

鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留基体标准物质的研制

刘正才^{1*}, 杨方¹, 吕小玲², 姚闽娜³, 杨旭³, 林永辉¹, 张琼¹

(1. 福建出入境检验检疫局福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福州 350001; 2. 福建圣农发展股份有限公司, 南平 354100; 3. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002)

摘要: **目的** 建立含金刚烷胺和利巴韦林多残留鸡肉糜样自然基体标准样品的研制和定值方法。**方法** 通过添加金刚烷胺和利巴韦林饲养白羽肉鸡获得阳性样本, 然后经过取样、均质、包装、辐照灭菌、均匀性检验、稳定性检验、协同定值等过程, 制备预期目标含量水平的含金刚烷胺和利巴韦林的多残留鸡肉糜样自然基体标准样品。**结果** 经 10 家实验室采用液相色谱-串联质谱法进行协同定值, 金刚烷胺和利巴韦林的特性值分别为 $10.1 \pm 1.0 \mu\text{g/kg} (k=2)$, $11.3 \pm 1.6 \mu\text{g/kg} (k=2)$ 。**结论** 研究表明获得的样品均匀性良好, 稳定性达到 10 个月, 能够用于兽药残留检测的质量控制。

关键词: 鸡肉; 金刚烷胺; 利巴韦林; 残留; 基体标准物质

Preparation of matrix reference material of amantadine and ribavirin residues in chicken muscle

LIU Zheng-Cai^{1*}, YANG Fang¹, LV Xiao-Ling², YAO Min-Na³, YANG Xu³, LIN Yong-Hui¹, ZHANG Qiong¹

(1. Fujian Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Fujian Provincial Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Fuzhou 350001, China; 2. Fujian Sunner Development Co., Ltd., Nanping 354100, China; 3. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for preparation and certification the matrix reference material (RM) of amantadine and ribavirin residues in chicken muscle. **Methods** The reference material was prepared by adding amantadine and ribavirin to feed white-feather chicken. The reference material minced chicken muscle with expected two antivirals (containing amantadine and ribavirin) residues was developed by the procedure of sampling, homogeneous, sealed packaging, irradiation sterilization, homogeneous testing and stability testing. **Results** The concentrations of the chemical constituents of the samples were certified through the collaborative analysis program participated by 10 laboratories with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, and the uncertainty assessment was performed. The property values and expanded uncertainties of amantadine and ribavirin were $10.1 \pm 1.0 \mu\text{g/kg} (k=2)$ and $11.3 \pm 1.6 \mu\text{g/kg} (k=2)$, respectively. **Conclusion** The results showed that the

基金项目: 国家质检总局科技项目(2014IK110)、质检公益项目(201310143-02)、福建省科技计划重点项目(2012Y6001, 2012Y0003)

Fund: Supported by AQSIQ Research Projects (2014IK110), General Administration of Quality Supervision, Inspection of Public Projects (201310143-02) and the Key Programs for Science and Technology Development of the Fujian Province (2012Y0003 and 2012Y6001)

*通讯作者: 刘正才, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: liuzhengcai@gmail.com

*Corresponding author: LIU Zheng-Cai, Senior Engineer, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fujian Provincial Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Fuzhou 350001, China. E-mail: liuzhengcai@gmail.com

uniformity of samples was good, and the expiration date of reference material was at least 10 months. The reference material can be used in the quality control of residues detection.

KEY WORDS: chicken muscle; amantadine; ribavirin; residues; matrix reference material

1 引言

随着畜禽饲养集约化水平提高,传染病的发生与流行已成为阻碍我国畜牧业快速发展的重要因素,因病毒感染导致动物死亡的比率仅次于细菌感染的致死率,继抗生素药物后,抗病毒药物被大量使用于畜禽产品生产中^[1]。金刚烷胺(amantadine, AMD)和利巴韦林(ribavirin, RB)均为人用主要抗病毒类药物,一些养殖企业为了防治病毒感染和经济效益,大量违规使用该药物用于鸡、鸭、猪流感的预防和早期治疗及猪传染性胃肠炎的防治等,导致抗药性增强以及畜禽产品抗病毒类药物残留超标现象,对消费者健康和对外贸易均产生很大危害。美国、加拿大以及我国均禁止使用金刚烷胺、利巴韦林等抗病毒类药物用于防治高致病性禽流感等引起的病毒性疾病^[2],此类药物也已列入我国畜禽产品普查及风险监测的重点项目。因此,准确监控和检测该类药物残留具有重要意义。

