

分散固相萃取结合亲水作用色谱 - 串联质谱法检测 预混合饲料中 7 种抗病毒药物含量

吴剑平, 张鑫*, 李丹妮, 严凤, 潘娟, 张婧

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

[收稿日期] 2015-12-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0049-07 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了同时检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物含量的分散固相萃取 (QuCHERS) 结合亲水作用色谱 (HILIC) - 串联质谱检测方法, 包括了金刚烷胺、吗啉胍、金刚乙胺、阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦和奥司他韦。选择使用乙腈提取, 无水 $MgSO_4$ 进行脱水和盐析, C18 粉和丙基乙二胺 (Primary secondary amine, PSA) 进行样品净化。使用亲水作用液相色谱柱进行分离, 流动相为 0.2% 甲酸和乙腈, 采用梯度洗脱, 三重四级杆质谱进行定性定量分析。实验结果表明, 方法的最低检出限为 25 $\mu g/kg$, 最低定量限为 50 $\mu g/kg$, 在 50 ~ 5000 $\mu g/kg$ 范围内线性关系良好 ($r > 0.995$), 添加回收率在 60% ~ 110% 之间, $RSD < 10\%$, 表明该方法具有较好的准确度与精密度。

[关键词] 抗病毒药物; 分散固相萃取; 亲水作用色谱; 串联质谱法

Determination of 7 Antivirus in Premixed Feed by QuCHERS Combined with Hydrophilic Interaction Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

WU Jian-ping, ZHANG Xin*, LI Dan-ni, YAN Feng, PAN Juan, ZHANG Jing

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Abstract: To determine 7 antivirus in feed including amantadine, moroxydine, rimantadine, acyclovir, ribavirin, ganciclovir and oseltamivir, a QuCHERS combined with hydrophilic interaction chromatography (HILIC) - tandem mass method was established. The acetonitrile was chosen to extract the target compounds, the anhydrous magnesium sulfate was chosen to dehydrate and salt out, and the C18 powder and the primary secondary amine (PSA) were chosen to purify the sample. After centrifugation, the extract was determined by the method below. The targets was separated by the gradient elution with a HILIC column as the stationary phase and 0.2% formic acid with acetonitrile as the mobile phase. The qualification and quantification were achieved by a tandem mass spectrometry. The results showed that the LOD of the method was 25 $\mu g/kg$ and the LOQ was 50 $\mu g/kg$. The

基金项目: 上海市市级农口系统青年人才成长计划: 沪农青字 (2014) 第 2 - 5 号; 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203023)

作者简介: 吴剑平, 硕士, 畜牧师, 从事兽药残留分析与研究。

通讯作者: 张鑫。E-mail: xin_zh@yeah.net

linearity of the method was good in the range of 50 ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the liner correlations were all above 0.995, and the recovery of 7 targets were between 60% ~ 110%, and the RSD were lower than 10%, which showed the good accuracy and precision of the method.

Key words: antiviral; QuCHERS; HILIC; tandem mass spectrometry

抗病毒药物一般是指具有可抗病毒感染机体的药物,抗病毒感染的机制很多,包括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。因此,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^[1]。从20世纪80年代初至今,我国畜牧业正逐渐向规模化、集约化方向发展。大规模、集约化、高密度的畜禽养殖对动物疫病防控提出了更高的要求,如何防控“圆环病”、“蓝耳病”、“禽流感”等病毒感染性疾病也成为了养殖业当前面临的一大课题。然而,这样的大背景下也催生出饲料中滥用抗病毒药物的现象,和滥用抗菌药物现象同时成为畜禽养殖行业的两大痼疾^[2-3]。2012年11月肯德基的供应商山西粟海集团“速成鸡”事件被曝光,据报道在饲喂过程中涉及到11种药物,其中就包含大剂量的金刚烷胺、利巴韦林等抗病毒药物。据文献报道^[4-6],抗菌药物的滥用有巨大危害,会导致动物中毒、免疫抑制、药物残留等问题,同时还有促使病毒产生变异,对目前人用抗病毒药物产生耐药的可能。目前抗病毒药物检测方法的报道主要集中在血浆和尿液等生物体液以及兽药中的非法添加领域,而对动物饲料中违法添加检测方法研究的相关报道较少^[7-8],其方法主要以液相色谱法或液相色谱串联质谱法^[9-10]为主,但这些方法往往仅局限于某一种或少数几种抗病毒药物,因此当前研究可以简便、迅速、准确地同时检测预混合饲料中添加多种类抗病毒药物的检测方法就有相当的必要性。

