

阴生津、益气消肿止痛、凉血活血化瘀、收敛生肌为基本治法。同时从类2~5的聚类分析结果可知,在清热解毒药中辅以活血化瘀之药时,可减少放射区瘀血阻滞血络所致的疼痛。本研究在一定程度上,可为临床防治放射性食管炎方剂组方及成药的开发提供参考。

参考文献:

[1] Kuroda Y, Sekine I, Sumi M, et al. Acute radiation esophagitis caused by high-dose involved field radiotherapy with concurrent cisplatin and vinorelbine for stage III non-small cell lung cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(4): 333-339.

[2] 王立东, 谌娜娜, 李蕊洁, 等. 放射性食管炎的临床研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2017, 32(5): 474-478.

[3] 鲁君巢. 放射性食管炎的中医治疗进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(37): 99; 101.

[4] 黄辉, 徐鹏飞, 魏鹏飞, 等. 中药降低中晚期食管癌急性

放射性损伤发生率的 Meta 分析[J]. *陕西中医药大学学报*, 2016, 39(6): 54-56.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[6] 路军章, 张蕾. 中医药防治急性放射性食管炎[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12): 3019-3022.

[7] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 麦冬的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2020, 37(4): 130-134.

[8] 孙艳菲, 张学顺. 北沙参药理作用及临床应用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(3): 191-193.

[9] 李翎熙, 陈迪路, 周小江. 玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测[J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2417-2426.

[10] 上官艳妮, 李林, 潘胤池, 等. 白及组织培养及其药理作用的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(7): 1706-1709.

HILIC-MS/MS 结合酶解-QuEChERS 净化法测定含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留

李高天¹, 王红青¹, 彭彦¹, 尹湘君², 季旭明², 阮家钊^{2*}

(1. 杭州市食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 建立亲水作用色谱-串联质谱 (HILIC-MS/MS) 结合酶解-QuEChERS 净化法测定含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留。方法 样品中加入¹³C₅ 利巴韦林内标, 1% 乙酸乙腈超声提取, 在 37 °C 下经酸性磷酸酶酶解, 经 QuEChERS 净化萃取包净化后用 Waters ACQUITY UPLC BHE HILIC (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离, 以 5 mmol/L 乙酸铵 (含 0.2% 甲酸) -乙腈为流动相梯度洗脱, 在电喷雾正离子电离多反应监测模式下监测, 内标法定量。结果 乌鸡白凤丸、复方鸡内金片中利巴韦林含量在 1.0~100 μg/kg 之间时, 相关系数大于 0.999, 方法检出限为 0.3 μg/kg, 定量限为 1.0 μg/kg, 日内回收率为 95.47%~100.75%, 日内精密度 RSD 为 0.53%~2.76%, 日间回收率为 94.47%~101.11%, 日间精密度 RSD 为 1.00%~2.33%。结论 该方法快速简便, 线性范围宽, 重复性好, 可用于含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留的定性及定量检测。

关键词: 中成药; 鸡源成分; 利巴韦林; 代谢物总残留; 亲水作用色谱-串联质谱 (HILIC-MS/MS); 酶解-QuEChERS 净化法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)01-0280-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.054

利巴韦林是一种嘌呤核苷类似物, 能抑制多种核酸病毒引起的疾病, 曾广泛应用于治疗动物病毒性传染病, 如鸡痘、鸡传染性喉气管炎等^[1]。但利巴韦林具有一定的遗传、生殖毒性和致癌性, 禽畜滥用可能会导致药物残留, 使其通过食物链进入人体从而影响人体健康^[2-3]。

我国中药材资源丰富, 动物源性药材使用广泛^[4-5]。人

们熟知的中成药乌鸡白凤丸由乌鸡、黄芪等 20 味药材组成, 收载于《中国药典》^[6]; 鸡内金是鸡的砂囊内壁, 其药用价值可溯源于《神农本草经》^[7]。养殖户为了提高鸡的抵抗力, 往往会在养殖过程中滥用利巴韦林, 导致鸡肉、鸡骨、砂囊等组织中会有利巴韦林及其代谢物的残留和蓄积^[8-9], 给含鸡源成分中成药的质量安全带来较大隐患。

