

禽畜肉中利巴韦林残留量检测方法的研究

陈燕, 李晓雯, 刘畅*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立禽畜肉中利巴韦林的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法。**方法** 待测样品中的利巴韦林用 0.25 mol/L 醋酸铵缓冲溶液(pH 4.8)提取, 经固相萃取柱净化、浓缩、定容后采用液相色谱-串联质谱法在正离子模式下检测。**结果** 该方法在 10~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 $r>0.999$ 。利巴韦林在禽肉及畜肉中的检测限均为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率在 97.0%~109.4%之间, 精密度(以相对标准偏差表示)在 0.7%~2.8%之间($n=6$)。**结论** 本方法具有前处理简单、选择性好、灵敏度高等优点, 可用于禽畜肉中利巴韦林残留量的定量检测。

关键词: 利巴韦林; 液相色谱-串联质谱法; 固相萃取; 禽畜肉

Study on detection methods of ribavirin in tissues of livestock and poultry

CHEN Yan, LI Xiao-Wen, LIU Chang*

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

ABSTRACT: Objectives To establish a method for the determination of ribavirin in tissues of livestock and poultry by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The residues of ribavirin in the samples were extracted with buffer (ammonium acetate pH 4.8). After being cleaned up with SPE column, concentrated and reconstituted, the residues were detected by HPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) via positive ionisation mode. **Results** The limit of quantification was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method showed a good linearity over the range of 10~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ribavirin with $r>0.999$. The average recoveries at 3 spiked concentration levels were between 97.0%~109.4%, while the relative standard deviations (RSD) were between 0.7%~2.8% ($n=6$). **Conclusion** The established method is highly sensitive, accurate and reproducible. It is suitable for the detection of ribavirin in tissues of livestock and poultry.

KEY WORDS: ribavirin; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; tissues of livestock and poultry

1 引言

利巴韦林又名病毒唑、三氮唑核苷, 化学名为: 1- β -D-呋喃核糖基-1H-1,2,4,-三氮唑-3-羧酰胺, CAS号: 36791-04-5, 分子式: $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, 结构式见图 1。

利巴韦林系广谱强效的抗病毒药, 为单磷酸次黄嘌呤核苷脱氢酶抑制剂, 抑制肌红蛋白转变为鸟苷酸, 阻碍病毒核酸的合成, 阻止病毒复制和传播, 从而达到抗病毒的作用^[1]。该类物质易产生耐药性, 使病毒发生变异, 长期使用对机体细胞产生毒害作用, 其对

*通讯作者: 刘畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品分析。E-mail: ccchangchang@hotmail.com

*Corresponding author: LIU Chang, Ph.D, Associate Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500, Zhangheng Road, Shinan District, Shanghai 201230, China. E-mail: ccchangchang@hotmail.com

人体产生的最突出的安全性问题是溶血性贫血、遗传毒性、生殖毒性和致癌性等^[2]。

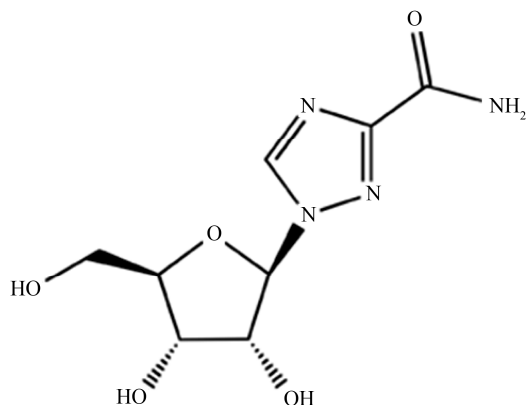


图 1 利巴韦林的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of ribavirin

农业部于 2005 年先后颁布的农业部第 560 号公告《兽药地方标准废止目录》及农医发[2005]33 号文件《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》中,均明确规定“禁止金刚烷胺、金刚乙胺、阿昔洛韦、吗啉(双)胍(病毒灵)、利巴韦林等及其盐、酯的单、复方等制剂生产、经营和使用。违者按生产、经营假兽药和使用禁用兽药处理,依照《兽药管理条例》予以处罚”。

