

肉鸡中金刚烷胺残留测定及其残留代谢规律研究

曾海英^{1*}, 王家磊¹, 刘志敏¹, 任召珍²

(1. 山东时进检测服务有限公司, 荣成 264309; 2. 威海海洋职业学院, 荣成 264300)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱测定肉鸡中金刚烷胺残留量的分析方法, 探究鸡肉和鸡肝中的残留代谢规律。**方法** 样品用乙腈-乙酸-1%三氯乙酸(70:2:30, V:V:V)溶液提取, 固相萃取小柱净化后, 用液相色谱-串联质谱仪进行测定, 利用金刚烷胺-D₆为内标定量。**结果** 金刚烷胺在 0~10 μg/kg 范围内线性良好, 相关系数(r^2)为 0.9995, 方法检测限为 1 μg/kg。在添加质量浓度 1~10 μg/kg 范围内回收率为 90.1%~95.7%, 相对标准偏差为 1.17%~1.62%($n=6$)。药物饲喂实验结果表明, 金刚烷胺在肉鸡中吸收快、分布广, 鸡肉中的残留明显高于鸡肝中残留含量, 鸡肉更容易产生药物蓄积。在停药 13 d 后, 鸡肉中金刚烷胺仍有药物蓄积, 而鸡肝中的金刚烷胺残留量为未检出。**结论** 该方法操作简单、灵敏度高、稳定性好, 适用于肉鸡中金刚烷胺残留的测定, 揭示金刚烷胺在肉鸡中残留代谢规律。

关键词: 金刚烷胺; 液相色谱-串联质谱法; 残留分析; 肉鸡

Determination of amantadine residue in broilers and study on its residual metabolism

ZENG Hai-Ying^{1*}, WANG Jia-Lei¹, LIU Zhi-Min¹, REN Zhao-Zhen²

(1. Shandong Shijin Inspection Service Co., Ltd., Rongcheng 264309, China;
2. Weihai Ocean Vocation College, Rongcheng 264300, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for determining amantadine residues in broilers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and explore the residual metabolism rules in chicken and chicken liver. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile-acetic acid-1% trichloroacetic acid (70:2:30, V:V:V) solution. After purification by a solid-phase extraction column, the samples were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using amantadine-D₆ as the internal standard. **Results** The linearity was good over the range of 0–10 μg/kg, the correlation coefficient (r^2) was 0.9995, and the limit of detection of the method was 1 μg/kg. The recoveries were 90.1%–95.7% and the relative standard deviations (RSDs) were 1.17%–1.62% ($n=6$) within the range of 1–10 μg/kg. The results of drug feeding experiments showed that amantadine was quickly absorbed and widely distributed in broilers. The residue content in chicken was significantly higher than that in chicken liver, and chicken was more prone to drug accumulation. Drug accumulation of amantadine remained in the chicken 13 d after discontinuation and amantadine residues in the chicken liver were undetectable. **Conclusion** This method has the advantages of simple operation, high sensitivity and good stability, and is suitable for the determination of amantadine residues in broilers to reveal the residual metabolism of amantadine in broilers.

*通信作者: 曾海英, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: 37702021@qq.com

*Corresponding author: ZENG Hai-Ying, Engineer, Shandong Shijin Inspection Service Co., Ltd., Rongcheng 264309, China. E-mail: 37702021@qq.com

KEY WORDS: amantadine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; retention analysis; broiler

0 引言

金刚烷胺, 又名三环癸胺, 是最早用于抑制流感病毒的抗病毒药物, 主要用于治疗流感病毒 A 型感染性疾病^[1]。目前还未曾在兽医临床上用于动物病毒的预防和治疗, 未被批准用作禽畜。将人用抗病毒药物用于畜禽, 不仅容易导致动物性食品中药物残留, 还会导致动物机体产生免疫抑制和耐药性等问题, 甚至导致病毒发生变异, 影响动物疫病控制及人用病毒药物的有效性^[2]。近年的流行病学调查表明, 我国流感病毒对金刚烷胺的耐药性由 2000 年的 13.16% 激增至 2012 年的 80.00%, 严重威胁着人类健康和社会经济发展^[3-4]。目前不少家禽养殖户非法、违规使用金刚烷胺促使肉鸡快速生长, 获取暴利。因此农业部在 2005 年发布第 560 号公告中, 明确禁止在兽药领域生产和销售使用金刚烷胺^[5]。目前, 金刚烷胺的检测方法有酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法^[6-7]、气相色谱法^[8]、液相色谱法^[9]、液相色谱质谱法^[10]等, 其中液相色谱-串联质谱分析法灵敏度高、检测限低、准确性高, 在检测中广泛应用。本研究采用液相色谱-串联质谱分析法测定肉鸡组织中的金刚烷胺残留量, 并根据肉鸡中金刚烷胺残留监测情况, 对肉鸡中金刚烷胺残留监控提供技术指导和支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ABSCIEX-5500 三重四极杆液相色谱质谱联用仪(美国 AB 公司); Allegrax-22R 高速冷冻离心机(德国 BECKMAN COULTER 公司); GM-200 刀式研磨仪(德国莱驰公司); ARA520 电子天平(美国奥豪斯公司); IKAT18 高速匀浆机(广州仪科实验室技术有限公司); HSC-24A 氮气吹干仪(天津恒奥科技发展有限公司); R-215,V-700 旋转蒸发仪(德国 BUCHI 公司); FE20 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 固相萃取器(天津腾实验设备有限公司); PCX 固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔)。

