

离子淌度差分质谱技术测定鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林

欧阳少伦*, 邵琳智, 谢敏玲, 吴映璇, 林峰
(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: **目的** 将离子淌度差分质谱(DMS)技术应用于鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林抗病毒药物的残留量分析。**方法** 样品中的金刚烷胺和利巴韦林采用三氯乙酸提取, 经磷酸酯酶酶解, PBA 固相萃取小柱净化后, 选用亲水相互作用色谱柱以 5mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1%甲酸)-乙腈为流动相梯度洗脱, DMS 结合 ESI 正离子模式定性定量分析。**结果** 在 0.5~5.0 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内线性关系良好, 方法定量限为 1.0 $\mu\text{g/L}$, 标准添加水平在 1.0、2.0、10 $\mu\text{g/L}$ 时, 回收率在 68.4%~112.8%之间, 相对标准偏差($n=6$)在 7.3%~11.2%之间。**结论** 该技术的应用可以显著提高目标化合物的选择性, 有效去除基质中的干扰物质, 噪音明显降低。**关键词:** 离子淌度差分质谱; 抗病毒药; 鸡肉

Differential mobility spectrometry for analysis of amantadine and ribavirin residues in chicken muscle

OUYANG Shao-Lun*, SHAO Lin-Zhi, XIE Min-Ling, WU Ying-Xuan, LIN Feng
(Technical Center of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a differential mobility spectrometry method for determination of amantadine and ribavirin residues in chicken muscle. **Methods** The amantadine and ribavirin in sample were extracted by trichloroacetic and enzyme hydrolyzing with acid phosphatase, then purified with PBA cartridge. The targeted compounds were separated on a HILIC column with the gradient elution of 5 mmol/L ammoniumacetate (0.1% formic acid) and acetonitrile as the mobile phases. Quantitative and qualitative were detected by tandem mass spectrometry in positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode with differential mobility spectrometry (DMS) on. **Results** The method showed a good linearity in the range of 0.5~5.0 $\mu\text{g/L}$, and the limits of quantification was 1.0 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries in chicken muscle at the 1.0, 2.0 and 10 $\mu\text{g/kg}$ spiked levels was in the range of 68.4%~112.8% with the relative standard deviations (RSD) in the range of 7.3%~11.2%. **Conclusion** This method can significantly improve the selection of target analysts, effectively eliminate the matrix interference and reduce the noise.

KEY WORDS: differential mobility spectrometry; antiviral drugs; chicken muscle

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技计划项目(2014GDK01)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (2014GDK01)

*通讯作者: 欧阳少伦, 工程师, 主要研究方向为食品分析。E-mail: oyshl@163.com

*Corresponding author: OUYANG Shao-Lun, Senior Engineer, Technical Center of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China. E-mail: oyshl@163.com

1 引言

随着液相色谱-串联质谱仪的普及、三重四极杆的高灵敏度、高选择性, LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry)方法已成为检测动物源食品中兽药残留最重要的分析手段,也是目前应用最广泛的确证技术。食品中兽药残留的特点是残留物水平低、样品基质复杂、干扰物质多、不易进行残留物的分离与纯化。目前大家所熟悉的解决干扰问题的方式就是通过样品的前处理技术,尽可能地在保留目标化合物的同时去除大量干扰化合物。

采用 LC-MS/MS 方法^[1,2]的报道文献中,基质对目标化合物检测的影响多见于“基质效应”,直接干扰检测的情况很少。这两年国内对检测鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留量的相关研究也明显增多^[3-6],而之前有关报道国内外都较少见。在测定金刚烷胺和利巴韦林时,虽然样品也经过净化处理,但是基质中仍存在大量的干扰物质,有些通过液相色谱将干扰物与目标化合物完全分离,有些则不能。动物组织中内源性的化合物与待测化合物的结构非常相似,难以用常规的前处理手段去除^[7-9],这正是鸡肉中检测金刚烷胺和利巴韦林的难点所在。有关样品前处理和液相色谱串联质谱仪器条件的方面可参考相关文献^[5]。

