

利巴韦林在畜禽体内的代谢规律与检测 技术研究进展

魏法山¹, 巩阿娜², 盖圣美², 谢文佳¹, 刘登勇^{2*}

(1. 河南省产品质量监督检验院, 郑州 450004; 2. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁省食品安全重点实验室, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 锦州 121013)

摘要: 利巴韦林是一种人工合成的核苷类广谱强效抗病毒药物, 主要用于临床医学, 在畜禽养殖过程因利益驱使违规使用利巴韦林药物的现象仍普遍存在, 导致在生产实践中多次发生畜禽利巴韦林中毒事件而被禁止使用。本文主要介绍了利巴韦林在畜禽动物体内的代谢规律及检测方法的研究现状。重点阐述了利巴韦林药物的基本理化性质、合成方法及药代动力学; 并归纳总结了我国现行有效的该药物残留标准检测方法及其他新型检测方法, 详细分析和评价每种检测方法的优缺点。旨在为食品安全工作者及科研人员提供参考, 为肉食品行业健康快速发展和保障人们食品安全奠定基础。

关键词: 畜禽动物; 利巴韦林; 代谢规律; 检测技术

Progress on metabolic regularity and detection technique of ribavirin in livestock and poultry

WEI Fa-Shan¹, GONG A-Na², GAI Sheng-Mei², XIE Wen-Jia¹, LIU Deng-Yong^{2*}

(1. Henan Province Product Quality Supervision and Inspection Center, Zhengzhou 450004, China; 2. College of Food Science and Technology, Bohai University; Food Safety Key Lab of Liaoning Province; National & Local Joint Engineering Research Centre of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China)

ABSTRACT: Ribavirin is a kind of artificial synthetic of nucleoside broad-spectrum antiviral drugs and it is widely used in clinical medicine. However, because of the interests of illegal, the phenomenon of abuse of ribavirin still exists in the process of livestock and poultry breeding, and it is forbidden due to occur repeatedly the poison of livestock and poultry ribavirin in production practice. The present paper mainly introduced the research status of ribavirin target and detection technique in animal body. The basic physicochemical properties, synthetic method and pharmacokinetics of ribavirin drugs were described, the domestic and foreign current detecting standards and methods of ribavirin were summarized, and the advantages and disadvantages of each kind of drugs detection method were analyzed and evaluated. It could provide references for food safety workers and researchers, and lay a good foundation to the rapid development of meat industry and the safeguard of people's safety.

KEY WORDS: animals; ribavirin; metabolic regularity; detection technique

*通讯作者: 刘登勇, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉品加工与质量安全控制。E-mail: jz_dyliu@126.com

*Corresponding author: LIU Deng-Yong, Ph.D., Associate Professor, Bohai University, No.19, Keji Road, New Songshan District, Jinzhou 121013, China. E-mail: jz_dyliu@126.com

1 引言

利巴韦林是一种人工合成的核苷类广谱强效抗病毒药物。自 1972 年合成^[1,2]以来, 主要用于人类病毒性感冒、腺病毒、肺炎、麻疹、甲型肝炎及病毒性脑炎等疾病的治疗^[3]。然而, 近些年伴随着畜牧业的规模化、集约化发展, 畜禽及其产品的广泛流通, 动物发病种类、病死率有逐年增高的趋势, 由病毒感染造成的动物死亡比例也逐年增加。面对目前抗病毒药物种类偏少、新型开发抗病毒药物不良反应较多的情况, 抗病毒效果显著且价格低廉的利巴韦林在畜禽类养殖中的违禁使用屡禁不止, 2012 年的“速生鸡”事件便证明了这一点。同时由于临床兽医用药的盲目性与习惯性(超剂量用药), 导致在生产实践中多次发生畜禽利巴韦林中毒事件^[4,5]。由此, 美国食品药品监督管理局(FDA)和我国农业部相继明确规定了该药物为禁用兽药^[6]。然而, 因利益驱使, 在畜禽养殖过程违规使用利巴韦林药物的现象仍普遍存在, 又因利巴韦林在动物体内易发生代谢转化, 使病毒变异, 在畜禽体内残留并蓄积在肝脏、肾脏、皮脂等各组织器官中, 从而导致该药物在动物体内大量残留, 可能直接危害人体健康, 也可能使致病菌产生耐药性, 间接对人类健康造成影响。

