

通过式固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定禽肉中利巴韦林的残留量

魏莉莉, 程志, 卢兰香, 丁一, 武传香, 胡梅, 薛霞*, 刘艳明*

(山东省食品药品检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(肉及肉制品监管技术), 山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 山东济南 250101)

摘要: 建立了通过式固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定禽肉中利巴韦林残留量的方法。样品在 37 °C 经酸性磷酸酯酶酶解, 乙腈提取, EMR-Lipid 固相萃取柱净化, 以乙腈和 0.1% 甲酸水 (含 5 mmol/L 甲酸铵) 为流动相, 经过 BEH Z-HILIC 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 经串联质谱仪, 在电喷雾正离子模式下以多反应监测 (MRM) 模式测定, 同位素内标法定量。对前处理条件、液相条件和质谱参数进行了系统的考察。该方法在 0.05~5 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 定量限 (LOQ) 为 2.0 μg/kg。在 2.0、4.0、20 μg/kg 添加水平下, 回收率为 94.5%~112.0%, 相对标准偏差 ($n=6$) 为 1.4%~3.2%。该方法相比标准方法前处理简单、快速, 适用于禽肉中利巴韦林残留的批量分析。

关键词: 通过式固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法; 利巴韦林; 禽肉

文章编号: 1673-9078(2023)07-312-319

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0860

Rapid Determination of Ribavirin Residue in Poultry Meat through Purification by Solid-phase Extraction and Analysis by Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

WEI Lili, CHENG Zhi, LU Lanxiang, DING Yi, WU Chuanxiang, HU Mei, XUE Xia*, LIU Yanming*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Supervising Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Ji'nan 250101, China)

Abstract: A rapid analysis method was established for determining the ribavirin residue in poultry meat through purification by solid-phase extraction and analysis by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. After enzymatic hydrolysis with acid phosphatase at 37 °C, the samples were extracted with acetonitrile and purified with an EMR-Lipid solid phase extraction column to remove liposoluble substances. The purified sample solution was subjected to separation using a BEH Z-HILIC column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) and a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% aqueous formic acid solution (containing 5 mmol/L ammonium formate) for analysis by tandem mass spectrometer in positive electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring (MRM). An isotope-labeled internal

引文格式:

魏莉莉,程志,卢兰香,等.通过式固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定禽肉中利巴韦林的残留量[J].现代食品科技, 2023,39(7):312-319.

WEI Lili, CHENG Zhi, LU Lanxiang, et al. Rapid determination of ribavirin residue in poultry meat through purification by solid-phase extraction and analysis by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 312-319.

收稿日期: 2022-07-09

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目 (2022MK072)

作者简介: 魏莉莉 (1985-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: weilili1224@126.com

通讯作者: 薛霞 (1979-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: xuexia9549@163.com; 共同通讯作者: 刘艳明 (1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: msymliu@163.com

standard method was used for quantitative analysis. The pretreat conditions, HPLC conditions and mass spectrometry parameters were systematically investigated. This method showed good linearity in the range of 0.05~5 $\mu\text{g/L}$ with the limit of quantification (LOQ) being 2.0 $\mu\text{g/kg}$. When the spiking levels were 2.0, 4.0 and 20.0 $\mu\text{g/kg}$, the recoveries of ribavirin were in the range of 94.5%~112.0% with the relative standard deviations ($n=6$) being 1.4%~3.2%. Compared with the standard method, this method is simple and rapid, thus suitable for batch analysis of ribavirin residue in poultry meat.

Key words: pass-through solid phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ribavirin; poultry meat

利巴韦林 (Ribavirin) 又名病毒唑, 具有广谱抗病毒活性, 对多种 DNA 和 RNA 病毒都有抑制作用, 在医学上被广泛用于流感病毒、麻疹病毒、甲型肝炎、乙型肝炎、腺病毒等的治疗^[1,2]。该类药物易产生耐药性, 对人体产生的最突出的安全性问题是溶血性贫血^[3]。在养殖行业, 为了促进禽类快速生长, 降低养殖风险, 滥用抗生素的现象时有发生。养殖过程中违规使用人用抗病毒药物, 一方面会造成耐药性的产生, 给动物疫病控制带来不良后果, 另一方面会导致药物残留, 并通过食物链对人体健康产生危害。我国农业部第 560 号公告 (2005 年) 明令禁止利巴韦林等抗病毒药物在动物养殖过程中使用。