目前国内外均无动物源性食品中利巴韦林残留测定的标准方法。由于动物源性食品基质复杂,在提取净化测定过程中可能对利巴韦林造成干扰。另外,利巴韦林是弱碱性的极性小分子,又为核苷类化合物,与组织中的一些内源性物质结构较为类似,给检测带来了一定的困难。目前文献报道的方法主要有放射免疫法^[3]、液相色谱法^[4]、气相色谱串联质谱法^[5]以及液相色谱串联质谱法^[6]等。这些方法检测的基体大部分是血液^{[7][8]}、药剂^[9]或兽药^[10]等,仅有少数文献^{[11][12]}报道了动物组织中利巴韦林残留的检测方法。

本方法根据利巴韦林的分子结构、化学性质,以现有文献为基础,建立了禽畜肉中利巴韦林残留的高效液相色谱-串联质谱检测方法,以期为监督执法提供技术支撑。

2 材料与方 法

2.1 仪器与设备

Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);

5500QTRAP 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); MS3 型漩涡振荡器(德国 IKA 公司); R40 型高速离心机(美国 Thermo 公司); 多位氮气浓缩仪(德国 Organomation 公司); Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Milli-pore 公司); PBA 苯硼酸交换固相萃取小柱(100 mg, 3 mL)(美国 Agilent 公司)。

2.2 材料与试剂

利巴韦林对照品(纯度 97%)购自中国药品生物制品检定所。利巴韦林-¹³C₅ 内标物质购自加拿大 TRC 公司。

甲醇(HPLC 级)、甲酸(HPLC 级)及 β -盐酸葡萄糖醛基酶-芳基硫酸酯酶均购自德国 Merck 公司。醋酸铵(HPLC 级)购自美国 Sigma 公司。冰醋酸(分析纯)、氨水均购自上海凌峰化学试剂公司。去离子水由 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制得。

标准储备液(100 μ g/mL)的配制:精密称取利巴韦林对照品约 10 mg,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准储备液。

标准使用溶液(1 μ g/mL)的配制:精密量取上述标准储备液(100 μ g/mL) 1.0 mL 至 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

内标溶液(1 μ g/mL)的配制:将 1 瓶利巴韦林-¹³C₅ 内标(约 1 mg)用甲醇-水(1:1, v/v)洗至 100 mL 容量瓶中,超声使其溶解,定容至刻度。精密量取上述溶液 5.0 mL 置 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

2.3 方 法

2.3.1 样品处理

2.3.1.1 提 取

取均质的试料 2.0 g(精确至 0.1 g)置 50 mL 离心管中,加入 0.25 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 4.8) 5 mL,内标溶液(1 μ g/mL) 50 μ L,再加入 β -盐酸葡萄糖醛基酶-芳基硫酸酯酶 20 μ L,涡旋振荡 1 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h。取出后冷却至室温,以 4600 r/min 的速度离心 10 min,取上清液至另一 50 mL 离心管中。用氨水调节 pH 至 8.5 \pm 0.1,加入正己烷 5 mL, 30 次/min 翻转振荡 1 min,以 4600 r/min 的速度离心 5 min,弃去上层液体。下层清液待固相萃取柱净化。

2.3.1.2 净 化

取 PBA 小柱(100 mg, 3 mL),依次用 3 mL 3%甲酸-甲醇溶液、3 mL 0.25 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 8.5)

活化, 转移提取液至固相萃取柱的顶部, 待提取液全部流出后, 用 3 mL 0.25 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 8.5)洗涤柱子, 在负压下至少干燥 10 min, 然后用 1 mL 0.1 mol/L 甲酸溶液洗脱固相萃取柱, 收集洗脱液, 供 HPLC-MS/MS 检测。

2.3.2 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(A), 甲醇(B); 梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 甲醇(B)体积比从 5%线性增加至 60%; 3.0~5.5 min, 甲醇(B)体积比为 60%; 5.5~7.0 min, 甲醇(B)体积比从 60% 线性减少至 5%; 7.0~10.0 min, 甲醇(B)体积比为 5%; 流速: 600 μL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C。

2.3.3 质谱条件

离子源: 电喷雾电离离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 喷雾电压: 5.5 kV; 毛细管温度: 500 °C; 雾化气压力(GS1): 50 psi; 辅助气压力(GS2): 50 psi; 气帘气压力(CUR): 35 psi; 碰撞气压力(CAD): 5 psi; 检测方式: 多反应监测(MRM)扫描模式。

