

# 高效液相色谱法测定猪组织中 维吉尼亚霉素 M 的残留

耿志明, 陈明, 许大光, 王冉, 柳伟荣, 郑勤

(江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究中心, 江苏南京 210014)

[收稿日期] 2004-07-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2005)02-0010-04 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立了猪组织中维吉尼亚霉素 M<sub>1</sub> 残留的高效液相色谱测定方法。样品用甲醇-0.2 mol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液提取, 正己烷洗涤, 经 C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化后做 HPLC 分析。选用二极管矩阵检测器, 波长 245 nm; 色谱柱为 ODS-3 C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(37.562.5, V/V)。维吉尼亚霉素 M<sub>1</sub> 标准曲线线性范围在 0.1~2.0 μg/mL。对不同组织的 3 种加药浓度进行回收率测定, 回收率在 72%~85%, 变异系数在 10% 以内。最低检测限为 10 ng/g。

**[关键词]** 高效液相色谱; 维吉尼亚霉素; 残留; 猪组织

维吉尼亚霉素(Virginiamycin, 简称 VGM) 是一种内酯环肽类抗生素, 由 VGM-M(M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) 和 VGM-S(S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub>) 组成, 其中 VGM-M<sub>1</sub> 和 VGM-S<sub>1</sub> 为主要成分。单独 VGM-M<sub>1</sub> 或 VGM-S<sub>1</sub> 的抗菌作用很弱, 但二者存在协同效应。商品 VGM 是 M<sub>1</sub> 和 S<sub>1</sub> 的混合物, 比例一般为 3:1, 在欧洲国家曾作为动物生长促进剂广泛应用于畜禽配合饲料。1999 年, 出于对饲用抗生素在动物产品中的残留问题的忧虑, 欧盟决定禁止将 VGM 等抗生素作为动物生长促进剂用于饲料<sup>[1]</sup>。目前, 我国允许在畜禽饲料中添加 VGM, 在实际生产中作为肉猪、肉鸡的药物添加剂, 用于预防动物疾病、促进动物生长。农业部 2002 年 235 号公告规定, VGM 在猪组织中的最高残留限量为肌肉 100 μg/kg, 肝脏 300 μg/kg, 肾脏 400 μg/kg。

有关动物组织中 VGM 残留检测方法研究的文献报道不多(国内尚无文献报道), 主要利用经典的液-液分配法提取组织样品中残留的 VGM, 再用高效液相色谱法进行检测。鉴于商品 VGM 是以 VGM-M<sub>1</sub> 组分为主, 文献报道的动物组织中 VGM 残留检测方法研究主要针对 VGM-M<sub>1</sub> 组分<sup>[2~4]</sup>, 本研究旨在建立利用固相萃取技术进行样

品前处理、反相高效液相色谱测定猪组织中 VGM-M<sub>1</sub> 残留的检测方法。

## 1 材料与方法

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪, Agilent 1100S, 美国 Agilent 公司, 配有二极管矩阵检测器(G1315B, DAD) 和化学工作站; 高速离心机, Biofuge stratos, 德国 Heraeus 公司; 高速组织分散器, GF 1, 江苏国华电器有限公司; 氮吹仪, N-EVEP 112, 美国 Organomation Associates 公司; 旋转蒸发仪, R-200, 瑞士 Ruch 公司; AccuBOND II ODS-C<sub>18</sub> 固相萃取(SPE) 柱, 500 mg/6 mL, 美国 Agilent 公司。

1.2 试剂与溶液 VGM-M<sub>1</sub> 标准品, 美国 SIGMA 公司, 纯度 ≥95%; 乙腈、甲醇为色谱纯, 正己烷、磷酸二氢铵为分析纯; 水为超纯水。