目前, 利巴韦林的检测方法主要有免疫分析法^[4]、分光光度法^[5-7]、高效液相色谱法^[8-13]、高效液相色谱-串联质谱法^[14-24]等。前三种方法易受基质干扰, 常用于兽药及制剂中利巴韦林含量的检测。液相色谱-串联质谱法精准度高, 选择性好, 已经成为检测动物基体中利巴韦林残留量的重要方法。动物源性食品基质复杂, 含有大量的蛋白、脂肪, 提取净化过程极易对利巴韦林造成基质干扰; 另外, 利巴韦林为强极性化合物, 结构与核苷类似, 易受到基体中内源性核苷的干扰, 给检测带来了一定的困难。现有标准^[25]及文献^[15,16,22,23]多采用苯硼酸固相萃取小柱进行净化, 但该方法操作繁琐。

本研究中, 利巴韦林经磷酸酯酶酶解, 乙腈提取, EMR-Lipid 固相萃取柱净化后, 采用 BEH Z-HILIC 亲水色谱柱分离, 三重四级串联质谱仪检测。该方法相比标准方法快速简单, 相比 QuEChERS 方法基质效应小。本方法的回收率、线性曲线、精密度等均满足 GB/T 27404-2008 规定的检验方法确认技术要求, 可为禽肉中利巴韦林的检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

利巴韦林 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, CAS 号: 36791-04-5, 纯度 99.34%) 标准品, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司; $^{13}\text{C}_5$ -

利巴韦林 ($^{13}\text{C}_5\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, CAS 号: 1646818-35-0, 纯度 99.4%) 标准品, 北京曼哈格公司; 甲醇 (CH_3OH)、乙腈 (CH_3CN) (色谱纯), 德国 Merck 公司; 甲酸铵 (HCOONH_4)、甲酸 (HCOOH) (色谱纯), 美国 Fluka 公司; 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)、乙酸 (CH_3COOH)、硫酸镁 (MgSO_4)、氯化钠 (NaCl) (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 酸性磷酸酯酶 (Wheat Germ, 活力: ≥ 0.4 unit/mg, CAS 号: 9001-77-8), 美国 Sigma-Aldrich 公司; Captive EMR-Lipid (3 mL/300 mg), 美国 Agilent 公司; 色谱柱 BEH Z-HILIC (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 美国 Waters 公司; 实验用样品购自济南市当地超市。

LCMS-8050 液相色谱质谱联用仪, 日本 Shimadzu 公司; MS3 型旋涡混合器, 德国 IKA 公司; 台式高速离心机, 德国 Sigma 公司; 超声波清洗仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 固相萃取装置, 美国 Supelco 公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; BT 125D 电子天平, 德国 Sartorius 公司。

1.2 溶液的配制

标准储备溶液配制: 称取利巴韦林、 $^{13}\text{C}_5$ -利巴韦林标准品 10 mg, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成 100 mg/L 的标准储备液。

标准工作溶液配制: 分别量取利巴韦林、 $^{13}\text{C}_5$ -利巴韦林标准溶液适量, 用乙腈配制成含 $^{13}\text{C}_5$ -利巴韦林 2 $\mu\text{g/L}$, 含利巴韦林分别为 0.05、0.10、0.25、0.50、2.00、5.00 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。

酸性磷酸酯酶溶液 (100 mg/L): 称取酸性磷酸酯酶 5 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀。

0.2 mol/L 乙酸铵溶液 (pH 值 4.8): 称取乙酸铵 15.4 g, 加 900 mL 水溶解, 用乙酸调 pH 值至 4.8 ± 0.1 , 加水定容至 1 000 mL。

1.3 样品前处理

称取 2 g 粉碎后的样品于 50 mL 离心管中, 加入

1 mg/L ¹³C₅-利巴韦林标准溶液 40 μL, 加入 3 mL 0.2 mol/L 乙酸铵溶液 (pH 值 4.8), 涡旋 2 min, 加入 100 μL 酸性磷酸酯酶溶液, 涡旋 1 min, 于恒温干燥箱中 37 °C 培养 2 h。取出后, 加入 17 mL 乙腈, 涡旋 3 min, 再加入 5 g 无水硫酸镁, 立即涡旋混合 1 min, 于 8 000 r/min 离心 3 min, 上清液待净化。

取上清液 3 mL, 注入 Captive EMR-Lipid 固相萃取柱中, 以小于等于 1.5 mL/min 的流速通过, 收集样品净化液于 15 mL 离心管中, 涡旋混匀后, 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 待测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Atlantis Premier BEH Z-HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μL; 流动相: A 相为乙腈, B 相为 0.1% 甲酸 (V/V, 含 5 mmol/L 甲酸铵) 溶液; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 90% A~80% A, 2.0~5.0 min, 80% A~60% A, 5.0~7.0 min, 60% A, 7.0~7.1 min, 60% A~90% A, 7.1~11.0 min, 90% A。

