

- Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems—a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1052(10): 10-26.
- [24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 分析实验室用水规格和试验方法: GB/T 6682—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [25] 杨军. 影响白酒中氰化物检测加标回收率因素探究及方法优化[J]. *食品安全导刊*, 2019(23): 38.
- [26] BYRNE D. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[J]. *Off J Eur Commun*, 2002, 8: 1-29.
- [27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氰化物的测定: GB 5009.36—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

## 实验技术与方法

# 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽类食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物残留量

谢继安, 刘柏林, 赵紫微, 王秀莉

(安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**目的 建立同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测禽类食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物(金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺、3,5-二甲基金刚胺)的残留量。方法 样品经酶解, 三氯乙酸沉淀蛋白, 低温高速离心, 上清液调节 pH 值后经 PBA/PCX 复合固相萃取柱净化, Agilent ZORBAX SB-Aq 柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)分析利巴韦林, Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)分析金刚烷胺类化合物, 串联质谱测定, 同位素内标法定量。结果 利巴韦林在 1.0~100 ng/mL、金刚烷胺类化合物在 0.2~20 ng/mL 范围内呈良好的线性关系, 相关系数(*r*)均为 0.999。利巴韦林的检出限和定量限分别为 0.5 和 1.5 μg/kg; 金刚烷胺类化合物的检出限和定量限分别为 0.1 和 0.3 μg/kg。利巴韦林(1.5~15 μg/kg)和金刚烷胺类化合物(0.3~3.0 μg/kg)添加 3 个浓度的检测结果显示, 利巴韦林的回收率为 91.4%~103.7%, 金刚烷胺类化合物的回收率为 94.3%~108.2%, 相对标准偏差(*RSD*)均小于 10%。结论 本方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱; 利巴韦林; 金刚烷胺; 金刚烷甲胺; 金刚烷乙胺; 3,5-二甲基金刚胺; 禽类食品  
中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)03-0261-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.03.008

## Determination the residue of ribavirin and adamantanes in poultry food by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Ji'an, LIU Bolin, ZHAO Ziwei, WANG Xiuli

(Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Anhui Hefei 230601, China)

**Abstract: Objective** An isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of ribavirin and adamantanes (amantadine, adamantanemethylamine, rimantadine, memantine) in poultry food. **Methods** After enzymatic hydrolysis and precipitated by trichloroacetic acid, the samples were centrifuged by high-speed centrifuge at low temperature, and purified by PBA/PCX composite solid-phase extraction cartridge. The separation of ribavirin was performed on UPLC system with Agilent ZORBAX SB-Aq (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm), adamantanes with Waters BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) and determined by tandem mass spectrometry. The method was quantified by internal standard. **Results** The calibration curves showed a good linearity between the peak ratio and the concentrations of 1.0-100 ng/mL (ribavirin) and 0.2-20 ng/mL (adamantanes) with *r* = 0.999. The limit of detection of ribavirin was 0.5 and 0.1 μg/kg for adamantanes. The limit of quantification of ribavirin was 1.5 and 0.3 μg/kg for adamantanes. The mean recoveries of the ribavirin ranged from 91.4%-103.7% and ranged from 94.3%-108.2% for adamantanes spiked at three concentration levels (1.5-15 and 0.3-3.0 μg/kg), with the relative standard deviations (*RSD*) less than 10%. **Conclusion** This method was simple, high sensitivity and accuracy.

**Key words:** Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ribavirin; amantadine; adamantanemethylamine; rimantadine; memantine; poultry food

利巴韦林(ribavirin),又称病毒唑,是广谱强效的合成核苷类抗病毒药物,对DNA和RNA病毒有抑制作用,主要用于人类病毒性感冒、肺炎、甲型肝炎和病毒性脑炎等疾病的治疗<sup>[1]</sup>。金刚烷胺类化合物主要有金刚烷胺(amantadine)、金刚烷甲胺(adamantanemethylamine)、金刚烷乙胺(rimantadine)和3,5-二甲基金刚胺(memantine),其中金刚烷胺主要用于抑制亚洲甲型流感病毒;金刚烷甲胺抗A2型病毒、副流感病毒的效果优于金刚烷胺;金刚烷乙胺抑制A型流感病毒的作用也强于金刚烷胺,但中枢神经副作用弱于金刚烷胺;3,5-二甲基金刚胺又称美金刚,临床上常用于中、重度治疗阿尔茨海默病,但其具有金刚烷胺的类似结构,也具有抑制甲型流感病毒作用<sup>[2-5]</sup>。