收稿日期: 2021-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774198); 浙江中医药大学校级科研基金资助项目 (2020ZZ06)

作者简介: 李高天 (1990—), 女, 硕士, 从事食品、药品检验研究。Tel: (0571) 85460823, E-mail: 373546685@qq.com

* 通信作者: 阮家钊 (1988—), 男, 硕士, 从事中药药效及物质基础研究。Tel: (0571) 86613607, E-mail: ruanjz1028@163.com

鸡肉食品中利巴韦林及其代谢物总残留检测目前主要的检测方法有 ELISA 法、HPLC 法、HPLC-MS/MS 等^[10-14]，然而含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留却未见相关的检测依据。本研究采用亲水作用色谱-串联质谱 (HILIC-MS/MS) 结合酶解-QuEChERS 净化法对含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留进行测定。

1 材料

1.1 仪器 AB SCIEX Qtrap 4000 超高效液相色谱-串联线性离子阱质谱联用仪 (美国 AB SCIEX 公司, 配置岛津 LC-30AD 超高效液相色谱仪); Mili-Q 去离子水发生器 (美国 Millipore 公司); KQ3200V 超声波发生器 (昆山市超声仪器有限公司); SHZ-B 水浴恒温振荡仪 (上海智诚分析仪器有限公司); MS3 旋涡混合器 (德国 IKA 公司); SBEQ-CR1012 固相萃取装置 (美国 Waters 公司); 4-16K 高速离心机 (德国 Sigma 公司); N-EVP-111 氮吹浓缩仪 (美国 Organomation Associates 公司)。

1.2 试剂与药物 利巴韦林对照品 (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 批号 G154277, 纯度 99.3%); ¹³C₅ 利巴韦林内标 (加拿大 Toronto Research Chemicals 公司, 批号 10-MRS-156-1, 含量 99.4%); 酸性磷酸酶 (美国 Sigma 公司, 批号 SLBV3717, 活性 ≥0.4 unit/mg); 亲水脂平衡 (HLB)、

阳离子交换 (MCX)、苯硼酸基弱阳离子 (PBA) 固相萃取小柱、15 mL QuEChERS 净化管 (含 400 mg PSA、400 mg C₁₈、1 200 mg 无水硫酸镁), 购于美国 Agilent 公司。乌鸡白凤丸 (北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 批号 18035367); 复方鸡内金片 (石药控股集团河北永丰药业有限公司, 批号 00519040141)。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 购于德国 Merck 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BHE HILIC 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 5 mmol/L 乙酸铵 (含 0.2% 甲酸) (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~2 min, 5% A; 2~4 min, 5%~30% A; 4~5 min, 30%~60% A; 5~5.1 min, 60%~5% A; 5.1~10 min, 5% A); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 正离子电离 (ESI+); 雾化气压力 379 kPa; 气帘气压力 172 kPa; 喷雾电压 5 500 V; 去溶剂气温度 500 °C; 去溶剂气压力 345 kPa; 碰撞气压力 69 kPa; 多反应监测 (MRM) 模式; 碰撞室出口电压 (CXP) 12.5 V; 射入电压 (EP) 10 V。其他质谱参数见表 1, MRM 定量离子图见图 1。

表 1 质谱参数

成分	t _R /min	定性离子 m/z	去簇电压/V	碰撞电压/eV
利巴韦林	1.84	245.1>113.1*、245.1>96.0	57	12.45
¹³ C ₅ 利巴韦林	1.84	250.1>113.1*、250.1>96.0	57	12.45