本研究首次将离子淌度差分质谱 (differential mobility spectrometry, DMS)与液质联用,建立鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留的 LC-ESI-DMS-MS/MS 分析。离子淌度差分质谱 (differential mobility spectrometry, DMS)是一个基于平面设计的系统,离子淌度池由两个平行的金属板组成,并可以形成离子迁移场区,离子通过气体流被引入质谱系统。该离子淌度池位于 Q0 和锥孔之间,在大气压条件下运行,具有串联质谱的所有扫描方式,而且引入化学修饰剂,具有超强的分辨能力^[10]。该方法不仅可同时检测金刚烷胺和利巴韦林的残留量,而且可以显著提高目标化合物的选择性,有效去除基质中的干扰物,噪音明显降低。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(UFLC LC-20AD, 日本岛津公司); 四极杆/线性离子阱质谱仪(AB SCIEX

QTRAP 5500, 美国 AB SCIEX 公司), 配有电喷雾离子源(ESI)和离子淌度差分质谱(AB SCIEX SelexIONTM); 涡旋振荡器(MS3, IKA 公司); 均质器(T25, IKA 公司); 高速离心机(4K15, Sigma 公司); BOND ELUT-PBA 固相萃取小柱(100 mg, 3 mL, 美国安捷伦公司)。

金刚烷胺、利巴韦林、金刚烷胺-D₆和利巴韦林-¹³C₅ 标准品分别购自 CHROMADEx、Dr. Ehrenstorfer、CDN 和 TRC 公司, 纯度均在 96%以上。乙腈为色谱纯, 甲酸、乙酸铵为优级纯, 其他试剂均为分析纯(广州分析试剂厂), 实验用水为超纯水。

样品来源: 超市内购得。

2.2 样品处理

称取 5 g 已绞碎的鸡肉样品(市售)(准确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中, 加入适量同位素内标金刚烷胺-D₆和利巴韦林-¹³C₅ 溶液, 静置 15 min。加入提取液 20 g/L 三氯乙酸溶液 10 mL, 均质 1 min, 涡旋振荡 1 min, 10000 r/min 离心 5 min, 移出上清液, 再加入三氯乙酸溶液 10 mL, 涡旋振荡 3 min, 10000 r/min 高速离心 5 min, 合并上清液定容至 20 mL。取定容液 4 mL, 用氨水调 pH 值至 4.8, 加 2 mL pH 4.8 的 250 mmol 乙酸铵缓冲液, 混匀, 加酸性磷酸酯酶 25 μL 于 37 °C 酶解 2 h。取出后冷却至室温, 用氨水调 pH 值至 8.5, 高速离心 5 min, 待净化。

用 3 mL 乙腈、3 mL pH 8.5 的 250 mmol 乙酸铵缓冲液活化 PBA 小柱, 加待净化样液, 依次用 3 mL pH 8.5 的 250 mmol 乙酸铵缓冲液、3 mL 乙腈淋洗, 真空抽干, 再用 2 mL 乙腈-水溶液(V:V=80:20, 含 0.1%甲酸)洗脱, 洗脱液过 0.22 μm 滤膜后待测定。

2.3 色谱与质谱条件

色谱柱: HILIC Silica (3.0 mm×100 mm, 3 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1%甲酸) (A)和乙腈(B)。线性梯度洗脱程序: 0~5 min, 10%A; 5~8 min, 10%A~50%A; 8~8.1 min, 50%A~10%A; 8.1~13 min, 10%A。进样量: 10 μL; 流速: 300 μL/min。

离子源: 电喷雾(ESI)离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测模式(MRM); 气帘气流速: 30 L/min; 雾化气(GS1)流速: 75 L/min; 辅助加热气(GS2)流速: 65 L/min; 碰撞气(CAD)流速: 中等; 辅助加热气温度(TEM): 600 °C; 喷雾电压(IS): 5000

V; 修饰剂(MD): 异丙醇; 修饰剂流速(MDC): 100 $\mu\text{L}/\text{min}$; 分离电压(SV): 3250。检测目标物的相关质谱参数见表 1。

3 结果与讨论

3.1 未开启 DMS 情况下的测定

3.1.1 标准溶液的测定

金刚烷胺和利巴韦林属于强极性化合物, 在普通反相色谱柱上不易保留, 选择亲水相互作用色谱柱(HILIC)^[11,12], 采用乙酸铵水溶液(含 0.1%甲酸)与乙腈梯度洗脱, 则能获得较高的灵敏度和良好的峰形, 金刚烷胺和利巴韦林标准溶液的 MRM 色谱图见图 1。