标准物质(reference material, RM)是具有一种或多种足够均匀和很好地确定了特性值,用于校准设备、评价测量方法或给材料赋值材料或物质^[3],标准物质的研制是分析过程中质量保证的基础,是确保检测方法数据的可靠性、可比性、可溯源性的前提^[4]。基体RM的候选材料获取于天然基体,目标物和基体结合情形与真实检测样品完全一致,在分析中可有效避免基体效应对物质成分分析的影响,因此,基体RM在食品残留检测结果的准确性和可靠性方面起到至关重要的作用。国外食品安全检测标准物质的研发起步较早,涉及重金属残留、食品添加剂、农药残留、食品毒素污染物等领域,但兽药基体标准样品较少,根据国际标准物质数据库(COMAR)检索,没有发现金刚烷胺和利巴韦林。我国对标准物质的研究比较晚,多年来我国的冶金、有色金属标准样品一直是标准样品的主力,近年来随着食品安全检测越来越受到世人的关注,食品标准样品开始起步发展,含药物残留的动物源基体标准物质的研究鲜见报道^[5-9],尚未见含金刚烷胺和利巴韦林的鸡肉基体RM研制的报道。本文主要介绍了以鸡肉为基体的含金刚烷胺和利巴韦林的RM的研制过程,该方法操作简单、稳定可靠,该标准物质可以满足国内外鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留检测进行质量控制和方法验证的需求。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源

(ACQUITY UPLC Waters 公司; API5500, Applied Biosystems 公司); 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 电动肉丸机(YQ-6, 中国佛山俊凌厨具电器厂); stomacher3500型拍击均质器(英国 Seward 公司); 分析天平(德国 Sartorius 公司); 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); ⁶⁰Co-γ-射线辐照装置(福建省康普顿公司)。

白羽肉鸡(福建圣农发展股份有限公司提供,约2 kg/只)。金刚烷胺和利巴韦林标准品(纯度≥98.5%),均购于德国 Dr.Ehremstorfer 公司; 同位素内标金刚烷胺-D₆、利巴韦林-¹³C₅, (纯度≥99.0%), 购自于 Sigma 公司; 乙腈、甲酸、冰乙酸均为色谱纯, 购于德国 Merck 公司; 酸性磷酸酯酶(Phosphatase Acid, From Wheat Germ, CAS 编号: 9001-77-8); Bond Elut PBA 固相萃取小柱(200 mg/3 mL, 美国安捷伦公司); Supelclean LC-SCX 固相萃取柱(北京振翔公司, 3 mL/60 mg); 包装材料: 铝箔复合材料平口袋为外包装, PE 平口袋作内袋。

2.2 自然污染样本的制备

选取体重约2公斤的白羽肉鸡200只,每次给药剂量为利巴韦林6 g/100 kg 水,金刚烷胺3 g/100 kg 水,每日给药1次,连续给药4 d,第5天给药后1 h 制得鸡肉样品。将肉鸡宰杀、去毛,取前胸肉,采用电动肉丸机,制成肉糜; 将肉糜3000 r/min 转速搅成酱样并匀浆5 min; 以4 kg/次的鸡肉量搅拌3次,混合后再搅拌3次; 再采用拍击式均质器进行二次混匀: 将样品装入拍击袋,置于拍击式均质器中,按180 拍/min 的频率,每次拍击5 min 后取出,再进行更换拍击,如此反复拍击3次。