3 结果与分析

3.1 供试品溶液制备的研究

3.1.1 酶解的选择

由于利巴韦林不能作为兽药使用, 所以很少有关于其在可食性动物体内的代谢规律的研究报道, 仅有数篇文献^{[13][14]}报道了利巴韦林在人或动物体内的代谢方式。由于利巴韦林以原药、利巴韦林单磷酸酯、利巴韦林二磷酸酯和利巴韦林三磷酸酯等形式存在, 所以必须对体内磷酸酯化的利巴韦林进行酶解才能对利巴韦林总量进行测定。本研究采用 37 °C 水浴对阳性肌肉样本进行酶解, 对比了非酶解、酶解 1 h 和酶解 16 h 后利巴韦林的总量。结果表明, 酶解 16 h 后的利巴韦林含量比酶解 1 h 时增加了 10%, 而非酶解测得利巴韦林的量只有酶解 1h 量的 3%。所以本研究选择 37 °C 水浴和 16 h 作为酶解条件。

3.1.2 固相萃取柱选择

综合考虑降低基质干扰、富集目标物和提高检测灵敏度等因素, 本研究选择固相萃取法作为净化方法。本研究尝试了 HLB、MCX、PBA 等固相萃取小柱, 发现 HLB 小柱对于利巴韦林的重复性较差,

MCX 小柱的回收率偏低(仅为 5%), 而 PBA(苯硼酸)小柱的优势较为明显。其特殊的苯硼酸官能团, 能够通过可逆的共价键保留分析物。这种非常强的共价保留机理产生了很高的选择性和净化效率, 使得利巴韦林得到了较好的保留。

3.1.3 定量方法的选择

在研究过程中, 首先采用外标法对利巴韦林进行了分析测定, 结果发现回收率偏低, 在 30%左右。后采用利巴韦林-¹³C₅ 作为内标物质, 用内标法对利巴韦林进行了分析测定。经比较, 采用内标法分析得到的回收率在 90%以上, 较外标法计算得到的回收率有大幅度的提高。故本方法采用内标法进行分析计算。

3.2 液相色谱-串联质谱条件的确定

3.2.1 色谱柱的选择

本研究比较了 HILIC (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)、AMIDE(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)及 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)的色谱柱, 发现 XDB-C₁₈ 能将利巴韦林与内源性化合物较好分离, 且阳性样本的质荷丰度比能与对照品一致。

3.2.2 流动相的选择

实验发现, 当流动相中加入甲酸时可以增加利巴韦林的信号响应, 加入乙酸铵时, 可以改善利巴韦林的色谱峰形, 并且乙酸铵的浓度变化对结果影响不大。综合考虑分析时间、仪器耐受、色谱峰形等多种因素, 本方法采用乙腈-含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相。

3.2.3 质谱条件的选择

本研究采用电喷雾离子源进行分析。将 1 μg/mL 的标准溶液以流动注射的方式在正离子模式下进行母离子扫描, 确定利巴韦林的分子离子。然后对其子离子进行全扫描, 其碎片离子主要为 m/z 113.0、 m/z 95.9、 m/z 133.1。经优化碰撞能量参数, 得到了最佳质谱条件, 质谱检测参数见表 1。虽然 m/z 133.1 响应较小, 但较为稳定, 故选择其作为定量离子; m/z 113.0 响应虽然较高, 但容易受到基质干扰, 在定性时可作为参考离子。

3.3 方法学验证

3.3.1 选择性

随机选择 20 批来源于批发市场、大型超市、菜场等地的鸡肉作为研究对象, 按本方法进行测定。选

择其中不含利巴韦林的样本作为空白样本, 添加对照品溶液适量后进行检测, 结果表明空白样品中的内源性物质不会干扰目标化合物的测定, 检测目标物分离良好, 如图 2、3 所示。

3.3.2 最低检测限

取空白样品, 分别加入不同体积混合标准溶液, 经过检测, 利巴韦林的最低检测限(信噪比>3)为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 如图 3 所示。

表 1 利巴韦林、利巴韦林内标质谱检测参数
Table 1 MS parameters for the determination of ribavirin and ribavirin- $^{13}\text{C}_5$

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(eV)	CXP(V)
利巴韦林	245.1	113	70	9	21	19
		95.9			40	45
利巴韦林- $^{13}\text{C}_5$	249.9	133.1	70	9	12	33
		95.9			49	12