3.1.2 鸡肉样品的测定

空白鸡肉加标样品经前处理, 获得无色澄清的样品进质谱检测, MRM 色谱图见图 2 中 A 所示。从图中可以看出, 两内标并无干扰物质, 而金刚烷胺和利巴韦林的两对监测离子对都有干扰物质存在, 背景噪音较高。金刚烷胺的干扰物在液相色谱柱上能与之完全分离, 基本不影响定量结果, 但利巴韦林与干扰物很难完全分离, 即使采用 HILIC 柱极限使用的流动相系统, 也不能使两者完全分离, 存在共流出物, 对定性和定量都有影响。

3.1.3 干扰物的分析

虽然 MRM 模式的检测方式, 具有高灵敏度和高选择性, 但是对于兽药残留检测, 不仅残留物水平低, 而且样品基质复杂, 含有蛋白质、脂肪、糖类、核酸、氨基酸等干扰物质。通过前处理可以去除部分干扰杂质, 但是有些与目标化合物结构类似内源性物质, 很难通过常规方式去除。有文献报道内源性的尿苷与利巴韦林不仅母离子相同, 子

离子也相同, 是干扰测定的主要化合物^[13,14], 低分辨的质谱无法识别, 只有采用高分辨质谱才能分离开^[6]。本研究中经过前处理的空白样品中仍存在很多干扰物质, 从图 2 中可以看到与利巴韦林不能完全分离的强度很高的杂质尿苷^[15], 其他杂质基本都能通过液相色谱与两目标化合物完全分离, 不会影响定性和定量结果。

3.2 采用 DMS 后的测定

3.2.1 DMS 质谱参数的优化

开启 DMS 后, ESI 离子源以及 MRM 检测离子对的质谱参数无需改变, 需要优化的只是 DMS 相关的质谱参数, 可通过流动注射 0.5 mg/L 的金刚烷胺和利巴韦林的标准溶液进行调节。本研究中发现若不引入修饰剂, 无论怎么改变分离电压 SV, 相应的补偿电压 COV 变化都会不明显, 不能增加离子之间的分离度, 引入异丙醇作为修饰剂, 待稳定一段时间后, 调节合适的 SV 值, 并优化 COV 值, 发现两化合物 COV 值明显偏离零点, 且差异很大, 说明离子之间的分离度明显增加, 当修饰剂流速增加, 分离能力并无明显增强, 反而会降低灵敏度, 所以最后确定“2.3”项下所示的质谱条件。

3.2.2 鸡肉样品的测定

检测的空白鸡肉加标样品经 LC-ESI-DMS-MS/MS 测定, MRM 色谱图见图 2 中 B 所示。通过左右对比, 可以明显看到, 金刚烷胺和利巴韦林两对监测离子对的干扰物质已完全去除, 背景噪音显著降低。虽然 DMS 开启后, 各离子对的绝对灵敏度明显降低, 但是噪音降低得更为显著, 信噪比(S/N)显著提高, 图 2 加标 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品金刚烷胺和利巴韦林的定量离子对的(152.2/135.2 和 245.2/96.0)分别由 42 和 4 提高为 115 和 382。

表 1 金刚烷胺和利巴韦林及其内标物的质谱参数
Table 1 MS/MS parameters for the amantadine, ribavirin and internal standard

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)	补偿电压 (V)
Amantadine	152.2	135.2*	100	25	-29
		93.1		39	
Ribavirin	245.2	113.1	60	14	-13.5
		96.0*		43	
Amantadine-D ₆	158.2	141.2	100	25	-29
Ribavirin- ¹³ C ₅	250.2	113.1	60	14	-13.5