将均质后的肉糜装袋,采用双层复合袋独立真空包装,每袋约25 g,贴上带有编号的样品标签,获得独立包装样本500个。以⁶⁰Co-γ-射线辐照灭菌,辐照剂量为9 kGy,灭菌后的样品置于-18℃冰柜冷冻保存。

2.3 样品均匀性与稳定性检验

随机抽取15份独立包装样品,取样量为5 g,以每个样品3次重复测试数据为一组,每种药物共15组45个数据,采用单因素方差分析法(*F*-检验)检验样品的均匀性。

稳定性检验分为长期稳定性和短期稳定性进行,长期稳定性共进行10个月,每月取样1次,每个样品重复检测3次,以平均值作为检测结果。短期稳定性通过模拟样品运输条件,利用*F*-检验法对检测结果的均匀性进行评价。

2.4 定值及溯源性

采用邮政网络协同定值^[10],选择10家金刚烷胺和利

巴韦林检测能力在食品兽药残留检测领域知名度较高的实验室作为协作定值实验室, 分别用编号 01~10 表示, 每个实验室测定 3 个样品, 每个样品平行测定 2 次。检测数据经夏皮洛-威尔克(Shapiro-Wilk)检验^[11]、柯克伦(Cochran)检验及格拉布斯(Grubbs)检验^[12]后取平均值进行定值。特性值不确定度 U_{CRM} 参照 GB/T 15000.3-2008^[13]进行评估。通过有证金刚烷胺和利巴韦林标准样品溯源, 以有证标准物质配制的标准溶液制作校准曲线, 以保证溯源性。

2.5 样品的分析方法

2.5.1 样品前处理方法

参考 SN/T 4253-2015 《出口动物组织中抗病毒类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》检测样品中金刚烷胺残留量; 参考 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》检测样品中利巴韦林残留量, 同位素内标法定量。

2.5.2 仪器条件

NUCLEOSHELL® HILIC (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液-0.2 %甲酸; B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~2 min, 95%B, 2~4 min, 95%B ~75%B,

4~5 min, 75%B~70%B, 6~10 min 95%B; 流速 0.4 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL。

多反应监测(MRM)扫描模式; 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描; 电喷雾电压(IS): 5500 V; 气帘气压力(CUR): 0.241 MPa(氮气); 离子源温度(TEM): 500 ℃; 雾化气压力 0.379 MPa; 辅助气压力 0.379 MPa。MRM 质谱参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 药物代谢及样本的制备

首先进行白羽鸡给药预实验, 按照 2.2 方法喂药之后, 去毛后取鸡前胸肉、肾、肝、血制成匀浆样, 按 2.5.1 方法分别进行测试, 鸡肉组织和血液中金刚烷胺和利巴韦林的残留量随药后时间的变化趋势如图 1 所示。从图中可以看出, 鸡肉、鸡肝、鸡肾以及血液中的金刚烷胺和利巴韦林含量随时间的推移, 先升高后趋于稳定, 其中鸡肉样品中金刚烷胺和利巴韦林均在 5 d 后降至合适浓度水平且基本稳定。因此, 阳性样本选择时间在用药后 5 d 采集, 以确保药物浓度适中且相对稳定。

表 1 2 种化合物的主要质谱参数
Table 1 MS/MS parameters of 2 compounds

化合物	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 /eV	入口电压/eV	碰撞能量/eV	出口电压/eV
金刚烷胺	4.4	152.1	135.1*	100	8	22	12
			107.1	100	8	37	12
			93.1	100	8	39	12
利巴韦林	2.1	245.1	113.1*	100	9	15	12
			96.0	100	9	35	12
金刚烷胺-D ₆	4.4	158.0	141.1	100	10	26	12
利巴韦林- ¹³ C ₅	2.1	250.1	113.0	100	10	15	12

*定量离子

表 2 鸡肉中金刚烷胺与利巴韦林残留量的均匀性方差分析
Table 2 The homogeneity test results of amantadine and ribavirin residues in chicken muscle

