹建明, 蔡欣欣, 等. 超高效液相色谱三重四极杆质谱法快速测定蜂蜜中 12 种大环内酯和林可酰胺类药物残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(5): 959-962.
- [6] Lin J, Cao JM, Cai XX, *et al.* Rapid multiresidue analysis of 12 macrolides and lincoamides in honey by ultra performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Heal Lab Tech*, 2010, 20(5): 959-962.
- [7] Chorghade MS. *Drug Discovery and Development*[J]. *Euro: Wiley-VCH*, 2006: 6.
- [8] Kibwage IO, Roets E, Verbruggen A, *et al.* Thin-layer chromatographic study of the metabolites of erythromycins in the wistar rat [J]. *J Chromatogr*. 1988, 434(1): 177-186.
- [9] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(6): 753-756.
Xiang P, Shen M, Zhuo XY. Matrix effects in liquid chromatographic- mass spectrometric analysis [J]. *J Instrum Anal*, 2009, 28(6): 753-756.
- [10] Kim YH, Heinze TM, Beger R, *et al.* A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution [J]. *Int J Pharm*, 2004, 271(1-2): 63-76.
- [11] 彭司勋. *药物化学*[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 394.
Peng SX. *Medicinal Chemistry* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 1999: 394.
- [12] 叶东, 邓志华, 梁建华, 等. 红霉素肟主杂质的分离和鉴定[J]. *北京理工大学学报*, 2002, 22(2): 244-246.
Ye D, Deng ZH, Liang JH, *et al.* Separation and identification of the main impurity in erythromycin oxime[J]. *J B Inst Techno*, 2002, 22(2): 244-246.
- [13] Thompson TS, Van den Heever JP. Degradation of erythromycin in honey and selection of suitable marker residues for food safety analysis [J]. *Food Chem*, 2012, 133(4): 1510-1520.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张晓燕, 工程师, 主要研究方向为食品兽药残留检测。

E-mail: huzhangxy@jsciq.gov.cn