近些年, 食品安全已经成为全球关注的焦点, 对于食品中有毒有害物质残留的检测方法也迅速发展。目前, 国内外检测利巴韦林的方法主要以放射免疫法^[7]、分光光度法^[7]、液相色谱法^[8]、液相色谱-质谱法^[9,10]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[11]等方法为主。因此, 本文主要对近几年爆发事件频率高、使用量大、对畜禽及人体危害程度较强的利巴韦林药物的代谢规律及检测方法进行综述, 并详细分析和评价该药物的药代动力学及检测方法的优缺点, 为食品安全工作者及科研人员提供参考, 为肉食品行业健康快速发展和保障人们食品安全奠定基础。

2 利巴韦林药物在畜禽体内的代谢规律研究现状

利巴韦林药物被畜禽动物摄入机体后, 易发生代谢转化, 使得其在机体内只有一部分是以原药的形式存在, 更多的是以代谢产物形式经血液运输后分布在各个组织中, 由此给科研人员及监管部门的检测人员带来困难。因此, 有必要对该药物目前的研究现状进行了解, 熟悉该药物的整个代谢规律(包括理化性质、合成方法以及药代动力学等), 以期对相关检测人员带来便利, 为畜禽产品质量安全监管提供科学的理论依据。

2.1 利巴韦林药物的性质及合成方法

利巴韦林, 又名病毒唑, 三氮唑核苷, 化学名 1- β -D-呋喃核糖基-1H-1, 2,4-三氮唑-3-甲酰胺。最早由美国 ICN

公司开发^[12], 我国于 1973 年由湖北省医药工业研究所研制, 并于 1980 年正式通过鉴定和投产使用^[13]。该药物是一种具有广谱抗病毒活性的合成类嘌呤核苷酸类似物, 为单磷酸次黄嘌呤核苷脱氢酶抑制剂, 抑制次黄嘌呤核苷酸(xanthylic acid, IMP)转变为鸟苷酸, 阻碍病毒核酸合成, 阻止病毒复制和传播, 从而达到抗病毒的作用。对多种 RNA 和 DNA 病毒均有明显的抑制作用^[2,14], 对 HIV 病毒也有较强的抑制作用。

目前, 我国利巴韦林合成的方法主要为化学合成法、酶法、发酵法和工程菌的构建等 4 种方法。其中化学合成法是我国目前最主要的生产方法, 主要以肌苷或鸟苷为原料, 经酰化、缩合、氨解 3 步反应合成^[15]。但是该方法具有一定的弊端, 即操作步骤繁杂, 环境污染问题严重, 而且效率低, 因此在工业化生产中受到一定的限制。酶法主要是利用某种微生物(如乙酰短杆菌等)嘌呤核苷磷酸酶的作用, 使核苷类化合物与 TCA 反应而制得利巴韦林^[16]。尽管采用该方法制备利巴韦林比化学合成法转化率要高, 但是也受到嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)活性的限制且原料成本较高, 不利于工业化生产。此外, 古屋晃等^[17]在 1976 年发明了采用发酵法生产利巴韦林的专利, 该专利是通过在培养基中加入 TCA, 利用枯草杆菌属等特定微生物的作用, 进行发酵培养而产生利巴韦林。一般包括直接发酵法和混合菌发酵法。但是, 据报道工业生产使用的绝大多数高产菌株主要是通过诱变方法或原生质体融合等方法选育获得, 而提高枯草芽孢杆菌产量也是工业生产中的关键问题。因此, 为解决生产中的困难, 工程菌的构建成为解决此类困难的一种有效方法^[18]。

根据利巴韦林药物合成方法及理化性质, 可知利巴韦林进入宿主细胞后, 首先被腺苷激酶磷酸化为 RMP, 随之在单磷酸、双磷酸腺苷激酶的作用下转化为 RDP、RTP^[19,20]。对于哺乳动物的腺苷激酶, 利巴韦林是一种相对较弱的底物。而在哺乳动物细胞内 RTP 是主要的胞内代谢产物, 这意味着腺苷激酶是合成反应的限速酶。当利巴韦林磷酸化代谢产物快速消除时, 将导致利巴韦林抗病毒作用缺乏持久性。研究表明, 利巴韦林消除的主要途径为代谢转化, 其通过肾脏代谢消除的部分仅占 5%~15%^[21]。剩余部分在动物体内可能的代谢途径有两条: 一条代谢途径是去核糖基化或酰胺水解形成三唑羧酸代谢物; 另一条是可逆的磷酸化途径^[22], 磷酸化的活性产物包括利巴韦林单磷酸、利巴韦林二磷、利巴韦林三磷酸^[23,24], 其中涉及多种酶(腺苷激酶、嘌呤核苷磷酸化酶)的作用。