化合物	差异源	SS	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i> -crit
金刚烷胺	瓶间	8.7101	14	0.62215	1.170	0.3452	2.03742
	瓶内	15.948	30	0.53162			
	总计	24.6585	44				
利巴韦林	瓶间	18.4014	14	1.3144	1.184	0.3357	2.03742
	瓶内	33.2983	30	1.1099			
	总计	51.69975	44				

SS: 方差; df: 自由度; MS: 均方差; *F*:*F* 值; *P*-value: *P* 值; *F*-crit: *F* 的临界值

将采集的阳性肌肉样本,采用电动肉丸机制成糜样、然后采用拍击均质和人工搅拌相结合的工艺,保障样本的均匀性。选用 PE 平口袋为内袋,铝箔复合材料为外袋的双层包装袋进行真空包装后,对样本进行 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照灭菌,有效延长了保质期。

3.2 均匀性研究

随机抽取 15 份独立包装样品,每个样品平行检测 3 次。对检测结果采用单因素方差分析法(F -检验)进行统计分析,方差分析结果如表 2 所示。表 1 方差分析结果表明 $F_{\text{金刚烷胺}}=1.170 < F_{0.05(14,30)}=2.03742$, $F_{\text{利巴韦林}}=1.184 < F_{0.05(14,30)}=2.03742$ 其 P -value 均大于 0.05,表明显著水平 $\alpha=0.05$ 时,其结果均未见显著差异,从而可以判定所研制的基体 RM 是均匀的。

3.3 稳定性研究

短期稳定性的考察分别模拟样品运输条件和极端条件,将样本分别置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、室温、阳光下暴晒条件下保存 14 d 后测定,每个样品重复测试 3 次。首先,从外观上观察,样品均未出现膨胀、样品变质等不正常状态;检测数据采用 F -检验表明:在显著水平 $\alpha=0.05$ 时, $F_{\text{金刚烷胺}}=1.909 < F_{\text{crit}}(3.490)$, $F_{\text{利巴韦林}}=0.1223 < F_{\text{crit}}(3.490)$,其结果均未见显著差异,从而可以判定所研制的自然基体标准物质短期是稳定的,满足常温实际运输要求。

长期稳定性实验设计和计算过程参照 GB

15000.3-2008 之“8 稳定性研究”进行,样品长期藏于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中,每月取样 1 次,连续 10 个月检测。根据稳定性研究的测量数据,采用 F 检验法检验一元线性回归模型的显著性,检测数据及分析结果表明,在 95%置信水平,利巴韦林 Significance $F=0.145 > 0.05$,金刚烷胺 Significance $F=0.417 > 0.05$,表示回归是不显著的,因此确定基体 RM 在 10 个月内是稳定的。

3.4 定值与离群值检验

本批标准品邀请了 10 家具有检测资质的机构协同定值,虽检测环境、仪器条件、检测人员不同,但均采用液相色谱-串联质谱法进行测定($n=2$),同位素内标法定量,每个实验室检测结果如表 3 所示。

定值结果通过正态分布检验、柯克伦检验、格拉布斯检验,剔除统计无效数据,取平均结果定值。特性值不确定度通过测定值标准不确定度、瓶间标准不确定度、长期稳定性不确定度的合成并扩展来评定。最终的特定值为:金刚烷胺特性值为 $10.1 \pm 1.0\text{ }\mu\text{g/kg}(k=2)$,利巴韦林特性值为 $11.3 \pm 1.6\text{ }\mu\text{g/kg}(k=2)$ 。

3.5 样品谱图

阳性样本按 2.5.1 前处理后上机检测,得到离子监测色谱图,如图 2 所示。可看出各离子对的峰形良好,且目标物出峰处无杂峰干扰,方法检出限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$,由此可见,制备的鸡肉肌肉中金刚烷胺和利巴韦林的浓度是适当的。

表 3 协同定值($n=2$)
Table 3 Cooperative setting value ($n=2$)