*定量离子。

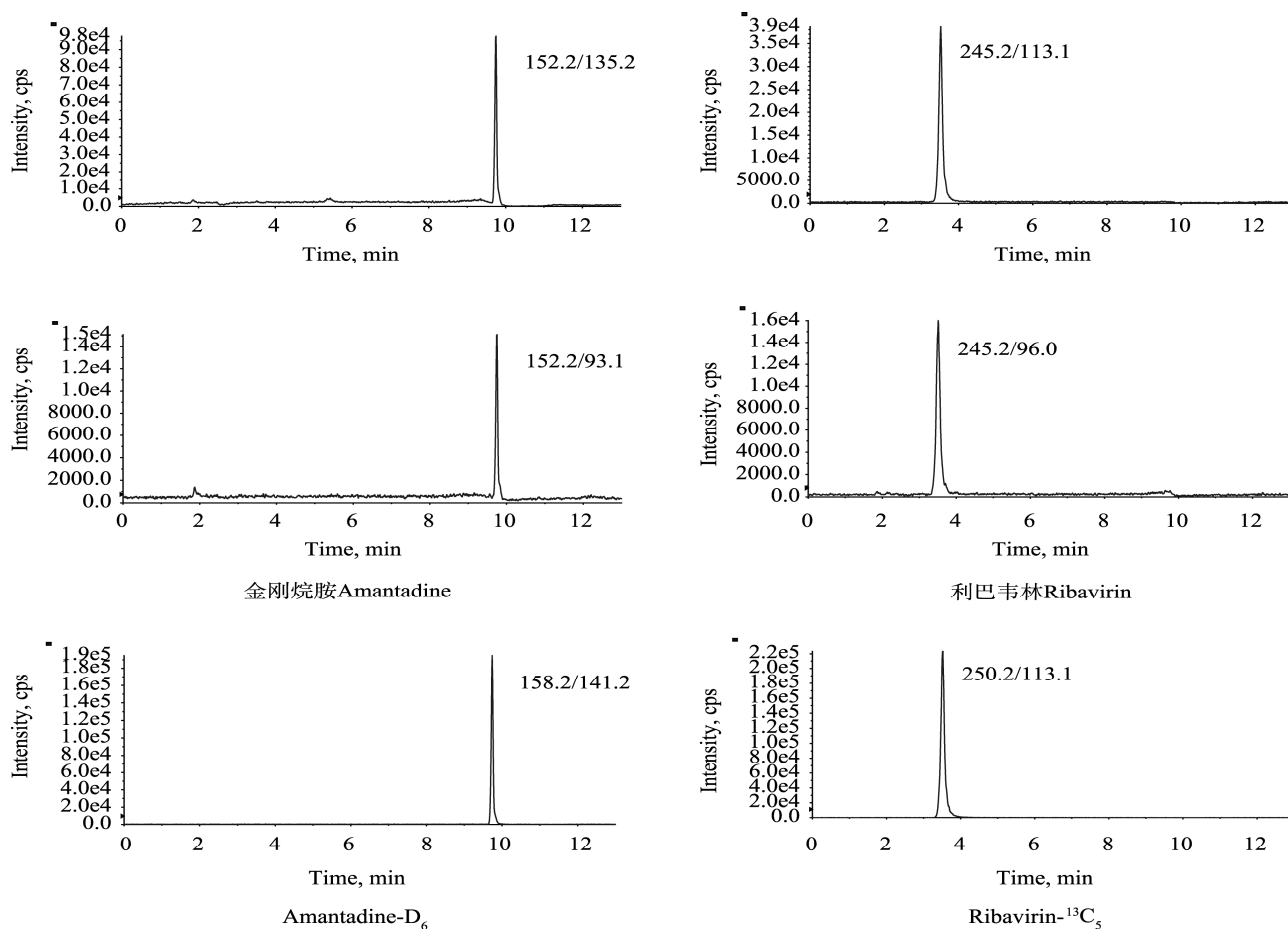
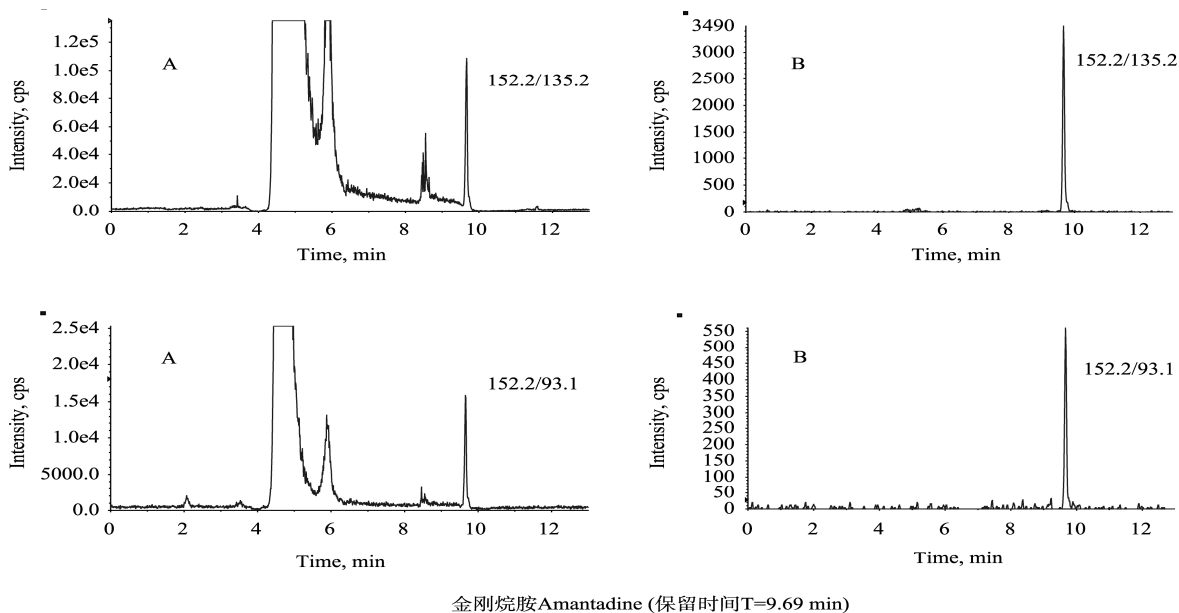