2.2 利巴韦林药代动力学

药代动力学(pharmacokinetics)是定量研究药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄规律, 并运用数学原理和方法阐述血药浓度随时间变化规律的科学。其研究有利于制定科学合理的用药方案, 为新药设计和临床用药提供客观

的评价标准^[25,26]。

目前,我国在仔猪口服利巴韦林的药代动力学方面已有研究,结果表明,利巴韦林较易在猪体内产生药物蓄积,在猪体内分布范围广泛,主要以红细胞、骨髓造血细胞、消化道上皮细胞、肾小管上皮细胞及胰腺上皮细胞最为敏感,但引起仔猪试验中毒剂量和临床报道的中毒剂量有较大差异,推测临床用药猪群发生中毒的原因除与用药剂量有关外,可能还与猪自身的健康状况、日龄及生理状态、饲料及其他药物影响等因素有关^[18]。而国内外对动物体内利巴韦林药代动力学的研究大部分仍然是以鼠和猴为动物源^[27,28],其原因可能是猴与人类基因相似,而以鼠为动物源更易在实验室进行研究,且鼠的繁殖期较短。Lin等^[29]研究表明,30 mg/kg体重的药物剂量尾静脉注射鼠后,最大血药浓度可达(20.5±3.5) μg/mL,药物平均半衰期 T_{1/2}为(9.9±2.9) h,整体清除率(CL)(2600±118) mL/h/kg;30 mg/kg体重的药物剂量尾静脉注射猴后,最大血药浓度可达(12.5±2.5) μg/mL,药物平均半衰期 T_{1/2}为(130±7) h,整体清除率(CL)(224±27) mL/h/kg。然而,近几年发生的利巴韦林畜禽中毒事件透射出一系列问题,我国目前除对仔猪口服利巴韦林的药代动力学进行了相关研究,其他畜禽动物体内利巴韦林药物的药代动力学尚不明确,同时也尚未可知人类食用哪些畜禽副产品及相关制品易造成食品安全隐患。

由此可知,利巴韦林药物在动物中药物动力学的研究,受不同种属间的动物在进化过程中表现出的生理差异影响,可直接导致不同种属机体药物动力学过程的变化。而且由于个体间的差异,也会导致同类药物在同种动物中的药动学参数产生差异。动物体内的药物动力学表明,利巴韦林的特点是吸收快、分布广,能分布于全身各处和各种组织及分泌物,消除较慢。因此,近些年来,随着药物化学的发展及人类健康水平的不断提高,对药物的药代动力学性质的要求越来越高,判断一个药物的应用前景特别是市场前景,不单纯是疗效强,毒副作用小,更要具备良好的药代动力学性质。

3 利巴韦林药物检测的标准与方法

3.1 我国现行有效的标准检测方法

目前,在我国与利巴韦林禁用药物相关的标准仅有一个,即江苏省地方标准 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^[30]。本标准规定了利用液相色谱串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定鸡肝中利巴韦林及其代谢物残留总量的测定方法、检出限、准确度和精密度等方面的要求,适用于鸡肝中利巴韦林及其代谢物残留总量的检测。检测原理为:试样中残留的利巴韦林代谢物经磷酸酯酶水解成利巴韦林原药,与试样中

残留的原药一起,经提取、净化后,于液相色谱串联质谱仪上测定,同位素内标法定量。该方法的检出限为 0.5 μg/kg;准确度为:1.0~10 μg/kg 的添加水平上的回收率范围为 60%~120%;精密度的:本方法的批内变异系数 20%,批间变异系数 20%。

综上所述,我国在畜禽养殖业中,关于利巴韦林药物的相关标准极为匮乏,仅有一个与鸡肝中此类相关的检测标准。然而近年来我国养猪业屡次发生利巴韦林药物中毒事件,我国目前仍没有与猪相关的利巴韦林药物的检测标准出台,尽管已经明令禁止该类药物使用,但没有相应的检测方法怎能知道猪肉中是否残留该类药物,对人体是否存在潜在的威胁。目前我国在此方面的研究属于空白,急需相关研究人员填补该方面的空白。

3.2 检测方法研究进展

动物体内利巴韦林药物的检测方法除仅有的江苏省地方标准(DB32/T 1165-2007)外,目前暂未出台其他标准类检测方法。为了提高此类药物的检测效率,相关研究人员一直在寻求快捷、简单、抗外界干扰强的新方法。目前,国内外检测利巴韦林的方法主要以液相色谱串联质谱法、毛细管电泳法、放射免疫法和高效液相色谱法等为主。