1.4.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI 源); MRM; 正离子模式扫描; 雾化气 (氮气) 流量: 3 L/min; 加热气 (空气) 流量: 10 L/min; 接口温度: 300 °C; 脱溶剂管温度: 250 °C; 加热块温度: 400 °C; 干燥气 (氮气) 流量: 10 L/min。利巴韦林、¹³C₅-利巴韦林的母离子、子离子、驻留时间等质谱参数见表 1。

表 1 利巴韦林及 ¹³C₅-利巴韦林质谱参数

Table 1 MS/MS parameters of ribavirin and ¹³C₅-ribavirin

目标物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/ms	Q1 预四极偏置电压/V	碰撞电压/eV	Q3 预四极偏置电压/V
利巴韦林	245.3	96.0	50	11	28	15
		113.0*	50	11	8	21
¹³ C ₅ -利巴韦林	250.3	113.0*	50	11	8	21

注: *为定量离子对。

1.5 基质效应评价

向试剂及样品处理液中添加同水平的同位素内标, 通过液相色谱-串联质谱仪测定二者的峰面积响应值, 评价基质效应 (ME) [26]。基质效应计算公式为:

$$ME = \left(\frac{R_1}{R_0} - 1 \right) \times 100\%.$$

式中:

ME——基质效应;

R₁——样品处理液中内标物的响应值;

R₀——试剂处理液中内标物的响应值。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

利巴韦林结构含有氨基及多个羟基, 极性很强且易结合质子, 因此选择正离子模式电喷雾离子源。将 0.1 mg/L 的利巴韦林标准溶液注入液相色谱质谱联用仪, 在母离子全扫描模式下, 获得化合物的分子离子峰[M+H]⁺为 245、[M+Na]⁺为 267, 选择强度高、稳定性好的[M+H]⁺为母离子; 在产物离子扫描模式下, 以 m/z 245 为母离子, 施加碰撞能, 进行二级质谱扫描, 获得 m/z 113 和 m/z 96 的碎片离子; 在多反应监测模式下, 进一步优化碰撞能、偏置电压等质谱参数, 以

获得高的灵敏度, 优化后的质谱条件见表 1。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

利巴韦林结构中的极性基团虽然有助于电离, 但缺乏在反相色谱柱上的色谱保留。另外, 根据文献报道[22], 动物源性的基体中都有一种与利巴韦林结构相似的物质 (尿苷) 影响利巴韦林的分离, 现有研究方法无法将该物质去除, 因此通过选择合适的色谱柱使利巴韦林与杂质有效分离是至关重要的。

本研究考察了反相 ACQUITY HSS T3 色谱柱和不同固定相键合的亲水作用色谱柱 (ACQUITY BEH HILIC、Atlantis Premier BEH Z-HILIC、Acchrom XAmide) 对利巴韦林的保留及分离效果, 结果见图 1。HSS T3 是在 C₁₈ 键合相基础上又增加了极性基团修饰, 可以兼容 100% 纯水相作为流动相, 但高比例的水相不利于电喷雾质谱的电离与挥发, 会降低分析物的离子化效率, 导致方法灵敏度太低无法满足检测需求。BEH HILIC 色谱柱表面裸露的硅醇基与利巴韦林之间存在较强的氢键作用导致峰形较宽且拖尾。BEH Z-HILIC 色谱柱相比 XAmide 色谱柱能将利巴韦林与内源性化合物更好分离, 且响应值较高, 因此, 选择了两性离子基团的 BEH Z-HILIC 色谱柱作为分离柱。

