

抗病毒药物的毒性及残留检测方法研究进展

孙 雷,李 丹,毕言锋,苏富琴,朱馨乐,王鹤佳,徐士新

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期]2013-07-01 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2013)10-0057-05 [中图分类号]S859.8

[摘 要] 就曾试用于兽医临床而后又被禁用的金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林、阿昔洛韦和吗啉胍等常见抗病毒药物的理化性质、代谢、毒性以及残留检测方法等四个方面的研究进展进行了综述。

[关键词] 抗病毒药物;代谢;毒性;残留检测

Research Development of Toxicity and Residue Detection Methods of the Antiviral Drugs

SUN Lei, LI Dan, BI Yan-feng, SU Fu-qin, ZHU Xin-le, WANG He-jia, XU Shi-xin

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: This paper summarized the research development of the physical and chemical character, metabolism, toxicity and residue detection methods of amantadine, rimantadine, ribavirin, aciclovir and moroxydine, which were used in veterinary medicine but were later forbidden to use.

Key words: antiviral drugs; metabolism; toxicity; residue detection

兽医临床上病毒感染的发病率和传播速度均超过其他病原体所引起的疾病,严重影响畜禽健康和畜牧业生产。在我国,曾试用于兽医临床的抗病毒药物主要有金刚烷类的金刚烷胺(Amantadine)和金刚乙胺(Rimantadine),核苷类的利巴韦林(Ribavirin,又称病毒唑)和阿昔洛韦(Aciclovir)以及杂环双胍类的吗啉胍(Moroxydine,又称病毒灵)等,它们也是人类常用的抗病毒药物,其化学结构式见图1。将人用抗病毒药物移植兽用,缺乏科学规范、安全有效的实验数据,因此我国农业部2005年发出《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》要求禁止生产、经营和使用金刚烷胺等抗病毒药物。美国FDA于2006年禁止金刚烷类和神经氨酸酶抑制剂类抗流感病毒药物用于禽类。由于抗病毒药物价格低廉,因此,一些不法分子仍将其用作兽药来预防和治疗动物疾病。长期大量使用这

些药物会导致动物中毒、免疫抑制、药物残留等问题,同时还可使病毒产生变异^[1]。2012年的“速成鸡”事件就检出鸡肉中残留有金刚烷胺,给我国家禽业带来了负面影响。本文就常见抗病毒药物的理化性质、代谢、毒性以及残留检测方法的研究进展进行了综述。

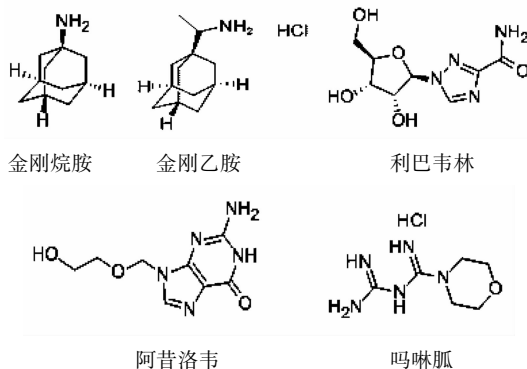


图1 常见抗病毒药物的化学结构式

1 理化性质

金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林、阿昔洛韦和吗啉胍均为白色结晶性粉末。金刚烷胺无臭,味苦,对光和空气稳定,易溶于水,20%水溶液的 pH 为 3.5~5.0,微溶于乙醇,不溶于苯和乙醚。金刚乙胺溶于乙醇、氯仿或水。利巴韦林无臭,无味,易溶于水,2%水溶液的 pH 为 4.0~6.5,微溶于乙醇、氯仿和醚。阿昔洛韦在水中极微溶解,其钠盐易溶于水,5%水溶液的 pH 为 11。吗啉胍无臭,味微苦,易溶于水,微溶于乙醇和乙醚,几乎不溶于氯仿^[2]。

