

## 【论著】

HPLC - MS/MS 法测定全蝎等动物类中药中维吉尼霉素 M<sub>1</sub>

王少敏, 俞灵, 陈静, 郑荣, 王柯, 季申\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**【摘要】** 目的: 建立全蝎等动物类中药中维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的 HPLC - MS/MS 测定方法。方法: 样品经酸化的 40% 甲醇提取、提取液再经过三氯甲烷萃取净化后, 用高效液相色谱 - 三重四级杆串联质谱进行分析测定。结果: 维吉尼霉素在 1 ng · ml<sup>-1</sup> ~ 250 ng · ml<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 线性方程为  $Y = 3.94 \times 10^4 X + 4.07 \times 10^3$ ,  $r = 0.9996$ , 回收率在 90.9 ~ 98.1% 之间。在全蝎中最低检测限分别为 0.7 μg · kg<sup>-1</sup>。蜈蚣、乌梢蛇、海马和水蛭等动物类药材的回收率也均在 85% ~ 95% 之间。结论: 本法灵敏、快速、准确、专属性强, 可用于全蝎等动物类中药中维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的测定。

**【关键词】** 维吉尼霉素 M<sub>1</sub>; 高效液相色谱 - 串联三重四级杆质谱; 全蝎

**【中图分类号】** O657.63

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1004 - 8685(2011)09 - 2142 - 03

Determination of Virginiamycin M<sub>1</sub> in Chinese herbs like scorpion by HPLC - MS/MS

WANG Shao - min, YU Ling, CHENG Jing, ZHENG Rong, WANG Ke, Ji Shen\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**【Abstract】 Objective:** To establish a HPLC - MS/MS method for determination of Virginiamycin M<sub>1</sub> in Chinese Herbs made by animal such as scorpion. **Methods:** After being extracted by acidified 40% methanol and purified by HLB SPE column, Virginiamycin M<sub>1</sub> was analyzed by HPLC - triple quadrupole MS. **Results:** There is a good linear relationship within the range of 1 ng · ml<sup>-1</sup> ~ 250 ng · ml<sup>-1</sup> for Virginiamycin M<sub>1</sub>. The regression equation is  $Y = 3.94 \times 10^4 X + 4.07 \times 10^3$ ,  $r = 0.9996$ . The recovery was between 90.9% ~ 98.1%. The LOD in Scorpion were 0.9 μg · kg<sup>-1</sup>. While the recovery of herbs like centipede, black snake, sea horse and leech was in the range of 85% ~ 95%. **Conclusion:** The method is sensitive, rapid, accurate and specific enough to determine Virginiamycin M<sub>1</sub> in Scorpion.

**【Key words】** Virginiamycin M<sub>1</sub>; HPLC - MS/MS; Scorpion

目前大多数动物类中药均为人工养殖。维吉尼霉素 M<sub>1</sub> (Virginiamycin M<sub>1</sub>) 是一种多肽类抗生素, 被广泛用于动物饲料添加剂和兽药中, 预防动物疾病、促进动物生长, 在动物类中药的养殖过程中亦被广泛使用。多肽类抗生素的毒性较大, 主要对肾、神经系统有一定毒性, 其在动物体内的残留可传递给人类, 造成危害。目前对维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的检测主要集中在家禽和猪肉中, 尚无中药中维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的检测方法<sup>[1, 2]</sup>, 为保证中药用药安全, 我们建立了检测动物类中药中维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的液相色谱 - 串联质谱测定法。

文献报道的维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的检测样品集中为家禽和猪的肌肉和肝脏中, 这些样品都含有大量水分, 基质相对简单。而动物类中药多为全体入药, 且经过炮制后, 基本干燥无水分, 肌肉相对较少, 且含有大量甲壳、毛发和其他部位, 因此对样品的前处理提出了较高的要求。本次试验经过摸索, 建立了一个简单、快速、准确、适用范围广的方法。

## 1 实验部分

## 1.1 仪器

Agilent 1200 液相色谱 - API5500 三重四级杆串联质谱仪, 高速均质器(德国 IKA, T25 digital ULTRA - TURRAX, 转速采用 12500 r · min<sup>-1</sup>); 氮气吹干仪(N - EVAPTM112 型, 美国 Organomation Associates, Inc 公司)。分析天平(BS2202/TE - 612 - L/CP225D 型电子天平, 德国 Sartorius 公司)

## 1.2 对照品

维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 对照品溶液(批号 116K4121, Sigma 公司)

## 1.3 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, Burdick - Jackson); 三氯甲烷(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司)