1 材料和方法

1.1 仪器 Ultimate 3000 双三元超高效液相色谱、Excalibur 控制软件、串联四极杆质谱带 HESI 电

离喷雾源(TSQ Quantiva)、Xcalibur 数据处理系统、高速冷冻离心机(Allegra X-22R, BECKMAN COULTER);AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;减压旋转蒸发仪(B-490, BUCHI);水浴控温氮吹仪(N-EVAP, 上海安谱公司)。

1.2 材料、药品与试剂 反相聚合物固相萃取柱(HLB 3 mL/60mg)、QuCHERS 材料,均购于美国 Waters 公司;金刚烷胺(Amantadine, ATD),吗啉胍(Moroxydine, MXD),金刚乙胺(Rimantadine, RTD),阿昔洛韦(Acyclovir, ACLV),利巴韦林(Ribavirin, RBV),更昔洛韦(Ganciclovir, GCLV),奥司他韦(Oseltamivir, OSTV)(纯度均 $\geq 99.0\%$,德国 DrEhrenstofer GmbH);乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,德国 Merk);去离子水(自制,电阻率 $\geq 18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$);高纯氮、高纯氩(纯度均为99.999%,上海佳杰特种气体公司)。

1.3 亲水相互作用色谱条件 色谱柱: Waters Cortecs HILIC(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm),柱温30 $^{\circ}\text{C}$,流速0.3 mL/min,进样量5 μL ,流动相:A为0.2%甲酸,B为乙腈,采用梯度洗脱程序如表1,所得典型色谱质谱图如图1。从上至下通道依次为金刚烷胺、金刚烷胺-D6、吗啉胍、金刚乙胺、阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦、奥司他韦。

表1 亲水相互作用法梯度洗脱程序

时间/min	流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	A/%	B/%
0	0.3	0	100
1	0.3	0	100
4	0.3	50	50
8	0.3	50	50
8.1	0.3	0	100
13.1	0.3	0	100