3.2.1 液相色谱串联质谱法

近些年来,由于“禽流感”病毒的高发,使得禽类养殖业遭到前所未有的重创,为了预防或治疗禽流感病毒,许多养殖人员大剂量使用利巴韦林药物,造成该药物在动物体内大量残留,从而给人类食用安全带来隐患。因此,建立动物体内利巴韦林药物的检测方法势在必行。而且国内外该类药物的检测动物源主要以鸡为主,包括鸡肉、鸡肝、鸡蛋和鸡血浆等。目前,国内外研究动物体内利巴韦林残留量所采用的最普遍的一种方法是液相色谱串联质谱法。

Wu等^[31]开发了一种新型的检测鸡肉中利巴韦林药物含量的方法,该方法需将快捷、简单、便宜、有效、坚固、安全的前处理方法与液相色谱-质谱法结合。结果表明,该方法的检测限和定量限分别为 1.1 μg/kg 和 1.5 μg/kg,平均回收率为 94.2%~99.2%,方法的重复性和再现性分别为 4.5%~4.9%和 4.8%~5.4%。最终研究表明该方法适用于日常的检测工作,而且整个检测过程仅需要 45 min,其中包括前处理过程。郑铎等^[32]通过超高效液相色谱-质谱法检测蛋鸡体内抗病毒药物利巴韦林的残留量,利用多反应监测模式和同位素内标法定量。该方法的利巴韦林线性范围为 5~5000 ng/mL,检出限为 1 ng/mL。在 10~1000 ng/mL 范围内样品添加回收率为 86.4%~97.1%,批内、批间相对标准偏差均满足定量要求。该研究还表明利巴韦林在蛋鸡血浆消除半衰期(T_{1/2β})为(2.95±0.9)h,消除较快。同时,该方法有效解决了以往采用酸性磷酸酶解,尽管间接测定了磷酸化利巴韦林,但与利巴韦林共洗脱的 TCONH₂未能得到良好分离^[33];即使采用柱后分流的方式,将利巴韦林、

TCONH₂与 RTCOOH 分开, 但该方法存在单次进样分析时耗时较长, 且采用单四极杆质谱模式定量, 在复杂基质分析中的灵敏度和特异性并不高等问题^[34]。此外, 祝伟霞等^[35]采用超高效亲水色谱-质谱法快速检测速成鸡及其制品中的利巴韦林及其代谢物的总残留量, 结果表明, 方法检出限为 1 μg/kg, 定量限为 5 μg/kg, 在 3 个添加水平下的回收率为 67.8%~112.7%, 相对标准偏差为 6.1%~13.6%。并经测定多种实际样品, 证明该方法简便、快速、准确, 可以满足日常鸡肉及其制品中利巴韦林及其代谢物总残留量的分析要求。除了对鸡肉中利巴韦林残留量的研究外, 相关学者采用液相色谱串联质谱法对鸡蛋^[36]、鸡肝^[37]和鸡血浆^[38]等均有研究, 并建立了一系列相关的检测方法。

由此可知, 我国目前已经建立了多个与鸡体中利巴韦林药物残留量相关的检测方法, 鸡体样品类型包括鸡肉、鸡血浆、鸡肝、鸡蛋、速成鸡及鸡肉制品等多方面, 其采用的方法以超高效液相色谱-质谱联用为主。检测不同部位采用不同的检测方法, 其检出限也具有一定差异, 在实际检测时需要根据样品的具体性质而定。

3.2.2 毛细管电泳法

高效毛细管电泳法, 是近年来发展最快的分析方法之一, 是以高压电场为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据样品中各组分之间分配行为上的差异而实现分离分析的液相分离方法。与常用的高效液相色谱法相比, 具有溶剂和试样消耗少、分离速度快、分离效率高、适用范围广、选择性强、仪器成本低等特点。Breadmore 等^[39]使用毛细管电泳法测定人体血清和血浆中利巴韦林药物残留量, 与液相方法相比, 该方法减少了样品前处理、提高了分离效率。还有人采用石英毛细管柱, 以磷酸二氢钠、硼砂和 SDS(pH 7.8)为电泳介质, 以多索茶碱为内标物, 快速测定利巴韦林及中间体的含量, 各物质间能达到很好的分离, 并具有良好的线性及回收率, 方法准确且快速^[40]。由此可知, 毛细管电泳法主要应用于临床医学上, 而畜禽动物体内该药物的检测方法研究尚未有报道。因此, 建议根据实际情况, 有效利用毛细管电泳法的分离速度快、分离效率高、适用范围广、选择性强、仪器成本低等优点, 建立毛细管电泳检测动物体内利巴韦林药物的相关方法。