1.2.1 0.2 mol/L 磷酸二氢铵溶液 称取 23 g 磷酸二氢铵, 用水稀释至 1 000 mL。

1.2.2 40% 甲醇溶液 量取 400 mL 甲醇和 600 mL 水混合均匀。

1.2.3 80% 甲醇溶液 量取 800 mL 甲醇和 200 mL 水混合均匀。

1.3 VGM-M<sub>1</sub> 标准溶液

基金项目: 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2002349)。

作者简介: 耿志明(1965 年~), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品质量安全与检测研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.3.1 储备液 称取 5.0 mg VGM-M<sub>1</sub> 标准品, 用乙腈溶解并稀释至浓度为 100 μg/mL 储备液, 4 °C 保存。

1.3.2 工作液 吸取适量储备液, 用流动相稀释至浓度为 10.0 μg/mL 的工作溶液。

1.3.3 绘制标准曲线用标准工作液 吸取适量工作液, 用流动相稀释至浓度为 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 μg/mL 的系列标准工作液。

1.4 色谱条件 检测器为二极管矩阵检测器; 色谱柱为 ODS-3 C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为室温; 检测波长设在 245 nm; 流动相为乙腈-水(37.562.5, V/V); 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

1.5 绘制标准曲线 将绘制标准曲线用标准工作液按浓度依次从低到高, 按色谱条件测定。每一浓度进 3 针, 按其所得峰面积平均值与对应的标准溶液浓度作标准曲线图, 计算回归方程和相关系数。

1.6 SPE 柱洗脱试验 吸取 0.50 mL 储备液, 用 20% 的甲醇水溶液定容至 50 mL, 吸取此溶液 2.5 mL 上 C<sub>18</sub>-SPE 柱(预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化), 分别用 5 mL 30%~90% 的不同比例甲醇水溶液洗脱, 按 1.4 项条件测定洗脱液中 VGM-M<sub>1</sub> 含量。

1.7 样品前处理 称取 2.5 g 左右已切碎的组织样品, 放入 50 mL 离心管中。加入 15 mL 甲醇, 组织分散器分散 30 s, 少量甲醇洗涤刀头, 再加入 10 mL 0.2 mol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液, 混合均匀后离心 10 min(5 000 r/min)。将上清液转移至 125 mL 分液漏斗中, 用 20 mL 正己烷洗涤。下层溶转移至 50 mL 茄形瓶中, 45 °C 恒温水浴减压浓缩至 2 mL 左右, 加入 4 mL 40% 甲醇溶液, 摇匀后上 C<sub>18</sub>SPE 柱(预先活化同 1.6 项下条件), 用 5 mL 40% 甲醇溶液洗涤, 用 5 mL 80% 甲醇水溶液洗脱。洗脱液 45 °C 恒温水浴, 氮气流吹至近干。用 250~500 μL 流动相溶解, 0.45 μm 膜过滤, 供高效液相色谱分析。

1.8 组织中残留量计算 根据峰面积, 由回归方程计算试样溶液中 VGM-M<sub>1</sub> 含量, 并按下式计算组织中 VGM-M<sub>1</sub> 的残留量:  $X = CV/M$

式中:  $X$  ——组织中 VGM-M<sub>1</sub> 的残留量(ng/g);

$C$  ——试样溶液中 VGM-M<sub>1</sub> 的浓度(ng/μL);

$M$  ——样品重量(g);

$V$  ——试样溶液体积(μL)。

1.9 回收率、变异系数(RSD)的测定 分别称取肌肉、肝脏、肾脏样品 2.50 g, 添加适量的标准溶液, 使样品含 VGM-M<sub>1</sub> 20~320 ng/g, 每种组织 3 个添加浓度, 每个浓度 4 个平行样品, 按 1.5 项下

方法处理后进行液相色谱分析。以加入量和测得量之比计算回收率。按每个浓度测 4 个重复样品的回收率计算批内变异系数, 每个浓度各测 3 批计算批间变异系数。

2.0 最低检测限的测定 称取肌肉样品 2.50 g, 添加适量的标准溶液, 使样品 VGM-M<sub>1</sub> 的浓度分别为: 5、10、20 ng/g, 每个浓度 3 个平行样品, 按 1.5 项下方法处理后进行液相色谱分析, 由化学工作站给出信号和噪音峰高的比值。以能检测到 3 倍于噪音峰高的 VGM-M<sub>1</sub> 浓度作为最低检测限。