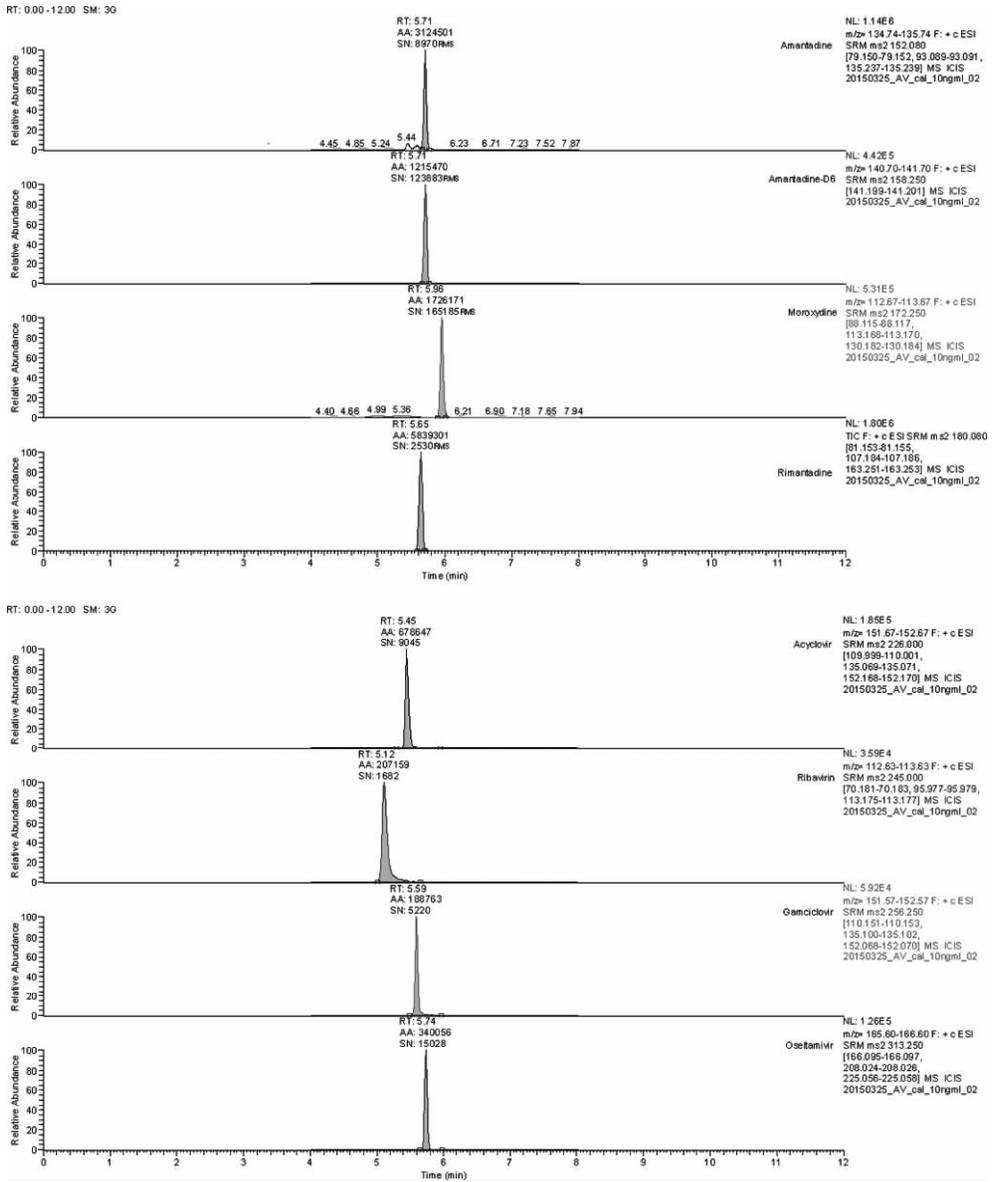


图 1 10 ng/mL 混合对照品溶液亲水相互作用色谱法的 SRM 图

1.4 质谱条件 使用 Thermo Fisher 公司的 TSQ Quantiva 串联四极杆质谱带 HESI 电离喷雾源质谱检测器对 1 μg/mL 的 7 种抗病毒类药物单标溶液进行优化, 兼顾各目标化合物优化后的质谱条件为: 选择正离子模式, 源电压 3900 V, 鞘气 (Sheath gas) 压力 344 kPa, 辅助气 (Aux gas) 流速 5 L/min, 吹扫气 (Sweep gas) 流速 0.3 L/min, 离子传输管

(Ion transfer tube) 温度 350 °C, 雾化器 (Vapourizer) 温度 400 °C, 检测模式为选择反应监控 (Selected reaction monitor, SRM), 碰撞气压力 0.2 Pa, Q1 段分辨率设为半峰宽 0.7, Q2 段分辨率设为半峰宽 0.7, 7 种抗病毒类药物的定性与定量离子对以及对应的撞击能量见表 2。

表 2 抗病毒类药物定性与定量离子对

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/V	透镜电压/V
金刚烷胺	152.08	79.151	36	53
		93.09	32	53
		135.238 *	20	53

续表

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	透镜电压/V
金刚烷胺 - D6	158.25	141.2 *	21	48
		88.116	23	63
吗啉胍	172.25	113.169 *	23	63
		130.183	20	63
		81.154	25	47
金刚乙胺	180.08	107.185 *	28	47
		163.252	18	47
		110	30	54
阿昔洛韦	226.02	135.07	31	54
		152.169 *	15	54
		70.182	32	46
利巴韦林	245.02	95.978	31	46
		113.176 *	12	46
		110.152	36	60
更昔洛韦	256.25	135.101	34	60
		152.069 *	16	60
		166.096 *	21	61
奥司他韦	313.25	208.025	15	61
		225.057	12	61

* 为定量离子

1.5 前处理条件 分散固相萃取法:取2.00 g 预混合饲料样品置于50 mL 试管中,加1 mL 水涡旋振匀,加10 mL 乙腈振荡提取5 min,加入2 g 无水硫酸镁,涡旋振匀,8000 r/min 离心5 min,取上层清液备用。取备用液2.00 mL,依次加入无水硫酸镁150 mg, C18 粉50 mg, PSA 粉100 mg, 涡旋1 min 后10000 r/min 离心5 min,取上清液过0.22 μm 尼龙滤膜后待测。反相色谱法中待测液以50 ℃ 氮气吹干,用0.2% 甲酸1.00 mL 溶解后上机测定;亲水相互作用色谱法中待测液直接上机测定,添加样品检测结果如图2 所示。