3.2.3 放射免疫法

放射免疫法是利用同位素标记的与未标记的抗原, 同抗体发生竞争性抑制反应的方法, 研究机体对抗原物质反应的发生、发展和转化规律。Austin 等^[41]报道了用放射性免疫的方法分析血浆中利巴韦林, 血浆中利巴韦林浓度为 2.45 ng/mL, 然而该方法特异性不好, 容易受到利巴韦林代谢物的干扰。随后, Kang 等^[42]使用一种酶联免疫的方法测定了利巴韦林在抵抗呼吸道合胞病毒时抗病毒作用物质的活性, 该方法与放射性方法比, 其特异性有所提高, 但仍然只能作为一种粗筛的方法, 还不能作为很好的定量手段。由此可知, 尽管放射性免疫法被用于临

床医学方面, 但是仍存在一些问题, 无法作为精准的检测方法使用。而且在畜禽动物体内, 该药物检测方法方面的研究尚未有报道。

3.2.4 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 自 20 世纪 60 年代末发展起来至今, 只要被分析对象能够溶解于可作为流动相的溶剂中并能够被检测, 就可直接进行分析, 国外早在 20 世纪 70 年代末就开始采用高效液相色谱法对人用利巴韦林进行检测^[43]。近些年来, 畜禽动物利巴韦林中中毒事件频繁发生, 使得利巴韦林在中兽药散剂中的违禁添加情况越来越引起相关部门的重视。

李树纲等^[44]建立了 HPLC 法检测白龙散、黄连解毒散、苍术香连散等 7 种兽用中药散剂中非法添加利巴韦林的方法。利巴韦林在 1.016~20.32 g/mL 的浓度范围内线性良好, 方法的回收率为 81.28%~119.46%, RSD 为 0.88%~1.65%。该方法适用于大部分兽药散剂中利巴韦林违禁添加的检测, 但是对于一些带有色素的兽药散剂的处理效果欠佳, 不能很好地去除色素。周剑等^[45]建立了兽药制剂中利巴韦林的高效液相色谱测定方法, 采用该方法对全国 12 个省份的 158 种市售兽药样品进行检测, 利巴韦林违禁添加总检出率为 4.3%。结果表明, 利巴韦林的线性范围为 0.1~50.00 μg/mL, r^2 为 0.9993, 检出限为 0.017 μg/mL。平均加标回收率 73.7%~116.8%。该方法快速、准确、灵敏度高、重复性好, 能满足兽药制剂中利巴韦林含量的检测要求, 与传统方法相比, 尤其适用于含色素固体兽药制剂。

经查阅国内外文献可知, 采用高效液相色谱法研究畜禽动物体内利巴韦林药物残留量的相关报道较少, 仅为上述两篇文章, 主要集中在人类用药方面, 相关的检测方法是否适用于畜禽动物体内该药物的检测尚未可知。如 Arianna 等^[46]采用高效液相色谱法测定血浆中利巴韦林药物含量, 首先以固相萃取的方法对血浆中利巴韦林进行提取, 并以磷酸盐缓冲溶液为流动相, 在 207 nm 波长处分析, 结果显示其定量限为 0.05 μg/mL。以及采用乙腈沉淀蛋白, 高效液相色谱结合紫外检测(HPLC-UV)方法测定血浆中利巴韦林含量^[47], 该方法是否适用于动物的检测还需要进一步研究。

此外, 还有一些测定利巴韦林的方法, 如旋光法^[48]、比色法^[49]、紫外分光光度法^[50,51]等, 每种方法都有其独特之处。研究表明, 与高效液相色谱比较, 旋光法不如 HPLC 法精确, 但结果相近, 而且旋光法快速、简便、重现性好, 适用于生产过程中质量控制的快速检验。比色法较简便, 适用于医院制剂室进行试剂配制和质量控制, 结果比较准确。但是, 实验所用 3,5-二羟甲苯溶液特别容易变色, 会影响到实验结果的准确度, 故实验过程要特别注意现用现配^[43]。

4 存在问题

(1)据统计,目前我国鸡体中残留利巴韦林药物的检测方法以液相色谱-质谱联用为主,除此之外,其他检测方法均是以人用药品为基础所建,其是否适用于畜禽动物体内利巴韦林药物残留量的检测尚未可知。

(2)尚未建立猪体中利巴韦林药物残留量的标准检测方法,由舆情事件发现,利巴韦林中中毒事件的发生主要在养猪业,然而目前我国没有建立猪体中利巴韦林药物残留量的检测方法,喂食此类药物的猪在屠宰后,猪肉或猪内脏中是否残留该类药物尚未可知。而我国又是盛产猪肉和其消费量最大的国家,据报道2014年我国猪肉产量占肉类总产量的65.1%,占全球猪肉总产量的52%。因此建议从我国国情出发,建立猪体中利巴韦林药物残留量的检测方法,完善标准体系的同时,保障食品安全。