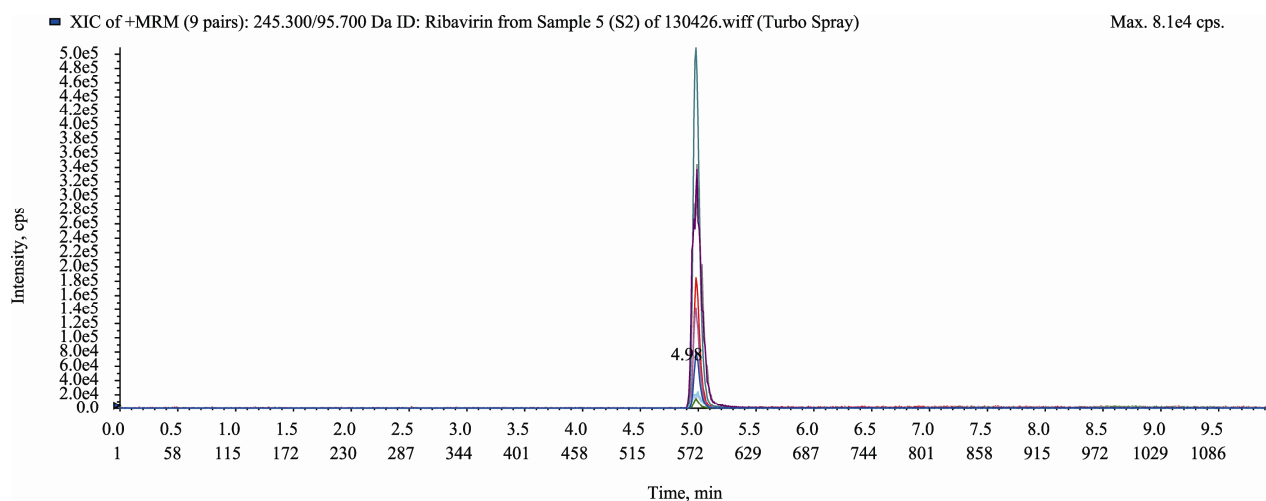


图 2 利巴韦林对照品总离子流色谱图
Fig. 2 The total ion chromatogram of ribavirin

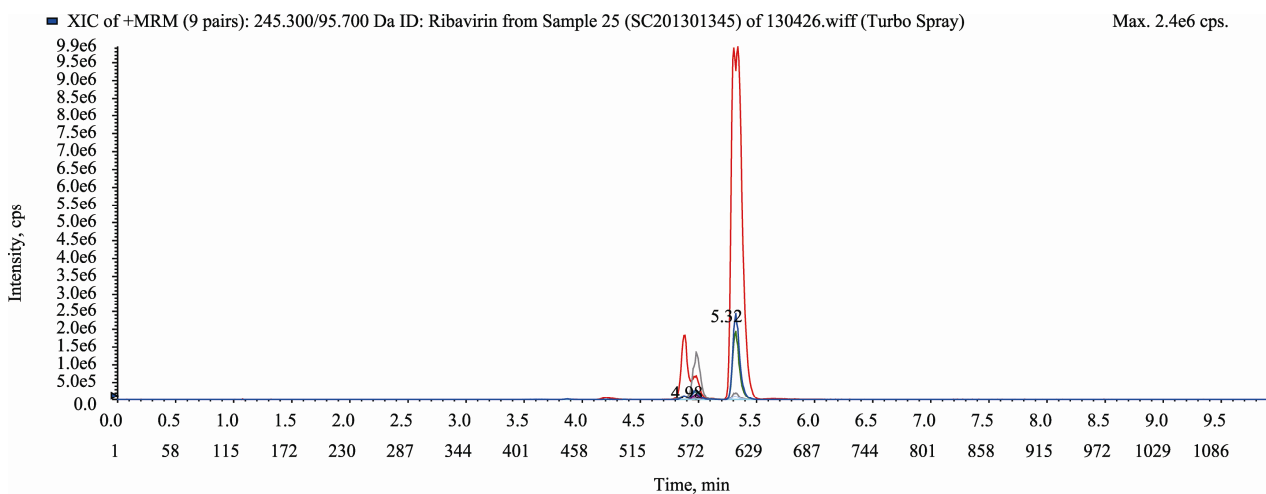


图 3 空白基质提取液添加利巴韦林对照品的总离子流色谱图
Fig. 3 The total ion chromatogram of ribavirin spiked in blank samples