乙腈、甲酸(色谱纯, 德国默克公司); 乙酸(分析纯, 烟台市双双化工有限公司); 氨水(分析纯, 天津市富宇公司); 三氯乙酸、乙酸铵(分析纯, 天津市瑞金特化学品有限公司); 金刚烷胺-D₆ 标准品(纯度>98%)、盐酸金刚烷胺(纯度 98.2%)(上海安谱科学仪器有限公司)。

1.2 给药与采样

选择体重约为 250 g 的肉鸡 45 只, 随机分为 2 组, 1 组 30 只, 2 组 15 只, 分笼饲养, 1 组 5 d 内各饲喂金刚烷胺 3000 mg, 平均每只鸡摄入量为 100 mg; 2 组为空白对照组。于饲喂结束第 1、3、7、9、13 d 分别处死, 取肝脏、鸡肉(胸肉和腿肉), 分装标记冷冻后保存。

1.3 样品前处理

样品制备: 切成小块后用研磨仪粉碎混匀供分析用, 装于食品级塑料袋中, 一份留样, 另一份供测试用。在样品制备过程中应注意试样不受到污染。

样品提取: 称取 2 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中, 加入质量浓度为 0.11 mg/L 的金刚烷胺-D₆ 内标溶液 100 μL, 加 15 mL 乙腈-乙酸-1%三氯乙酸(70:2:30, V:V:V)溶液, 高速匀浆 0.5~1 min, 冷冻离心机离心 5 min(4 °C 以下, 15000 r/min), 重复提取 1 次。合并上清液于 50 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度。

净化: 准确移取 10 mL 上清液, 样品提取液加入已用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化过的 Cleanert PCX 阳离子交换固相萃取柱中, 依次用 5 mL 2%的甲酸溶液(2 mL 甲酸: 98 mL 水, V:V)和 5 mL 1%甲酸乙腈溶液(1 mL 甲酸: 99 mL 乙腈, V:V)淋洗, 减压抽干, 再用 5 mL 5%氯化甲醇(5 mL 氨水: 95 mL 甲醇, V:V)洗脱, 于 60 °C 下用氮气吹干, 用 0.1%甲酸水溶液+甲醇(20:80, V:V)溶解残渣, 涡旋混合(30 s), 经 0.22 μm 有机相微孔滤膜后, 供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 反相色谱柱(150 mm×4.5 mm, 3.5 μm); 流动相: A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.2%甲酸), B: 乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 35 °C。具体条件参数见表 1。

表 1 金刚烷胺的色谱条件参数

Table 1 Chromatographic condition parameters of amantadine

时间/min	A/%	B/%
0	5	95
2	5	95
4	50	50
6	50	50
7	5	95
10	5	95

1.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描模式:正离子扫描;
检测方式:多重反应监测(multiple response monitoring,

MRM);喷雾电压:5500 V;气帘气:30 L/h;GS1/GS2:
45/55;离子源温度:550 °C;进样量:10 μL。金刚烷胺定
量定性离子条件如表2。

表2 金刚烷胺、金刚烷胺-D₆的质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of amantadine and amantadine-D₆

化合物	定性离子	定量离子	采集时间/ms	锥孔电/V	碰撞能量/eV
金刚烷胺	152/135	152/135	100	5500	35
	152/93		100	5500	16
金刚烷胺-D ₆	158/141	158/141	100	5500	35