## 2 结果

2.1 标准曲线 VGM-M<sub>1</sub> 线性范围为 0.1~2.0 μg/mL, 标准曲线方程为  $y = 22.9272x + 0.0643$ ,  $r = 0.9996$ 。标准曲线见图 1。VGM-M<sub>1</sub> 标准品溶液、空白肾脏组织和空白肾组织添加药物的提取液色谱图见图 2。

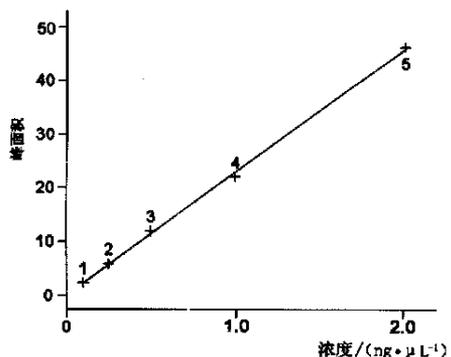
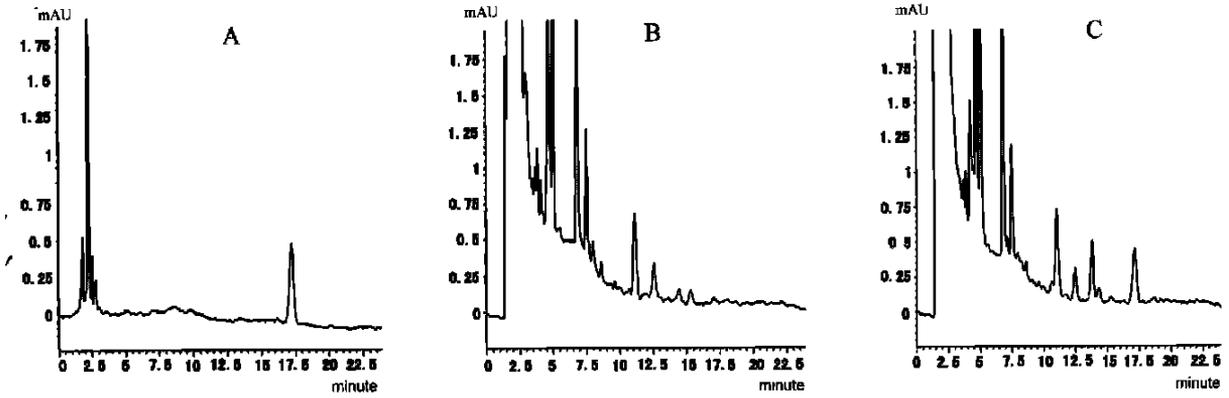


图 1 VGM-M<sub>1</sub> 标准曲线图

2.2 SPE 柱洗脱 试验中观察了在反相 C<sub>18</sub>固相萃取柱上不同甲醇水比例溶液洗脱 VGM-M<sub>1</sub> 的能力(见表 1)。控制固相萃取上柱液中甲醇浓度低于 40%, 用 40% 的甲醇溶液洗涤, 用 80% 的甲醇溶液洗脱, 可以获得理想的净化效果、同时保证足够的回收率。

表 1 甲醇水溶液洗脱 C<sub>18</sub>SPE 柱上 VGM-M<sub>1</sub> 的回收率

甲醇浓度	上柱量	测得量	回收率
/%	/μg	/μg	/%
30	2.5	0	0
40	2.5	0	0
45	2.5	0	0
50	2.5	0.24	9.4
55	2.5	2.21	88.3
60	2.5	2.44	97.4
70	2.5	2.49	99.7
80	2.5	2.50	100
90	2.5	2.50	100



A: VGM-M<sub>1</sub> 标准品 (1.0 µg/mL); B: 肾脏组织样品; C: 肾脏组织+ VGM-M<sub>1</sub> 标准品 (160 ng/g)