3.3.3 线性范围

取浓度为 10、20、50、100、200、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的利巴韦林系列标准工作液进样, 以利巴韦林峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 以利巴韦林的浓度为横坐标绘制标准工作曲线。结果表明, 在 10~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内, 利巴韦林峰面积与内标峰面积的比值和利巴韦林浓度呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9999。

3.3.4 回收率

取空白猪肉及鸡肉样品 2.0 g 均若干份, 分别精确加入标准使用溶液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 20、200、600 μL , 配制 10、100、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个质量浓度的质控样品, 按本方法测定。回收率以空白样品添加标准溶液后进行提取的峰面积与空白样品提取后加入同样浓度的标准溶液的峰面积比计算。回收率数据见表 2, 猪肉、鸡肉中利巴韦林各浓度回收率均在 90% 以上, 令人满意。

3.3.5 精密度

取空白样品 2.0 g 若干份, 分别添加不同量的目

标化合物, 配制 10、100、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个质量浓度的质控样品, 各 6 份, 按本方法测定, 计算精密度, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 化合物的精密度在 3% 之内, 符合实际检测要求。

3.3.6 方法应用

应用本方法测定了来自超市、农贸市场及批发市场的 90 批鸡肉(全鸡、鸡腿、鸡胸肉、鸡翅根、翅中等)及 300 批猪牛羊肉及下水, 结果共有 4 批畜肉及下水样品检出利巴韦林, 检出量在 17~1037 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 见表 4。表明畜肉饲养过程中的确存在非法使用利巴韦林的现象, 并且该药物在内脏中残留较高。

4 结 果

本文建立了禽畜肉中利巴韦林残留量的高效液相色谱-串联质谱检测方法。在样品前处理中, 采用 β -盐酸葡萄糖醛酰酶-芳基硫酸酯酶酶解, 醋酸铵缓冲溶液(pH 4.8)提取, 再经过 PBA 固相萃取柱净化。前处理步骤简单, 能针对利巴韦林的性质对样品进行充

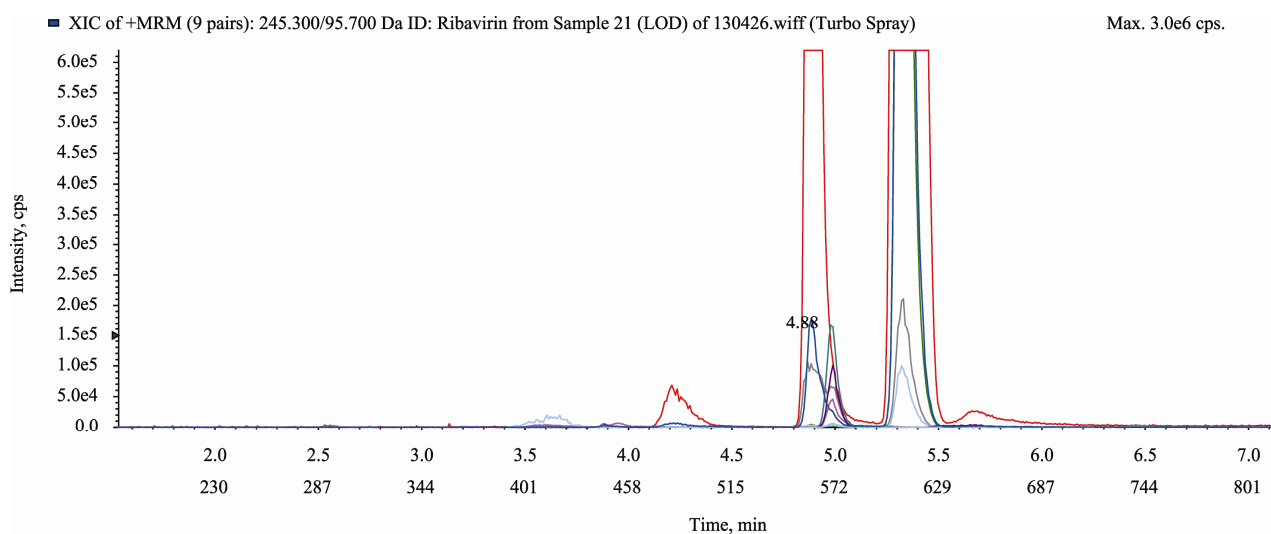


图 4 利巴韦林检测限的色谱图

Fig. 4 The chromatogram of LOD of ribavirin

表 2 利巴韦林回收率测试结果($n=5$)

Table 2 The recovery results of ribavirin ($n=5$)