图 1 金刚烷胺和利巴韦林标准溶液(0.5 $\mu\text{g/L}$)的多反应监测(MRM)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a mixture of amantadine and ribavirin standard solution (0.5 $\mu\text{g/L}$) in MRM mode



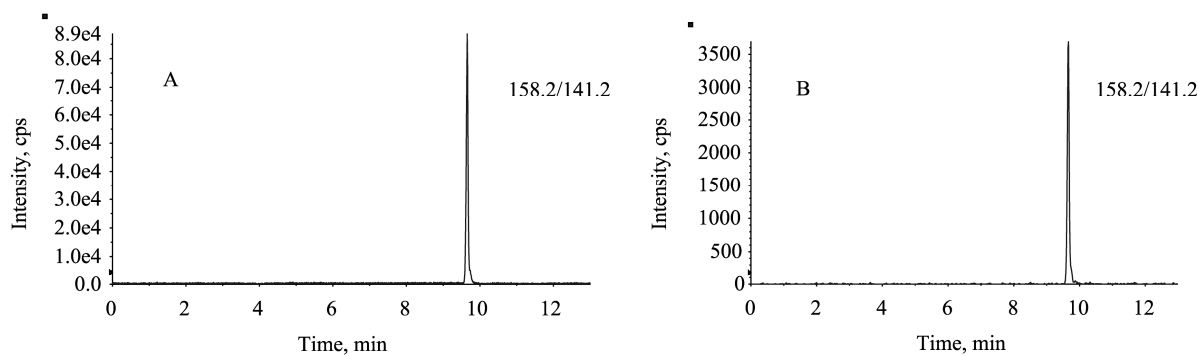
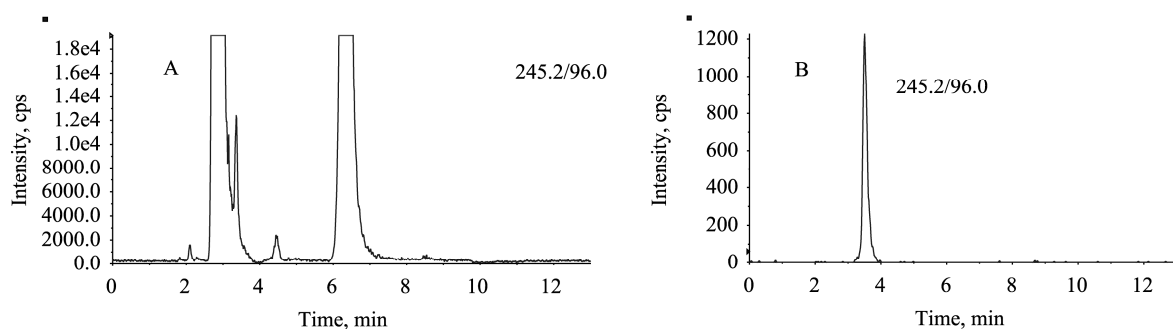
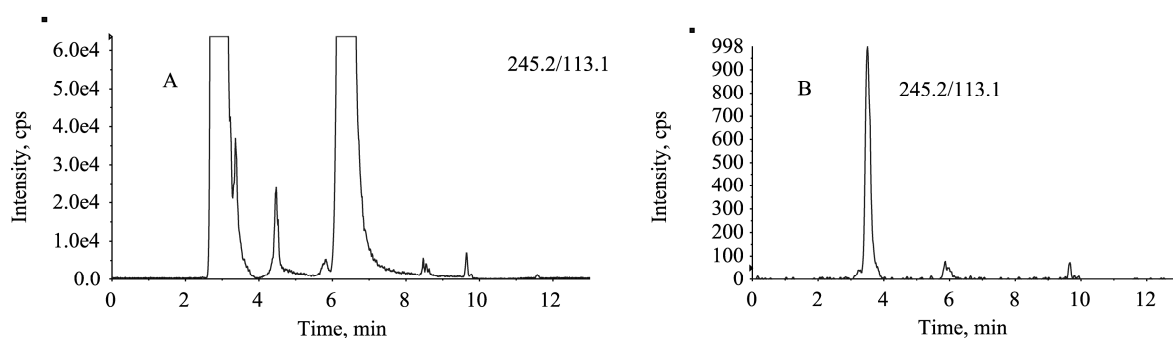
金刚烷胺Amantadine (保留时间 $T=9.69$ min)