2 体内代谢

不同的抗病毒药物在体内的代谢途径及代谢产物均不相同。金刚烷胺在动物体内发生降解代谢的量极少,90%以原型经肾小球滤过随尿排出,部分可被再吸收。金刚乙胺在小鼠、大鼠血浆、大鼠、狗、人尿液中可产生多种代谢产物,包括间羟基化代谢物、2个对羟基代谢物的差向异构体,以及它们与葡萄糖醛酸的结合物等,主要以代谢物形式经尿排泄^[3-4]。利巴韦林在猴、白鼠、人血浆和肝脏内进行的代谢实验表明,利巴韦林易被细胞内的嘌呤核苷激酶磷酸化,继之三磷酸化,最终以原药、单磷酸酯(RMP)、二磷酸酯(RDP)和三磷酸酯(RTP)等形式存在,其中以原型和 RMP 的代谢形式占多数^[5-6]。阿昔洛韦主要以原型经肾排泄。吗啉胍代谢主要是在肝脏中进行乙酰化形成无活性的代谢产物,经肾排泄。

3 毒性

3.1 急性毒性 研究发现,金刚烷胺对小鼠静脉注射的 LD_{50} 为 233 mg/kg,口服 LD_{50} 为 700 mg/kg,大鼠口服 LD_{50} 为 1275 mg/kg^[7];金刚烷胺对蛋鸡静脉注射 LD_{50} 为 29.72 mg/kg,肌肉注射 LD_{50} 为 144.92 mg/kg,腹腔注射 LD_{50} 为 122.47 mg/kg,口服 LD_{50} 为 668.34 mg/kg。小鼠、大鼠口服利巴韦林的 LD_{50} 分别为 5 g/kg、2 g/kg^[7];蛋鸡口服利巴韦林的 LD_{50} 为 734.85 mg/kg,肌注 LD_{50} 为 670.82 mg/kg,腹腔注射 LD_{50} 为 452.77 mg/kg,静脉注射 LD_{50} 为 396.86 mg/kg。可以看出,蛋鸡对金刚烷胺和利巴韦林比小鼠和大鼠敏感^[8-9]。蛋鸡经口灌服吗啉胍的 LD_{50} 为 17822 mg/kg^[10]。

3.2 亚慢性毒性 兽医上主要对金刚烷胺和利巴

韦林两种抗病毒药物进行了亚慢性毒性实验的研究。将 35 日龄的海兰褐蛋鸡分别按 20、40、80 mg/kg 的剂量通过肌肉注射方式连续给金刚烷胺 10 d,鸡出现精神不振、运动障碍、发育受阻等现象,剖检发现鸡腿部注射部位肌肉、肝和心有紫斑、瘀血斑和小出血点现象,80 mg/kg 剂量组鸡肝、肾、心、肺和大脑等器官出现充血、出血、水肿和实质细胞变性等;同时,对蛋鸡增重也造成较严重影响,用药 10 d 时 80 mg/kg 剂量组鸡的体重甚至出现了负增长^[8]。将 35 日龄的海兰褐蛋鸡分别按 30、60、120 mg/kg 的剂量通过肌肉注射方式连续给利巴韦林 10 d,120 mg/kg 剂量组鸡精神不佳、贫血、发育受阻并拉稀,剖检发现鸡肝、十二指肠、心、肺和肾出现淤血、出血、肿胀和实质细胞变性等,60 mg/kg 剂量组出现了红细胞压积下降、血液变稀薄、红细胞减少等现象,120 mg/kg 剂量组鸡的体重也出现了负增长现象^[9]。将体重为 (15.2 ± 1.5) kg 的二元杂交仔猪分别按 10、30、90 mg/kg 的剂量通过口服方式连续给利巴韦林 10 d,10 mg/kg 剂量组虽有一定临床表现,但无明显的中毒病变;30、90 mg/kg 剂量组仔猪具有明显的毒副作用,甚至导致急性死亡,血液、骨髓、消化道、胰腺、心、肝、肾、脑均出现明显的组织学病变,其中溶血性贫血是猪中毒发病的主要机制^[11]。