实验室	金刚烷胺($\mu\text{g/kg}$)						利巴韦林($\mu\text{g/kg}$)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
01	10.1	10.4	10.6	10.3	10.7	10.3	10.4	10.4	10.9	11.1	11.4	10.6
02	9.72	10.4	9.95	10.2	9.88	10.5	13.6	15.1	14.5	13.4	15.2	13.6
03	9.48	9.91	9.47	9.72	10.1	9.95	12.8	13.5	13.2	12.6	12.8	12.3
04	10.7	9.92	9.81	9.78	9.48	10.4	11.2	10.4	10.9	10.9	10.5	11.1
05	10.2	9.94	10.5	11.1	10.1	11.5	11.4	11.6	11.3	12.6	12.1	12.1
06	8.85	8.99	9.86	9.61	9.77	9.31	11.9	12.4	11.5	11.9	11.7	12.2
07	11.3	10.9	12.1	11.9	10.6	12.5	10.6	11.5	10.2	11.9	11.4	10.9
08	9.02	8.95	9.24	9.02	10.4	9.24	9.07	9.79	9.14	9.43	9.21	9.50
09	9.51	10.3	9.61	9.57	9.38	9.61	11.6	11.9	12.0	11.9	11.8	12.2
10	10.4	9.39	9.94	9.69	10.4	9.83	8.50	8.25	8.43	8.71	8.36	8.79
平均值	9.93	9.91	10.1	10.1	10.1	10.3	11.1	11.5	11.2	11.4	11.4	11.3
标准偏差	0.8	0.6	0.8	0.8	0.5	1.0	1.6	1.9	1.8	1.5	1.9	1.4

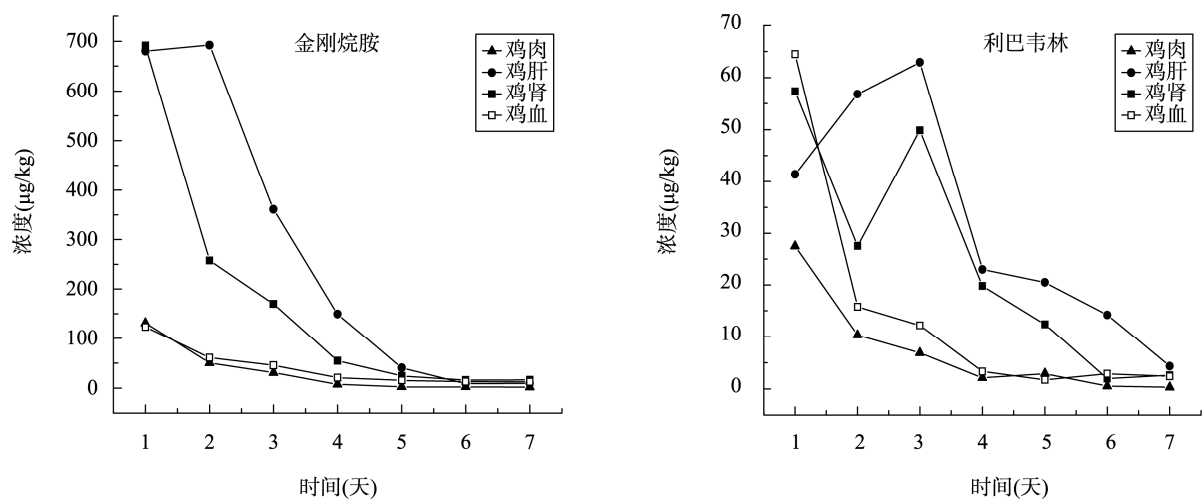


图 1 鸡组织和血液中金刚烷胺和利巴韦林残留量随药后时间变化
Fig. 1 Changes of residues in chicken tissue and blood after drug application

