

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定饲料中利巴韦林等 7 种抗病毒类药物

LCMSMS-542

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用系统测定饲料中利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、金刚乙胺、奥司他韦、金刚烷胺和吗啉胍 7 种抗病毒药物含量的方法。样品采用甲酸铵缓冲液和乙腈提取，再经过分散固相萃取净化，亲水相互作用色谱 - 串联质谱进行测定。结果表明：使用基质匹配外标法定量，利巴韦林等 7 种抗病毒药物在 0.5 ng/mL ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.995 以上，各校准点准确度在 89.9% ~ 118.8% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词：三重四极杆质谱 饲料 抗病毒类药物

抗病毒药物是指用于抵抗或破坏病毒感染途径，如直接抑制或杀灭病毒、干扰病毒吸附、阻止病毒穿入细胞、抑制病毒生物合成、抑制病毒释放或增强宿主抗病毒能力等的一类药物。抗病毒药物种类繁多，运用于临床治疗的主要包括金刚烷胺类、核苷类以及神经氨酸酶抑制剂类。近年来，畜禽养殖生产中由病毒引起的疾病越来越多，在饲料中滥用抗病毒药物的现象已成为畜禽养殖行业的一大顽症。2012 年的肯德基“速成鸡”事件被央视曝光，其中就涉及违规喂食金刚烷胺、利巴韦林等抗病毒药物。非法使用抗病毒类药物会造成动物体内药物残留，加大病毒的耐药性及变异的可能性，甚至部分残留的抗病毒类药物会对人体造成不可恢复性的损伤。

目前，有关抗病毒类药物残留的检测方法报道较

多，主要有酶联免疫法、气相色谱法、气相色谱 - 质谱法、液相色谱法、液相色谱 - 串联质谱法等，其中液相色谱 - 串联质谱联用法具有灵敏度高和选择性好的特点，适合于复杂基体中的痕量物质分析，且准确度较高。抗病毒药物检测方法的报道主要集中在临床领域，对动物饲料中非法添加检测方法研究的相关报道较少。本文参考农业农村部公告第 197 号 -6-2019 《饲料中利巴韦林等 7 种抗病毒类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用系统，建立了饲料中利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、金刚乙胺、奥司他韦、金刚烷胺和吗啉胍 7 种抗病毒药物含量的测定方法。该方法前处理简单、检测灵敏度高，适用于饲料中利巴韦林等 7 种抗病毒药物的快速检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.96

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox HILIC (100 mm×2.1 mm I.D., 2.7 μm,

P/N: 227-32025-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -50 mM 甲酸铵 +0.1% 甲酸水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.45 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：30°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 90%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	70
3.50	Pumps	Pump B Conc.	70
3.70	Pumps	Pump B Conc.	90
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200°C

加热模块温度：400°C

接口温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

驻留时间：10~40 ms

1.3 样品前处理方法

准确称取 2.00 g 饲料样品 (精确至 1 mg) 置于 50 mL 离心管中, 加 5 mL 0.05 mol/L 甲酸铵溶液, 涡旋振匀, 8000 r/min, 离心 3 min, 收集上清液; 残渣加入 5 mL 乙腈振荡提取残渣 3 min, 8000 r/min, 离心 3 min 后收集上清液。重复上述整个提取过程一次, 合并上清液作为提取液备用。移取上述提取液 200 μ L, 加入乙腈 800 μ L 稀释后, 依次加入无水硫酸镁 100 mg, PSA 粉 100 mg, 涡旋 1 min 后 14000 r/min, 离心 3 min, 取上清液过 0.22 μ m 微孔有机滤膜后进行 LC-MS/MS 分析。