2 结果与分析

2.1 线性定量范围的确定 将7种抗病毒药物对

照品分别用甲醇溶解,制成1 μg/mL 的标准品贮备液,取适量该贮备液用0.2% 甲酸稀释成1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50、100.0 μg/L 的标准曲线系列工作溶液,将该系列溶液依次按1.4项和1.5项的检测方法进样检测,将所得定量通道色谱图积分后面积与内标峰面积比值以Y表示,进样浓度以X表示,所得回归曲线结果如下表3所示,其线性相关系数*r*都大于等于0.995。实验表明,该方法同时检测7种抗病毒药物进样浓度在1.0~100.0 μg/L,即实际含量在50~5000 μg/kg 范围内线性良好。

表3 7种抗病毒药物线性范围表

化合物	线性回归方程	线性相关系数 <i>r</i>
金刚烷胺	$Y = -0.00503047 + 0.145874X$	0.9998
吗啉胍	$Y = 0.240946 + 0.124876X$	0.9958
金刚乙胺	$Y = -0.000701655 + 0.185135X$	0.9993
阿昔洛韦	$Y = -0.106099 + 0.0527366X$	0.9987
利巴韦林	$Y = -0.0169887 + 0.0201602X$	0.9961
更昔洛韦	$Y = -0.0280481 + 0.0143664X$	0.9953
奥司他韦	$Y = -0.0423695 + 0.0137618X$	0.9993

