

高效液相色谱-串联质谱法测定熟制鸡肉制品中金刚烷胺

刘晓茂,张守军,杨志伟,曹悦,裴岗,曹彦忠,张进杰,崔宗岩*

(秦皇岛出入境检验检疫局检验检疫技术中心,河北秦皇岛 066004)

[收稿日期] 2016-02-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 04-0052-05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定熟制鸡肉制品中金刚烷胺的分析方法。样品用乙腈提取,PXC小柱净化,经C18色谱柱分离,以电喷雾离子源(ESI)在正离子多反应监测(MRM)模式下进行测定,内标法定量。金刚烷胺的检出限为 $0.05\text{ }\mu\text{g/kg}$,定量限为 $0.15\text{ }\mu\text{g/kg}$,在 $0.3\sim 150\text{ }\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数 r^2 为0.9992。对于4种不同的熟制鸡肉制品,在4个加标水平下的平均回收率范围为 $87.2\%\sim 94.8\%$,批内精密度($n=6$)为 $6.7\%\sim 10.0\%$,批间精密度($n=3$)为 $8.5\%\sim 13.6\%$ 。该方法灵敏度高,准确性好,适用于熟制鸡肉制品中金刚烷胺残留量的测定。

[关键词] 金刚烷胺;熟制鸡肉制品;高效液相色谱-串联质谱

Determination of Amantadine in Cooked Chicken Products by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

LIU Xiao-mao, ZHANG Shou-jun, YANG Zhi-wei, CAO Yue, PEI Gang,

CAO Yang-zhong, ZHANG Jin-jie, CUI Zong-yan*

(Inspection and Quarantine Technique Centre, Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: A method for the determination of amantadine in cooked chicken products has been developed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The sample was extracted by acetonitrile, then cleaned up by PXC solid phase extraction cartridge, and then separated on a C18 column and finally analyzed by HPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive electrospray ionization, and an internal standard calibration method was used. The limit of determination for amantadine was $0.05\text{ }\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantitation was $0.15\text{ }\mu\text{g/kg}$. The calibration curves showed good linearity in the range of $0.3\sim 150\text{ }\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficient of 0.9992. The average recoveries of amantadine at 4 spiked levels, in 4 kinds of cooked chicken products, were in the range of $87.2\%\sim 94.8\%$ with intra-assay precision of $6.7\%\sim 10.0\%$ ($n=6$), and inter-assay precision of $8.5\%\sim 13.6\%$ ($n=3$). The method is accurate and sensitive, which is suitable for the determination of amantadine in cooked chicken

作者简介: 刘晓茂,高级工程师,硕士,从事食品安全检测研究。

通讯作者: 崔宗岩。E-mail: ciqqhd@126.com

products.

Key words: amantadine; cooked chicken products; high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS)

金刚烷胺是最早用于抑制流感病毒的抗病毒药,在抑制人流感病毒方面,金刚烷胺具有价格低廉,效果明显等特点。2012 年 12 月我国爆发“速生鸡”事件,曝光鸡在饲养过程中被违规喂食金刚烷胺抗病毒药物,该药物滥用不仅造成鸡肉风味和品质的下降,更会导致细菌耐药性的发生和药物残留,并通过食物链影响人类健康和破坏生态平衡,造成严重不良后果。农业部在 2005 年发布第 560 号公告中,明确规定抗病毒药物为禁用兽药^[1]。由于熟制鸡肉制品大多经过油炸工序且包裹面粉,基质比较复杂,检测难度较大,因此建立一种简单、实用、准确、高效的测定熟制鸡肉制品中金刚烷胺含量检测方法,具有重要意义。