1.4.3 线性方程

配制系列金刚烷胺工作液,质量浓度为0、0.5、1.0、
2.0、4.0、6.0、10 μg/L,分别选定定量离子峰面积与内
标物的峰面比值对浓度绘制标准曲线,金刚烷胺在0~
10 μg/L的范围内成良好线性, $r^2>0.99$ 。具体结果见表3。

表3 方法的回归方程、相关系数及检出限

Table 3 Regression equation, correlation coefficient and limit of
detection of the method

化合物	线性方程	相关系数(r^2)	检测限/(μg/kg)
金刚烷胺	$Y=0.176X+0.0052$	0.9995	1

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

由化学结构可知,金刚烷胺有高度稳定性,略溶于水,
有良好的亲油性,使得它在众多的有机溶剂中有较
好的溶解性^[11],如二氯甲烷、二氯乙烷、乙醇、氯仿等
有机溶剂。修虹等^[12]采用水提取胶囊中的金刚烷胺,裴
璐等^[13]选择用乙腈-水(7:3, V:V)来提取片剂中的金刚
烷胺。中华人民共和国出入境检验检疫行业标准选择使用
三氯乙酸溶液-乙腈(9:1, V:V;三氯乙酸质量浓度为
20 g/L)进行提取^[14],结合文献的提取方法与仪器公司给
予的技术参考,并考虑氯仿的毒性较大,分别考察了
水、乙腈、乙醇、异丙醇、5%氨水甲醇:异丙醇(4:1, V:V)、
三氯乙酸溶液-乙腈(9:1, V:V;三氯乙酸质量浓度为
20 g/L)、乙腈-乙酸-1%三氯乙酸(70:2:30, V:V:V)溶液提
取,提取效果见图1。最后发现乙腈-乙酸-1%三氯乙酸
(70:2:30, V:V:V)溶液做为提取液时效果最好,响应值最
高,基质干扰较少,蛋白沉淀效果较好。因此选择乙腈-
乙酸-1%三氯乙酸(70:2:30, V:V:V)溶液做提取溶剂。

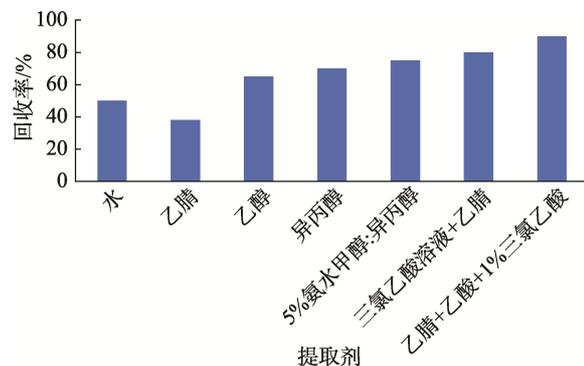


图1 提取剂提取效果图

Fig.1 Extraction effect of extractants

2.2 固相萃取小柱的选择

金刚烷胺处理采用的萃取柱有 C₁₈^[15]、PSA^[16]、
PCX^[17]柱等。本研究分别使用了 C₁₈、PSA 和 PCX 柱。
取不同浓度的标准品 1 mL 分别加入到 3 种固相萃取柱
中,结果见图2,通过测试 PCX 回收效果最好,因此选
择 PCX 为净化柱。

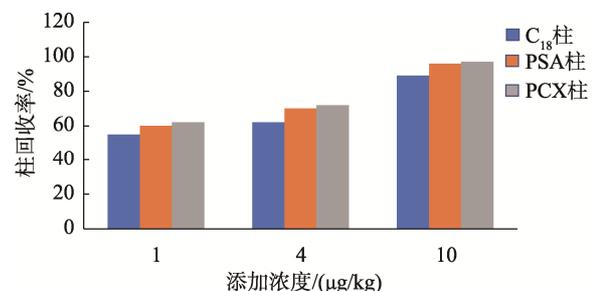


图2 不同固相萃取柱对金刚烷胺回收率的影响

Fig.2 Effect of different SPE columns on recovery of
amantadine

2.3 质谱条件的优化

研究表明,金刚烷胺在正离子模式下得到较好的

的分子离子峰 $[M+H]^+$, 采用正离子模式进行质谱条件优化。取 0.1 mg/L 的标准溶液直接进质谱, 正离子模式下调试离子源的喷雾电压, 看化合物 Q1 离子图的响应, 发现 5500 V 时 Q1 响应值最高, 因此选定喷雾电压为 5500 V, 根据化合物的响应选取合适的气流量; 在 Q3 模式下选择响应高、稳定性好的两个离子 135、93; 在 MRM 模式下, 选择合适的碰撞能量, 由此确定质谱条件, 质谱条件详见表 2。

