

分析与监测

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.22.022

## 水源水中8种治疗新冠的抗病毒药物的同步检测

侯云鹤<sup>1,2</sup>, 董紫君<sup>2,3</sup>, 宋洪星<sup>4</sup>, 李微<sup>1</sup>, 闫韫<sup>4</sup>, 王路<sup>4</sup>

(1. 沈阳建筑大学 市政与环境工程学院, 辽宁 沈阳 110168; 2. 深圳职业技术学院 材料与环境工程学院, 广东 深圳 518055; 3. 深圳大学 土木与交通工程学院, 广东 深圳 518055; 4. 深圳市水文水质中心, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 随着新冠疫情的持续暴发,大量治疗药物不可避免地由不同途径进入水体,在对其进行治理和生态评价时面临准确、快速检测的问题,需要建立同步分析水中多种治疗新冠的抗病毒药物的方法。通过对液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的测定条件进行优化,构建了一种同步检测水源水中利巴韦林、奥司他韦、奈韦拉平、拉米夫定、阿巴卡韦、司他夫定、阿昔洛韦、喷昔洛韦等8种抗病毒药物的方法。结果表明,该方法的8种抗病毒药物的子离子响应值相对较高,有利于目标化合物的检测;8种抗病毒药物的标准曲线的线性相关系数( $r$ ) $\geq 0.995$ ,检出限(MDL)和测定下限分别为0.004~0.081、0.013~0.267  $\mu\text{g/L}$ ,实际水样的加标回收率与RSD分别为81.61%~113.03%、0.84%~8.12%。

**关键词:** 抗病毒药物; 检测方法; 水源水; LC-MS/MS

**中图分类号:** TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2022)22-0130-05

## Simultaneous Detection of Eight Antiviral Drugs for Treatment of COVID-19 in Source Water

HOU Yun-he<sup>1,2</sup>, DONG Zi-jun<sup>2,3</sup>, SONG Hong-xing<sup>4</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, YAN Yun<sup>4</sup>,  
WANG Lu<sup>4</sup>

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang 110168, China; 2. School of Materials & Environmental Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China; 3. College of Civil and Transportation Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China; 4. Shenzhen Hydrology and Water Quality Center, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** The continuous outbreak of COVID-19 results in a large number of therapeutic drugs inevitably entering water bodies through different pathways, and there are problems of accurate and rapid detection in the treatment and ecological evaluation of these drugs. Therefore, it is necessary to establish a method for simultaneous detection of multiple antiviral drugs for treatment of COVID-19 in water. A method for the simultaneous detection of 8 antiviral drugs (ribavirin, oseltamivir, nevirapine, lamivudine,

基金项目: 深圳市科技创新委可持续发展专项(专2021N029); 国家自然科学基金资助项目(42277373); 广东省攀登计划(pdjh2022b0977)

通信作者: 董紫君 E-mail: dongzijun@szu.edu.cn

abacavir, stavudine, acyclovir and penciclovir) in source water was developed by optimizing the determining parameters of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The daughter ion response values of 8 antiviral drugs in this method were relatively high, which was beneficial to the detection of target compounds. The correlation coefficient ( $r$ ) of the standard curve of 8 antiviral drugs was not less than 0.995 0, the method detection limit (MDL) and the lower limit of determination were in the range of 0.004–0.081  $\mu\text{g/L}$  and 0.013–0.267  $\mu\text{g/L}$ , respectively, and the spike recoveries and RSDs of actual water samples were 81.61%–113.03% and 0.84%–8.12%, respectively.

**Key words:** antiviral drugs; detection method; source water; LC-MS/MS

2020年新冠疫情席卷全球,直接威胁人类生命。由于之前没有针对COVID-19的特异性药物,各国都是将现有具有潜在治疗效果的抗病毒药物用于医治COVID-19患者。目前的研究表明:药利巴韦林<sup>[1]</sup>、奥司他韦<sup>[2]</sup>、奈韦拉平<sup>[3]</sup>、拉米夫定<sup>[4]</sup>、阿巴卡韦<sup>[5]</sup>、司他夫定<sup>[6]</sup>、阿昔洛韦<sup>[7]</sup>和喷昔洛韦<sup>[8]</sup>可能是治愈COVID-19的抗病毒药物。疫情期间,抗病毒药物的使用,一方面治疗了患者,阻断了病毒的传播;另一方面,如果过量使用这些药物,则药物及其代谢产物,容易随着人体排泄物进入城市污水处理厂,这些药物具有极强的持久性和生物累积性,只有很少的一部分在污水处理厂被去除,残余的药物及其代谢产物会进入受纳水体,对水生态环境造成风险。而且水中的病毒会通过变异导致对这些药物产生抗药性,变异后的病毒更不利于去除,因此,在对这些药物的环境影响效应进行跟踪研究时,迫切需要建立水中多种抗病毒药物的同步分析方法。

目前关于抗病毒药物的检测,大多数方法都是基于医学生物样本如血浆、尿液和血清的检测,Jung等<sup>[9]</sup>利用液相色谱-质谱对人体血浆中的17种抗病毒药物进行检测;Acquavia等<sup>[10]</sup>利用电喷雾电离-质谱法对生物组织中的抗病毒药物进行检测。地表水中抗病毒药物含量很低(纳克级~微克级),目前关于其同步痕量检测方法的研究还很少。

本研究利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术,通过优化测定条件,构建了一种同步检测水源水中利巴韦林、奥司他韦、奈韦拉平、拉米夫定、阿巴卡韦、司他夫定、阿昔洛韦、喷昔洛韦的方法。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

