

高效液相色谱 - 串联质谱法测定蜂蜜中的红霉素及其代谢物

张晓燕^{1*}, 郑定钊², 袁芳¹, 刘艳¹, 黄娟¹, 许蔚¹,
杨雯筌¹, 丁涛¹, 陈磊¹, 吴斌¹

(1. 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, 江苏 南京 210001;
2. 福建工贸学校, 福建 福州 350002)

摘要: 建立了高效液相色谱 - 串联质谱法检测蜂蜜中红霉素及其代谢物红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A 的测定方法。以 pH 7.0 的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法测定蜂蜜中红霉素及其代谢物的含量。该方法前处理简单, 采用内标法定量, 方法的线性范围为 2.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, 相关系数大于 0.996, 红霉素及其两种主要代谢物的检出限和定量下限分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率范围为 70.5% ~ 109.2%, RSD 小于 10%。方法的回收率稳定且重现性较好, 可用于蜂蜜中红霉素及其代谢物的检测。

关键词: 蜂蜜; 红霉素; 代谢物; 高效液相色谱 - 串联质谱

中图分类号: O657.63; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 4957(2013)09 - 1131 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2013.09.019

Determination of Erythromycin A and Its Metabolites in Honey by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Xiao-yan^{1*}, ZHENG Ding-zhao², YUAN Fang¹, LIU Yan¹, HUANG Juan¹, XU Wei¹,
YANG Wen-quan¹, DING Tao¹, CHEN Lei¹, WU Bin¹

(1. National Honey Reference Laboratory, Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of Jiangsu Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 2. Fujian Industry and Trading School, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric method for the determination of erythromycin A and its metabolites including erythromycin A enoether and anhydroerythromycin A was developed. The sample was extracted with pH 7.0 phosphate buffer and cleaned-up with HLB column. The detection of target compounds was performed by LC - MS with electrospray positive ionization under the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The internal standard method was used for quantitative analysis. Under the optimal conditions, the calibration curves were linear in the range of 2.0 - 100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ with correlation coefficients more than 0.996. The limits of detection and the limits of quantitation were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recoveries of three compounds at fortified levels of 2.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ranged from 70.5% to 109.2% with RSDs less than 10%. The method, with higher recoveries and good precision, was suitable for the determination of erythromycin A and its metabolites in honey.

Key words: honey; erythromycin; metabolite; high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC - MS/MS)

土霉素被认为是治疗美洲幼虫腐臭病 (AFB) 的有效药物, 并被广泛使用。但随着细菌对土霉素耐药性的增加, 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, 红霉素对有土霉素耐受性的美洲幼虫腐臭病有较好的效果^[1], 但红霉素的大量使用或使用后休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^[2]。

收稿日期: 2013 - 04 - 24; 修回日期: 2013 - 05 - 17

基金项目: 国家质检总局科技资助项目 (2011IK209)

* 通讯作者: 张晓燕, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品中兽药残留检测, Tel: 025 - 52345187, E-mail: zhangxy@jsci.gov.cn

目前测定红霉素的方法有薄层色谱法^[3-4]、液相色谱法^[5-6]以及液相色谱-串联质谱法^[7-8]等,液相色谱-串联质谱法灵敏度高、抗干扰能力强,已成为检测红霉素残留的主要方法^[2,9-13]。但由于蜂蜜呈弱酸性,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^[14]。但目前已有文献并无关于蜂蜜中红霉素代谢物的研究,也无相关代谢物检测的国家标准和行业标准,所以很有必要建立蜂蜜中红霉素代谢物的检测方法。本文研究了蜂蜜中红霉素的稳定性,并建立了蜂蜜中红霉素与其主要代谢物红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A 的液相色谱-串联质谱检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan Surveyor 液相色谱系统和 TSQ Vantage 串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(Electron Spray Ionization, ESI);涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);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 和红霉素 A-¹³C, D3 标准品(纯度均在 95% 以上,购自 Toronto Research Chemicals 公司),用甲醇溶解并配成 0.5 g/L 的标准储备液,再逐级稀释成 0.5 mg/L 的混合标准工作液。标准工作曲线按照 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L 的浓度配成标准溶液,配制时将 0.5 mg/L 红霉素 A-¹³C, D3 加入到标准工作溶液中,使其浓度为 50.0 μg/L。磷酸氢二钾、盐酸均为分析纯,甲醇、甲酸均为色谱纯。0.2 mol/L 磷酸氢二钾缓冲液:称取 22.8 g K₂HPO₄·3H₂O,用 300 mL 水溶解,用盐酸溶液调至 pH 7.0,用水定容至 500 mL。