注: * 为定量离子。

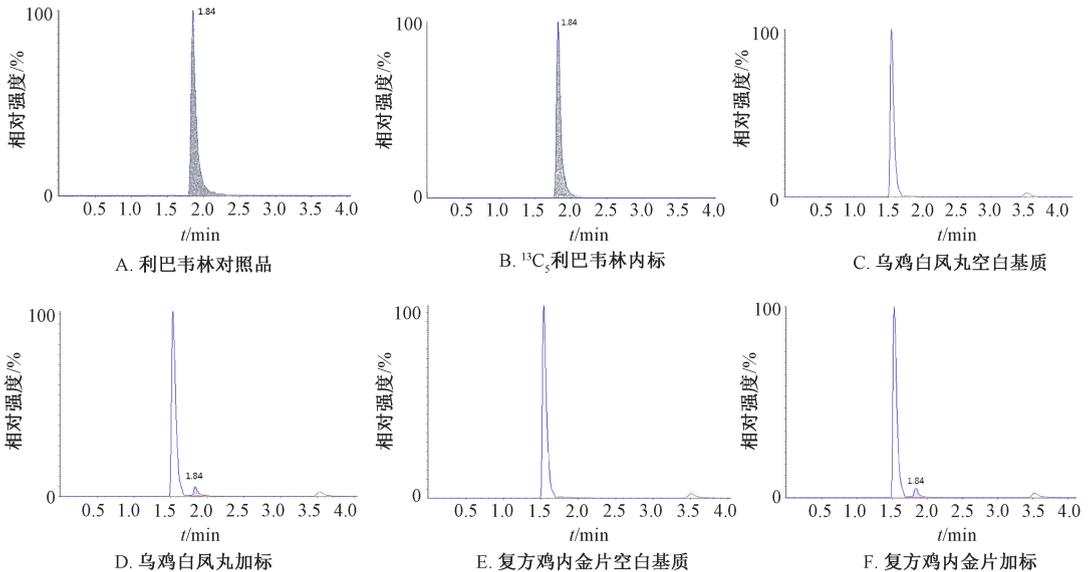


图 1 MRM 定量离子图

2.3 对照品溶液制备 精密称取 100% 水平利巴韦林对照品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇溶解至刻度, 质量浓度为 100 mg/L, -20 °C 避光保存, 临用前稀释成 2 mg/L; 将 ¹³C₅ 利巴韦林内标用甲醇定容至 100 mL, 配成 100 mg/L 贮备液, 临用前稀释至 1 mg/L, 即得。

2.4 供试品溶液制备 取乌鸡白凤丸、复方鸡内金片适量, 研细, 烘干, 精密称取 5.0 g 粉末, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入 1 mg/L 内标工作液 25 μL, 加 30 mL 含乙腈 (1% 乙酸) 涡旋混匀 5 min, 超声提取 10 min, 加酸性磷酸酶 50 μL, 在 37 °C 下酶解 60 min, 4 000 r/min 离心

5 min, 转移上清液, 再加入 10 mL 含 1% 乙酸的乙腈至残渣中, 涡旋混匀, 离心, 合并上清液至 50 mL, 吸取 12 mL, 置于 15 mL QuEChERS 净化管内, 涡旋混匀 2 min, 静置 5 min 使样液与填料充分接触, 4 000 r/min 离心 2 min, 转移 10 mL 上清液于另一试管中, 氮气吹干, 加入 1 mL 乙腈溶解残渣, 0.22 μm 滤膜过滤。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 为了消除基质效应对测定结果的影响, 本实验在乌鸡白凤丸、复方鸡内金片中添加标准工作液, 使其含量分别为 1.0、2.5、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/kg, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在

“2.1” “2.2”项条件下进样测定。以进样量为横坐标 (X), 定量离子与内标校正离子峰面积之比为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程分别为 $Y = 0.201 1X - 0.014 5$ ($R^2 = 0.999 8$)、 $Y = 0.219 5X - 0.044 8$ ($R^2 = 0.999 4$), 在 1.0~100 μg/mL 范围内线性关系良好。再以 3 倍信噪比 (S/N) 为检出限, 10 倍信噪比 (S/N) 为定量限, 测得两者分别为 0.3、1.0 μg/kg。

2.5.2 方法回收率、精密度的试验 取空白样品适量, 分别以 1、2、10 倍定量限进行方法回收率试验, 日内每个添加水平每天平行测定 6 次, 连续 3 d, 结果见表 2。