(3)相关人员对国家有关规定的重视程度不够,相关知识匮乏。我国相关规定表明,利巴韦林被列为人用药,兽药厂不得生产含利巴韦林的相关药物,兽药经销商不得销售利巴韦林或含有利巴韦林的药,猪场也不得使用利巴韦林或含利巴韦林的药。然而,因兽用无指定的西药抗病毒药,许多小规模猪场并不知道此规定,或即使知道此规定,当发生病毒性疫病时仍偷偷选用利巴韦林药物,因此猪中利巴韦林中中毒的案例仍时有发生。

5 结论与建议

整理现有利巴韦林检测方法,规范现有检测方法并确定其有效实用性势在必行;同时采用法律措施规范禁用药物的滥用情况,并尽量完善目前空缺的标准体系,填补空白项;并通过国家规范养殖业的同时,加强对养殖人员及兽医进行相关知识的培训,以降低安全事件发生的概率,同时也在一定程度上保障食品安全。

参考文献

- [1] Jr CJ, Michaelis M, Hoever G, *et al.* Development of antiviral therapy for severe acute respiratory syndrome [J]. *AntivRes*, 2005, 66(2-3): 81-97.
- [2] Bosch M, Sanchez AF, Ojeda C. Ribavirin: Analytical determinations since the origin until today[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(2): 185-193.
- [3] Naik GS, Tyagi MG. A pharmacological profile of ribavirin and monitoring of its plasma concentration in chronic hepatitis C infection [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2012, 2(1): 42-54.
- [4] 王治方, 徐引弟, 侯自花, 等. 规模化猪场利巴韦林中中毒病例分析[J]. *养猪*, 2008, (3): 70.
Wang ZF, Xu YD, Hou ZH, *et al.* Analysis of large scale pig farm ribavirin poisoning cases [J]. *Swine Prod*, 2008, (3): 70.
- [5] 王军, 王炳翔. 一例猪利巴韦林中中毒的诊治[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2012, (8): 74-74.
Wang J, Wang BX. Diagnosis and treatment of a case of swine ribavirin poisoning [J]. *Chin J Anim Husb Vet Med*, 2012, (8): 74-74.
- [6] 刘正才, 杨方, 徐姍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡组织中利巴韦林的残留量及其前处理方法优化[J]. *分析试验室*, 2015, (9): 1067-1071.
Liu ZC, Yang F, Xu S, *et al.* Optimization of sample pretreatment and determination of ribavirin residues in chicken tissues by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2015, (9): 1067-1071.
- [7] 朱克卫, 程明川, 徐牛生, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中利巴韦林的含量[J]. *环境化学*, 2014(6): 1052-1053.
Zhu KW, Cheng MC, Xu NS, *et al.* The ribavirin's content in chicken by High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2014, (6): 1052-1053.
- [8] D'Avolio A, Ibañez A, Sciandra M, *et al.* Validation of liquid/liquid extraction method coupled with HPLC-UV for measurement of ribavirin plasma levels in HCV-positive patients [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 835(1-2): 127-130.
- [9] Liu Y, Xu C, Yan R, *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(1): 17-23.
- [10] Danso D, Langman LJ, Snozek CLH. LC-MS/MS quantitation of ribavirin in serum and identification of endogenous isobaric interferences [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(23-24): 2332-2335.
- [11] Breadmore MC, Theurillat R, Thormann W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(10-11): 1615-1622.
- [12] Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, *et al.* Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-*D*-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides[J]. *J Med Chem*, 1972, 15(11): 1150-1154.
- [13] 张小平. 三氮唑核苷生产及市场概况[J]. *上海食品药品监管情报研究*, 2000, 56(1): 28-29.
Zhang XP. Production and market situation of ribavirin [J]. *Shanghai Food Drug Inf Res*, 2000, 56(1): 28-29.
- [14] Lin CC, Yeh LT, Vitarella D, *et al.* Viramidine, a prodrug of ribavirin, shows better liver-targeting properties and safety profiles than ribavirin in animals [J]. *Ant Chem Chemother*, 2003, 14(3): 145-152.
- [15] 郑人华, 孙莉, 裴文. 三氮唑核苷合成研究进展[J]. *浙江工业大学学报*, 2003, 31(3): 336-339.
Zheng R H, Sun L, Fei W. Research progress on the synthesis of ribavirin [J]. *J Zhejiang Univ Technol*, 2003, 31(3): 336-339.
- [16] 邱蔚然, 丁庆豹. 酶法合成核苷类抗病毒药物[J]. *中国医药工业杂志*, 1999, (10): 474-479.
Que WR, Ding QB. Enzymatic synthesis of antiviral nucleosides [J]. *Chin J Pharm*, 1999, (10): 474-479.
- [17] Japanese Patent Publication No.17830/1979.
- [18] 于宏. 仔猪口服利巴韦林药代动力学及体内外毒性试验研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
Yu H. Studies of pharmacokinetics and toxicologic effects of ribavirin after oral administration in vivo and vitro of pigs [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2010.
- [19] Willis RC, Carson DA, Seegmiller JE. Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line [J]. *Proc*