3.3 免疫毒性 抗病毒药物的免疫毒性主要表现为对机体细胞免疫和体液免疫的抑制。金刚烷胺中毒可对鸡免疫器官和抗氧化功能造成影响。将 40 日龄的海兰蛋鸡分别以 1、2 g/L 的剂量通过饮水方式连续给金刚烷胺 3 d,结果发现,随着给药量的增加,鸡脾脏、胸腺、法氏囊和血清中的超氧化物歧化酶(SOD)和总抗氧化能力(T-AOC)呈下降趋势,丙二醛(MDA)呈上升趋势,说明鸡体内重要免疫器官受到了超氧游离基的攻击造成了细胞损伤^[12]。采用¹²⁵I-UdR 同位素释放试验,观察利巴韦林在体外对小鼠脾细胞自然杀伤性的影响,结果表明,利巴韦林的剂量与脾细胞自然杀伤(NK)活性呈负相关,浓度为 5 μ mol/L 时即可显著抑制 NK 活性,利巴韦林与地塞米松合用对 NK 活性的抑制有相加作用,与 γ 干扰素合用则有拮抗作用^[13]。另外,利巴韦林可使小鼠脾脏 T 细胞对刀豆蛋白 A

(ConA)的增殖反应明显降低,表明利巴韦林可抑制细胞免疫反应,同时还可使幼鼠胸腺发育受抑制、胸腺萎缩、重量减轻,从而间接影响体液免疫功能。以小鼠脾脏 B 细胞对细菌脂多糖(LPS)的增殖反应作为特异性体液免疫功能的指标,观察到利巴韦林对体液免疫功能也有抑制作用。利巴韦林还可使小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的百分率和吞噬指数降低,表明对非特异性免疫功能也有抑制作用^[14]。

3.4 特殊毒性 大鼠每日给予 50 mg/kg 剂量(为人类常用量的 12 倍)的金刚烷胺后,对大鼠胚胎有毒性和致畸作用^[15];另外,金刚烷胺还可引起鸡胚发生畸形,双腿明显变粗,呈外八字形,踝关节屈曲,瘫痪卧地,翅膀变短,向两侧平展,呈划水状,单目或双目失明等^[16]。利巴韦林对雄性小鼠生殖细胞有抑制作用,幼年鼠实验组的睾丸曲细精管生殖细胞定量明显低于对照组的定量,而成年鼠实验组与对照组无差异^[17]。利巴韦林对仓鼠等不同啮齿类动物可引发颅骨、眼、四肢、脑部、肋骨等出现畸形或杀死胚胎的毒性,但以灵长类动物狒狒为观察对象的研究却没有发现对胚胎的致畸作用;大鼠按 16 ~ 60 mg/kg 剂量经口给予利巴韦林 2 年时间,可诱发乳房、胰腺、垂体和肾上腺良性肿瘤,但对人体的致癌性并未肯定^[18]。

4 残留检测方法

抗病毒药物检测方法的报道主要集中在药物百分含量测定,血浆和尿液等生物体液中药物测定以及兽药中的非法添加,而动物性食品中残留检测方法的报道相对较少。仅有的残留检测方法主要是液相色谱法(LC)和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。LC 法需要柱前或柱后衍生化,方法繁琐,且不利于多残留分析^[19]。LC-MS/MS 法具有灵敏度高、选择性好、定性定量准确、抗干扰能力强等优点,因此针对基质复杂的动物性食品中抗病毒药物的残留检测大都采用了此法。

已有抗病毒药物的残留检测方法主要针对鸡、猪的肌肉、肝脏、肾脏等可食性组织以及蜂蜜、鱼和虾等动物性食品,检测药物主要是金刚烷胺、利巴韦林、吗咪胍以及同类的其他药物。因抗病毒药物