目前,文献报道的金刚烷胺测定方法主要有荧光分光光度法^[2]、气相色谱法^[3-5]、液相色谱法^[6-9]、液相色谱 – 串联质谱法 (HPLC – MS/MS)^[10-11],荧光分光光度法干扰因素较多,测量精密度差,气相色谱法需衍生后检测,液相色谱法灵敏度较低且无法提供结构信息,HPLC – MS/MS 法可提供待测物的结构信息,具有较高的灵敏度和选择性。本文采用 HPLC – MS/MS 法,对前处理过程中固相萃取柱的实验条件及各影响因素进行了较为深入的探讨,采用优化的方法对熟制鸡肉制品中金刚烷胺的含量进行了实际检测和验证。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱仪(日本岛津公司);3200 三重四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)(美国 Applied Biosystems 公司);PXC 固相萃取小柱(150 mg, 6 mL, 迪马公司);TurboVap LV 浓缩工作站为美国 Biotage 公司;SA300 振荡器(日本 Yamato 公司);固相萃取装置(天津海洋玻璃仪器厂);涡旋混匀器(美国 Scientific Industries 公司);真空泵(津腾公司)。

金刚烷胺标准品(Toronto Research Chemicals

公司,纯度 99.5%);金刚烷胺内标标准品(Toronto Research Chemicals 公司,纯度 99.5%);所用溶剂或其他试剂均为分析纯或色谱纯;所用水为超纯水。

标准溶液的配制:准确称取 10 mg 金刚烷胺标准品,用甲醇溶解并完全转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 1000 mg/L 储备液,于 4 °C 条件下储存。

内标溶液的配制:准确称取 10 mg 金刚烷胺内标标准品,用甲醇溶解并完全转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 1000 mg/L 储备液,于 4 °C 条件下储存。

1.2 样品的提取与净化 称取 2 g(精确至 0.01 g)样品至 50 mL 塑料离心管中,加入适量内标溶液,加入 10 mL 乙腈,在振荡器上振荡 20 min,高速离心 5 min(15000 r/min)。将上清液转移至装有 10 mL 5% 三氯乙酸溶液的塑料离心管中,混匀后将样品溶液加载至预先用 5 mL 甲醇和 10 mL 水活化过的 PXC 固相萃取小柱上。待样品溶液全部过柱后,分别用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗,弃去全部流出液,用真空泵减压抽干,然后用 5 mL 氨水 – 甲醇 – 乙酸乙酯(5 + 47.5 + 47.5, V/V/V)溶液洗脱,收集洗脱液于氮吹管中,向其中加入 20 μL 甲酸,50 °C 氮气吹干,用 1 mL 乙腈 – 水(25 + 75, V/V)溶液溶解残渣,过 0.2 μm 水系滤膜,供液相色谱 – 串联质谱测定。

1.3 液相色谱与质谱条件 色谱柱:Atlantis T3 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 3 μm);流速 0.2 mL/min;进样量 20 μL;柱温 40 °C;流动相 A:甲酸 – 水(1 + 999, V/V)溶液;流动相 B:乙腈。梯度洗脱条件为:初始流动相 A 为 98%, 4 min 后变为 96%, 5 min 后降为 60%, 8 min 后降为 50%, 8.1 min 升至 98%, 保持至 13 min。

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫

描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压(IS):5300 V;雾化气(NEB)压力:0.5 MPa;气帘气(CUR)压力:0.35 MPa;辅助气(AUX)压力:0.7 MPa;辅助气温度(TEM):500 ℃;碰撞室出口

电压(CXP):3.2 V;金刚烷胺及金刚烷胺内标定量离子对、定性离子对、碰撞能量、去簇电压、保留时间,见表1所示。金刚烷胺及内标的MRM色谱图见图1。

表1 金刚烷胺及内标的质谱实验条件

组分名称	监测离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	碰撞气能量(CE)/eV	去簇电压(DP)/V	保留时间/min
金刚烷胺	152.2/135.2	152.2/135.2	25	40	7.75
	152.2/107.1		37	40	
金刚烷胺内标	158.3/112.2	158.3/141.2	26	40	7.75
	158.3/141.2		37	40	