由于畜牧养殖环节滥用利巴韦林和金刚烷胺类化合物,药物残留会导致病毒耐药性,通过食物链对人体健康产生危害,存在较大的安全风险<sup>[5]</sup>,我国原农业部于2005年颁布的第560号公告中明令禁止利巴韦林和金刚烷胺类化合物等抗病毒药物用于畜禽养殖环节<sup>[6]</sup>,美国食品药品监督管理局(FDA)也于2006年禁止将人类抗病毒药物用于畜禽养殖环节<sup>[7]</sup>。2012年我国爆出“速生鸡”事件,媒体曝光了部分养殖场违规喂食利巴韦林和金刚烷胺类化合物等抗病毒药物,引起了较大的社会反响。由于利巴韦林和金刚烷胺类化合物等抗病毒药物价格低廉,效果好,仍然有养殖环节将此类药物用于动物疾病的预防和治疗。

由于利巴韦林在生物体内代谢成磷酸化利巴韦林<sup>[7]</sup>,分析利巴韦林总残留量时需要将磷酸化利巴韦林转化成游离态的利巴韦林,而金刚烷胺类化合物在生物体内几乎以原型形式存在。目前我国对动物源性食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物总残留量检测的相关研究报道较少,大多采用液相色谱-串联质谱法检测利巴韦林或金刚烷胺类化合物<sup>[1,8-13]</sup>。本试验建立了利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测技术,以有效解决利巴韦林和金刚烷胺类化合物在动物源性食品中的检测技术难题。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Acquity™ UPLC 超高效液相色谱仪、XEVO™

TQ MS 均购自美国 Waters, Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore),旋涡混匀器,电子天平, GX-271 固相萃取仪(美国 Gilson),高速冷冻离心机, MTN-2800D 氮吹浓缩装置,苯硼酸(PBA)/聚合阳离子交换树脂(PCX)复合固相萃取柱(自制, 200 mg/100 mg, 3 mL, PBA 和 PCX 填料:美国 Agilent)。

标准品:利巴韦林(C16813570,德国 Dr. Ehretorfer),金刚烷胺(PHR1711)、金刚烷甲胺(180378)、金刚烷乙胺(390593)和3,5-二甲基金刚胺(PHR1886)均购自美国 Sigma-Adrich,<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-利巴韦林(R414477)、D<sub>15</sub>-金刚烷胺(A575822)、D<sub>4</sub>-金刚烷乙胺(R517002)和D<sub>6</sub>-3,5-二甲基金刚胺(M218002)均购自加拿大 Toronto Research Chemicals;乙腈、甲醇和异丙醇均为色谱纯,甲酸、氨水和冰乙酸为均优级纯,三氯乙酸为分析纯,酸性磷酸酶(3.0 U/mg,美国 Sigma-Adrich),0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液(pH=4.8),0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液(pH=8.5)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

准确移取适量金刚烷胺类化合物的单标标准储备液(100 μg/mL)和利巴韦林标准储备液(100 μg/mL),用甲醇配制成混合标准工作液(金刚烷胺类化合物:0.2 μg/mL,利巴韦林:1.0 μg/mL);准确移取适量 D<sub>15</sub>-金刚烷胺、D<sub>4</sub>-金刚烷乙胺和 D<sub>6</sub>-3,5-二甲基金刚胺的同位素单标标准储备液(100 μg/mL)和<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-利巴韦林标准储备液(100 μg/mL),用甲醇配制成混合同位素内标工作液(金刚烷胺类同位素化合物:0.2 μg/mL,<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-利巴韦林:1.0 μg/mL)。

准确移取适量混合标准工作液和混合同位素内标工作液,用0.5%甲酸水溶液配制成混合标准系列溶液,其中金刚烷胺类化合物浓度为:0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10和20 μg/L;利巴韦林浓度为:1.0、2.0、5.0、10、20、50和100 μg/L。每份标准系列溶液含2.0 μg/L的D<sub>15</sub>-金刚烷胺、D<sub>4</sub>-金刚烷乙胺和D<sub>6</sub>-3,5-二甲基金刚胺,10 μg/L的<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-利巴韦林混合同位素内标。