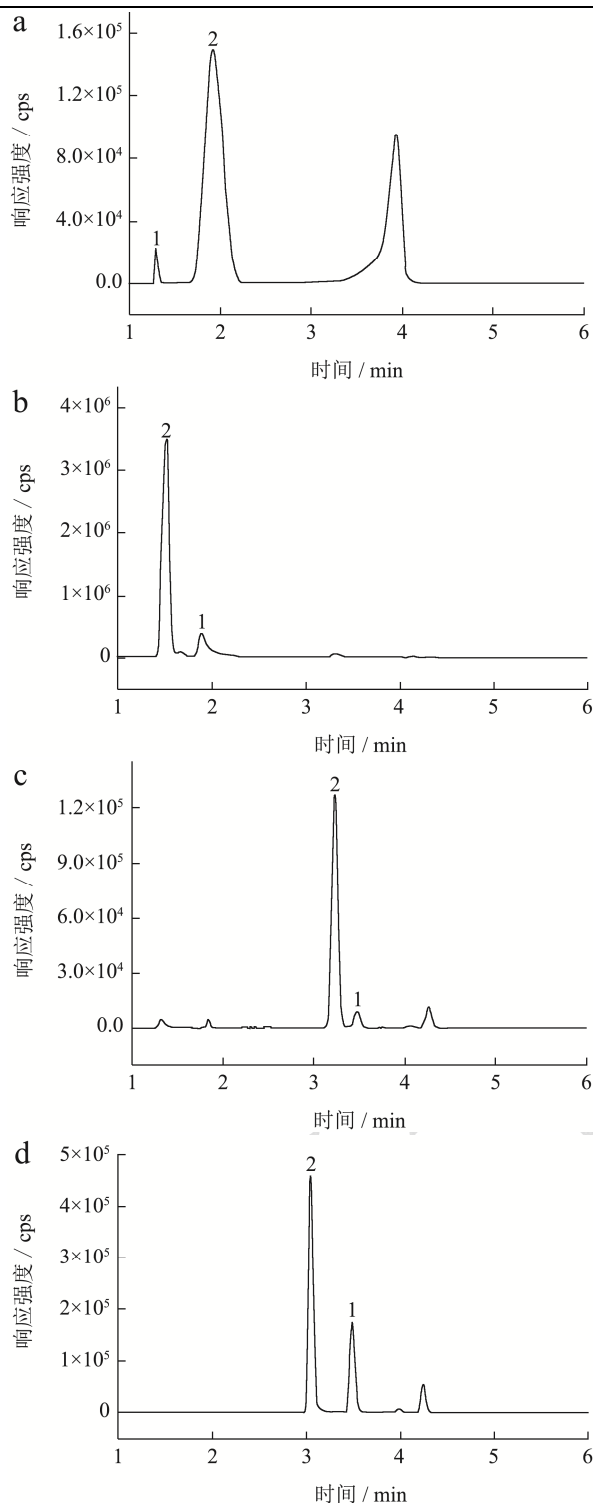


图1 利巴韦林(1)以及杂质(2)在不同色谱柱的分离情况

Fig.1 Chromatograms for the ribavirin and impurity on different column

注: a 为 HSS T3 色谱柱, b 为 BEH HILIC 色谱柱, c 为 Xamide 色谱柱, d 为 BEH Z-HILIC 色谱柱。

2.2.2 流动相的选择

利巴韦林在正离子模式下易电离,流动相中加入甲酸能够提高利巴韦林的信号响应强度。本研究比较了乙腈-0.05%甲酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.2%甲酸、

乙腈-0.1%甲酸(含 5 mmol/L 甲酸铵)、乙腈-0.1%甲酸(含 10 mmol/L 甲酸铵)等不同流动相种类。实验表明,随着甲酸浓度的增加,利巴韦林的保留时间不变,但响应值逐渐增强,当甲酸的浓度为 0.2%时,样品中利巴韦林与杂质无法完全分离,所以选择乙腈-0.1%甲酸水为流动相。当在流动相中加入 5 mmol/L 甲酸铵后,内源性干扰物的响应降低,利巴韦林的响应增强,之后再增加甲酸铵的浓度,响应值变化不大。综合考虑选择乙腈-0.1%甲酸(含 5 mmol/L 甲酸铵)为流动相。

2.3 样品前处理的选择

2.3.1 酶解条件的选择

利巴韦林在动物体内主要以原药、单磷酸酯、二磷酸酯和三磷酸酯等形式存在^[27,28],需对磷酸酯化的利巴韦林进行酶解,才能测定试样中总利巴韦林含量。同时,也有文献^[19,29]比较了酶解和不酶解的区别,得出酶解后的测定值明显高于不酶解的测定值。本文采用标准^[25]中酶解的方法,即在 pH 值 4.8 条件下 37 ℃ 酶解 2 h。

2.3.2 提取溶剂的选择

利巴韦林属于强极性化合物,常用的提取溶剂主要有三氯乙酸水溶液、乙腈、甲醇等。本实验比较了 5%三氯乙酸水溶液(pH 值 4.8)、乙腈、0.1%甲酸-乙腈、甲醇 4 种提取溶剂的提取效率。向阴性鸡肉样品中添加 25 μg/kg 的利巴韦林标准物质,比较提取效率。结果表明,四种提取溶剂对利巴韦林的回收率均能达到 80%以上,但是 5%(V/V)三氯乙酸水溶液(pH 值 4.8)和甲醇提取后的基质效应明显高于乙腈和 0.1%甲酸-乙腈,分析原因可能是甲醇、5%三氯乙酸水溶液为亲水性提取溶剂,水溶性共提取物较多,增加了基质效应的影响。此外,由于酶解液为缓冲液,提取液中加入 0.1%甲酸后,提取效果无明显变化,因此采用乙腈为提取剂。