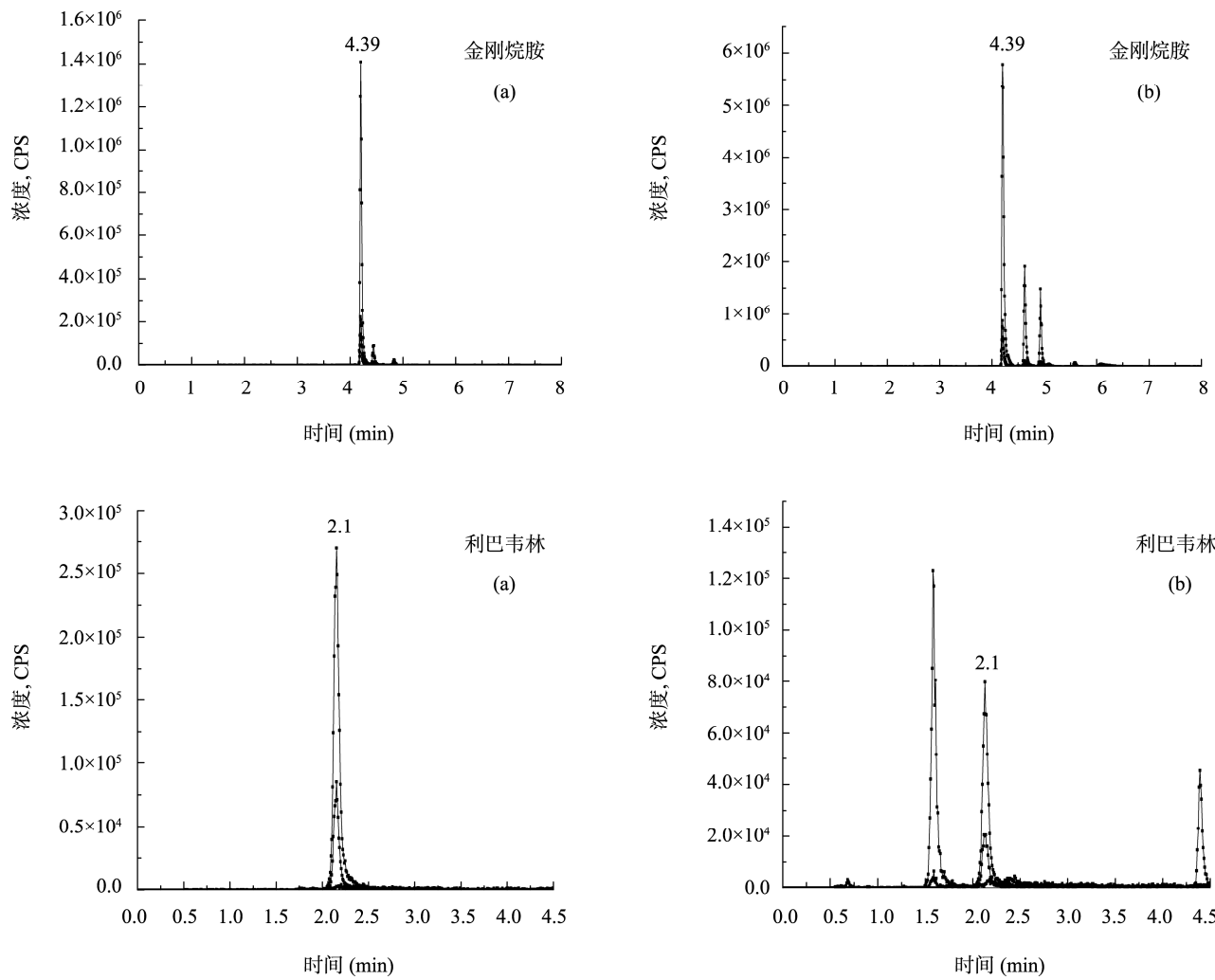


图 2 标准溶液(a) 及样品(b)的选择离子监测色谱图

Fig. 2 Selected ion chromatograms of standard solutions (a) and RM samples (b)

(a): 金刚烷胺和利巴韦林混合标准溶液(10 μg/L), 进样量: 2 μL; (b) 金刚烷胺(10.1 μg/L)和利巴韦林基质标准溶液(11.2 μg/L), 进样量: 2 μL