#### 1.2.2 样品前处理

将鸡肉、鸡肝等及其制品充分绞碎,均质。分出500 g作为样品,置于-20℃以下避光保存。取鸡蛋数枚,去壳,将蛋黄和蛋清充分打匀。分出500 g作为样品,置于-20℃以下避光保存。

酶解和提取:称取2 g样品于50 mL刻度离心

管中,加入混合同位素内标工作液,加入 5 mL 乙酸铵缓冲液(pH=4.8)和 40  $\mu$ L 酸性磷酸酶溶液,盖紧盖子,漩涡混匀 30 s,于 37  $^{\circ}$ C 恒温摇床中避光酶解 2 h。酶解液加 4 mL 5%三氯乙酸溶液,漩涡混匀 30 s,2  $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),移取上清液于另一 50 mL 刻度离心管中,用 5%氨水溶液调节溶液 pH 值为 8.5 $\pm$ 0.1,用水定容至 10 mL,混匀,10 000 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm),上清液过 0.45  $\mu$ m 再生纤维素(RC)微孔滤膜,得到澄清的样品提取液。

净化:PBA/PCX 固相萃取柱依次用 3 mL 乙腈、3 mL 0.5%甲酸水溶液和 3 mL 乙酸铵缓冲液(pH=8.5)活化。取 5.0 mL 样品提取液过柱,依次用 3 mL 乙酸铵缓冲液(pH=8.5)和 3 mL 水淋洗,抽干柱子。PBA/PCX 固相萃取柱先用 3 mL 0.5%甲酸水溶液洗脱于 5 mL 容量瓶,抽干柱子,用 0.5%甲酸水溶液定容至刻度,混匀,过 0.22  $\mu$ m RC 微孔滤膜,供 UPLC-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 5%氨化甲醇溶液(含 10%异丙醇)洗脱,50  $^{\circ}$ C 水浴氮吹近干,用 0.5%甲酸水溶液复溶并定容至 5 mL,混匀,过 0.22  $\mu$ m 亲水性聚四氟乙烯(PTFE)滤膜,供 UPLC-MS/MS 分析金刚烷胺类化合物。

### 1.2.3 仪器条件

色谱(利巴韦林):色谱柱:Agilent ZORBAX SB-Aq 柱(3.0 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu$ m),流动相:A 为 0.2%甲酸水溶液,B 为乙腈,柱温 40  $^{\circ}$ C,进样量 20  $\mu$ L,流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 3 利巴韦林和金刚烷胺类化合物的质谱参数

Table 3 MS conditions of ribavirin and adamantanes

目标物	保留时间/min	母离子/( $m/z$ )	子离子/( $m/z$ )	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
利巴韦林	2.39	245.0	113.1 $^*$ /96.1	18	10/30
$^{13}$ C <sub>5</sub> -利巴韦林	2.38	250.0	113.1	18	10
金刚烷胺	2.24	152.1	135.1 $^*$ /93.1	36	18/26
D <sub>15</sub> -金刚烷胺	2.17	167.2	150.2	36	18
金刚烷甲胺	3.78	166.1	149.1 $^*$ /93.0	40	18/24
金刚烷乙胺	4.63	180.2	163.1 $^*$ /81.0	34	16/22
D <sub>4</sub> -金刚烷乙胺	4.62	184.2	167.1	34	16
3,5-二甲基金刚胺	5.02	180.2	163.1 $^*$ /107.0	34	16/26
D <sub>6</sub> -3,5-二甲基金刚胺	5.08	186.2	169.1	34	16

注: $^*$ 为定量离子

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理

#### 2.1.1 样品酶解

利巴韦林的药代动力学研究<sup>[7]</sup>表明,利巴韦林经消化道后吸收迅速,进入宿主细胞被迅速磷酸化,生成具有活性的代谢产物利巴韦林单磷酸(RMP)、利巴韦林双磷酸(RDP)和利巴韦林三磷酸(RTP),因此

表 1 利巴韦林 UPLC 梯度洗脱程序

Table 1 UPLC gradient elution condition of ribavirin

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.0	0.40	100	0
2.5	0.40	100	0
3.0	0.40	95	5
4.0	0.40	10	90
5.0	0.40	10	90
5.5	0.40	100	0
6.5	0.40	100	0

色谱(金刚烷胺类化合物):色谱柱:Waters BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu$ m),流动相:A 为 0.2%甲酸水溶液,B 为甲醇,柱温 40  $^{\circ}$ C,进样量 10  $\mu$ L,流动相梯度洗脱程序见表 2。