图2 VGM-M<sub>1</sub> 标准品和肾脏组织样品的色谱图

2.3 回收率、RSD 以及检测限 回收率的测定和 RSD 计算结果见表 2。猪组织中 VGM-M<sub>1</sub> 残留的最低检测限为 10 ng/g。

3 讨论

3.1 本实验在样品前处理时采用匀浆、离心、净化

等步骤, 操作简便、快速。在净化步骤中, 国外文献报道均采用多次液-液萃取, 本实验采用反相 C<sub>18</sub> 固相萃取柱, 节省了试剂和时间。

3.2 本实验采用二极管矩阵检测器同时观察了 VGM-M<sub>1</sub> 在 207、214、235、245、254nm 的色谱图,

表 2 猪组织中 VGM-M<sub>1</sub> 残留回收率 (n=4) 与 RSD 测定结果

组织	添加浓度 / (ng·g <sup>-1</sup> )	测定批次	测得浓度 / (ng·g <sup>-1</sup> ) ( $\bar{x} \pm s$ )	回收率 / % ( $\bar{x} \pm s$ )	批内 RSD / %	批间 RSD / %
肌肉	20	1	14.45 ± 0.72	72.25 ± 1.63	3.07	3.25
		2	15.38 ± 0.31	76.88 ± 1.55	2.82	
		3	15.18 ± 0.53	75.88 ± 2.63	4.61	
	40	1	30.25 ± 1.85	75.63 ± 4.63	7.74	3.57
		2	32.38 ± 1.63	80.94 ± 4.06	6.62	
		3	31.68 ± 1.68	79.92 ± 4.19	6.73	
	80	1	64.77 ± 1.24	80.96 ± 1.55	2.66	2.27
		2	65.17 ± 2.24	81.46 ± 2.80	5.14	
		3	67.53 ± 2.56	84.42 ± 3.20	5.20	
肝脏	20	1	14.75 ± 0.54	73.75 ± 2.70	5.29	4.02
		2	15.97 ± 0.42	79.85 ± 2.10	3.77	
		3	15.52 ± 0.89	77.76 ± 4.45	7.77	
	120	1	101.20 ± 4.27	84.33 ± 3.56	5.85	3.20
		2	100.08 ± 2.48	83.40 ± 2.07	3.26	
		3	95.24 ± 3.17	79.37 ± 2.64	4.70	
	240	1	200.56 ± 3.63	83.57 ± 1.51	2.54	1.50
		2	196.00 ± 4.85	81.67 ± 2.02	3.29	
		3	195.04 ± 3.73	81.27 ± 1.56	2.65	
肾脏	20	1	15.42 ± 0.83	77.10 ± 4.13	7.58	4.58
		2	16.90 ± 0.37	84.50 ± 1.85	2.87	
		3	16.13 ± 0.54	80.63 ± 2.68	4.41	
	160	1	127.36 ± 4.27	79.60 ± 2.67	4.61	2.98
		2	135.09 ± 9.42	84.43 ± 5.89	9.98	
		3	130.24 ± 3.63	81.40 ± 2.27	3.35	
	320	1	261.22 ± 6.33	81.63 ± 1.98	3.61	1.83
		2	270.93 ± 8.46	84.67 ± 2.64	4.18	
		3	266.88 ± 10.88	83.40 ± 3.40	5.99	

VGM-M<sub>1</sub> 在 207 nm 处响应最大, 基质干扰也最大。随着波长的增加, VGM-M<sub>1</sub> 的响应逐渐下降, 但基质干扰大幅减小。将检测波长定在 245 nm, 基质干扰少, 且有足够的响应。