2.3.3 净化方式的选择

为降低基质干扰,获得高灵敏度的方法,需要对样品进行净化。盐析是去除杂质的一种重要手段,常用的盐析剂主要有无水硫酸镁和氯化钠。无水硫酸镁可以吸附体系中的水分,促使分析物向有机相中转移;氯化钠可促使水相和有机相两相分离,实现分析物的液-液分配。本实验考察了两种盐析剂对利巴韦林回收率的影响,实验发现无水硫酸镁作为盐析剂时利巴韦林的回收率为 75.2%,氯化钠作为盐析剂时利巴韦林的回收率仅为 8.4%,这归因于利巴韦林具有很强的亲水性,无法通过液-液分配到达乙腈层,因此本方法选

择无水硫酸镁作为盐析剂。

在盐析的基础上,进一步对净化方式进行了考察。分别比较了基质分散固相萃取(C_{18} 、PSA、 NH_2)、通过式固相萃取(PRiME HLB、EMR-Lipid)、稀释等的净化效果,实验条件如下:

(1) 基质分散固相萃取:分别取 3 mL 盐析后的溶液于 15 mL 离心管中,分别加入 100 mg 吸附剂(C_{18} 、PSA、 NH_2),涡旋混匀 3 min,离心后过 0.22 μm 滤膜。

(2) 通过式固相萃取:分别取 3 mL 盐析后的溶液,注入通过式固相萃取柱(PRiME HLB、EMR-Lipid)中,收集样品净化液于 15 mL 离心管中,涡旋混匀后,过 0.22 μm 滤膜。

(3) 稀释:取 1 mL 盐析后的溶液加 1 mL 乙腈,涡旋混匀后,过 0.22 μm 滤膜。

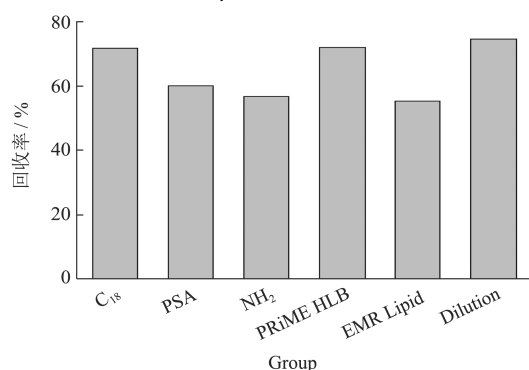


图2 不同净化方式的回收率

Fig.2 Recovery of ribavirin by different purification methods

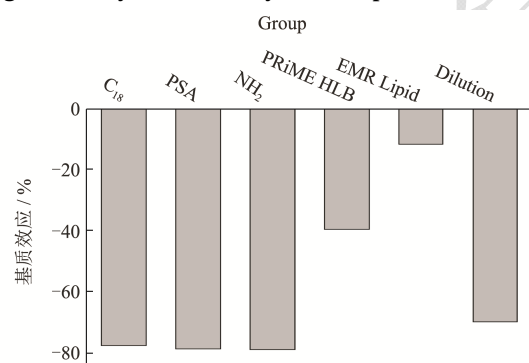


图3 不同净化方式的基质效应

Fig.3 Matrix effects of ribavirin by different purification methods

实验表明(图2),用乙腈直接稀释样品后回收率基本无变化;经过基质分散固相萃取后,分析物有不同程度的损失,且极性分散剂(PSA, NH_2)对目标物的吸附明显大于非极性吸附剂(C_{18});通过式固相萃取虽然对目标物也有一定的吸附,但基质效应明显低于直接稀释和基质分散固相萃取,且 EMR-Lipid 相比 PRiME HLB 净化效果更好(图3),响应值更高,

综合考虑选用 EMR-Lipid 为净化柱。

2.3.4 上样体积的选择

对于通过式固相萃取上样的过程,也是分析物保留和洗脱的过程,上样体积小可能造成回收率低,上样体积大可能会影响净化效果。本方法比较了不同的上样体积,并从基质效应、回收率和响应等方面进行评价,结果如图4和图5所示。图4表明,随着上样体积的增大,基质效应逐渐增强,这归因于上样体积越大,净化效果越差;图5表明,随着上样体积的增大,回收率逐渐增大,但由于基质抑制的作用,响应强度逐渐减弱,当上样体积为 3 mL 时,响应强度最大,因此,选择上样体积为 3 mL。