化合物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	猪肉		鸡肉	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
利巴韦林	10	97.0	2.9	97.8	2.1
	100	109.4	3.7	105.3	2.5
	300	102.0	2.3	102.9	1.8

表3 猪肉中利巴韦林的精密度($n=6$)
Table 3 The precision of ribavirin in porks ($n=6$)

化合物	添加浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$	精密度%	
		猪肉	鸡肉
利巴韦林	10	2.7	2.5
	100	1.0	0.7
	300	2.8	0.8

表4 利巴韦林阳性样品的检出结果
Table 4 Positive results for the real case

样品	基质	检测结果($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	肥牛肉片	133
2	肥牛3号片	17
3	猪肝	477
4	猪肾	1037

分的净化。本实验采用内标法进行定量,利巴韦林的检测限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在 $97.0\% \sim 109.4\%$ 之间,精密度在 $0.7\% \sim 2.8\%$ 之间($n=6$),保证了方法的准确性。本文使用的 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 柱和相应的流动相可使利巴韦林与结构相似的内源性化合物较好地分离。该方法具有前处理简单,选择性好,灵敏度高等优点,可用于禽畜肉中利巴韦林残留量的定量检测。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学(第17版)[M].北京:人民卫生出版社,2011.
Chen XQ, Jin YY, Tang G. New Pharmacology (17th Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing Press, 2011.
- [2] 程忠刚,傅伟龙,刘树中.动物抗病毒药物应用研究进展[J].中兽医医药杂志,2010,(6):17-19.
Cheng ZG, Fu WL, Liu SZ. Research progress of application of animal antiviral drugs [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2010, (6): 17-19.
- [3] Austin RK, Hintz M. Sensitive radio-immunossay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin [J]. Antimicrobiol Agents Chemoth, 1983, 24(5): 696-701.
- [4] Hama M, Jayewardene AL, Gambertoglio J, et al. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes [J]. Antimicrob Agents Chemoth, 1999, 43(11): 2716-2719.
- [5] Roboz J, Suzuki R. Determination of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole) in blood and urine by chemical ionization-mass fragmentography [J]. J Chromatogr, 1978, 160: 169-179.
- [6] Yeh LT, 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.
- [7] Henk VDL, Jan WCA, Wim TK, et al. Determination of ribavirin in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2012, 88: 385-390.
- [8] Liu YF, Xu C, Yan RZ, et al. Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of viramidine and ribavirin in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2006, (832): 17-23.
- [9] 吴飞,丁黎. LC-MS 法应用于利巴韦林颗粒剂的人体生物等效性研究[J].医学信息(中旬刊),2011,(8):28-29.
Wu F, Ding L. Study on the bioequivalence of ribavirin granules in healthy volunteers by LC-MS [J]. Med Inform, 2011, (8): 28-29.
- [10] 崔成富,陈创华,林海丹,等.中兽药散剂中非法添加利巴韦林的检测方法研究[J].中国兽药杂志,2011,(09):38-41.
Cui CF, Chen CH, Lin HD, et al. Study on the Determination method of ribavirin illegally added in the veterinary traditional Chinese herb medicine powders [J]. Chin J Vet Drug, 2011, (09): 38-41.
- [11] 王维霞. LC-MS/MS 对鸡肉中利巴韦林残留的分析[J].山东畜牧兽医,2013,34(7):8-9.
Wang WX. Analysis of ribavirin residues in chicken by LC-MS/MS [J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2013, 34(7): 8-9.
- [12] 朱永林,邵德佳,蒋天梅,等.高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肝中利巴韦林及其代谢物残留总量[J].中国兽药杂志,2008,42(7):22-25.
Zhu YL, Shao DJ, Jiang TM, et al. Determination of the total amount of ribavirin and its metabolite residues in chicken liver by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Vet Drug, 2008, 42(7): 22-25.
- [13] Yeh LT, 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] Lin CC, Yeh LT, Luu T, et al. Pharmacokinetics and metabolism of [^{14}C]ribavirin in rats and cynomolgus monkeys [J]. Antimicrobiol Agents Chemoth, 2003, 47(4): 1395-1398.

(责任编辑:张宏梁)

作者简介



陈燕, 主管药师, 主要研究方向为食品与药品分析。
E-mail: rammychen@hotmail.com



刘畅, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为食品与药品分析。
E-mail: ccchangchang@hotmail.com