2.4 回收率实验

取阴性鸡肉样品, 分别加入标准品, 添加 1、4、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度, 每个浓度 6 个平行样品, 回收率及相对标准偏差见表 4。

表 4 不同浓度金刚烷胺的回收率及相对标准偏差
Table 4 Recovery and relative standard deviation of amantadine at different concentrations

1 $\mu\text{g}/\text{kg}$		4 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
90.1~94.2	1.62	92.6~95.1	1.53	94.8~95.7	1.17

2.5 鸡肉和鸡肝中金刚烷胺残留规律

金刚烷胺在肉鸡体内的残留及消减结果在对照组(2 组)鸡肉和鸡肝脏中未检测到金刚烷胺。1 组实验鸡中, 金刚烷胺在肝脏、鸡肉中的残留量在停药第 2 d 达到峰值, 肝脏残留浓度为 5600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、鸡肉为 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。随着停药天数的增加各组织残留浓度迅速下降, 至停药 13 d 后, 肝脏内金刚烷胺残留量未检出。金刚烷胺的平均每天消减速率肝脏要快于鸡肉, 分别为 621.9、115 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 见表 5。

表 5 金刚烷胺代谢情况
Table 5 Metabolism of amantadine

项目	停药天数/d	肝脏残留/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	鸡肉残留/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
金刚 烷胺	1	5602.3	1507.6
	3	186	200
	7	12.6	31.3
	9	5.2	15.2
	13	未检出	12.5

2.6 鸡肉和鸡肝中金刚烷胺残留分析

金刚烷胺口服后极易被吸收, 口服 1~4 h 后血浆浓度达到高峰, 生物利用率为 90%~100%, 药物半衰期为 5~20 h^[18]。金刚烷胺在肉鸡不同组织中的残留检测结果显示, 组织中的残留浓度有一定差异性, 投药初期鸡肝

中浓度明显高于鸡肉, 金刚烷胺在肝脏中的代谢速率明显高于肌肉组织, 停药 3 d 时肌肉和肝脏的含量基本持平, 停药 13 d 后, 肝脏中残留量为未检出。

3 结论与讨论

由于金刚烷胺类抗病毒药物的长期、大剂量使用容易导致流感病毒产生耐药性, 诱导产生新的变异类型, 严重影响人类健康和畜牧业的发展^[19]。严格控制畜禽养殖中金刚烷胺类药物的使用尤为必要。建立以乙腈-乙酸-1%三氯乙酸(70:2:30, V:V:V)为提取液, 经 PCX 小柱净化后, 采用电喷雾离子化和多反应检测方式采集, 采用内标法定量的测定方法, 方法准确度高、检测线低, 符合残留检测的要求。通过对肉鸡中金刚烷胺投药饲养残留分析发现, 肌肉中药物残留时间更长, 为肉鸡中金刚烷胺的监管提供依据。

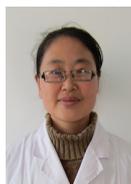
参考文献

- [1] 董以爱, 葛春燕. 常用抗病毒药物使用介绍[J]. 农业科技与信息, 2002, (9): 35.
DONG YA, GE CY. Introduction to the use of common antiviral drugs [J]. Agric Sci Technol Inf, 2002, (9): 35.
- [2] 李婷. 养殖业抗生素利用法律规制问题研究[D]. 保定: 河北大学, 2020.
LI T. Research on the legal regulation of the use of antibiotics in aquaculture [D]. Baoding: Hebei University, 2020.
- [3] 徐德顺, 纪蕾, 陈莉萍, 等. 湖州市甲 3 型流感病毒胺类药物耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, (4): 956-957.
XU DS, JI L, CHEN LP, et al. Adamantane resistance among influenza H3 subtype virus isolates from the mainland of Huzhou [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, (4): 956-957.
- [4] 颜键华, 何奇松, 熊毅, 等. 广西 H₃N₂ 亚型马流感病毒耐药性分析[J]. 南方农业学报, 2015, (6): 1127-1131.
YAN JH, HE QS, XIONG Y, et al. Drug resistance of equine influenza virus subtype H₃N₂ from Guangxi [J]. J Southern Agric, 2015, (6): 1127-1131.
- [5] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 560 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No. 560 of the Ministry of agriculture of the people's Republic of China [S].
- [6] 崔乃元, 刘怡菲, 王萍, 等. 鸡、鸭肉中金刚烷胺、金刚乙胺、索金刚胺间接竞争 ELISA 检测方法研究[J]. 食品工业科技, 2020, 42(1): 286-291.
CUI NY, LIU YF, WANG P, et al. Indirect competitive ELISA for detection of amantadine, rimantadine and solamantadine in chicken and duck meat [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 42(1): 286-291.
- [7] 冯才伟, 黄健, 王兆芹, 等. 检测动物组织中金刚烷胺残留的酶联免疫试剂盒的研制[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(11): 27-31.
FENG CW, HUANG J, WANG ZQ, et al. Development of enzyme-linked immunoassay kit for detecting amantadine residues in animal tissues [J]. Anim Husb Vet Med, 2016, 48(11): 27-31.