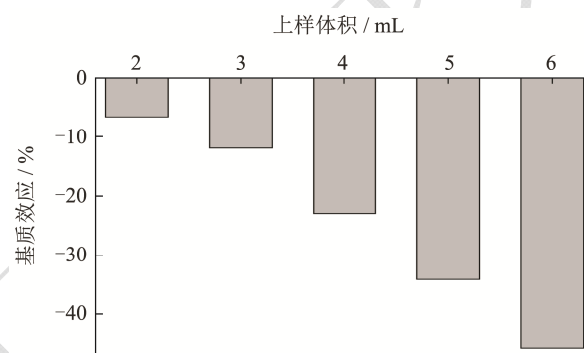


图4 不同上样体积的基质效应

Fig.4 Matrix effects of ribavirin with different loading volume

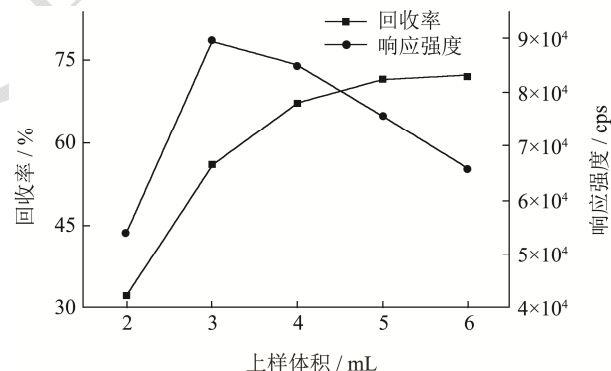


图5 不同上样体积的回收率和响应值

Fig.5 Recovery and intensity of ribavirin with different loading volume

2.4 定量方式的选择

采用基质匹配标准曲线外标法、基质加标标准曲线外标法和内标法分别对样品进行检测比对,结果如表2所示。采用基质匹配标准曲线外标法定量回收率偏低,无法满足检测要求,基质加标标准曲线外标法的回收率虽然满足检验要求,但无法消除样品之间的差异性因素,因此为提高检测效率,本方法采用纯溶剂标准溶液内标法进行定量。

表 2 不同定量方式的结果比对

定量方式	添加水平/(μg/kg)	回收水平/(μg/kg)	回收率/%
基质匹配标准曲线外标法	10.0	5.5	55
基质加标标准曲线外标法	10.0	9.1	91
内标法	10.0	9.7	97