- Nat Acad Sci, 1978, 75(7): 3042–3044.
- [20] Gallois-Montbrun S, Chen Y, Dutatre H, *et al.* Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets [J]. *Molec Pharmacol*, 2003, 63(3): 538–546.
- [21] Glue P, Schenker S, Gupta S, *et al.* The single dose pharmacokinetics of ribavirin in subjects with chronic liver disease [J]. *British J Clin Pharm*, 2000, 49(5): 417–421.
- [22] Agnesod D, Nicolò AD, Simiele M, *et al.* Development and validation of a useful UPLC–MS/MS method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in peripheral blood mononuclear cells of HCV+ patients ☆ [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90(1): 119–126.
- [23] Jim Zhen W, Heli W, Lau JYN, *et al.* Activation and deactivation of a broad-spectrum antiviral drug by a single enzyme: adenosine deaminase catalyzes two consecutive deamination reactions [J]. *Antimicrob Chemother*, 2003, 47(1): 426–431.
- [24] Jim Zhen W, Gary L, Heli W, *et al.* Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: Implications for ribavirin metabolism in erythrocytes [J]. *Antimicrob Chemother*, 2005, 49(6): 2164–2171.
- [25] Zhang H, Wang G, Li K, *et al.* A high performance liquid chromatography method for the quantitative determination of ribavirin in human plasma and its application in a pharmacokinetics study [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22(4): 361–364.
- [26] Poizotmartin I, Bellissant E, Garraffo R, *et al.* Addition of boceprevir to PEG-interferon/ribavirin in HIV-HCV-Genotype-1-coinfected, treatment-experienced patients: efficacy, safety, and pharmacokinetics data from the ANRS HC27 study [J]. *Hiv Clin Trial*, 2016, 17(2): 63–71.
- [27] 陈秀兰, 刘英华, 盖晓丹, 等. 利巴韦林注射液大鼠体内药代动力学研究 [J]. *解放军药学学报*, 2006, 22(4): 298–300.
Chen X L, Liu Y H, Gai X D, *et al.* Pharmacokinetics Study of Ribavirin Injection in Rats [J]. *Pharm J Chin People's Liber Army*, 2006, 22(4): 298–300.
- [28] Shi X, Zhu D, Lou J, *et al.* Evaluation of a rapid method for the simultaneous quantification of ribavirin, sofosbuvir and its metabolite in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1002: 353–357.
- [29] Chin CL, Li TY, Trong LDL, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of [14C] ribavirin in rats and cynomolgus monkeys [J]. *Antimicrob Chemother*, 2003, 47(4): 1395–1398.
- [30] 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 the total amount of Ribavirin and its metabolite residues in chicken liver by liquid chromatography mass spectrometry [S].
- [31] Wu YL, Chen RX, Zhu L, *et al.* Determination of ribavirin in chicken muscle by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1012–1013: 55–60.
- [32] 郑铤, 汤晓艳, 曹兴元, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测蛋鸡体内抗病毒药物利巴韦林 [J]. *食品科学*, 2016, (4): 197–201.
Zheng X, Tang X Y, Cao X Y, *et al.* Detection of antiviral drug ribavirin in laying hens by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2016, (4): 197–201.
- [33] Yeh LT, Mai N, Lin CC. A Sensitive and specific method for the determination of total ribavirin in human red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2003, 41(5): 255–260.
- [34] Chowdhury SK, Gopaul V, Blumenkrantz N, *et al.* Chapter 11 Detection and characterization of highly polar metabolites by LC-MS: proper selection of lc column and use of stable isotope-labeled drug to study metabolism of ribavirin in rats [J]. *Progress Pharm Biomed Anal*, 2005, 6(05): 277–293.
- [35] 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 products by ultra-performance hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(10): 934–938.
- [36] 孙海新, 许娜, 张慧, 等. 鸡蛋中金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林和吗啉胍多残留检测方法的研究 [J]. *中国家禽*, 2015, 37(23): 22–25.
Sun HX, Xu N, Zhang H, *et al.* Multi-residues determination method of amantadine, rimantadine, ribavirin and moroxydine in eggs [J]. *China Poul*, 2015, 37(23): 22–25.
- [37] 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, Jang TM, *et al.* Determination of total residues of ribavirin and its metabolites in chicken liver by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Vet Drug*, 2008, 42(7): 22–25.
- [38] 郑铤, 汤晓艳, 周剑, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡血浆中利巴韦林及其主要代谢物 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34(7): 819–823.
Zheng X, Tang YY, Zhou J, *et al.* Simultaneous determination of ribavirin and its main metabolites in chicken plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2015, 34(7): 819–823.
- [39] Breadmore MC, Theurillat R, Thormann W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(10–11): 1615–1622.
- [40] 韩加怡. 利巴韦林及各中间体的高效毛细管电泳定量分析 [J]. *药物分析杂志*, 2001(3): 160–162.
Han J Y. Analysis of ribavirin and its intermediate substances by HPCE [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2001, (3): 160–162.
- [41] Julian E, Alison PA, Downer A, *et al.* Effects of fluorocarbon surfactant chain structure on stability of water-in-carbon dioxide microemulsions. links between aqueous surface tension and microemulsion stability [J]. *Langmuir*, 2002, 18(8): 3014–3017.
- [42] Psathas PA, Rocha SRPD, Lee CT, *et al.* Water-in-carbon dioxide emulsions with poly(dimethylsiloxane)-based block copolymer ionomers [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2000, 39(8): 2655–2664.
- [43] 周剑, 王敏, 杨梦瑞, 等. 抗病毒药物利巴韦林检测技术的研究进展 [J]. *化学试剂*, 2016, 38(1): 1–6.
Zhou J, Wang M, Yang MR, *et al.* Progress of detection technology for antiviral drug ribavirin [J]. *Chem Reag*, 2016, 38(1): 1–6.
- [44] 李树纲, 金录胜, 汪洋, 等. HPLC 法测定兽用中药散剂中非法添加利巴韦林的方法研究 [J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(6): 30–33.
Li SG, Jin LS, Wang Y, *et al.* Study on determination of illegally added