表 2 金刚烷胺类化合物 UPLC 梯度洗脱程序

Table 2 UPLC gradient elution condition of adamantanes

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.0	0.30	70	30
5.0	0.30	45	55
5.5	0.30	10	90
7.0	0.30	10	90
7.5	0.30	70	30
9.0	0.30	70	30

质谱:电离源:电喷雾离子源,电离方式:正离子模式(ESI<sup>+</sup>),毛细管电压 3.0 kV,离子源温度 150  $^{\circ}$ C,脱溶剂气温度 500  $^{\circ}$ C,脱溶剂气流量 800 L/h,锥孔反吹气流量 50 L/h,碰撞气流量 0.15 mL/min,检测方式:多离子反应监测(MRM)。利巴韦林和金刚烷胺类化合物的保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 3。

测定禽类食品中利巴韦林时,需要对样品中磷酸化的利巴韦林进行酶解,从而得到游离态利巴韦林。本试验采用酸性磷酸酶进行酶切反应,得到利巴韦林原型,由于磷酸酶的生物活性受环境影响较大,应现配现用,并通过酸性磷酸酶活性检测试剂盒(荧光法)确定酶的活度值,以确保酶切反应效率。

#### 2.1.2 样品提取

禽类食品酶解液中含有大量蛋白、多肽等生

物活性物质,为防止这些物质堵塞固相萃取柱筛板,需要沉淀蛋白后才能通过固相萃取柱净化,本试验在各类禽类食品酶解液中,尝试加入1~5 mL的5%三氯乙酸溶液来沉淀蛋白,结果显示,当5%三氯乙酸溶液的加入量为4和5 mL时,能完全沉淀各类禽类食品酶解液中的蛋白、多肽等生物活性物质,考虑到5%三氯乙酸溶液加入量对样品提取溶液最终定容体积的影响,故选用4 mL的5%三氯乙酸溶液。

由于样品酶解液中还含有一定的脂肪,特别是鸡蛋样品的酶解液含有大量脂肪,加入三氯乙酸溶液沉淀蛋白后,需在低温(2~4 ℃)条件下,10 000 r/min离心10 min,才能得到较为理想的澄清溶液,再用5%氨水溶液调节上清液pH值为 $8.5 \pm 0.1$ ,此时样品溶液会略显浑浊,再经0.45 μm RC微孔滤膜过滤,得到澄清的样品提取液。

### 2.1.3 样品净化

使用PBA/PCX复合固相萃取柱净化是为了尽可能提高利巴韦林液质分析时离子化效率,有效降低共流出物(主要是内源性游离核苷酸)基质抑制效应。复合固相萃取柱的上层PBA填料在溶液pH值为 $8.5 \pm 0.1$ 时,可将利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺保留在PBA填料中,洗脱利巴韦林时,下层PCX填料可在酸性条件下吸附金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺、3,5-二甲基金刚胺和酶解液中内源性游离核苷酸,最后用氨化甲醇洗脱PCX填料吸附的金刚烷胺、金

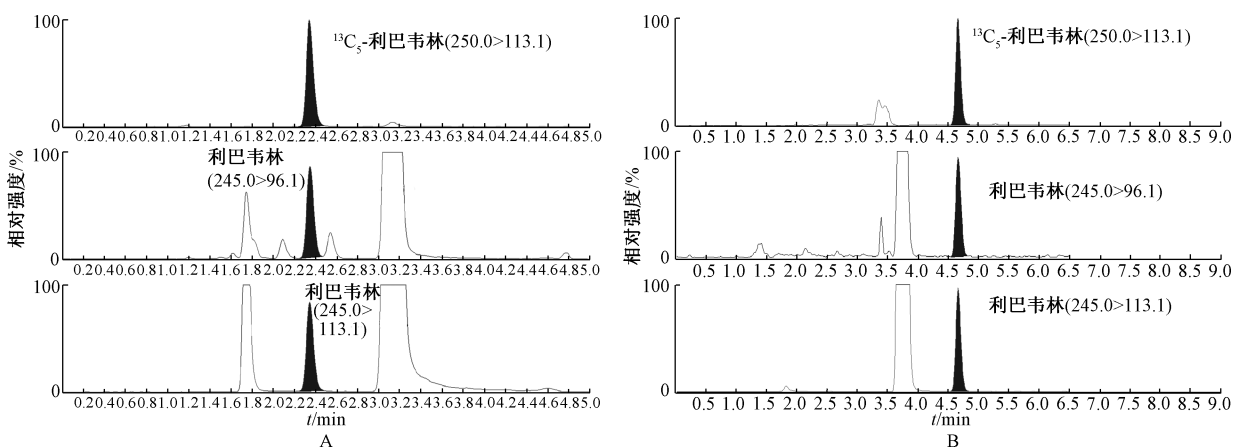
刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺,从而实现了一个固相萃取柱同时净化样品溶液中利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺。试验表明,通过PBA/PCX复合固相萃取柱净化后, $^{13}\text{C}_5$ -利巴韦林、 $\text{D}_{15}$ -金刚烷胺、 $\text{D}_4$ -金刚烷乙胺和 $\text{D}_6$ -3,5-二甲基金刚胺的绝对回收率能达到60%以上。