3.3 本实验采用 ODS-3 C<sub>18</sub> 色谱柱观察了不同比例乙腈和水混合流动相的分离效果。乙腈与水的比例对 VGM-M<sub>1</sub> 与饲料中其它组分的色谱分离情况有明显影响。当流动相中乙腈浓度大于 60% 时, VGM-M<sub>1</sub> 保留时间太短, VGM-M<sub>1</sub> 难以与组织中其它组分分离; 当流动相中乙腈浓度小于 30% 时, VGM-M<sub>1</sub> 保留时间太长, 并且 VGM-M<sub>1</sub> 的峰形拖尾。当流动相中乙腈浓度控制在 35%~ 40% 时, VGM-M<sub>1</sub> 保留时间适中, VGM-M<sub>1</sub> 与组织中其它组分可以达到基线分离效果。图 2 即为流动相中乙腈与水的比例为 37.5:62.5 时的色谱图, VGM-M<sub>1</sub> 保留时间为 17.3 min。

3.4 本实验建立的方法, 采用高效液相色谱二极管矩阵检测器测定猪组织中 VGM-M<sub>1</sub> 的残留量, 最低检测限为 10 ng/g, 不同组织不同浓度的回收率均在 70% 以上, 批内、批间 RSD 全部在 10% 以内, 完全满足猪组织中 VGM-M<sub>1</sub> 残留量检测的要求。

#### 参考文献:

- [1] 朱其太. 部分国家对兽药使用的规定[J]. 中国检验检疫, 2003, 6: 48- 49.
- [2] Moats WA, Leskinen L. Determination of virginiamycin residues in swine tissue using high performance liquid chromatography[J]. J Agri Food Chem, 1988, 36: 1297- 1300.
- [3] David W, Gottschall, Constance Gombatz, et al. Analysis of tissue residues and comparative metabolism of virginiamycin in rats, turkeys, and cattle[J]. J Agri Food Chem, 1987, 35: 900- 904.
- [4] Chemistry laboratory guidebook(Novobiocin), novobiocin and virginiamycin. NBV July. 1991, [http://www.fsis.usda.gov/Frame/FrameRedirect\\_Asp?\\_main=/ophp/clg/index.htm](http://www.fsis.usda.gov/Frame/FrameRedirect_Asp?_main=/ophp/clg/index.htm).

## Determination of virginiamycin M<sub>1</sub> residues in swine tissues by HPLC

GENG Zhiming, CHEN Ming, XU Darguang, WANG Ran, LIU Weirong, ZHENG Qin  
(Food Safety Research and Service Center, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014; China)

**Abstract:** A method was developed for detecting virginiamycin M<sub>1</sub> in swine tissues by HPLC with DAD detection at 245 nm. Virginiamycin M<sub>1</sub> was extracted from tissues with methanol and 0.2 mol/L ammonium dihydrogenphosphate, purified by AccuBOND II ODS-C<sub>18</sub> solid phase extraction cartridge, and determined with an ODS-3 C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and water acetonitrile (62.5:37.5) as mobile phase. The relationship of peak area response and concentration of virginiamycin M<sub>1</sub> between 0.1~ 2.0 μg/mL was linear. Average recoveries of virginiamycin M<sub>1</sub> from swine tissues fortified at a level of 20~ 320 ng/g were 72%~ 85%. Coefficients of variation were below 10%. The detection limit for virginiamycin M<sub>1</sub> was 10 ng/g.

**Key words:** HPLC; virginiamycin M<sub>1</sub>; residue; swine tissues

• 书讯 • 《基因克隆技术在制药中的应用》(45 元/册) 本书论述了基因克隆技术的基本原理、基因克隆技术在生物制药中的研究和应用。全书分为上下篇: 技术篇和应用篇。技术篇共 9 章, 在内容上加重了基因克隆技术基本知识的系统论述; 应用篇共 8 章, 主要介绍基因克隆技术在制药中的应用, 并列各种生物药物基因的克隆与表达实例, 以及各种基因工程药物的发酵生产实例。本书理论加实例, 内容反映前沿科学, 实用性强, 可供从事生物技术、制药的科研和生产技术人员及高等院校相关专业的师生使用。

欲邮购该书者请通过邮局将书款及邮寄费(书款的 10%) 汇至《中国兽药杂志》编辑部。

地址: 北京中关村南大街 8 号; 邮编: 100081; 收款人: 《中国兽药杂志》编辑部,

电话: 010- 62199582 或 62164577。