- [8] 楼永军, 陈爽, 陶巧凤. 毛细管柱气相色谱法测定盐酸金刚烷胺有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 493-495.
CHEN YJ, CHEN S, TAO QF. GC determination and identification of related substances of amantadine hydrochloride [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(3): 493-495.
- [9] ZHANG JZ, ZHAO J, ZHOU JH, *et al.* Determination of amantadine residue in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorometric detection [J]. Chin J Chem, 2011, 29(8): 1764-1768.
- [10] 魏秀丽, 高迎春, 陈玲, 等. 超高效液相-串联质谱法测定鸡肉组织中金刚烷胺残留[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(6): 53-55.
WEI XL, GAO YC, CHEN L, *et al.* Determination of amantadine residues in chicken tissue by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Vet Drug, 2013, 47(6): 53-55.
- [11] 高治, 王艳, 苏晓明, 等. 金刚烷胺的化学研究[J]. 广州化学, 2004, 29(4): 59-64.
GAO Z, WANG Y, SU XM, *et al.* Chemical research of adamantane [J]. Guangzhou Chem, 2004, 29(4): 59-64.
- [12] 修虹, 黄榕珍, 付梅春. HPLC-ELSD 法测定复方氨酚烷胺胶囊中盐酸金刚烷胺及对乙酰氨基酚的含量[J]. 中国药品标准, 2006, (1): 23-25.
XIU H, HUANG RZ, FU CM, *et al.* Determination of amantadine hydrochloride and paracetamol in qingke capsules by HPLC-ELSD [J]. Drug Stand China, 2006, (1): 23-25.
- [13] 裴璐, 张爱兵. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定盐酸金刚烷胺片中盐酸金刚烷胺含量[J]. 中国药业, 2012, 21(24): 59-60.
PEI L, ZHANG AB. Determination of amantadine hydrochloride in amantadine hydrochloride tablets by HPLC-ELSD [J]. China Pharm, 2012, 21(24): 59-60.
- [14] 辛丽娜, 谭喜梅, 梁飞燕, 等. 2018年广西禽蛋中兽药残留风险检测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5621-5627.
XIN LN, TAN XM, LIANG FY, *et al.* Analysis of veterinary drug residue risk in eggs in Guangxi in 2018 [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5621-5627.
- [15] 曹骞, 王磊, 代立勤, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中金刚烷胺药物残留研究[J]. 现代农业科技报, 2010, (10): 191, 193.
CAO Q, WANG L, DAI LQ, *et al.* Determination of amantadine residues in chicken by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Mod Agric Sci Technol, 2010, (10): 191, 193.
- [16] 陈国, 王全胜, 吴银良. 液相色谱-串联质谱法快速测定鸡蛋中金刚烷胺、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量[J]. 食品安全质量学报, 2019, 10(10): 3042-3048.
CHEN G, WANG QS, WU YL. Rapid and simultaneous determination of amantadine, florfenicol and florfenicol amine residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(10): 3042-3048.
- [17] 段科, 刘刚, 娄喜山, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织中的金刚烷胺、金刚乙胺和盐酸美金刚[J]. 食品安全质量学报, 2018, 9(3): 652-658.
DUAN K, LIU G, LOU XS, *et al.* Determination of amantadine, rimantadine and memantine hydrochloride in animal tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(3): 652-658.
- [18] 游新勇. 肉鸡体内金刚烷胺残留消除规律及其转录组学检测方法研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
YOU XY. Study on the residue elimination behavior of amantadine and its transcriptome detection method in broiler chickens [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [19] 孙海鑫, 曹立民, 林洪, 等. HPLC-MS/MS 法检测鸡肉食品中金刚烷胺残留[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 61-64, 89.
SUN HX, CAO LM, LIN H, *et al.* Analysis of amantadine residues in chicken using HPLC-MS/MS [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(12): 61-64, 89.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



曾海英, 工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: 37702021@qq.com