

动物源性食品中金刚烷胺、金刚乙胺和利巴韦林残留量的LC-MS/MS解决方案

The solution for amantadine, rimantadine and ribavirin residues in animal-derived foods by LC-MS /MS

刘青¹, 朱怀恩¹, 李立军¹, 郭立海¹

Liu Qing¹, Zhu Huaien¹, Li Lijun¹, Guo Lihai¹

SCIEX China

Keywords: Amantadine, Rimantadine, Ribavirin, PBA-2

金刚烷胺、金刚乙胺和利巴韦林是动物常用的抗病毒类药物，其残留问题在鸡肉产品尤为突出，本文依照《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中《动物源性食品中金刚烷胺、金刚乙胺和利巴韦林残留量测定的标准操作程序 液相色谱串联质谱法》，利用液相色谱串联三重四极杆质谱（SCIEX ExionLC™系统 + QTRAP®4500系统）（图1）建立了动物源性食品中3种抗病毒类药物的残留量的液相色谱串联三重四极杆质谱（LC-MS/MS）解决方案，结果显示上述3种药物残留灵敏度优于手册中要求3倍。

本实验方法具有如下特点：

本方法中金刚烷胺、金刚乙胺的定量限分别为0.2 µg/kg；利巴韦林的定量限分别为0.2 µg/kg，低于《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中的值。

- 前处理采用与《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》相同的PBA/PCX（型号PBA-2）的固相萃取小柱（SPE），符合《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》的规定。
- 同一色谱分离条件，两针进样10分钟，无需更换色谱柱，省去了更换流动相和色谱柱的繁琐操作，优于手册中更换色谱柱和流动相的方法（图2和图3）。
- 利用了A/B阀切换的模式，将天然的干扰峰尿苷去除，能够更好地排除假阳性，加标和阳性样品峰型得到改善（图3）。



图1. SCIEX ExionLC™系统和 QTRAP®4500系统

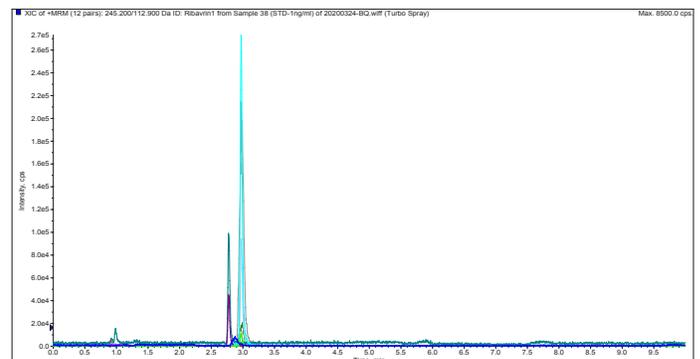


图2. 金刚烷胺、金刚乙胺色谱图

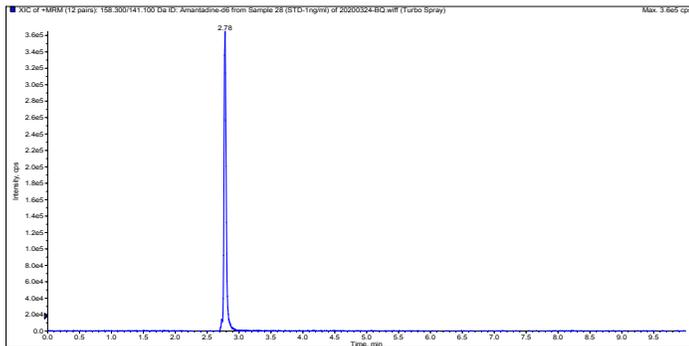


图3. 金刚烷胺内标色谱图

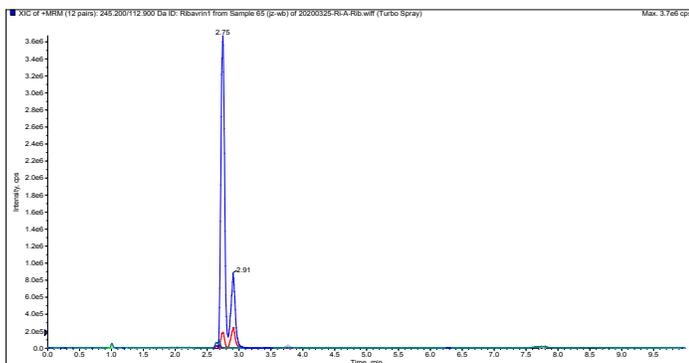


图4. 利巴韦林加标色谱图 (峰1为干扰峰; 峰2为利巴韦林)