大都含有氨基,属于有机碱,在酸性溶液中易溶于水,在碱性溶液中易溶于有机溶剂,因此样品前处理主要采用三氯乙酸^[19,23-24]、三氯乙酸+乙腈^[20,25]、三氯乙酸+甲醇^[21]、乙腈+乙酸^[26]、纯甲醇^[27]等有机酸或/和有机溶剂进行提取。该类药物在提取液中主要以阳离子形式存在,因此提取后大多采用了混合型阳离子交换柱(MCX)^[21]、强阳离子交换柱(SCX)^[25-26]或亲水亲脂型离子交换柱(HLB)^[23-24]等固相萃取柱进行净化。因利巴韦林同时含有氨基和较多的醇羟基,极性很强,常见的 C18、HLB、SCX、SAX、NH₂ 等固相萃取柱净化效果均不理想,采用苯硼酸型(PBA)固相萃取柱可以取得满意的净化效果^[22,27]。同样,因该类药物极性较强,在进行液相色谱分离时除少数使用 C18 色谱柱外^[19-22,24],对于多残留检测大都使用亲水作用较强的 Xamide、HILIC、ZIC-HILIC 等色谱柱^[23,25-27],以甲醇或乙腈+甲酸或乙酸铵水溶液为流动相,采用等度或梯度洗脱方式进行分离。采用 LC 法检测时需对药物进行衍生化,以满足荧光检测器的要求,例如检测金刚烷胺残留需用 4-氟-7-硝基苯并恶二唑(NBD-F)作衍生化试剂进行柱前衍生化反应^[19]。采用 LC-MS/MS 法检测都采用电喷雾正离子(ESI⁺)离子源和多反应监测(MRM)模式进行采集,以满足确证检测方法的要求。因动物性食品基质较为复杂,通过充分的提取净化后该类药物在质谱检测时仍存在较强的基质抑制效应,因此定量时大都采用基质匹配标准溶液进行单点或多点定量。若使用内标法则会使定量结果更加准确可靠,更适宜 LC-MS/MS 法检测,例如:金刚烷胺残留检测使用美金刚胺^[19]、氯苯那敏^[20]作内标,利巴韦林及其代谢物残留检测使用¹³C₅-利巴韦林作内标^[22],金刚烷胺、金刚乙胺等 6 种抗病毒药物残留检测也有使用相应同位素内标的报道^[27]。

已报道的动物性食品中抗病毒药物的残留检测方法、适用范围、检测药物、样品前处理、液相色谱条件以及方法灵敏度等汇总见表 1。从表中可以看出,方法的检出限在 0.06 ~ 10 μg/kg 之间,能较好的满足抗病毒药物残留检测分析方法的要求。