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
利巴韦林	Ribavirin	36791-04-5	245.00	113.10*	-12	-10	-26
				96.05	-12	-29	-38
阿昔洛韦	Acyclovir	59277-89-3	226.00	152.05*	-10	-9	-12
				135.00	-10	-26	-26
更昔洛韦	Ganciclovir	82410-32-0	256.20	152.05*	-12	-11	-12
				110.05	-12	-30	-22
金刚乙胺	Rimantadine	1501-84-4	180.10	163.10*	-10	-12	-12
				79.05	-18	-33	-18
奥司他韦	Oseltamivir	196618-13-0	313.20	166.05*	-10	-9	-18
				225.10	-12	-5	-12
金刚烷胺	Amantadine	768-94-5	152.10	135.10*	-11	-10	-26
				107.10	-16	-42	-30
吗啉胍	Moroxydine	3731-59-7	172.20	113.05*	-12	-20	-24
				130.10	-18	-15	-18

注：* 表示定量离子对

1.4 混合标准溶液的配制

1 µg/mL 的 7 种抗病毒类药物混合标准品贮备溶液, 取适量, 使用空白基质溶液进行稀释, 配制浓度为 0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL 和 100.0 ng/mL 的基质匹配标准系列工作液, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以定量离子峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制校准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

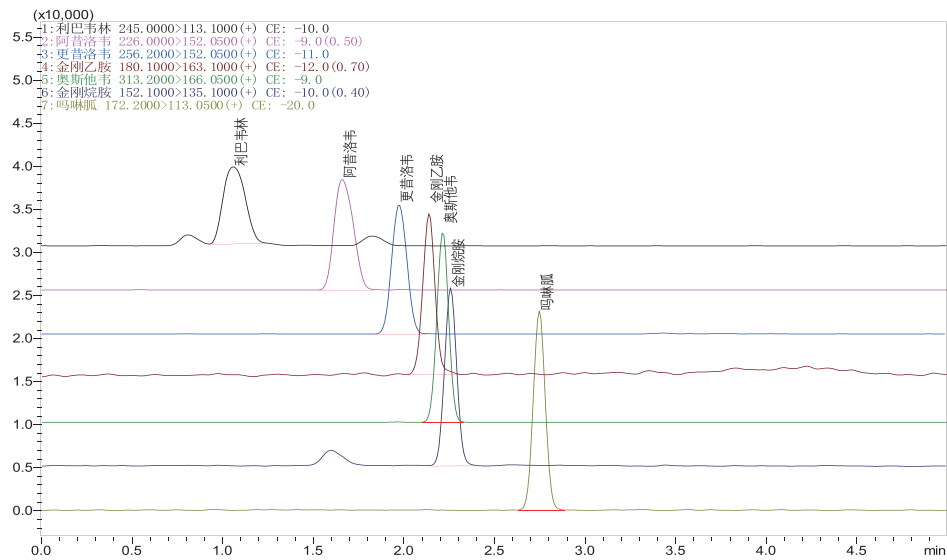
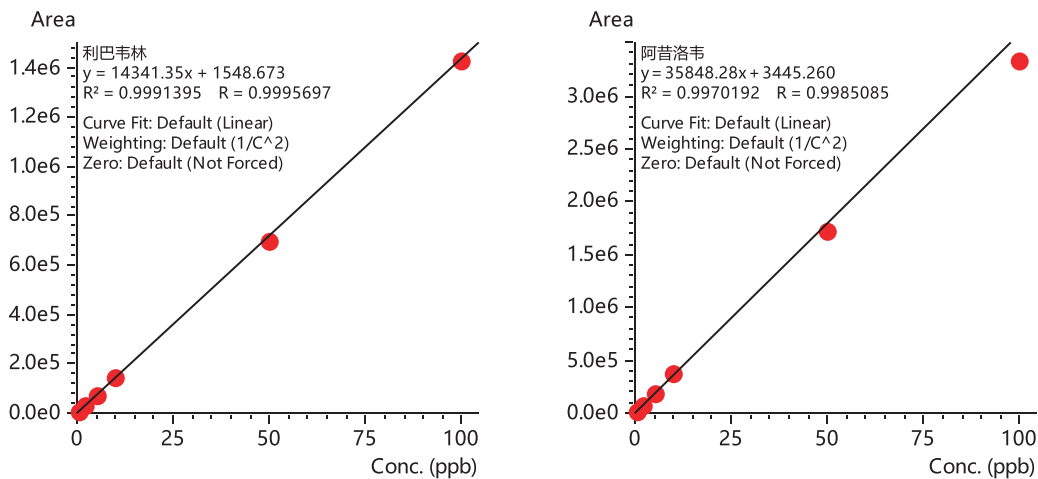