PBA/PCX复合固相萃取柱具有离子交换柱功能,因此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(即约3 s/滴)。试验表明,流速过快会造成样品中内标的绝对回收率偏低,从而影响检测结果的准确性。

## 2.2 色谱条件的优化

### 2.2.1 利巴韦林色谱条件优化

由于利巴韦林含有羟基和酰胺基,为极性很强的化合物,色谱分析时应采用极性化合物分离色谱柱,Agilent ZORBAX SB-Aq和Acquity UPLC® HSS T3色谱柱都能够实现在100%水相的条件下保留极性化合物。通过试验优化,确定了Agilent ZORBAX SB-Aq色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)和Acquity UPLC® HSS T3色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm),能够实现干扰峰与待测组分的完全基线分离,从而满足痕量利巴韦林的定性定量分析,见图1。SB-Aq色谱柱相对于HSS T3色谱柱的柱压更低,且利巴韦林色谱峰与杂质峰分离度更好,故本试验最终采用Agilent ZORBAX SB-Aq色谱柱分析利巴韦林。



注:A为Agilent ZORBAX SB-Aq色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm);B为Acquity UPLC® HSS T3色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm)

图1 空白鸡肉样品加标利巴韦林色谱图

Figure 1 Chromatograms of blank chicken spiked ribavirin

由于利巴韦林对钠离子的亲和作用强于氢离子,因此当质谱分析中 $[\text{Ribavirin}+\text{H}]^+$ 峰(准分子离子峰)相对较小的情况下,也可以使用 $[\text{Ribavirin}+\text{Na}]^+$ 峰为母离子进行检测,为保证 $[\text{Ribavirin}+\text{Na}]^+$ 峰的稳定性,流动相的水相改为乙酸钠溶液

(0.1 mmol/L, 含0.2%甲酸),即可满足质谱 $[\text{Ribavirin}+\text{Na}]^+$ 峰的稳定性。 $[\text{Ribavirin}+\text{H}]^+$ 峰为母离子时,两个碎片离子 $m/z$ 为113.1和96.1相对丰度比较小(约为4:1),而 $[\text{Ribavirin}+\text{Na}]^+$ 峰为母离子时,两个碎片离子 $m/z$ 为135.1和155.1

相对丰度比较大(约为 20:1),不利于低含量样品的定性定量分析;因此实验室应尽可能使用[ Ribavirin +H]<sup>+</sup>峰(准分子离子峰)进行质谱分析。

### 2.2.2 金刚烷胺类化合物色谱条件优化

分析金刚烷胺类化合物时,由于金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺互为同分异构体,在质谱分析上

存在母离子和主要子离子完全一样,必须在 UPLC 上将其完全基线分离才能进行检测。本试验采用 Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱,经过优化梯度洗脱程序,UPLC 上金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺完全基线分离,实现了一个方法同时检测金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺。金刚烷胺类化合物色谱图见图 2。