1.2 样品前处理

1.2.1 样品提取与净化 称取蜂蜜样品 5.00(±0.05)g 于 50 mL 具塞聚丙烯离心管中,加入 50 μL 1.0 mg/L 的红霉素 A-¹³C, D3 内标和 15 mL 磷酸盐缓冲液,涡旋混匀 1 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(3:7)溶解,过 0.45 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.2.2 分析条件 HPLC 条件:Agilent Polaris C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 甲酸溶液(B);梯度洗脱程序:0~1 min:10% A, 1.1~2 min:10%~60% A, 2.1~7 min:60% A, 7.1~8 min:60%~90% A, 8.1~9 min:90% A, 9.0~9.1 min:90%~10% A, 9.1~11 min:10% A;流速为 0.25 mL/min;柱温为室温,进样体积为 25 μL。

MS/MS 条件:采用 ESI 源,正离子方式检测;扫描模式:多反应监测模式(MRM);喷射电压:2 500 V;鞘气(Sheath Gas)36 arb,辅助气(Auxiliary Gas)6 arb。其他质谱条件见表 1。

表 1 3 种化合物及内标的母离子、子离子和碰撞能量
Table 1 Parent ions, daughter ions and collision energy of three compounds and internal standard

Compound	Parent ion	Product ions	Collision energy(eV)
Erythromycin A	734.3	158.0*, 576.0	32, 17
Erythromycin A enolether	716.5	158.1*, 522.4, 558.4	29, 19, 14
Anhydroerythromycin A	716.5	158.1*, 522.4, 558.4	29, 19, 14
Erythromycin A- ¹³ C, D3	738.6	161.9, 580.4	32, 17

* quantitation ion

2 结果与讨论

2.1 蜂蜜中红霉素 A 的稳定性

蜂蜜为弱酸性,而红霉素在酸性条件下不稳定。在蜂蜜样品中添加 10 μg/kg 的红霉素 A 标准溶液,由于蜂蜜一般在室温保存,所以红霉素 A 的稳定性实验按照上述温度条件进行。样品制好后于不同时间检测蜂蜜中红霉素 A 的含量(见图 1)。实验发现,室温下,蜂蜜中的红霉素 A 降解很快,表明蜂蜜中的红霉素 A 不稳定。

2.2 蜂蜜中红霉素 A 的代谢物

根据红霉素 A 的性质, 在酸性条件下, 红霉素 A C6 上的羟基与 C9 上的酮羰基形成半缩酮, 其羟基与 C8 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 C12 上的羟基与 C8、C9 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^[15-16]。蜂蜜的 pH 值约为 3.9, 呈弱酸性, 对检出红霉素的蜂蜜样品进行分析后发现该蜂蜜中存在红霉素 A 的酸性降解产物红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A。图 2 为阳性蜂蜜样品及阴性蜂蜜样品的色谱图。

2.3 提取液的选择

由于红霉素 A 在酸性条件下不稳定, 在中性及弱碱性条件下稳定, 因此选择 pH 5.0~10.0 的磷酸盐缓冲液, 考察了不同 pH 值缓冲溶液对红霉素 A 及其代谢物的提取效率, 结果如表 2 所示。发现提取液 pH 值为 5.0 时, 红霉素 A 和脱水红霉素 A 基本无回收, pH 值大于 8.0 时, 脱水红霉素 A 的回收率较低, 最终选择 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液作为最佳提取液。