图 1 7 种抗病毒药物基质标准样品 MRM 图谱 (5 ng/mL)

2.2 线性范围与检出限

将 0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL 和 100.0 ng/mL 的不同浓度的抗病毒药物基质匹配标准系列工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 使用外标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表 3。



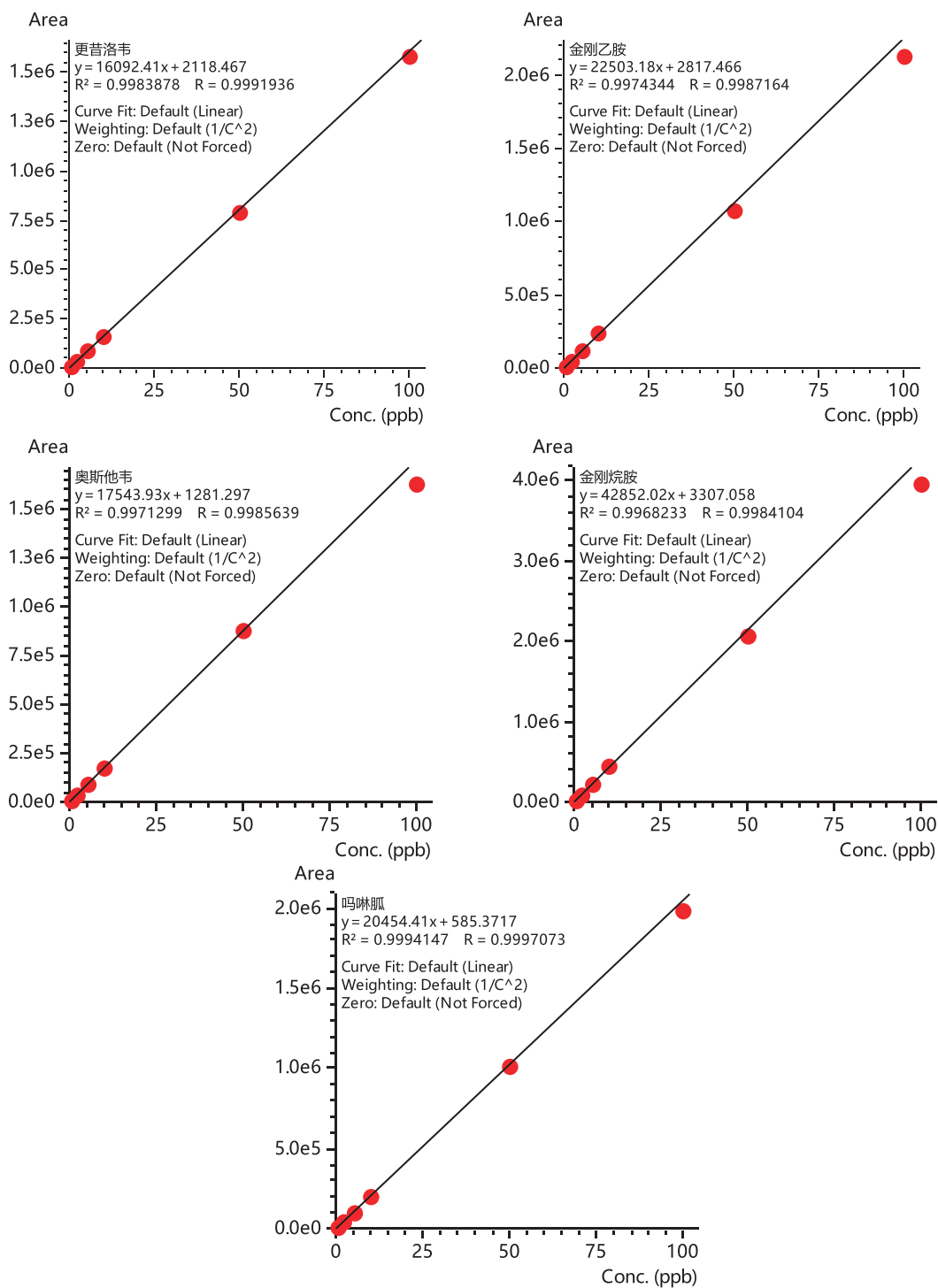


图 2 校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物名称	校准曲线	R	线性范围 (ng/mL)	准确率 (%)	检出限 (ng/mL)
利巴韦林	$y = 14341x + 1548$	0.999	0.5~100	97.7~105.2	0.17
阿昔洛韦	$y = 35848x + 3445$	0.998	0.5~100	92.1~106.4	0.17
更昔洛韦	$y = 16092x + 2118$	0.999	0.5~100	93.7~111.9	0.17

金刚乙胺	$y = 22503x + 2817$	0.998	0.5~100	89.9~118.8	0.17
奥司他韦	$y = 17543x + 1281$	0.998	0.5~100	92.2~107.9	0.17
金刚烷胺	$y = 42852x + 3307$	0.998	0.5~100	91.4~106.4	0.17
吗啉胍	$y = 20454x + 585$	0.999	0.5~100	95.7~107.2	0.17

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 50 ng/mL 不同浓度的 7 种抗病毒药物基质标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：7 种不同浓度的抗病毒药物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别小于 0.50% 和 8.84%，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物名称	5 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%
利巴韦林	0.26	1.82	0.38	4.93	0.11	2.11
阿昔洛韦	0.37	7.08	0.32	7.15	0.50	3.93
更昔洛韦	0.09	8.59	0.26	3.42	0.08	4.09
金刚乙胺	0.08	8.84	0.06	2.88	0.06	4.99
奥司他韦	0.12	7.97	0.10	7.68	0.05	6.47
金刚烷胺	0.07	8.62	0.07	5.06	0.05	3.73
吗啉胍	0.08	8.67	0.05	7.92	0.06	4.88

2.4 回收率实验

称取空白饲料样品，加入少量利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、金刚乙胺、奥司他韦、金刚烷胺和吗啉胍药物混合标准品贮备溶液，使加标浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行做 3 份。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定 7 种抗病毒类药物的加标回收率。空白饲料样品 MRM 色谱图如 3 所示，150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标样品 MRM 色谱图如 4 所示，各化合物的平均加标回收率结果在 60.7% ~117.1% 之间。