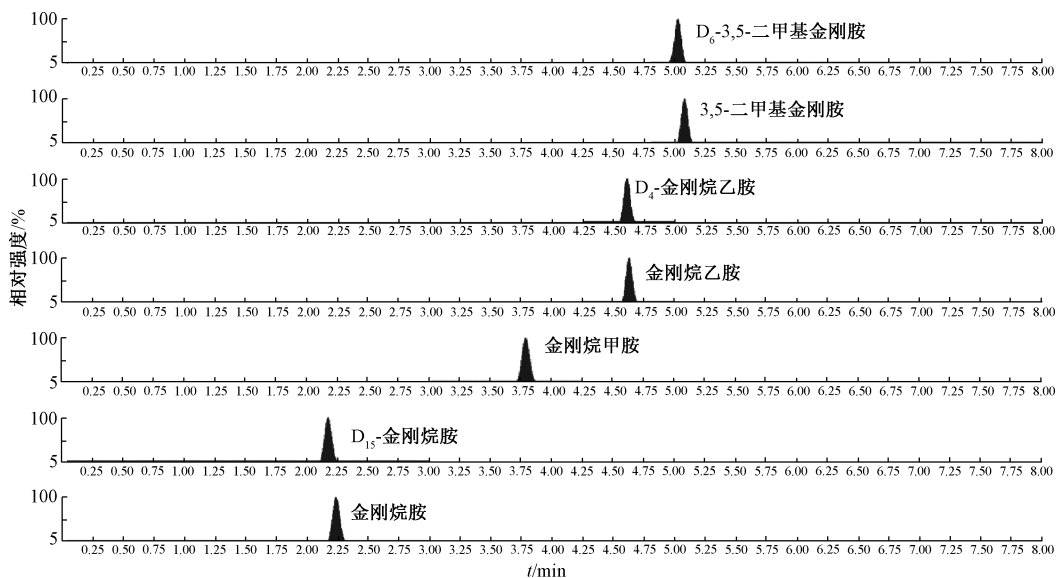


图 2 金刚烷胺类化合物及其同位素内标色谱图(Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱)

Figure 2 Chromatograms of adamantanes and internal standards (Waters BEH C<sub>18</sub> column)

## 2.3 方法验证

### 2.3.1 线性范围、检出限、定量限

将标准曲线系列溶液和样品溶液注入 UPLC-MS/MS 仪,得到利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺的色谱图和峰面积。分别以利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺的浓度为横坐标,以利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺的峰面积与各自内标的峰面积比值为纵坐标,绘制利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺标

准曲线。由于缺乏金刚烷甲胺的同位素内标,加标回收试验显示,基质样品中金刚烷甲胺的回收率和金刚烷乙胺十分接近,因此,以金刚烷甲胺的浓度为横坐标,以金刚烷甲胺的峰面积与 D<sub>4</sub>-金刚烷乙胺的峰面积比值为纵坐标,绘制金刚烷甲胺标准曲线。结果表明,利巴韦林在 1.0~100 ng/mL,金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和 3,5-二甲基金刚胺在 0.2~20 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,相关系数(*r*)均为 0.999。线性方程、相关系数、检出限(LOD)和定量限(LOQ)见表 4。

表 4 利巴韦林和金刚烷胺类化合物的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 Standard curve, correlation coefficient, LODs and LOQs for ribavirin and adamantanes

目标物	线性方程	相关系数 <i>r</i>	LOD/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
利巴韦林	$y=0.109357x+0.005625$	0.999	0.5	1.5
金刚烷胺	$y=0.390343x+0.011622$	0.999	0.1	0.3
金刚烷甲胺	$y=0.516629x+0.002189$	0.999	0.1	0.3
金刚烷乙胺	$y=0.633760x+0.006028$	0.999	0.1	0.3
3,5-二甲基金刚胺	$y=0.734388x+0.000593$	0.999	0.1	0.3

### 2.3.2 回收率和精密度

分别准确称取 9 份不含待测物的鸡肉和鸡蛋样品进行添加回收率和精密度试验,利巴韦林添加的浓度分别为 1.5、3.0、15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,金刚烷胺类化合物添加的浓度分别为 0.3、0.6、3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,每个浓度水

平做 3 个平行试验,结果见表 5。从表中可以得出,利巴韦林的回收率为 91.4%~103.7%,金刚烷胺类化合物的回收率为 94.3%~108.2%,3 次平行试验测定结果的相对标准偏差(*RSD*)在 2.7%~5.8%之间,小于 10%,因此该方法的回收率、精密度和准确

表5 鸡肉和鸡蛋中利巴韦林和金刚烷胺类化合物  
加标回收率和精密度( $n=3$ )

Table 5 Recoveries and relative standard deviation of  
ribavirin and adamantanes in chicken and egg