图 2 空白鸡肉中加标 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 金刚烷胺和利巴韦林的 MRM 色谱图

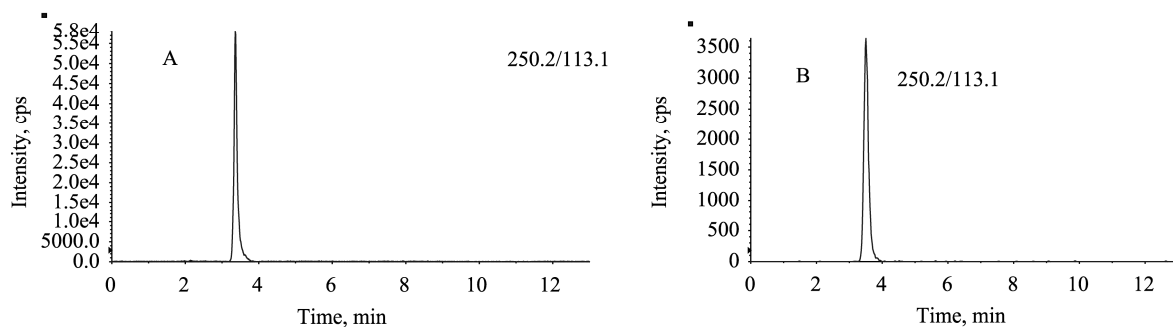
Fig. 2 MRM chromatograms of spiked chicken muscle 1.0 $\mu\text{g/kg}$ with amantadine and ribavirin

(A: 离子淌度-关闭状态下; B: 离子淌度-打开状态下)

(A: DMS-OFF; B: DMS-ON)

金刚烷胺内标Amantadine-D₆ (保留时间T=9.71 min)

利巴韦林Ribavirin (保留时间T=3.48 min)

利巴韦林Ribavirin-¹³C₅ (保留时间T=3.49 min)

续图2 空白鸡肉中加标 1.0 μg/kg 金刚烷胺和利巴韦林的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of spiked chicken muscle 1.0 μg/kg with amantadine and ribavirin
(A: 离子淌度-关闭状态下; B: 离子淌度-打开状态下)
(A: DMS-OFF; B: DMS-ON)

3.3 方法的线性范围、定量限、加标回收率和精密度

以金刚烷胺和利巴韦林的质量浓度(X)为横坐标, 定量离子的峰面积与内标的峰面积之比(Y)为纵坐标绘制标准曲线。结果表明在 $0.5\sim 5.0\ \mu\text{g/L}$ 的浓度范围内线性关系良好, 金刚烷胺和利巴韦林的线性方程和相关系数分别为 $Y=0.158X-0.0369(r=0.9996)$ 和 $Y=0.527X-0.0286(r=0.9994)$ 。

以在空白鸡肉基质中添加标准溶液, 当添加量为定量限(LOQ)时, 定量离子对的信噪比(S/N)大于 10, 定性离子对的信噪比大于 3, 以此标准添加量为方法的定量限, 金刚烷胺和利巴韦林的定量限为 $1.0\ \mu\text{g/kg}$ 。

分别添加 1.0 、 2.0 、 $10\ \mu\text{g/kg}$ 三个水平浓度的金刚烷胺和利巴韦林, 每个水平重复测定 6 次, 内标法定量, 结果见表 2。

表 2 空白鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林的加标回收率与精密度($n=6$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of amantadine and ribavirin spiked in blank chicken muscle sample ($n=6$)