## 1.4 供试品

全蝎(批号: 090812, 产地: 浙江) 蜈蚣(批号: 090325, 产地: 浙江) 乌梢蛇(批号: 090325, 产地: 浙江) 水蛭(批号: y - 091020, 产地: 浙江) 海马(批号: y - 090615, 产地: 浙江)

## 2 方法与结果

## 2.1 液相色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX C<sub>8</sub>, 3.5 μm × 2.0 × 5 cm 柱温:

**【基金项目】** 国家科技重大专项课题项目(2009ZX09502 - 024)

**【作者简介】** 王少敏(1978 - ), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中药质量控制研究。

\* 通讯联系人, E - mail: j\_l\_shen2006 @ gmail.com

40℃。流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸 - 10 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵水溶液, 流速: 0.3 ml · min<sup>-1</sup> 梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

	时间 (min)				
	10.0	0	1.5	5.2	5.3
A (%)	30	20	20	30	30
B (%)	70	80	80	70	70

2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源; 正离子模式检测; 扫描方式为多反应监测 (MRM); 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度为 550℃, 去簇电压: 170 伏。离子选择通道: m/z 526.3 → 155.2 (定量), m/z 526.3 → 377.2 (定性), 两对离子对的碰撞能量分别为 24 v 和 30 v, 总离子流图见图 1。

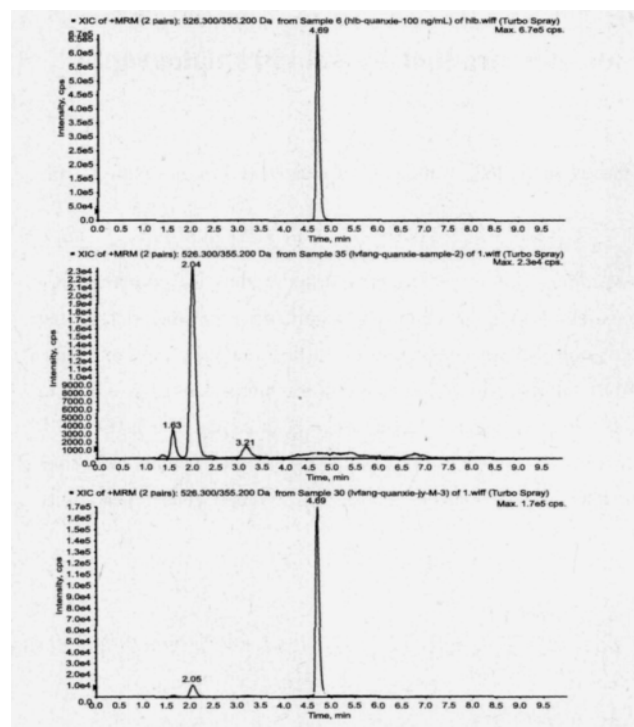


图 1 维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 对照品、全蝎样品、全蝎加标供试品离子流 (TIC) 图

2.3 标准溶液的制备

精密称取维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 0.1 mg/ml 的溶液, 作为贮备液。再用甲醇 - 0.1% 甲酸 (含 10 mmol/L 甲酸铵) (1:1) 混合溶液稀释成每 1 ml 含 1 ng、5 ng、10 ng、50 ng、100 ng、250 ng 的溶液作为系列标准溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取样品粉末 (过二号筛) 5 g 精密称定, 精密加入含 0.1% 甲酸的 40% 甲醇 25 ml, 高速匀浆 2 min, 离心 10 min (4000 r · min<sup>-1</sup>) 精密吸取上清液 5 ml 40℃ 条件下用氮气吹至约 3 ml, 用石油醚 (60℃ ~ 90℃) 3 ml 萃取, 弃去石油醚液, 水层用氯仿 8 ml 萃取两次, 合并氯仿层, 40℃ 条件下用氮气吹至近干, 加入 0.5 ml 的甲醇, 于涡旋振荡器振荡 2 min, 用 0.1% 甲酸 (含 10 mmol/L 甲酸铵) 溶液定容至 1 ml, 混匀, 过

0.45 μm 滤膜, 即得。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系考察、精密度的试验 取样品粉末 (过二号筛) 5 g 精密称定, 按照下述“2.4 供试品溶液的制备”项下方法制备操作至“合并氯仿层, 40℃ 条件下用氮气吹至近干”, 分别加入“2.3”项下系列标准溶液 1 ml, 作为基质标曲溶液。进样分析, 记录色谱峰面积, 以各成份的进样量为横坐标 (X), 各成份的峰面积为纵坐标 (Y), 进行回归分析, 校正曲线结果见表 2。