- ribavirin in veterinary Chinese materia medica powders by HPLC [J]. Chinese J Vet Drug, 2012, 46(6): 30–33.
- [45] 周剑, 陈洁, 王敏, 等. HPLC 法抽检兽药中利巴韦林的违禁添加情况[J]. 化学试剂, 2015, 37(1): 49–52.
- Zhou J, Chen J, Wang M, *et al.* Sampling inspection of illegally added ribavirin in veterinary drugs by HPLC [J]. Chem Reag, 2015, 37(1): 49–52.
- [46] Loregian A, Scarpa MC, Pagni S, *et al.* Measurement of ribavirin and evaluation of its stability in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. J Chromatogr B, 2007, 856(1-2): 358–364.
- [47] D'Avolio A, Nicolò A D, Simiele M, *et al.* Development and validation of a useful HPLC–UV method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in blood and erythrocytes of HCV+ patients [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 66: 376–380.
- [48] 范宇, 王联民. 旋光法测定利巴韦林注射液含量方法探讨[J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(2): 152–154.
- Fan Y, Wang LM. Discussion on the method of ribavirin injection content by optical rotation [J]. Acta Acad Med Xuzhou, 2005, 25(2): 152–154.
- [49] 柏亚林, 陈双璐. 复方利巴韦林滴鼻液的制备及质量控制[J]. 中国药师, 2003, 6(7): 424–425.
- Bai YL, Chen SL. Preparation and quality control of compound ribavirin nasal drops [J]. China Pharm, 2003, 6(7): 424–425.
- [50] Sastry CS, Naidu PY, Lakshmi CS, *et al.* Application of sodium metaperiodate for the determination of ribavirin in pharmaceutical formulations [J]. Talanta, 1998, 47(1): 85–93.
- [51] Gordana AM, Mira MČ, Nevenka BV, *et al.* Selective indicator reaction for kinetic determination of traces of manganese(II), ribavirin and tiazofurin [J]. Microchim Acta, 2000, 135(3–4): 173–178.

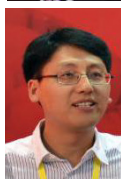
(责任编辑: 白洪健)

作者简介



魏法山, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: weifashan@aliyun.com



刘登勇, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉品加工与质量安全控制。

E-mail: jz_dyliu@126.com