

Thermo

SCIENTIFIC 赛默飞世尔科技

高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中利巴韦林的含量

朱克卫¹ 程明川² 徐牛生² 柯振华² 江 峥²

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广州, 510730; 2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海, 201206)

利巴韦林为合成的核苷类广谱抗病毒药,可用于病毒性感冒、肺炎、肝炎、出血热等病症的治疗.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利巴韦林、金刚烷胺等抗病毒药物.违禁抗病毒药物的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.美国食品药品监督管理局(FDA)早于 2005 年就禁止将人类抗病毒药物用于畜禽类;我国农业部公告第 560 号中也明确规定抗病毒药物为禁用兽药.

利巴韦林的检测方法有放射免疫法、紫外分光光度法、气相色谱-质谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱法等,其中液相色谱-串联质谱法以高灵敏度和高选择性,既可用于残留的确证分析,又能作为通用的高效能测定方法,得到了越来越广泛的应用.目前,我国尚无动物源食品中利巴韦林检测的国家标准.

本文采用液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中利巴韦林的残留量,方法简单,灵敏度高,抗干扰能力强,为利巴韦林药物的监控提供了技术支持.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

利巴韦林标准品,纯度 100.0%,中国药品生物制品检定所;¹³C₅-利巴韦林,纯度,98%,加拿大 TRC 公司;甲酸、甲酸铵、甲醇、乙腈为色谱纯;水为自制超纯水.标准品用甲醇溶解并配制 1.0 mg·mL⁻¹ 标准储备液,再根据需要稀释成适当浓度的标准工作液.

TSQ Vantage 三重四极杆串联质谱仪(赛默飞世尔科技公司),配置有电喷雾电离源(HESI-II);Dionex Ultimate 3000 RSLC 超高效液相色谱.

1.2 试样的制备

称取均质匀浆后的鸡肉样品 2 g,加入内标溶液 10 μL(25 ng),再加入 10 mL 乙腈/0.1% 甲酸水溶液(7:3),涡旋混匀,超声提取 10 min.离心后,取 3 mL 上清进行固相萃取(HyperSep HyperCarb 固相萃取柱,200 mg/3 mL).

固相萃取步骤:活化:5 mL 甲醇,5 mL 水,负压过柱;上样:3 mL 上清液,1 mL·min⁻¹ 速率过柱;淋洗:3 mL 水;洗脱:3 mL 甲醇:乙腈(4:6),1 mL·min⁻¹ 速率洗脱;收集洗脱液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,供上机测定分析.

1.3 实验条件

液相条件 色谱柱:Thermo Hypersil Gold Amino,100×2.1 mm,3 μm;梯度洗脱程序见表 1,进样量 5 μL,流速 300 μL·min⁻¹.

表 1 梯度洗脱表

时间/min	0.00	2.00	5.00	8.00	8.10	10.00
水(0.1% 甲酸+5 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵)/%	10	10	70	70	10	10
乙腈/%	90	90	30	30	90	90

质谱条件 电喷雾电离源(HESI-II),正离子模式;选择反应监控(SRM)扫描,喷雾电压:3300 V;雾化温度 330 ℃,离子传输管温度:330 ℃;氮气作为鞘气和辅助气,其中鞘气为 40 arb,辅助气为 5 arb,氩气用作碰撞气,碰撞压力为 1.5 mTorr;选择反应监测(SRM),离子对信息见表 2.

2 结果与讨论

2.1 特异性和方法检出限(MDL)

本试验的检测条件下,利巴韦林及其同位素内标均在 2.3 min 左右出峰,峰形良好,无杂质峰干扰测定,基线平稳.

本方法具有较高的特异性,能准确测定鸡肉中利巴韦林的浓度,灵敏度较高.

表 2 离子对信息表

化合物	母离子	子离子	碰撞能量(CE)/eV	S-lens 电压/V
利巴韦林 (Ribavirin)	245.203	96.100	25	59
		113.100* (* 定量离子)	9	59
¹³ C ₅ -利巴韦林 (Ribavirin IS)	250.189	96.10	28	57
		113.100	6	57

取利巴韦林标及其同位素内标标准溶液加入到空白基质中,使鸡肉基质中利巴韦林含量约为 0.1 μg·kg⁻¹,按“试样的制备”项下操作,记录色谱图,得到利巴韦林基质前加标的最低检出限,S/N=9,结果图 1.