样品类别	目标物	添加量 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收 率/%	RSD /%
鸡肉	利巴韦林	1.5	91.4	5.8
		3.0	96.3	5.1
		15	101.7	4.5
	金刚烷胺	0.3	95.8	4.1
		0.6	103.6	3.8
		3.0	101.3	2.8
	金刚烷甲胺	0.3	108.2	4.6
		0.6	97.3	4.1
		3.0	103.9	2.9
		0.3	94.3	4.5
		0.6	98.3	3.3
		3.0	102.6	2.7
	3,5-二甲基金刚胺	0.3	95.1	4.9
		0.6	98.4	3.6
		3.0	100.8	3.2
利巴韦林	1.5	92.9	4.8	
	3.0	98.4	4.1	
	15	103.7	4.4	
	0.3	97.1	3.8	
	0.6	101.5	3.2	
	3.0	99.8	2.9	
金刚烷胺	0.3	98.7	4.7	
	0.6	104.2	4.3	
	3.0	101.3	3.8	
	0.3	96.3	4.5	
	0.6	97.5	3.8	
	3.0	102.4	3.5	
金刚烷乙胺	0.3	98.2	3.9	
	0.6	101.6	3.4	
	3.0	102.3	3.3	

度良好,适用于禽类食品中利巴韦林和金刚烷胺类化合物残留的测定。

#### 2.4 实际样品测定

应用本试验建立的检测方法对市场采集的80份鸡肉和80份鸡蛋进行测定。结果显示,鸡肉中利巴韦林检出率为1.3%(1/80),金刚烷胺检出率为17.5%(14/80),金刚烷乙胺检出率为5.0%(4/80),其他化合物均未检出;鸡蛋中金刚烷胺检出率为8.8%(7/80),金刚烷乙胺检出率为2.5%(2/80),其他化合物均未检出;因此,在禽类养殖环节还存在利巴韦林和金刚烷胺类化合物的非法添加。

#### 3 小结

本试验采用酸性磷酸酶酶解样品,三氯乙酸沉淀蛋白,PBA/PCX复合固相萃取柱净化,同位素内标法定量,建立了一种快速测定禽类食品中利巴韦

林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺的检测方法。该方法可一次性提取利巴韦林和金刚烷胺类化合物,操作简单快速,解决了利巴韦林分析干扰问题,同时使用同位素内标法进行定量,结果准确可靠。该方法适用于大批量禽类食品中利巴韦林、金刚烷胺、金刚烷甲胺、金刚烷乙胺和3,5-二甲基金刚胺的快速检测。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 牛亚慧,石磊,兰作平,等. 金刚烷胺类衍生物的研究进展[J]. 科学咨询(科技·管理),2016(40):59-60.
- [3] ANTOINE S, FRANCOISE P. Gas chromatographic determination of amantadine hydrochloride (symmetrel) in human plasma and urine[J]. J Chromatogr B: Biomed Sci and Appl, 1980,183(1):33-39.
- [4] 李士敏,王玮. 液相色谱-质谱联用法测定大鼠中盐酸金刚烷胺浓度及体内药动学研究[J]. 药物分析杂志,2007,37(1):66-68.
- [5] WILLS R J, FAROLINO D A, CHOMA N, et al. Rimantadine pharmacokinetics after single and multiple doses[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987,31(5):826-828.
- [6] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第560号[EB/OL]. (2005-11-01)[2019-10-20]. [http://www.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/2005/t20051117\\_496523.htm](http://www.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/2005/t20051117_496523.htm).
- [7] U. S. FDA prohibits use of antiviral drugs in poultry to help keep drugs effective for humans[EB/OL]. (2009-06-18)[2019-10-20]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108620.htm>.
- [8] PAGE T, CONNOR J D. The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells[J]. Int J Biochem, 1990,22(4):379-383.
- [9] YEH L T, NGUYEN M, LOURENCO D, et al. A sensitive and specific method for the determination of total ribavirin in monkey liver by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005,38(1):34-40.
- [10] 祝伟霞,杨冀州,袁萍,等. 超高效亲水色谱-串联质谱法快速检测鸡肉及其制品中的利巴韦林及其代谢物的总残留量[J]. 色谱,2013,31(10):934-938.
- [11] 邵琳智,姚仰勋,谢敏玲,等. 亲水相互作用色谱-串联质谱法同时测定动物组织中金刚烷胺与利巴韦林[J]. 分析测试学报,2013,32(12):1448-1452.
- [12] 吴银良,赵健,叶宇飞,等. 同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺类药物残留量[J]. 分析测试学报,2014,33(8):905-910.
- [13] 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):226-232.