表 2 利巴韦林方法回收率、精密度试验结果

中成药	添加水平 / (μg·kg ⁻¹)	日内 (n=6)		日间 (n=3)	
		方法回收率/%	精密度/%	方法回收率/%	精密度/%
乌鸡白凤丸	1.0	95.72	2.18	95.06	1.98
	2.0	98.09	1.22	97.09	1.28
	10.0	95.47	0.53	94.47	1.70
复方鸡内金片	1.0	97.48	0.69	97.10	1.18
	2.0	98.47	1.14	98.82	1.00
	10.0	100.75	2.76	101.11	2.33

2.6 利巴韦林及其代谢物总残留测定 采用 MRM 模式, 利巴韦林有 2 个检测通道, 每个通道对应 1 个监测离子对, 若 2 个通道中均出现与对照品保留时间一致的色谱峰, 并且 2 个子离子相对丰度与对照品一致, 则可判定检出该成分。各成分丰度均符合欧盟 2002/657/EC 法规关于定性判断时相对离子丰度得允许偏差范围^[15], 可判断这些子离子相对丰度一致。根据定量监测离子对离子流图中的色谱峰峰面积, 采用内标法计算 7 批乌鸡白凤丸、4 批复方鸡内金片中利巴韦林及其代谢物总残留, 结果见表 3, 可知均未检出。

表 3 利巴韦林及其代谢物总残留测定结果

厂家	中成药	批号	检测结果
企业 1	乌鸡白凤丸	18035367	未检出
企业 2	乌鸡白凤丸	17040003	未检出
企业 3	乌鸡白凤丸	170312	未检出
企业 4	同仁乌鸡白凤丸	16015114	未检出
企业 4	同仁乌鸡白凤丸	16015251	未检出
企业 4	同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)	16030008	未检出
企业 4	同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)	16035267	未检出
企业 5	复方鸡内金片	00519040141	未检出
企业 6	复方鸡内金片	170810	未检出
企业 7	复方鸡内金片	161001	未检出
企业 8	复方鸡内金片	160718	未检出

3 讨论

3.1 提取溶剂选择 采用已报道的 20 g/L 三氯乙酸、0.1% 甲酸-20 mmol/L 乙酸铵/甲醇、乙腈 (1% 乙酸) 对样品进行提取^[16-18], 发现三氯乙酸提取液在后续氮吹浓缩时无法完全吹干, 影响后续 QuEChERS 净化便利性; 甲酸-乙酸铵/甲醇提取液在氮吹时有大量粘稠物质附着于试管底部, 严重影响利巴韦林的回收率和精密度, 可能是甲醇体

系对样品中的杂质共萃取较多, 而净化过程又无法完全吸附导致; 乙酸乙腈与前两种提取液相比, 提取的杂质较少, 有利于后续的 QuEChERS 净化和氮吹浓缩。因此, 本实验采用乙腈 (1% 乙酸) 作为提取剂。

3.2 净化条件选择 采用亲水亲脂平衡、磺酸基强阳离子、苯硼酸基弱阳离子三种固相萃取小柱和 QuEChERS 净化管净化, 发现三种固相萃取小柱虽然去除杂质效果较好, 但回收率明显偏低 (HLB 柱净化回收率为 40.1%~55.4%, MCX 柱为 45.1%~59.4%, PBA 柱为 59.2%~66.5%)。QuEChERS 净化管内的 PSA 能有效去除乌鸡白凤丸内的蜂蜜和复方鸡内金片的外包糖衣中的多糖类杂质, C₁₈ 能有效吸附动物组织中的油脂等非极性成分^[19]。实验结果表明 QuEChERS 净化管的回收率明显高于固相萃取柱, 并且操作简单, 净化时间短。

3.3 色谱-质谱条件优化 本实验考察了 Waters X-Bridge C₁₈ (4.6 mm×50 mm, 2.5 μm)、Agilent ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Waters ACQUITY UPLC BHE HILIC (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 发现同一质量浓度利巴韦林 (1.0 μg/L) 的峰面积分别为 2 293、1 975、2 265。虽然 Waters X-Bridge C₁₈ 反相柱和 Waters ACQUITY UPLC BHE HILIC 亲水柱响应相近, 但利巴韦林在 Waters X-Bridge C₁₈ 柱上不易保留, 和基质中的尿苷类似物难以基线分离, 而尿苷类似物相对分子质量均为 244.2, 在质谱 ES1+ 源中的碎片离子质荷比与利巴韦林也相同^[20], 因此在实际样品检测时无法准确定量。Agilent ZORBAX SB-Aq 柱的响应与其他两种柱子相比略低, 可能是超高比例水相作为流动影响了利巴韦林的离子化^[21]。Waters ACQUITY UPLC BHE HILIC 亲水填料色谱柱起始的水相比例为 95%, 对目