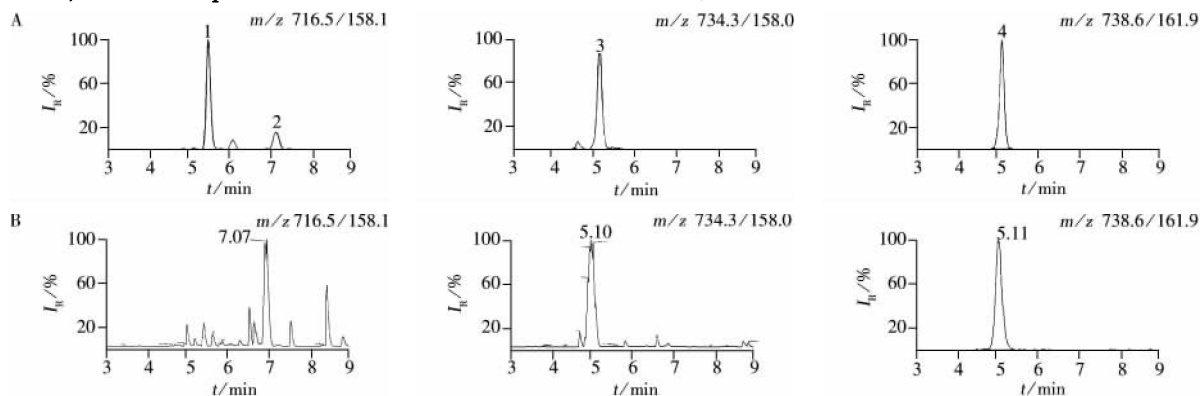


图 2 阳性蜂蜜样品(A)及阴性蜂蜜样品(B)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of positive honey(A) and negative honey(B)

1. erythromycin A enolether; 2. anhydroerythromycin A; 3. erythromycin A; 4. erythromycin A-¹³C, D₃

表 2 缓冲液 pH 值对绝对回收率的影响

Table 2 Recoveries of the compounds extracted by buffers with different pH values

Compound	pH value					
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
Erythromycin A	<10	46.8	54.5	47.2	41.7	42.8
Erythromycin A enolether	92.5	70.0	67.4	41.1	34.6	35.2
Anhydroerythromycin A	11.2	53.6	55.7	22.5	23.6	27.1

2.4 检测方法的比较

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^[17], 本实验评价了蜂蜜基质对红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A 3 种化合物测定的影响。在阴性蜂蜜中添加红霉素 A、红霉素 A 烯醇醚和脱水红霉素 A (添加水平均为 5.0 μg/kg) 后按照“1.2.1”步骤处理 (Sp-honey1), 同时在按照“1.2.1”步骤处理好的阴性样品中加入相同浓度的上述 3 种化合物 (Sp-honey2), 比较样品基质对测定结果的影响。结果显示, Sp-honey1 的目标物峰面积均为标准溶液的 40%~50%, 表明在前处理过程中目标物有部分损失; Sp-honey2 的目标物峰面积与标准溶液接近, 表明排除前处理的损失后, 蜂蜜基质对 3 种物质的测定结果无明显影响。通过引入同位素内标红霉素 A-¹³C, D₃, 可以校正前处理的损失, 从而获得满意的回收率。

2.5 线性范围、检出限及定量下限

配制质量浓度在 2.0~100.0 μg/L 间的系列标准溶液, 以待测物与内标的峰面积比值(γ)为纵坐

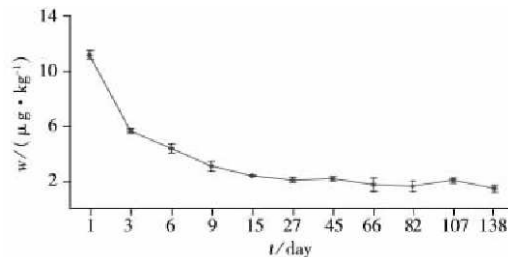


图 1 蜂蜜室温放置过程中红霉素 A 含量的变化
Fig. 1 Content variation of erythromycin A in honey during conservation at room temperature

标, 待测物的质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)为横坐标进行线性回归, 各化合物的线性方程及相关系数见表3。结果显示, 3种化合物在该范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.996。

根据标准品的信噪比($S/N=3$), 确定方法的检出限为0.5 $\mu\text{g/kg}$; 在阴性蜂蜜样品中添加待测物标准溶液, 提取净化后进行测定, 确定方法定量下限($S/N=10$)为2.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

在阴性蜂蜜中添加3个水平(2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/kg}$)的红霉素A、红霉素A烯醇醚和脱水红霉素A, 每个水平做6个平行, 按照“1.2.1”方法处理, 进行回收率实验, 结果见表3。由表3可知, 3种化合物的平均回收率为70.5%~109.2%, 相对标准偏差为1.7%~9.8%, 方法的准确度和精密度均达到残留分析方法的要求。

表3 3种化合物的线性方程、相关系数、回收率与精密度($n=6$)

Table 3 Regression equations, correlation coefficients of three compounds and the results of recovery and precision tests($n=6$)