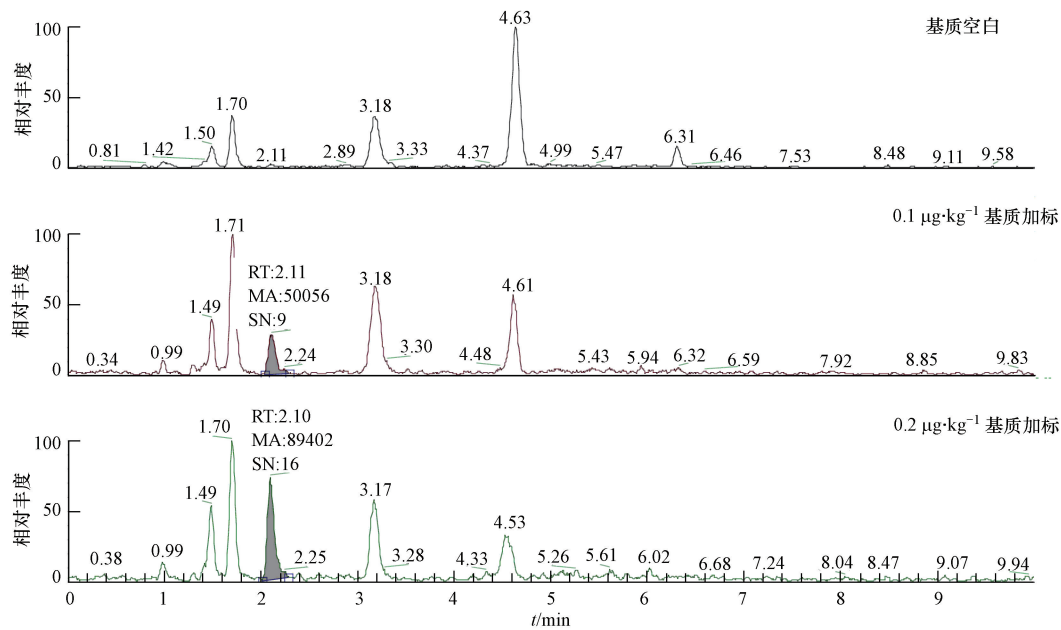


图 1 方法检出限色谱图

2.2 线性范围

以定量离子 m/z 245. 0> 113. 0 与内标校正离子 m/z 250. 0> 113. 0 峰面积之比 y 为纵坐标, 利巴韦林浓度 x ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 得到鸡肉中添加利巴韦林的标准曲线, 方程为: $y = -0.03999 + 0.1358x$, $R^2 = 0.9921$. 在 0.5—20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好($n=6, 3$ 次平行).

2.3 定性实验

在相同试验条件下, 样品中与利巴韦林标准物质的保留时间一致, 且监测离子相对于基峰的丰度比符合离子相对丰度的允许偏差的要求, 可判定该试料中存在利巴韦林残留. 试样离子相对丰度的允许偏差范围: 相对丰度>50%, 允许相对偏差±20%; 相对丰度在 20%—50%, 允许相对偏差±25%; 相对丰度在 10%—20%, 允许相对偏差±30%; 相对丰度≤10%, 允许相对偏差±50%.

2.4 回收率实验

在相同实验条件下, 采用基质加标的方法, 在鸡肉空白样品中分别添加了 1.0 μg·kg⁻¹ 和 5.0 μg·kg⁻¹ 的标准品, 进行回收率实验. 检测结果表明, 利巴韦林残留的回收率为 85.3% 和 90.9%, 方法的回收率满足相关法规要求.

3 结论

利巴韦林为强极性化合物, 常规色谱柱保留差, 易受到基质的干扰, 本文采用氨基柱进行色谱分离, 可获得良好的效果. 采用 HyperSep Hypercarb 进行样品的净化, 方法简单, 能有效去除杂质干扰, 与现有方法相比, 避免了反复调节 pH 的步骤. 由于用 LC-MS/MS 测定利巴韦林时有较强的基质效应出现, 单独采用外标法定量的结果准确度较低, 本实验采取同位素内标校正, 有效去除了基质效应的影响, 能够较准确用于定量.

关键词: 利巴韦林, 鸡肉, 高效液相色谱-串联质谱.