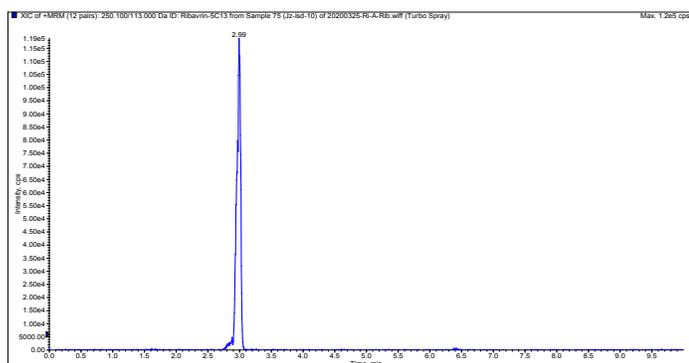


图5. 利巴韦林内标色谱图

1. 样品前处理

• 1.1 酶解

称取2 g试样(精确至0.001g)于50 mL刻度离心管中,加入40 μ L混合内标工作液,加入5 mL乙酸铵缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.8)和40 μ L酸性磷酸酶溶液,盖紧盖子,漩涡混匀30 s,于37 $^{\circ}$ C恒温摇床或恒温烘箱中避光酶解2 h。

• 1.2 提取:

酶解液加4 mL5%三氯乙酸溶液,漩涡混匀30 s, 10000 r/min低温(2~4 $^{\circ}$ C)离心10 min,移取上清液于另一50 mL刻度离心管中,用氨水溶液(5%)调节溶液pH 8.5 \pm 0.1,用水定容至10 mL,混匀,过0.45 μ m RC微孔滤膜(或10000 r/min离心5 min),得到澄清的样品提取液。

• 1.3 净化:

PBA/PCX固相萃取柱依次用3 mL乙腈、3 mL0.5%甲酸水溶液和3 mL乙酸铵缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.5)活化。取5.0 mL上述样品提取液过柱,依次用3 mL乙酸铵缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.5)和3 mL水淋洗,抽干柱子。

PBA/PCX固相萃取柱先用2 mL0.5%甲酸水溶液洗脱于小试管中,抽干柱子,漩涡混匀洗脱液,过0.22 μ m RC滤膜,供LC-MS/MS分析利巴韦林。

PBA/PCX固相萃取柱再用3 mL甲醇淋洗,抽干柱子,用3 mL氯化甲醇(5%,含10%异丙醇)洗脱于小试管中,50 $^{\circ}$ C水浴氮吹近干,用2.0 mL甲酸水溶液(0.5%,含5%甲醇)复溶,漩涡混匀,过0.22 μ m PTFE滤膜,供LC-MS/MS分析金刚烷胺和金刚乙胺。

注:除固相萃取柱活化外,其他所有溶液通过固相萃取柱时的流速应严格控制在1.0 mL/min左右(即约3秒1滴)。

2. 实验方法

2.1 液相方法

液相: SCIEX ExionLC™ AC 系统

色谱柱: Amide Hilic, (2.6 μ m, 2.1 \times 5 mm)

流动相: A: 水(含10 mmol甲酸铵) B: 甲醇

流速: 0.4 mL/min

进样量: 2 μ L

洗脱程序: 梯度洗脱(表1)

表1. 液相洗脱程序

时间(分钟)	A (%)	B (%)
1	20	80
4	20	80
5	70	30
6	70	30
7	20	80
8	20	80

2.2 质谱方法

离子源：电喷雾电离（electrospray ionization, ESI），正离子模式

离子源参数：

气帘气 CUR: 40 psi 源温度 TEM: 550°C

碰撞气 CAD: Medium 喷雾气GS1: 40 psi

辅助加热气GS2: 40 psi

离子对信息（表2）

表2. 离子对信息表

母离子	子离子	离子名称	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)
245.2	112.9	利巴韦林 1	52	12
245.2	96.3	利巴韦林 2	52	43
152.2	135	金刚烷胺 1	80	35
152.2	93	金刚烷胺 2	80	35
180.2	163.2	金刚乙胺1	45	15
180.2	81	金刚乙胺2	45	32