表 2 线性关系考察、精密度的试验

回归方程	线性范围 / (ng/ml)	r	精密度的 (RSD / % n = 6)
Y = 3.94 × 10 <sup>4</sup> X + 4.07 × 10 <sup>3</sup>	1 ~ 250	0.9996	1.0

2.5.2 方法专属性 取经预先测定, 不含维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的全蝎样品, 按照“2.4”项下操作, 制备全蝎供试品溶液; 同时在全蝎中添加“2.3”项下贮备液 5 μl, 按照“2.3”项下操作, 制备加标供试品溶液, 试验结果表明, 其它成分不干扰维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的测定, 色谱图见图 1。

2.5.3 加样回收率试验 取全蝎样品粉末 (未检出维吉尼霉素 M<sub>1</sub>, 过二号筛) 各 5 g, 一式 9 份, 以 3 份为一组, 分别精密加入每 ml 含 50 μg、5 μg、0.5 μg 维吉尼霉素 M<sub>1</sub> 的标准溶液各 25 μl, 精密加入含 0.1% 甲酸的 40% 甲醇 25 ml, 按“2.3”项下制备高中低浓度的加标供试品溶液, 测定, 计算回收率及相应 RSD 值, 结果表明, 本方法回收率试验结果良好, 见表 3。

表 3 回收率试验

编号	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)
低添加水平 - 1	12.5	11.1111	88.888
低添加水平 - 2	12.5	10.3103	82.482
低添加水平 - 3	12.5	10.2102	81.681
中添加水平 - 1	125	103.6035	82.882
中添加水平 - 2	125	103.103	82.482
中添加水平 - 3	125	104.104	83.283
高添加水平 - 1	1250	1146.145	91.691
高添加水平 - 2	1250	1141.14	91.291
高添加水平 - 3	1250	1224.327	97.946
平均			95.3
RSD			3.2

2.5.4 重复性试验 因样品未检出维吉尼霉素 M<sub>1</sub>, 采用加样方法进行重复性试验。按“2.5.2 加样回收率试验”项下制备中浓度加样全蝎供试品溶液, 一式 6 份, 进样分析, 记录峰面积, RSD 为 3.4%。

2.5.5 稳定性试验 精密量取同一份高浓度回收率全蝎供试品溶液, 分别与 0 h、4 h、8 h、20 h 进样, 测定峰面积, RSD 2.3%。试验结果表明, 供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.5.6 检出限 取全蝎药材低浓度加标供试品溶液进行分析, 测定信噪比, 分别以信噪比为 3 与 10 时的量作为检出限与定量限, 结果检出限和定量限分别为: 0.7 μg/kg 和 2.4 μg/kg。

表 2 样品加标回收结果 ( $n=6$ )

样品	样品本底 (mg/kg)	添加量 (mg/kg)	测得平均值 (mg/kg)	回收率范围 (%)	平均回收率 (%)
鲜龙眼	—	0.5	0.452	84.1-95.3	90.4
	—	1.0	0.933	87.9-96.6	93.3
	—	5.0	4.825	92.0-101.2	96.5
龙眼罐头	—	0.5	0.456	86.5-97.4	91.2
	—	1.0	0.958	89.7-98.3	94.1
	—	5.0	4.876	93.2-100.8	97.5
龙眼干	—	0.5	0.447	82.1-96.7	89.4
	—	1.0	0.928	86.4-100.2	92.8
	—	5.0	4.697	91.5-102.7	93.9

注：“—”表示“未检出”。

### 2.7 精密度试验

分别取鲜龙眼、龙眼罐头和龙眼干空白样品 5.0 g 加入一定量的  $\text{ClO}_3^-$  标准,使其含量均为 1.0 mg/kg,按 1.4 方法进行处理,进样分析,进行 6 次平行测定,测定结果平均值为分别为 0.933 mg/kg、0.941 mg/kg、0.927 mg/kg, RSD 分别为 3.72%、2.69%、3.91% 精密度较好。

### 3 小结

本文建立的离子色谱-电导检测测定龙眼及其制品中氯酸盐的方法简便快捷,精密度和准确度较好,能满足日常检测

工作的要求。

表 3 样品加标测定的精密度 ( $n=6$ )

	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	均值	RSD
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	(%)
鲜龙眼	0.879	0.906	0.954	0.966	0.931	0.962	0.933	3.72
龙眼罐头	0.951	0.897	0.923	0.965	0.983	0.927	0.941	2.69
龙眼干	0.952	0.934	0.895	1.002	0.912	0.864	0.927	3.91