4 结 论

本研究采用液相色谱-串联质谱法,多家实验室邮政网络协同定值,制得一批含有金刚烷胺和利巴韦林的鸡肉RM,结果测量值可靠,均匀性和稳定性良好,金刚烷胺特性值为 $10.1 \pm 1.0 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$),利巴韦林特性值为 $11.3 \pm 1.6 \mu\text{g/kg}$ ($k=2$)。本研究建立的研制和定值方法对进一步开展抗病毒类药物残留检测用基体RM研制具有重要的意义。

参考文献

- [1] 李秋,王珊. 抗病毒药物的研究进展[J]. 医药导报, 2011, 6(30): 732-735.
- [2] Li Q, Wang S. The research progress of antiviral drugs [J]. Her Med, 2011, 6(30): 732-735.
- [3] FDA Prohibits Use of Antiviral Drugs in Poultry to Help Keep Drugs Effective for Humans[EB/OL]. [2009-06-18]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucml08620.htm>
- [4] 全浩, 韩永志. 标准物质及其应用技术[M]. 第2版. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [5] Quan H, Han YZ. Standard substance and its application technology [M]. 2nd ed. Beijing: China Standard Press, 2002.
- [6] Zakaria O, Rezali MF. Reference materials as a crucial tools for validation and verification of the analytical process [J]. Procedia-Soc Behav Sci, 2014, 121(2): 204-213.
- [7] 杨方, 杨守深, 卢声宇, 等. 鳙鲩肌肉冻干粉中呋喃唑酮代谢物3-氨基-2-噁唑烷酮残留标准物质的研制[J]. 分析化学, 2010, 38(3): 397-400.
- [8] Yang F, Yang SS, Lu SY, et al. Preparation and certification of reference materials for 3-amino-a-oxazolidinone residue in eel muscle lyophilisates [J]. Chin J Anal Chem, 2010, 38(3): 397-400.
- [9] 余孔捷, 杨方, 刘正才, 等. 含氟甲喹残留的鳙鲩肉糜自然基体标准样品的制备[J]. 色谱, 2011, 29(7): 691-695.
- [10] Yu K J, Yang F, Liu ZC, et al. Preparation of natural matrix standard sample of minced eel for quality control of flumequine residue[J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29 (7): 691-695.
- [11] 时文春, 冯燕平, 李开锋, 等. 鱼肉中氯霉素标准样品的研制[J]. 分析测试学报, 2012, 31(10): 1339-1344.
- [12] Shi WC, Feng YP, Li KF, et al. The research of reference material chloramphenicol in fish [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(10): 1339-1344.
- [13] 黄超群, 谢文, 侯建波, 等. 蜂王浆冻干粉中甲硝唑残留标准样品制备的研究[J]. 分析测试学报, 2013, 32(4): 512-518.
- [14] Huang CQ, Xie W, Hou JB, et al. Preparation of reference material for metronidazole residue in royal jelly powder [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(4): 512-518.
- [15] 余孔捷, 刘正才, 黄杰, 等. 含喹诺酮类多残留鳙鲩自然基体标准样品快速制备[J]. 分析试验室, 2015, 34(2): 182-185.
- [16] Yu KJ, Liu ZC, Huang J, et al. Fast production of natural matrix reference material minced eel with quinolone multi residues[J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(2): 182-185.
- [17] Ellison SR, Rosslein M, Williams A, et al. Eurachem/CITAC guide cg4. quantifying measurement uncertainty in analytical measurement [M]. Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2000.
- [18] GB/T 4882-2001 数据的统计处理和解释-正态性检验[S].
- [19] GB/T 4882-2001 Statistical interpretation of data-normality tests [S].
- [20] GB/T 6379.2-2004 测量方法与结果的准确度第2部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法[S].
- [21] GB/T 6379.2-2004 Accuracy of measurement methods and results-part 2: basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method [S].
- [22] GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法[S].
- [23] GB/T 15000.3-2008 Directives for the work of reference materials(3)reference materials-general and statistical principles for certification [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



刘正才, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为农兽药残留检测分析。
E-mail: 54369174@qq.com