Analyte	Regression equation	r^2	Added $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Found $\bar{w}/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
Erythromycin A	$y=0.095\ 66+1.969x$	0.999 6	2.0, 5.0, 10.0	1.84, 4.82, 9.44	92.0, 96.4, 94.4	1.7, 7.8, 2.7
Erythromycin A enolether	$y=0.039\ 11+0.312\ 0x$	0.996 8	2.0, 5.0, 10.0	1.47, 4.76, 10.44	73.5, 95.2, 104.4	6.2, 9.7, 4.3
Anhydroerythromycin A	$y=-0.170\ 5+1.564x$	0.998 8	2.0, 5.0, 10.0	1.41, 3.77, 10.92	70.5, 75.4, 109.2	3.8, 9.8, 8.2

2.6 实际样品的测定

采用该方法对150个蜂蜜样品进行检测, 其中1个样品检出12.8 $\mu\text{g/kg}$ 红霉素A, 4个样品检出红霉素A烯醇醚, 其含量为7.6~62.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

3 结论

本文对红霉素的稳定性进行研究, 并建立了蜂蜜中红霉素A、红霉素A烯醇醚和脱水红霉素A的高效液相色谱-串联质谱检测方法, 该方法前处理简单, 回收率稳定且重现性较好。对实际样品测试结果还表明, 测定蜂蜜中红霉素残留时, 要同时检测其代谢物。

参考文献:

- [1] Jan K, David A K, Mark F, Jeffery S P. *Apidologie*, **2001**, 32: 215-222.
- [2] Granja R, Niño A M, Zucchetti R, Niño R M, Patel R, Salerno A G. *J. AOAC Int.*, **2009**, 92(3): 975-980.
- [3] Han N Y, Zhou T. *Food Sci.* (韩南银, 周婷. 食品科学), **2003**, 24(2): 118-120.
- [4] Ramirez A, Gutiérrez R, Diaz G, González C, Pérez N, Vega S, Noa M. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 784: 315-322.
- [5] Yu H J, Shen X S, Li Q, Huang D M, Chen Y N, Jian L D. *Chin. J. Anal. Lab.* (于慧娟, 沈晓盛, 李庆, 黄冬梅, 陈轶男, 菅乐东. 分析实验室), **2006**, 25(4): 82-85.
- [6] Hui Y H, Yu H J, Cai Y Q, Zhou P G. *Marine Fisheries* (惠芸华, 于慧娟, 蔡友琼, 周培根. 海洋渔业), **2006**, 28(4): 321-325.
- [7] Yu H J, Cai Y Q, Hui Y H, Liu T, Jiang C J, Shen X S. *Chin. J. Anal. Chem.* (于慧娟, 蔡友琼, 惠芸华, 刘婷, 姜朝军, 沈晓盛. 分析化学), **2009**, 37(1): 91-94.
- [8] Bogialli S, Ciamparella C, Curini R, Di Corcia A, Laganà A. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(40): 6810-6815.
- [9] Gunes N, Cibik R, Gunes M E, Aydin L. *Food Addit. Contam. A*, **2008**, 25(11): 1313-1317.
- [10] Xu J Z, Wu Z X, Yang W Q, Yang G J, Chen Z X, Ding T, Shen C Y, Wu B, Jiang Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (徐锦忠, 吴忠贤, 杨雯莹, 杨功俊, 陈正行, 丁涛, 沈崇钰, 吴斌, 蒋原. 分析化学), **2007**, 35(2): 166-170.
- [11] Lin J, Cao J M, Cai X X, Zhang X Y. *Chin. J. Heal. Lab. Technol.* (林洁, 曹建明, 蔡欣欣, 张秀尧. 中国卫生检验杂志), **2010**, 20(5): 959-962.
- [12] Vidal J L, Aguilera-Luiz Mdel M, Romero-González R, Frenich A G. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57(5): 1760-1767.
- [13] Wang J. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52(2): 171-181.
- [14] Chorghade M S. *Drug Discovery and Development*. Euro: Wiley-VCH, **2006**: 6.
- [15] Peng S X. *Medicinal Chemistry*. Beijing: China Medical Science Press(彭司勋. 药物化学. 北京: 中国医药科技出版社), **1999**: 394.
- [16] Ye D, Deng Z H, Liang J H, Jin X H, Bai J R, Yao G W. *J. Beijing Inst. Technol.* (叶东, 邓志华, 梁建华, 金小红, 白景瑞, 姚国伟. 北京理工大学学报), **2002**, 22(2): 244-246.
- [17] Xiang P, Shen M, Zhuo X Y. *J. Instrum. Anal.* (向平, 沈敏, 卓先义. 分析测试学报), **2009**, 28(6): 753-756.