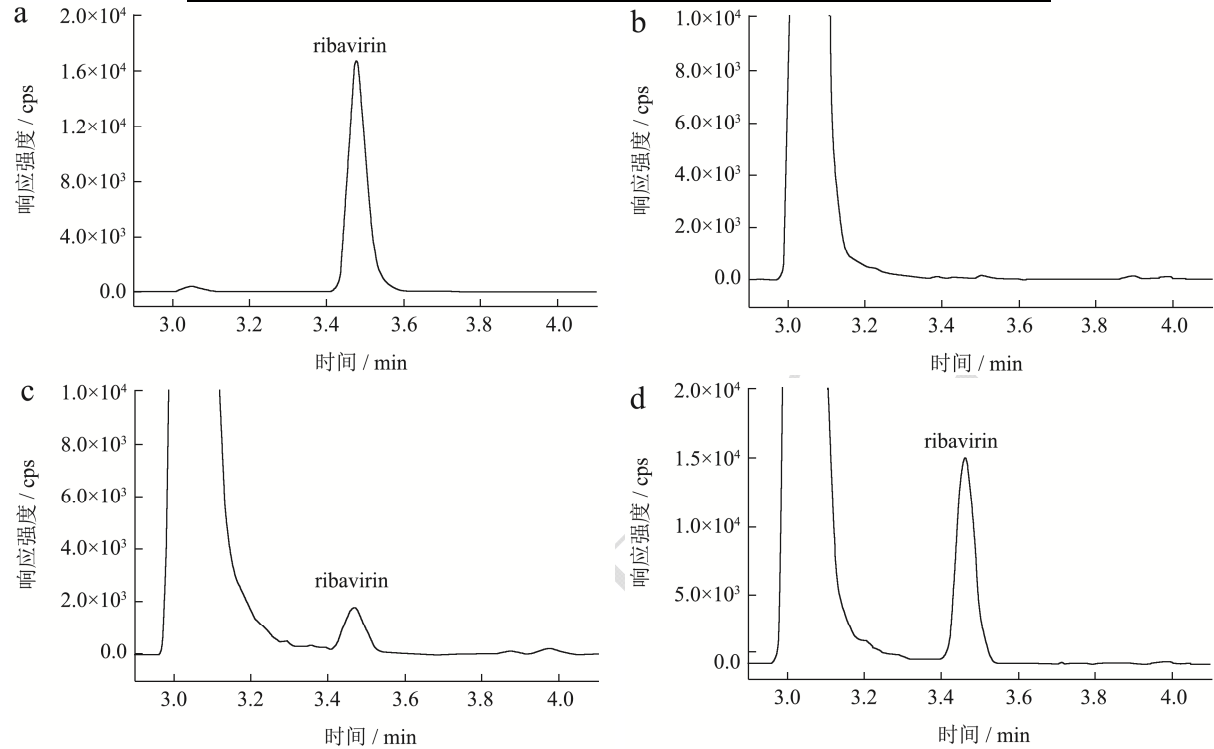


图 6 标准溶液(a)、空白样品(b)、定量限加标样品(c)、10 倍定量限加标样品(d)的特征离子色谱图

Fig.6 Characteristic ion current chromatograms of standard solution (a), blank sample (b) and LOQ (c), 10 LOQ (d) spiked sample

2.5 方法学验证

2.5.1 线性范围、检出限和定量限

将标准工作溶液（0.05、0.10、0.25、0.50、2.00、5.00 μg/L，含内标 2 μg/L）注入高效液相色谱-串联质谱仪测定，以利巴韦林峰面积与内标峰面积的比值(y)为纵坐标，以利巴韦林的质量浓度(x)为横坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程。结果显示利巴韦林在 0.05~5 μg/L 范围内呈良好的线性，线性方程为 $y=0.622\ 618x-0.004\ 587\ 05$ ，相关系数(r)为 0.999 2。

分别向空白鸡肉中添加系列浓度的标准物质，产生 3 倍信噪比的浓度确定了检出限，10 倍信噪比的浓度确定为定量限。本方法中利巴韦林的检出限和定量限分别 1.0 μg/kg 和 2.0 μg/kg。标准溶液、空白样品、定量限水平样品、10 倍定量限水平的样品特征离子色谱图如图 6 所示。

2.5.2 回收率与精密度

分别向空白鸡肉、鸭肉中添加低（LOQ）、中

（2 LOQ）、高（10 LOQ）三个水平的标物溶液，每个水平做 6 个平行试验，结果见表 3。鸡肉、鸭肉中利巴韦林的回收率为 94.5%~112.0%，相对标准偏差为 1.4%~3.2%。

2.6 与标准方法的比较

取鸡肉样品，采用本方法和 SN/T 4519-2016《出口动物源食品中利巴韦林残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法》进行比较。本方法的绝对加标回收率为 50%~60%，内标校正回收率为 90%~110%，方法检出限为 1.0 μg/kg，而标准方法的绝对回收率为 30%~40%，内标校正回收率为 90%~110%，方法测定低限为 1.0 μg/kg。且本方法操作快捷方便，避免了反复调节 pH、淋洗、氮吹等步骤。

2.7 实际样品分析

将建立的方法应用于市售 15 份鸡肉样品、5 份鸭肉样品的检测，所测样品中均未检出利巴韦林残留。

表 3 不同添加水平下利巴韦林的测定结果

Table 3 Analytical results of ribavirin at different spiked levels (n=6)										
基质	编号	LOQ			2 LOQ			10 LOQ		
		回收浓度/ (μg/kg)	回收率/ %	精密度/ %	回收浓度/ (μg/kg)	回收率/ %	精密度/ %	回收浓度/ (μg/kg)	回收率/ %	精密度/ %
鸡肉	1	2.19	109.5	3.2	3.93	98.2	1.4	19.5	97.5	2.1
	2	2.10	105.0		3.92	98.0		20.3	101.5	
	3	2.24	112.0		3.86	96.5		19.8	99.0	
	4	2.11	105.5		3.78	94.5		20.1	100.5	
	5	2.20	110.0		3.90	97.5		20.7	103.5	
	6	2.06	103.0		3.90	97.5		20.2	101.0	
鸭肉	1	2.11	105.5	3.1	3.87	96.8	1.7	20.2	101.0	2.5
	2	2.06	103.0		3.92	98.0		19.6	98.0	
	3	2.23	111.5		3.82	95.5		20.3	101.5	
	4	2.09	104.5		3.87	96.8		19.1	95.5	
	5	2.16	108.0		3.96	99.0		19.4	97.0	
	6	2.06	103.0		4.01	100.2		20.1	100.5	

3 结论

本研究建立了通过式固相萃取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定禽肉中利巴韦林残留量的方法,与之前研究相比,创新性地采用 EMR 固相萃取柱净化,省去了反复调节 pH、淋洗、氮吹等步骤,提高了检测效率,为保障食品安全,打击违法添加行为提供了技术支持。

参考文献

[1] Lin C C, Yeh L T, Vitarella D, et al. Viramidine, a prodrug of ribavirin, shows better liver-targeting properties and safety profiles than ribavirin in animals [J]. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 2003, 14: 145-152.