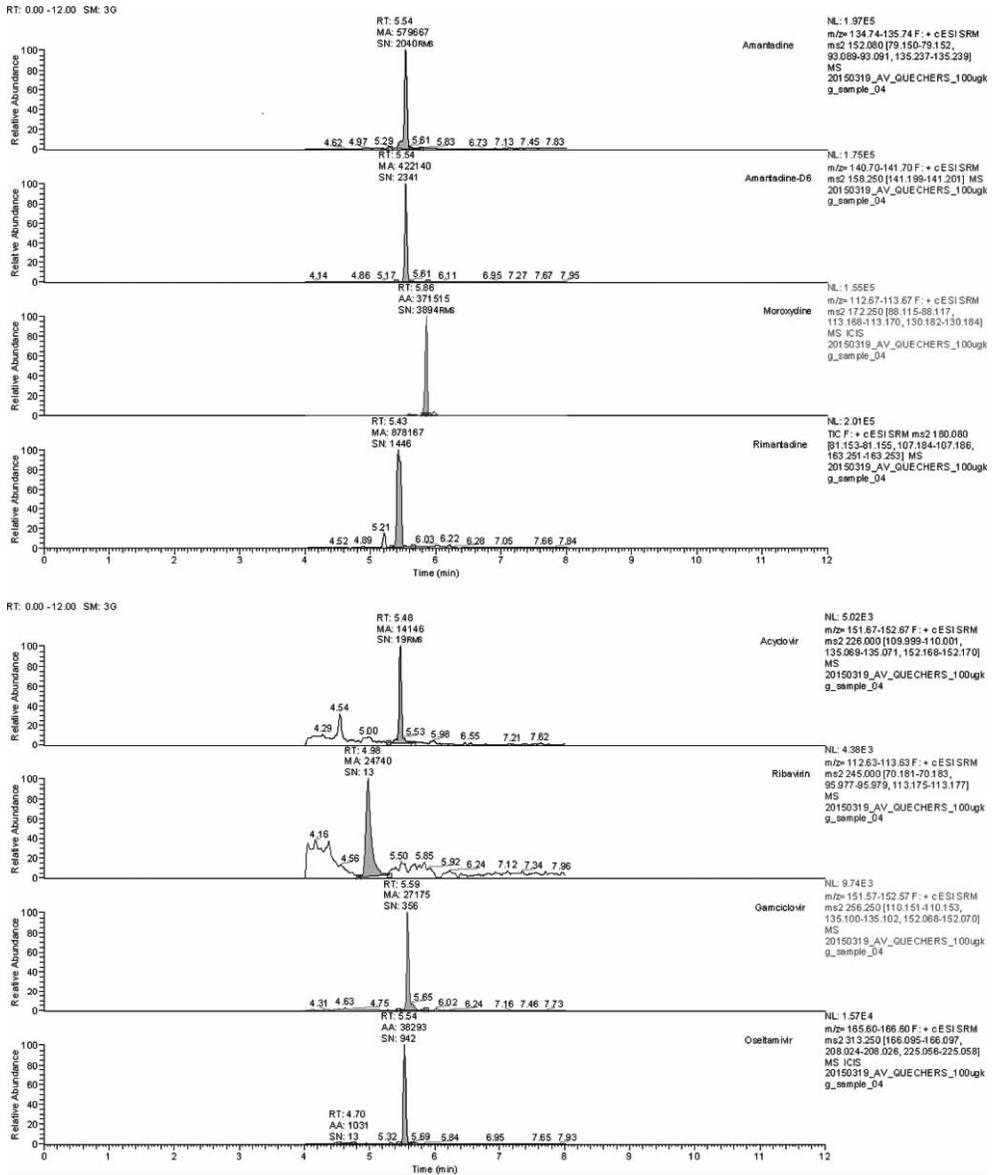


图 2 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加样品亲水相互作用色谱法的 SRM 图

2.2 检测限与定量限的确定 选择 20 个空白样品,按优化条件进行处理后上机测定,取与标准图谱中相同保留时间的噪音信号平均值,以信噪比 $S/N \geq 3$ 为检出限 (LOD), $S/N \geq 10$ 为定量下限 (LOQ),确定该方法的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量下限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。检测限处 SRM 图谱见图 2。

2.3 方法准确度与精密度实验 为研究分散固相萃取和传统固相萃取法检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物时方法回收率和精密度的差异,使用 6 批不同预混合饲料,每批称取等量 6 份,3 份一组分两组,分别加入 50、100、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 7 种喹恶啉类化合物,两组分别采用分散固相萃取法和传统固相萃取

法,所得结果如表 4 所示。实验结果表明,分散固相萃取法检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物时回收率结果在 60% ~ 90% 之间, $RSD < 10\%$,同时测得使用传统反相机理的固相萃取法只有金刚烷胺、金刚乙胺和奥司他韦三种药物的回收率达到 60% 以上,而其他四种药物的回收率均未达到 60%,结果表明分散固相萃取具有较高的准确度与精密度。

2.4 方法选择性的验证 选择 20 个空白样品,按优化条件进行处理后上机测定,未发现假阳性结果,表明该方法的选择性良好。

3 讨论与小结

3.1 色谱方法的确定 本次实验尝试了两种截然

表4 分散固相萃取准确度和精密度结果表

化合物	添加量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	分散固相萃取	
		回收率 $R/\%$ ($n=6$)	$RSD_{S_r}/\%$ ($n=3$)
金刚烷胺	50	84.1	9.5
	100	76.9	2.9
	500	81.2	4.0
吗啉胍	50	80.4	5.5
	100	75.3	3.2
	500	77.0	7.8
金刚乙胺	50	77.8	4.2
	100	79.6	8.9
	500	85.1	6.3
阿昔洛韦	50	80.2	5.7
	100	78.5	7.2
	500	75.1	9.9
利巴韦林	50	79.2	4.1
	100	72.3	6.7
	500	77.1	5.8
更昔洛韦	50	86.5	7.3
	100	82.2	4.1
	500	81.0	5.2
奥司他韦	50	73.3	7.9
	100	75.8	8.6
	500	74.3	6.3

不同的色谱分离方法,其中使用具有超纯硅胶载体高碳载量的 Waters HSS T3 超高效液相色谱柱,其目的是在对目标化合物中高极性化合物增强保留的同时,对非极性化合物不会产生过强的保留。另外,将流动相起始比例设为 0.2% 甲酸: 甲醇 = 95:5, 尽量增强其中强极性化合物的保留,然后在强极性的化合物均出峰以后迅速将比例调整到 0.2% 甲酸: 甲醇 = 20:80, 使得保留较强的弱极性化合物能尽早出峰。除极性较弱的金刚乙胺、奥司他韦以外,其余 5 种化合物的极性均较强,在 2 min 以内均已出峰。考虑到对色谱柱的耐用性,不宜将流动相的水相比比例再升高,因此很难增强对剩余 5 种化合物的保留,而一般样品基质中的强极性干扰杂质往往在 0~2 min 内出峰,因此很容易与目标化合物争夺电荷,造成严重的基质干扰;由于抗病毒类药物的分子量较小,过早的出峰时间也容易受到质量数接近的物质干扰,金刚烷胺通道就明显有此