标物的离子化影响小,且通过调整流动相梯度变化确定了“2.1”项下的色谱条件。

将0.5 mg/L利巴韦林对照品及其¹³C₅内标溶液以10 μL/min体积流量注入离子源,在正离子检测方式下进行母离子扫描,得到准分子离子[M+H]⁺峰;优化各离子对的去簇电压、碰撞能量等,得到最佳的二级质谱条件^[22];选择响应值高、基线噪音低的离子对作为监测离子对,确定了“2.2”项下的质谱条件。

4 结论

本研究建立酶解-QuEChERS净化法结合亲水作用色谱-串联质谱法测定含鸡源成分中成药中利巴韦林及其代谢物总残留的分析方法。该方法简便、快速、灵敏度高,抗干扰能力强,可满足实际样品检测的需要,同时也为其他动物源性中成药的残留检测提供参考。

参考文献:

[1] 郭震浪,苏振宁,王正飞,等.热毒宁与利巴韦林比较治疗小儿急性上呼吸道感染的Meta分析[J].中成药,2016,38(2):278-283.

[2] 周剑,王敏,杨梦瑞,等.抗病毒药物利巴韦林检测技术的研究进展[J].化学试剂,2016,38(1):1-6;33.

[3] 魏法山,巩阿娜,盖圣美,等.利巴韦林在畜禽体内的代谢规律与检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(10):3966-3972.

[4] 聂黎行,胡晓茹,张聿梅,等.基于国家药品抽验任务探讨含动物类成分中成药的质量控制[J].中国药学杂志,2016,51(6):506-512.

[5] 葛庆联,陈宽维,吴华俊,等.药用价值地方鸡种动态保种的研究[J].中国家禽,2005,9(S1):44-47.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:694-695.

[7] 田子钰,刘素香,陈常青.中药治疗小儿功能性消化不良的研究进展[J].中草药,2017,48(4):803-807.

[8] 王振东,王欣然,李熠,等.畜禽产品中抗病毒类药物残留检测方法研究进展[J].农产品质量与安全,2020(1):72-79.

[9] Xie S L, Wen K, Xie J, et al. Magnetic-assisted biotinylated single-chain variable fragment antibody-based immunoassay for mantadine detection in chicken[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(24):6197-6205.

[10] Davolio A, Nicol Ò A, 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]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 66: 376-380.

[11] Wei C, Grace J E, Zvyaga T A, et al. Utility of high-resolution accurate MS to eliminate interferences in the bioanalysis of ribavirin and its phosphate metabolites [J]. Bioanalysis, 2012, 4(15):1895-1905.

[12] 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].分析试验室,2015,34(9):1067-1071.

[13] Mu P, Xu N, Chai T, et al. Simultaneous determination of 14 antiviral drugs and relevant metabolites in chicken muscle by UPLC-MS/MS after QuEChERS preparation [J]. J Chromatogr B, 2016, 1023-1024: 17-23.

[14] 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].

[15] David B. Comission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the inter pertation of results [J]. Off J Eur Communit, 2002, 8(17):8-36.

[16] 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.

[17] 林胜军,黄诚.全自动固相萃取-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.

[18] 张秀尧,蔡欣欣,张晓艺,等.二维高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱联用法快速测定鸡肉和鸡蛋中利巴韦林总残留量[J].质谱学报,2018,39(4):442-450.

[19] 徐俊,谢敏,周瑶敏,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定畜禽毛发中利巴韦林及其代谢物[J].分析试验室,2020,39(2):213-217.

[20] 郑锌,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] 霍金海,孙国东,魏文峰,等.UPLC-Q-TOF/MS法分析牛黄清感胶囊成分[J].中成药,2018,40(10):2340-2348.