### [参考文献]

- [1] 张修玉, 曾祥有, 姜春晓, 等. 龙眼产期调控剂氯酸盐对果园土壤微生物的影响[J]. 首届全国农业环境科学学术研讨会论文集, 2005, 11(1): 72-77.
- [2] 曾祥有, 黎华寿, 陆宏谋, 等. 氯酸钾对龙眼产期的调控效应[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(5): 573-576.
- [3] 黎华寿, 张修玉, 姜春晓. 氯酸盐生态毒理研究进展[J]. 生态学杂志, 2005, 24(11): 1323-1328.
- [4] 龚美珍, 殷绍平. 糖蜜酵母废水提取焦糖色素的研究[J]. 中国调味品, 2005, 11(11): 43-46.
- [5] 钟志雄, 梁春穗, 杜达安, 等. 离子色谱法测定食品中亚硫酸盐的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(1): 29-31, 39.
- [6] 侯艳文, 牟世芬, 侯小平, 等. 阴离子交换色谱淋洗液流速对测定灵敏度影响的讨论[J]. 色谱, 1998, 16(4): 347-350.

(收稿日期: 2011-05-09)

(上接第 2143 页)

### 3 样品测定

按拟订方法测定全蝎药材样品,结果未检出维吉尼霉素  $M_1$ 。

### 4 其它样品测定与回收率试验结果

取蜈蚣、乌梢蛇、海马和水蛭药材按上述方法制备基质标准溶液和供试品溶液,并按“2.5.3 加样回收率”项下,分别精密加入每 ml 含 5  $\mu\text{g}$  维吉尼霉素  $M_1$  的对照品溶液 25  $\mu\text{l}$  (蜈蚣、乌梢蛇),制备中,高浓度的加样回收率试验。结果表明这些药材的回收率均较好,该方法的适用性较广,具体见表 4:

表 4 蜈蚣等其他 4 种药材测定结果及加样回收率试验试验结果

药材	测定结果	回收率 (%)
蜈蚣	未检出	84.5
乌梢蛇	未检出	93.7
海马	未检出	85.2
水蛭	未检出	90.3

### 5 讨论

目前文献报道的维吉尼霉素  $M_1$  检测多针对新鲜家禽或猪肉,其样品一般为肌肉或肝脏等部位,其中含有大量的水分,基质相对简单,检测方法包括高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱<sup>[2-4]</sup>。动物类中药多为全体入药,且经过炮制后,基本干燥无水分,肌肉相对较少,含有大量甲壳、毛发和其他部位,基质复杂,90%为固态物质,更易受到杂质干扰,故采用专属性强、液相色谱-串联质谱测定法,利用分子量不同,采

用 MRM 技术,避免了其它杂质的干扰,专属性强,灵敏度高。

根据文献报道,维吉尼霉素  $M_1$  在氯仿中易溶,在丙酮、乙醚中极微溶解,在石油醚中不溶。故采用以氯仿为溶剂进行液液萃取净化,并在氯仿萃取前使用石油醚萃取除去脂溶性强的杂质。经过溶剂的萃取次数和萃取体积的考察,最终确定了样品的前处理方式,实际操作中发现其简单、快捷,适用于多种药材。

取纯溶剂配制的混合标准工作溶液制备标准曲线;另取全蝎样品,一式 6 份,按供试品制备方式供试品溶液,将供试品溶液于 40 $^{\circ}\text{C}$  氮吹至干,分别精密加入浓度为 5 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 和 200 ng/ml 的对照品溶液各 1 ml 作为基质对照品溶液;精密吸取各基质对照品溶液 10  $\mu\text{l}$  进样测定,以上述标准曲线计算基质对照品溶液中的浓度,与配制浓度进行比较,计算百分比,考察基质效应。结果表明,基质对照品浓度仅为真实浓度的 10%,基质减弱效应明显,故本方法需制备基质标准曲线进行计算。

### [参考文献]

- [1] 赵洪娟, 张月琴. 维吉尼亚霉素类抗生素的应用[J]. 饲料工业, 1998, 19(5): 46-47.
- [2] 耿志明, 陈明, 许大光. 高效液相色谱法测定猪组织中维吉尼亚霉素  $M_1$  的残留[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(2): 10-13.
- [3] GB/T 20765-2006. 猪肝脏、肾脏、肌肉组织中维吉尼亚霉素  $M_1$  残留量测定 液相色谱-串联质谱法[S]. 2006: 1-5.
- [4] 林维宣, 孙兴权, 田苗. 动物组织中粘杆菌素、杆菌肽及维吉尼亚霉素残留量的液相色谱-串联质谱检测[J]. 分析测试学报, 2009, 28(2): 212-215.

(收稿日期: 2011-05-19)