[2] Witkowski J T, Robins R K, Sidwell R W, et al. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1972, 15(11): 1150-1154.

[3] 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.

[4] Austin R K, Trefts P E, Hintz M, et al. Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983, 24(5): 696-701.

[5] 林婉贞,刘怡,任斌,等.紫外分光光度法测定利巴韦林含片含量[J].天津药学,2005,17(2):29-31.

[6] 李红丽,王克科,张效林,等.吸收双波长紫外分光光度法测定利巴韦林和乙酰胺含量[J].云南化工,2005,32(5):44-46.

[7] 陈双璐,柏亚林.复方利巴韦林滴鼻液的含量测定[J].华西药理学杂志,2002,17(4):299-300.

[8] Loregian A, Scarpa M C, Pagni S, et al. Measurement of ribavirin and evaluation of its stability in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 856: 358-364.

[9] D’Avolio A, Nicolò A D, Simiele M, et al. Development and validation of a useful HPLC-UV method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in blood and erythrocytes of HCV+ patients [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 66: 376-380.

[10] 冯文,刘峰,谢华.高效液相色谱法测定利巴韦林滴眼液中有关物质的含量[J].中南药学,2021,19(9):1919-1924.

[11] 李立理,徐可,张菁,等. HPLC 法测定利巴韦林滴眼液中抑菌剂的含量[J].中国药品标准,2020,21(5):424-428.

[12] 陈晨,韩春晓,魏园园,等.HPLC-PDA 法测定柴胡注射液中非法添加利巴韦林的研究[J].中国兽药杂志,2014,48(7):37-40.

[13] El-shorbagy H I, Elsebaei F, Hammad S F, et al. A green stability-indicating RP-HPLC-UV method using factorial design for determination of ribavirin, sofosbuvir and ledipasvir: application to average content, acid degradation kinetics and *in vitro* drug interactions study [J]. Microchemical Journal, 2020, 158: 105251.

[14] 郑铎,汤晓艳,周剑,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡血浆中利巴韦林及其主要代谢物[J].分析测试学报,2015, 34(7):819-823.

- [15] 谢继安,刘柏林,赵紫微,等.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[J].中国食品卫生杂志,2020,32(3):261-266.
- [16] 王紫竹,周鑫,邹唯嘉.超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中利巴韦林残留量[J].中国乳业,2018,10:52-56.
- [17] Van der lijke H, Alffenaar J W, Kok W T, et al. Determination of ribavirin in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2012, 88: 385-390.
- [18] 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]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 38(1): 34-40.
- [19] 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.
- [20] 郑铨,汤晓艳,曹兴元,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测蛋鸡体内抗病毒药物利巴韦林[J].食品科学,2016,37(4): 197-201.
- [21] 齐凯,汤晓艳,王敏,等.超高效液相色谱-串联质谱法分析鸡蛋中利巴韦林及其代谢物残留[J].分析化学,2016,44(6): 923-928.
- [22] 刘正才,杨方,徐姗,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡组织中利巴韦林的残留量及其前处理方法优化[J].分析实验室,2015,34(9):1067-1071.
- [23] 林胜军,黄诚.自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中的金刚烷胺和利巴韦林[J].食品安全质量检测学报,2018,9(1):149-154.
- [24] Wang Z, Wang X, Wang Y, et al. Simultaneous determination of five antiviral drug residues and stability studies in honey using a two-step fraction capture coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1638: 461890.
- [25] SN/T 4519-2016,出口动物源食品中利巴韦林残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [26] Wang P G, Zhou W. Rapid determination of cocamidopropylbetaine impurities in cosmetic products by core-shell hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1461: 78-83.
- [27] Yeh L, Nguyen M, Lin C C. A sensitive and specific method for the determination of total ribavirin in human red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatographic Science, 2003, 41(5): 255-260.
- [28] Liu Yifei, Xu Christine, YanRongzi, et al. Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of viramidine and ribavirin in human plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 832: 17-23.
- [29] 虞长贵.HPLC-MS/MS 测定动物源性食品中利巴韦林和金刚烷胺药物残留[J].现代食品,2021,17:213-215.