表 1 已报道的动物性食品中抗病毒药物残留检测方法汇总表

作者	适用范围	检测药物	前处理	液相色谱条件	检测方法及灵敏度
张金振 ^[19]	蜂蜜	金刚烷胺	样品用 1% 三氯乙酸溶液提取,经 PCX 柱净化,用 NBD-F 柱前衍生化	XDB C18 色谱柱分离,流动相为 0.1% 三氟乙酸溶液 + 乙腈 (35 + 65, V/V), 荧光检测器	HPLC 法, 检测限为 8μg/kg
魏秀丽 ^[20]	鸡肉	金刚烷胺	样品用 0.5% 三氯乙酸 + 乙腈 (1 + 1, V/V) 提取, MAX 柱净化	BEH C18 柱分离, 流动相为 0.1% 甲酸甲醇 + 0.1% 甲酸水, 梯度洗脱	LC-MS/MS 法, 检出限为 1μg/kg, 定量限为 2μg/kg
云环 ^[21]	鸡肉、鸡肝、鸡蛋、猪肉、猪肝和猪肾	金刚烷胺	样品用甲醇 + 1% 三氯乙酸溶液 (1 + 1, V/V) 提取, MCX 柱净化	Hypersil Gold C18 色谱柱分离, 流动相为 5mmol/L 乙酸铵 - 0.1% 甲酸 + 甲醇, 梯度洗脱	LC-MS/MS 法, 检出限为 5μg/kg
朱永林 ^[22]	鸡肝	利巴韦林及其代谢物	样品先酶解将磷酸酯型代谢物还原为原形, 再调 pH, PBA 柱净化	C18 色谱柱分离, 流动相为甲醇 + 0.1% 甲酸溶液 (2 + 8, V/V)	LC-MS/MS 法, 检出限为 0.5μg/kg
祝伟霞 ^[23]	鸡肉、鸡肝、鸡肾、鱼、虾	吗啉胍	样品经 5g/L 三氯乙酸溶液提取, 加庚烷磺酸钠离子对试剂, HLB 柱净化 (肝脏需先用 C18 柱净化)	HILIC 色谱柱分离, 流动相为 20mmol/L 甲酸乙腈溶液 + 20mmol/L 乙酸铵溶液 (7 + 3, V/V)	LC-MS/MS 法, 检测限为 2μg/kg, 定量限为 5μg/kg
王彩娟 ^[24]	蜂蜜	吗啉胍	样品用 5% 三氯乙酸溶液和 0.5mol/L 庚烷磺酸钠溶液提取, HLB 柱净化	CAPCELL PAK CR 色谱柱分离, 流动相为 20mmol/L 乙酸铵 + 乙腈 (7 + 3, V/V)	LC-MS/MS 法, 定量限为 5μg/kg
刘正才 ^[25]	鸡肉、鸡肝	金刚烷胺、金刚乙胺和吗啉胍等 5 种	样品用 20g/L 三氯乙酸 + 乙腈溶液 (10 + 2.5, V/V) 提取, SCX 柱净化	Xamide 色谱柱分离, 流动相为含 5mmol/L 乙酸铵 - 0.2% 甲酸 + 水 + 乙腈, 梯度洗脱	LC-MS/MS 法, 检出限为 0.06 ~ 0.3μg/kg, 定量限为 0.2 ~ 1μg/kg
Chan ^[26]	家禽肌肉	金刚烷胺、金刚乙胺和阿昔洛韦等 7 种	样品用乙腈 + 1% 乙酸溶液 (12.5 + 5, V/V) 提取, SCX-2 柱净化	经 ZIC-HILIC 色谱柱分离, 流动相为 20mmol/L 乙酸铵 (pH5.5) + 乙腈, 梯度洗脱	LC-MS/MS 法, CCB _β ≤ 10μg/kg
Berendsen ^[27]	家禽肌肉	金刚烷胺、金刚乙胺和利巴韦林等 7 种	样品用纯甲醇提取, Strata-X C 柱串联 PBA 柱净化	使用色谱柱切换技术, 经 Symmetry C18 或 Hypercarb 色谱柱分离, 流动相为 50mmol/L 甲酸水 + 50mmol/L 甲酸乙腈, 梯度洗脱	LC-MS/MS 法, 定量限为 1 ~ 10 μg/kg

5 结 语

通过对理化性质、代谢、毒性以及残留检测方法的研究情况进行综述,可使人们对常见抗病毒药的危害有较全面的认识,同时也为加强动物性食品中抗病毒药物的残留监控,保障人们身体健康提供了技术支持。

参考文献:

[1] 程忠刚,傅伟龙,刘树中. 动物抗病毒药物的应用研究进展[J]. 兽医导刊, 2010, (8): 42-45.

[2] 包鸿俊. 浅谈抗病毒药在兽医上的应用[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(6): 1-3.

[3] Hoffman H E, Gaylord J C, Blasecki J W, *et al.* pharmacokinetics and metabolism of rimantadine hydrochloride in mice and dogs

[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988, 32(11): 1699-1704.