分析物	加标量/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%	RSD/%
金刚烷胺	1.0	68.4~93.6	10.4
	2.0	71.9~107.2	7.3
	10.0	86.8~103.5	9.7
利巴韦林	1.0	70.2~112.8	11.2
	2.0	74.7~97.1	9.5
	10.0	82.5~98.6	8.9

3.4 实际样品的测定

用本文建立的方法测定 10 份鸡肉样品, 其中 1 份检出金刚烷胺残留量为 $3.8\ \mu\text{g/kg}$, MRM 色谱图见图 3。

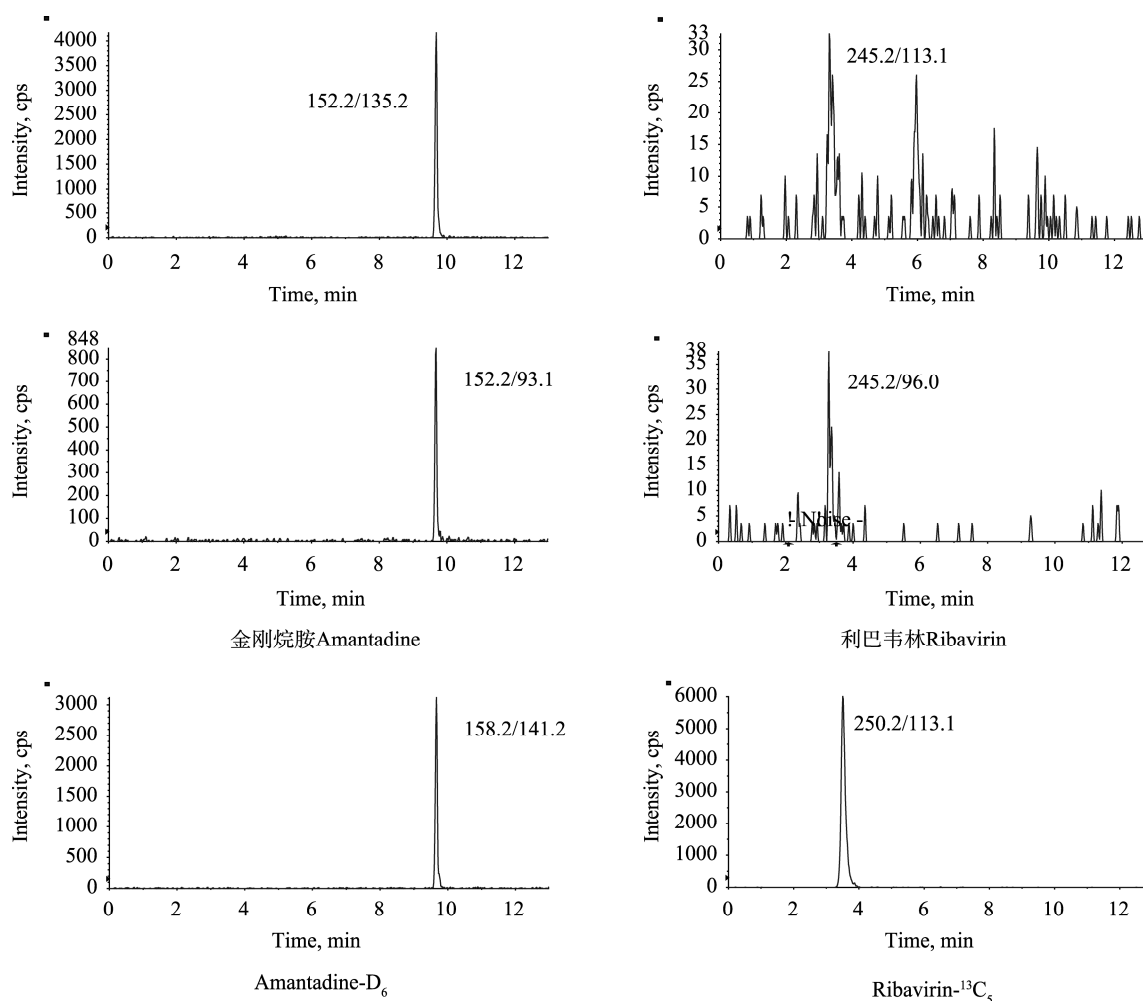


图 3 鸡肉样品中金刚烷胺和利巴韦林的 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of chicken muscle sample of a mixture of amantadine and ribavirin in MRM mode