情况。针对这一情况同时尝试了使用亲水相互作用(HILIC)色谱法,选择了采用薄壳核壳技术填料的 Waters Cortecs HILIC 色谱柱。亲水相互作用色谱是通过类似于硅胶的强亲水性聚合物吸附剂作为固定相,在流动相水含量较低的时候其与极性化合物之间产生较强的分子间作用力以实现保留,当水含量提高后由于水的极性强于大多数有机目标物,因此会取代目标化合物与固定相产生键合,从而实现了对高极性化合物的保留。由于一般 HILIC 色谱柱的柱效相对较低,难以实现高效率的分离,本方法选择具有薄壳核壳技术的 HILIC 色谱柱,该填料核外的壳层增加了目标化合物在色谱柱中的行程,提高了填料的比较面积,充分利用传质阻力和涡流扩散效应提高了色谱柱的柱效。实验结果如图 1 所示,所有目标化合物保留时间均在 5~6 min 之间,除色谱峰型略有拖尾,柱效略逊于反相 C18 柱以外,其保留行为十分适合液质联用检测技

术的需求。而且,该方法的另一个优势是进样溶剂可以是纯乙腈,因此预处理步骤中最后用高比例乙腈洗脱的溶剂可以经过过滤以后直接进样,省去了溶剂置换的步骤。

3.2 分散固相萃取法的确定 分别以分散固相萃取法和传统固相萃取法对相同样品进行了分析检测,实验结果表明,分散固相萃取法同时检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物时回收率结果在 60% ~ 90% 之间,而使用传统反相机理的固相萃取法所得结果中只有金刚烷胺、金刚乙胺和奥斯他韦三种药物的回收率达到 60% 以上,而其他四种药物的回收率均未达到 60%,推测这可能与化合物性质差异有关。因此查阅了化合物的水溶解系数、水油分配系数和酸碱环境下的解离系数等理化性质参数^[8]。水溶解系数、水油分配系数表明该 7 种抗病毒药物在有机溶剂中溶解度较高,因此提取试剂宜采用高比例有机溶剂;而金刚烷胺、金刚乙胺和奥司他韦的水油分配系数较大,因此在传统的反相固相萃取柱上保留较好,同时在色谱柱上也会有较好的保留行为,而其余 4 种药物在反相柱上较难保留,回收率结果较差;酸碱条件下的 pKa 显示金刚烷胺、金刚乙胺、吗啉胍在酸性条件下难以水解,呈极性较小的分子状态,在碱性条件下易呈极性较大的离子状态,而阿昔洛韦、利巴韦林、更昔洛韦和奥司他韦则正好相反,在酸性条件下易解离而碱性条件下不易解离,因此不能采用传统的调节 pH 后使用离子交换型固相萃取方法来同时兼顾这 7 种化合物,最终采用了中性有机溶剂提取以同时兼顾 7

种化合物的提取与净化,分散固相萃取和 HILIC 色谱技术结合同时分析 7 种抗病毒药物。

参考文献:

- [1] 孙雷,李丹,毕言锋,等. 抗病毒药物的毒性及残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 57-61.
- [2] 顾欣,张鑫,李丹妮,等. 我国兽用抗菌药物使用现状及“无抗”饲养的探讨[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(8): 54-57.
- [3] 李振,王云建. 畜禽养殖中抗生素使用的现状、问题及对策[J]. 今日畜牧兽医, 2009, 24(8): 1-3.
- [4] 沈林凤. 滥用抗病毒药物对患者危害和临床治疗分析[J]. 医学信息, 2011, 24(6): 3816.
- [5] 李必会. 畜牧生产中常用的抗病毒药物及作用机制[J]. 浙江畜牧兽医, 2014, 1(1): 35.
- [6] 杨泽林,吴宣,岳华,等. 抗病毒药物在兽医上的应用与存在的问题[J]. 四川畜牧兽医, 2014, 30(5): 31-32.
- [7] 陈慧华,韦敏珏,周炜,等. 液相色谱-串联质谱法测定动物组织中金刚烷胺和金刚乙胺的残留量[J]. 质谱学报, 2013, 34(4): 227-232.
- [8] 张鑫,吴剑平,严凤,等. 基于双柱固相萃取-色谱联用技术同时检测鸡肉中 8 种抗病毒药物残留[J]. 中国兽药杂志, 49(9): 45-50.
- [9] 周晓,张勋,康明琴,等. 固相萃取净化-液相色谱串联质谱法测定饲料中金刚烷胺含量[J]. 饲料检测, 2014, 1(1): 55-59.
- [10] 艾连峰,马育松,陈瑞春,等. 在线净化液相色谱串联质谱法测定动物源食品中金刚烷胺的残留[J]. 分析化学, 2013, 41(8): 1194-1198.

(编辑:侯向辉)