[4] 贾薇. 液质联用法分析生物样品中四环素类药物和金刚乙胺代谢物[D]. 沈阳药科大学, 2001 年硕士学位论文.

[5] Lin C C, Lourenco D, Xu G, *et al.* Disposition and metabolic profiles of [¹⁴C] viramidine and [¹⁴C] ribavirin in rat and monkey red blood cells and liver[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(5): 1872-1875.

[6] Lin C C, Yeh L T, Luu T, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of [¹⁴C] ribavirin in rats and cynomolgus monkeys [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(4): 1395-1398.

[7] 李家泰. 临床药理学[M]. 第 2 版. 北京人民卫生出版社, 1998: 735-753.

[8] 李静,乔健,赵立红,等. 金刚烷胺对蛋鸡毒副作用初步观

- 察[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(3): 42-43.
- [9] 李静, 乔健, 赵立红, 等. 利巴韦林对蛋鸡毒副作用初步研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004, (7): 73-74.
- [10] 于连智, 张德新, 廖静华, 等. 盐酸吗啉胍在鸡体内药物代谢动力学研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1994, 25(4): 422-426.
- [11] 于宏, 孙宏磊, 杨凤, 等. 仔猪口服利巴韦林毒性试验研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2797-2803.
- [12] 唐娇, 高雅, 徐世文. 金刚烷胺中毒对鸡免疫器官及抗氧化功能的影响[J]. 饲料博览, 2009, (11): 37-39.
- [13] 陈其御, 杨建勤, 米从明. 利巴韦林在体外对小鼠脾细胞NK活性的影响[J]. 药学报, 1995, 30(6): 417-421.
- [14] 南景一, 孙晓兰, 高梅. 利巴韦林对幼鼠免疫功能的影响[J]. 中国医院药学杂志, 1997, 17(7): 299-300.
- [15] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 临床用药须知[S]//中华人民共和国药典1995版二部. 北京: 化学工业出版社: 96-98.
- [16] 冀贞阳. 可致鸡胚畸变的两种禽用药物[J]. 中国家禽, 2005, 27(24): 32.
- [17] 杨兆瑞, 孙晓兰. 病毒唑对鼠睾丸生殖细胞的影响[J]. 第四军医大学学报, 2002, 21(11): 230-231.
- [18] 吴婷, 吴涛, 詹思延, 等. 利巴韦林致癌、致畸和致突变作用的综合评价[J]. 药物不良反应杂志, 2006, 8(4): 244-247.
- [19] Zhang J Z, Zhao J, Zhou J H, *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]. Chinese Journal of Chemistry, 2011, (8): 1764-1768.
- [20] 魏秀丽, 高迎春, 陈玲, 等. 超高效液相色谱-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.
- [21] 云环, 张朝晖, 罗生亮, 等. 固相萃取/LC-MS/MS法检测动物源性食品中的金刚烷胺[J]. 现代仪器, 2009, 15(6): 41-45.
- [22] 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.
- [23] 祝伟霞, 杨冀州, 魏蔚, 等. 动物组织中盐酸吗啉胍残留的高效液相色谱-串联质谱测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 437-439.
- [24] 王彩娟, 祝伟霞, 杨冀州, 等. 蜂蜜中吗啉胍残留的液相色谱-串联质谱分析方法研究[Z]. 全国生物医药色谱及相关技术学术交流会(2012)会议手册.
- [25] 刘正才, 杨方, 余孔捷, 等. 液相色谱-点喷雾串联质谱法同时检测鸡组织中5种抗病毒类药物的残留量[J]. 色谱, 2012, 30(12): 1253-1259.
- [26] Chan D, Tarbin J, Sharman M, *et al.* Screening method for the analysis of antiviral drugs in poultry tissues using zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 700: 194-200.
- [27] Berendsen B J A, Wegh R S, Essers M L, *et al.* Quantitative trace analysis of a broad range of antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, (4): 1611-1623.

(责任编辑:李文平)