3. 实验结果

3.1 金刚烷胺、金刚乙胺线性（图3）：线性良好（ $r^2 > 0.99$ ）。

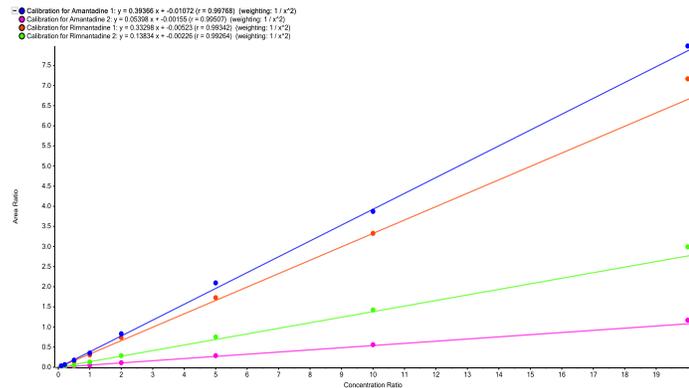


图6. 金刚烷胺、金刚乙胺线性

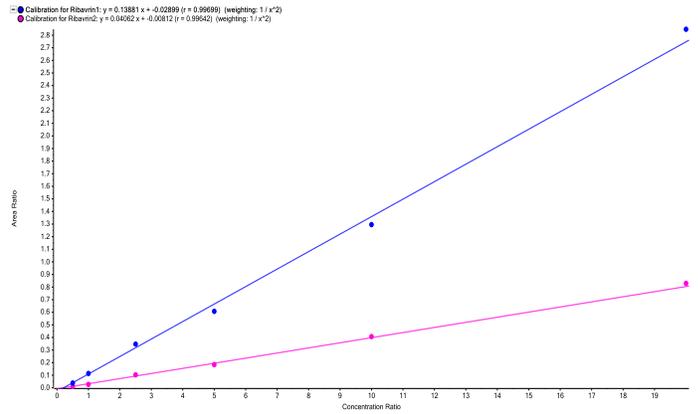


图7. 利巴韦林线性

3.2 加标回收率：本实验采用鸡蛋肉基质利巴韦林分别做0.75 ng/ml、1.5 ng/ml、7.5 ng/ml加标，金刚烷胺、金刚乙胺林分别做0.2 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml加标，结果表明回收率在80%~120%（表4）（表5）。

表3. 利巴韦林加标回收结果

化合物名称	平均回收率%	平行加标样品	标准偏差%
0.75ng/ml	116.9	6	8.78
1.5ng/ml	84.7	6	6.8
7.5ng/ml	93.2	6	6.0

表4. 金刚烷胺、金刚乙胺加标回收结果

化合物名称	平均回收率%	平行加标样品	标准偏差%
0.2ng/ml	103.8	6	2.28
2ng/ml	107.4	6	4.45
5ng/ml	105.6	6	2.17

3.3 重复性：3种化合物在0.1 ng/ml浓度下连续进样6针，所有化合物RSD<3%（表5）。

表5. 3种化合物在浓度为0.1 ng/ml下重复性

化合物名称	浓度	重复进样次数	标准偏差
金刚烷胺	0.1ng/ml	6	2.72
金刚乙胺	0.1ng/ml	6	2.25
利巴韦林	0.1ng/ml	6	2.63

3.4 定量限：定量限浓度均为0.1 ng/ml外，完全满足《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中要求。

4.总结

从实验结果看，SCIEX ExionLC™系统 + QTRAP®4500系统稳定，灵敏度高，完全满足《2019年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中要求，并且比手册中的灵敏度高，所以不止QTRAP® 4500系统，SCIEX Triple Quad™ 3500系统等产品也能从事手册中3种抗病毒药物的检测。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-00000-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)