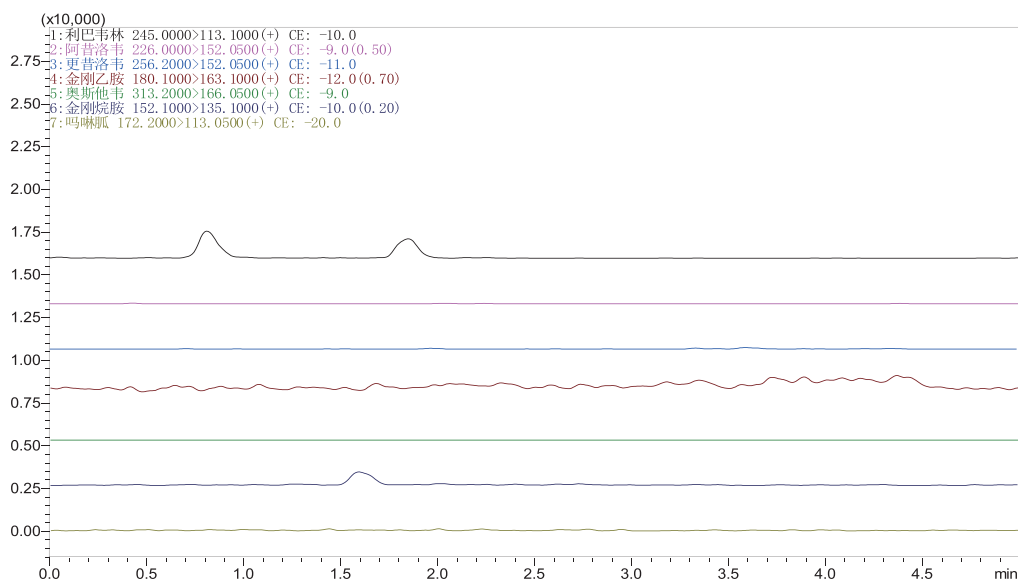


图 3 空白饲料样品 MRM 图谱

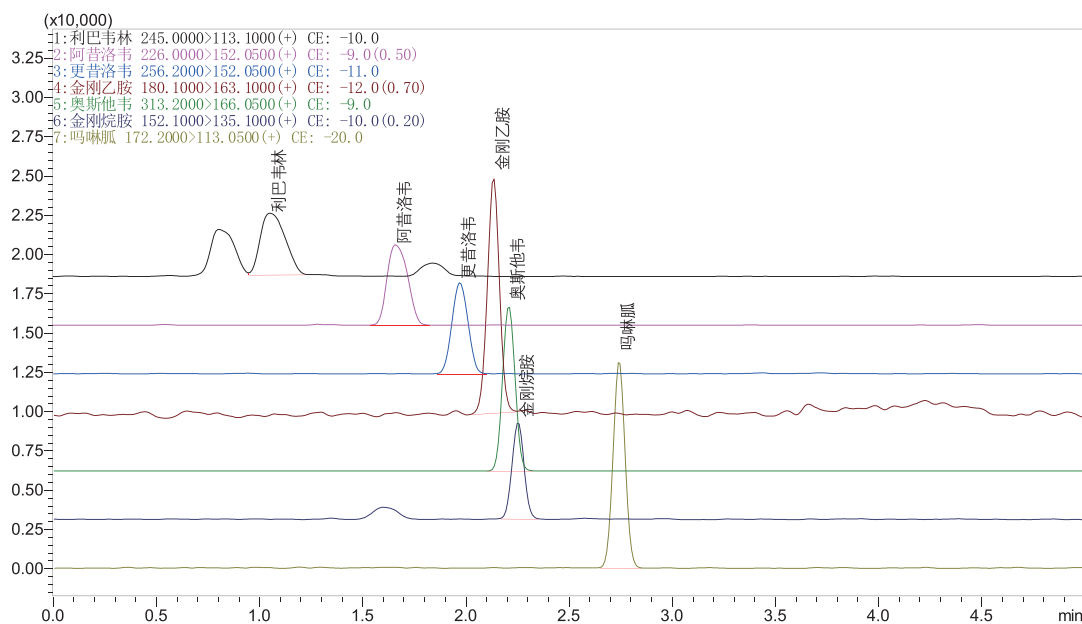


图 4 7 种抗病毒类药物的加标样品 MRM 图谱 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定饲料中 7 种抗病毒药物含量的方法，包括了利巴韦林、阿昔洛韦、更昔洛韦、金刚乙胺、奥司他韦、金刚烷胺和吗啉胍。利巴韦林等 7 种抗病毒药物在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。使用基质匹配外标法定量，利巴韦林等 7 种抗病毒药物在 0.5 ng/mL ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，各校准点准确度在 89.9% ~ 118.8% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。该方法简单快速、灵敏度高，可供饲料行业相关工作者参考使用。

岛津应用云