4 结论

本文利用离子淌度差分质谱技术,建立可同时测定鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留量的检测方法,在本研究中有效去除了鸡肉中目标分析物共流出杂质的干扰,使目标化合物的选择性显著提高,基质中的噪音明显降低,有效地提高了检测灵敏度,该方法操作简单、快速,测定结果准确可靠,适用于鸡肉中的金刚烷胺和利巴韦林残留量的测定。

参考文献

- [1] DB32/T 1165-2007. 鸡肝中利巴韦林及其代谢物残留总量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
DB32/T 1165-2007. Determination of total residues of ribavirin and its metabolites in chicken liver-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [S].
- [2] DB32/T 1163-2007. 鸡肝中金刚烷胺残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
DB32/T 1163-2007. Determination of amantadine residues in chicken liver-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [S].
- [3] 云环, 崔风云, 严华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中的利巴韦林和金刚烷胺[J]. 色谱, 2013, 31(8): 724-728.
Yun H, Cui FY, Yan H, *et al.* Determination of ribavirin and amantadine in chicken by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(8): 724-728.
- [4] 祝伟霞, 杨冀州, 袁萍, 等. 超高效亲水色谱-串联质谱法快速检测鸡肉及其制品中的利巴韦林及其代谢物的总残留量[J]. 色谱, 2013, 31(10): 934-938.
Zhu WX, Yang JZ, Yuan P, *et al.* Rapid determination of total residues of ribavirin and its metabolites in chicken and chicken product by ultra-performance hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(10): 934-938.
- [5] 邵琳智, 姚仰勋, 谢敏玲, 等. 亲水相互作用色谱-串联质谱法同时测定动物组织中金刚烷胺和利巴韦林[J]. 分析测试学报, 2013, 32(12): 1448-1452.
Shao LZ, Yao YX, Xie ML, *et al.* Determination of amantadine and ribavirin in animal tissues by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2013, 32(12): 1448-1452.
- [6] Wei C, Grace JE Jr, Zvyaga TA, *et al.* Utility of high-resolution accurate MS to eliminate interferences in the bioanalysis of ribavirin and its phosphate metabolites [J]. *Bioanal*, 2012, 4(15): 1895-1905.
- [7] Kromdijk W, Pereira SA, Rosing H, *et al.* Development and validation of an assay for the simultaneous determination of zidovudine, abacavir, emtricitabine, lamivudine, tenofovir and ribavirin in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 919-920: 43-51.
- [8] Zironi E, Gazzotti T, Lugoboni B, *et al.* Development of a rapid LC-MS/MS method for ribavirin determination in rat brain [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(4): 889-992.
- [9] Meijuan X, Wenzheng J, Xiaoyan X, *et al.* Determination of rimantadine in rat plasma by liquid chromatography electrospray mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 864: 123-128.
- [10] 李春波. AB SCIEX 离子淌度差分质谱技术 SelexION™-极限提高质谱鉴别能力[J]. 现代科学仪器, 2011, 5: 163-165.
Li CB. AB SCIEX SelexION™ Technology [J]. *Mod Sci Instrum*, 2011, 5: 163-165.
- [11] 刘正才, 杨方, 余孔捷, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法同时检测鸡组织中 5 种抗病毒类药物的残留量[J]. 色谱, 2012, 30(12): 1253-1259.
Liu ZC, Yang F, Yu KJ, *et al.* Multi-residue determination of five antiviral drugs in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(12): 1253-1259.
- [12] 云环, 张朝晖, 罗生亮, 等. 固相萃取/LC-MS/MS 法检测动物源性食品中的金刚烷胺[J]. 现代仪器, 2009, 15(6): 42-45.
Yun H, Zhang ZH, Luo SL, *et al.* Determination of amantadine residues in food of animal origin by Solid phase extraction /LC-MS/MS [J]. *Mod Instrum*, 2009, 15(6): 42-45.
- [13] Yeh L T, Nguyen M, Dadgostari S, *et al.* LC-MS/MS method for simultaneous determination of viramidine and ribavirin levels in monkey red blood cells [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3): 1057-1064.
- [14] Meléndez M, Rosario O, Zayas B, *et al.* HPLC-MS/MS method for the intracellular determination of ribavirin monophosphate and ribavirin triphosphate in CEMss cells [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1233-1240.
- [15] Van der Lijke H, Alffenaar JWC, Kok WT, *et al.* Determination of ribavirin in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, 88(15): 385-390.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



欧阳少伦, 工程师, 主要研究方向为食品分析。
E-mail: oyshl@163.com