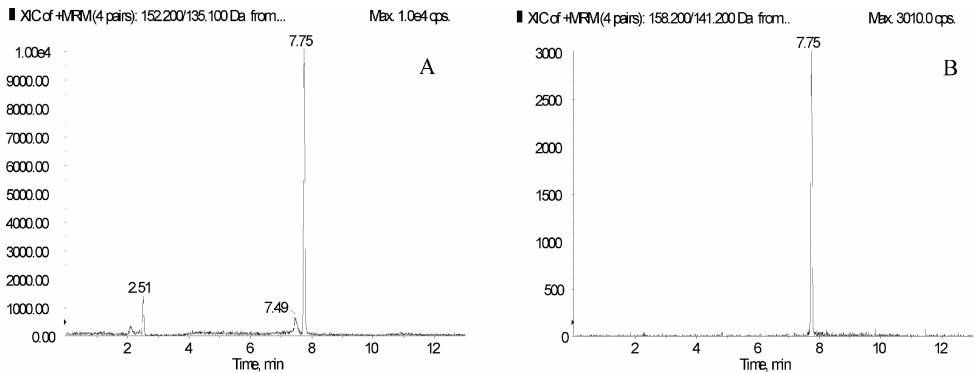


图1 金刚烷胺(A)及内标(B)的MRM色谱图(空白基质添加,浓度均为0.3 μg/kg)

2 结果与分析

2.1 提取条件的选择 参考文献报道的实验条件,分别使用甲醇-1%三氯乙酸(50+50, V/V)、乙腈-1%三氯乙酸(50+50, V/V)、甲醇-5%三氯乙酸(50+50, V/V)、乙腈-5%三氯乙酸(50+50, V/V)、甲醇和乙腈作为提取液,空白基质添加0.15 μg/kg,通过回收率来对比提取效果,结果如图2。可见,采用乙腈提取的回收率最高,因而本方法选择乙腈作为提取液。

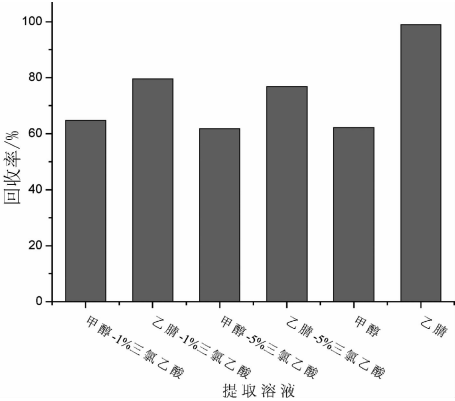


图2 提取液对金刚烷胺回收率的影响

2.2 净化条件的选择 实验采用空白样品加标的方式,考察了三种固相萃取柱小柱 HLB、MCX 和 PXC 的净化效果和回收率情况,结果表明,采用 MCX 和 PXC 的净化效果具有较好的样品净化效果,可除去熟制鸡肉制品样品中大量的脂肪、蛋白质等干扰物。而 PXC 小柱的回收率比 MCX 高,因而实验选择 PXC 为净化柱。

2.3 洗脱液的选择 取 25 mL 提取液,加入 0.1 μg/mL 金刚烷胺标准 100 μL,混匀后分别取出 5 mL 过 PXC 固相萃取小柱,待样液全部过柱后,分别用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗小柱,抽干,分别用 5 mL 5% 氨水甲醇、5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(4:1)、5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(1:1)、5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(1:4)这 4 种洗脱液进行洗脱,比较它们的响应值,结果如图3所示,5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(1:1)响应值最高,因此本方法选择 5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(1:1)为洗脱液。

进一步对洗脱溶液用量进行了优化和选择,分别用 3、4、5、6、7、8 mL 的 5% 氨水甲醇-乙酸乙酯(1:1)洗脱液洗脱,比较它们的响

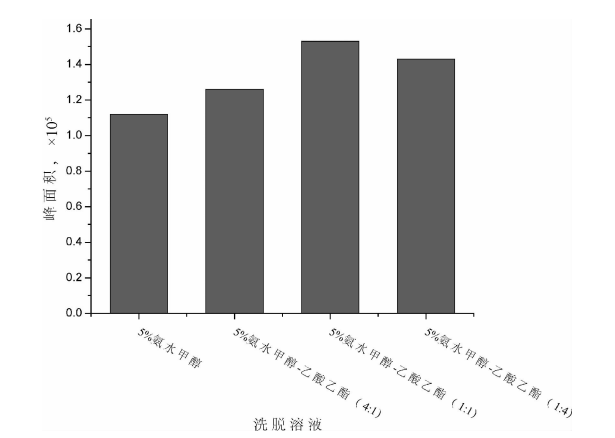


图3 洗脱液的对金刚烷胺响应的影响

应值,结果表明,用5 mL洗脱液即可洗脱完全,因而实验选择洗脱溶液用量为5 mL。

2.4 甲酸加入量的选择 实验发现,洗脱液浓缩定容后测定,金刚烷胺的响应明显降低。而在洗脱液中加入一定体积的甲酸,再进行浓缩,则目标物响应良好。实验考察了洗脱液中加入不同含量的甲酸条件下金刚烷胺的回收率。取50 mL洗脱液,加入0.1 $\mu\text{g/mL}$ 金刚烷胺标准200 μL ,混匀后分别取出5 mL添加0、10、20、30、40、50 μL 的甲酸,然后进行晾干,定容,液相色谱串联质谱测定,比较其响应值,结果如图4所示,在洗脱液中加入20 μL 甲酸响应值最高,因而实验选择甲酸加入量为20 μL 。

2.5 方法的检出限、线性范围及回收率 在优化条件下,用阴性样品按1.2项制作空白基质,配制浓度分别为0.3、1.5、3.0、6.0、15.0、30.0、60.0、

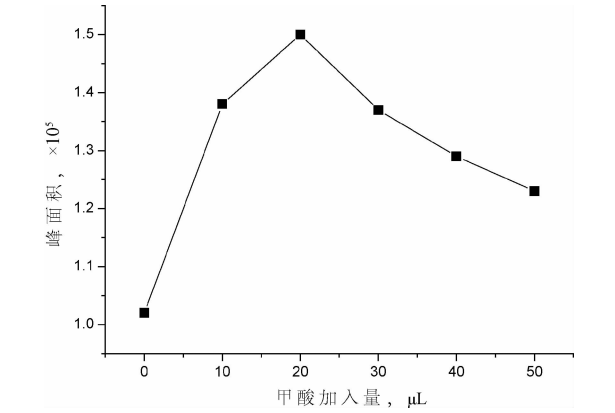


图4 甲酸含量对金刚烷胺响应的选择

150.0 $\mu\text{g/L}$ 的金刚烷胺基质标准工作液,上机测试。以金刚烷胺的质量浓度 $X(\mu\text{g/L})$ 为横坐标,以金刚烷胺与内标的峰面积比 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程 $Y = 1.56X + 0.0182$ 及相关系数 $r^2 = 0.9992$,线性范围为0.3~150 $\mu\text{g/L}$ 。

根据6个空白熟制鸡肉制品样品的基线噪音值求其平均值,按信噪比 $S/N = 3$ 计算检出限(LOD),信噪比 $S/N = 10$ 计算定量限(LOQ),得鸡肉中金刚烷胺的LOD为0.05 $\mu\text{g/kg}$ 、LOQ为0.15 $\mu\text{g/kg}$ 。

选取鸡腿肉、鸡胸肉、鸡翅、鸡皮这4种常见熟制鸡肉制品,在重复性条件下分别进行0.15、0.30、0.75、1.50 $\mu\text{g/kg}$ 四个水平的加标回收率实验,每个水平平行测定6次,并重复3批次,结果见表2。结果表明,本方法的平均回收率范围为87.2%~94.8%,批内精密度($n = 6$)为6.7%~10.0%,批间精密度($n = 3$)为8.5%~13.6%。

表2 熟鸡肉制品中金刚烷胺的回收率、批内精密度及批间精密度

基质	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均回收率/%	批内精密度($n = 6$)/%	批间精密度($n = 3$)/%
鸡腿肉	0.15	92.6	10.0	13.1
	0.30	93.9	9.5	11.4
	0.75	92.1	9.9	10.9
	1.50	88.3	7.6	8.5
鸡胸肉	0.15	89.6	8.2	12.8
	0.30	91.3	8.9	10.3
	0.75	93.2	9.8	11.1
	1.50	87.2	6.7	9.3
鸡翅	0.15	92.7	8.0	13.6
	0.30	94.3	9.8	12.1
	0.75	93.6	9.3	10.8
	1.50	89.1	6.8	10.6
鸡皮	0.15	94.8	8.4	11.8
	0.30	94.8	8.3	12.2
	0.75	93.3	9.5	9.8
	1.50	89.5	6.9	10.5

3 讨论与小结

本文针对目前研究较少的熟制鸡肉品,建立了其中金刚烷胺检测的高效液相色谱-串联质谱法。先前报道的金刚烷胺检测方法^[11-12],大多检测生鸡肉样品,基质较为简单、单一,且方法定量限在1.0~4.0 μg/kg之间。本文方法在优化的条件下定量限为0.15 μg/kg,相较上述方法^[13-14]具有更高的灵敏度。

样品前处理的改进是本文技术创新的重点,针对熟制鸡肉制品的特性,选择固相萃取的前处理方式,对样品的提取条件、净化参数等进行了详细的考察和优化,发现影响熟制鸡肉品中金刚烷胺回收率的关键因素为乙腈提取和洗脱液浓缩前甲酸的加入量,通过该实验条件的选择和优化,使得本方法具有较低的检出限,并获得良好的回收率和精密度。本文所建立的方法具有较高的灵敏度和准确度,适用于各种熟制鸡肉制品中金刚烷胺的测定。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部公告第560号. 兽药地方标准废止目录[S].
- [2] 张文伟,杨梅,施杰,等. 荧光法测定片剂中金刚烷胺的含量[J]. 分析化学,2002,(4): 508-508.
- [3] 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.
- [4] 龚莉,王莹莹,王婧斯,等. GC法测定小儿氨酚烷胺颗粒中盐酸金刚烷胺[J]. 现代药物与临床,2014,(9): 995-997

- [5] 邱婧,童达,李晓燕. 气相色谱法测定小儿氨酚烷胺颗粒中盐酸金刚烷胺的含量[J]. 中国药师,2015,(6): 1067-1069
- [6] 赵德华,贺凯,马玲,等. HPLC-ELSD法测定盐酸金刚烷胺片的含量[J]. 宁夏医学杂志,2011,33(11): 1045-1046.
- [7] 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.
- [8] 马玲,张学良,贺凯,等. HPLC-ELSD法测定盐酸金刚烷胺颗粒中盐酸金刚烷胺的含量[J]. 药物分析杂志,2011,(11): 2188-2190.
- [9] 朱胜平,钟华,何飞,等. 高效液相色谱法测定盐酸美金刚烷胺片的含量[J]. 中南药学,2005,(4): 209-210.
- [10] 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,2015,49(9): 45-50.
- [11] 曲斌,朱志谦,陆桂萍,等. UPLC-MS/MS快速测定鸡肉中金刚烷胺和氟喹诺酮类药物残留[J]. 中国兽药杂志,2013,47(7): 50-54.
- [12] 云环,崔风云,严华,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中的利巴韦林和金刚烷胺[J]. 色谱,2013,(8): 724-728.
- [13] 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.
- [14] 尹晖,孙雷,毕言锋,等. 鸡肉和鸡蛋中金刚烷胺与金刚乙胺残留检测 UPLC-MS/MS法研究[J]. 中国兽药杂志,2014,48(6): 32-35.

(编辑:侯向辉)