液相色谱-串联质谱联用仪:电喷雾离子源,

AB SCIEX TripleQuad 6500+;色谱分析柱:Kinetex<sup>®</sup> 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A (3.0 mm×100 mm)、ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  (2.1 mm×100 mm),保护柱:Kinetex<sup>®</sup> 1.7  $\mu\text{m}$  C18 100A (50 mm×2.1 mm);超纯水系统(MilliQ-Integral 3);移液枪:100、1 000  $\mu\text{L}$ ;容量瓶:10、100 mL。

利巴韦林、奥司他韦、奈韦拉平、拉米夫定、阿巴卡韦、司他夫定、阿昔洛韦、喷昔洛韦标准品,纯度 $\geq 99.0\%$ ;甲醇、乙腈,色谱纯,纯度 $\geq 99.9\%$ ;甲酸铵、甲酸,分析纯,纯度 $\geq 99.0\%$ ;实验用水为超纯水(电阻率18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )。

### 1.2 溶液的配制

分别称取8种抗病毒药物1.0 mg至10 mL的容量瓶中,用甲醇定容后配制成100 mg/L的单一原液,在4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存,取8种药品10  $\mu\text{L}$ 原液于10 mL容量瓶中,用2 mmol/L甲酸铵+0.02%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液(9/1)定容,制成100  $\mu\text{g/L}$ 的混合溶液,用于目标化合物及其子离子的确定,再取8种药品100  $\mu\text{L}$ 原液于10 mL容量瓶中,用2 mmol/L甲酸铵+0.02%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液(9/1)定容,制成1 mg/L的混合溶液,将混合溶液用2 mmol/L甲酸铵+0.02%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液(9/1)稀释成0、2、4、6、8、10  $\mu\text{g/L}$ 的标准曲线工作溶液。

### 1.3 样品的采集

实测水样取自深圳市龙岗区布吉水质净水厂的进出水口、深圳市第三人民医院排水口,用2 L的棕色玻璃瓶收集,收集前用水样润洗棕色玻璃瓶3~4次,待水样完全充满棕色玻璃瓶后盖上盖子,并在4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存,于48 h内完成前处理及检测。

### 1.4 LC-MS/MS条件

色谱条件:柱温40  $^{\circ}\text{C}$ ,最大温度80  $^{\circ}\text{C}$ ,进样体

积5  $\mu\text{L}$ ,采用梯度洗脱方式,梯度洗脱程序见表1。

表1 液相色谱流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution program of mobile phase in liquid chromatography

时间/min	流速/( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	A/%	B/%
0.0	0.40	90	10
3.0	0.40	10	90
5.0	0.40	10	90
5.1	0.40	90	10
7.0	0.40	90	10

注: A为2 mmol/L甲酸铵+0.02%甲酸水溶液,B为0.1%甲酸乙腈溶液。

串联质谱条件:离子源是正离子模式,检测方式为多离子反应监测方式(MRM)。8种抗病毒药物多反应检测条件见表2。

表2 8种抗病毒药物多反应检测条件

Tab.2 Multi-response detection conditions of eight antiviral drugs

项目	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	碰撞能量/V	锥孔电压/V	碰撞室出口电压/V
利巴韦林	245.1	113.0	15.0	20.0	12.0
		96.1	41.0		
奥司他韦	313.1	208.1	19.0	30.0	10.0
		225.1	15.0		
		166.1	26.0		
奈韦拉平	267.1	226.0	34.0	130.0	10.0
拉米夫定	230.1	112.1	24.0	155.0	10.0
阿巴卡韦	287.2	191.1	27.0	120.0	10.0
司他夫定	225.1	166.1	17.0	147.0	10.0
		208.1	13.0		
阿昔洛韦	226.1	152.1	18.0	20.0	10.0
喷昔洛韦	254.1	152.1	24.0	140.0	10.0

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分析柱的选择

实验研究了 Kinetex<sup>®</sup> 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A (3.0 mm $\times$ 100 mm) 和 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  (2.1 mm $\times$ 100 mm) 两个不同色谱分析柱对8种目标化合物的分离效果,结果表明,使用 Kinetex<sup>®</sup> 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A (3.0 mm $\times$ 100 mm) 色谱分析柱时,8种抗病毒药物能够被很好地分离,且具有更高灵敏度。因此,选择 Kinetex<sup>®</sup> 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A (3.0 mm $\times$ 100 mm) 作为色谱分析柱。

### 2.2 样品基质的选择

实验分别用甲醇、乙腈、2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液(9/1)作为样品基质,结果表明,2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液(9/1)作为样品基质时,8种抗病毒药物子离子的峰分离度更好,因此,选定2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液(9/1)作为样品基质。

### 2.3 流动相的选择

实验分别采用流动相为纯水(A)和甲醇(B)、0.1% 甲酸(A)和甲醇(B)、2 mmol/L 甲酸铵水溶液(A)和甲醇(B)、2 mmol/L 甲酸铵水溶液(A)和乙腈(B)、2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液(A)和0.1% 甲酸乙腈溶液(B)进行检测。结果表明2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液(A)和0.1% 甲酸乙腈溶液(B)作为流动相时,8种抗病毒药物子离子的峰分离度和响应值更好,因此,选定2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液(A)和0.1% 甲酸乙腈溶液(B)作为流动相。

### 2.4 质谱条件的优化

实验中,以2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液(A)和0.1% 甲酸乙腈溶液(B)作为流动相,采用电喷雾离子源(ESI<sup>+</sup>),对8种目标化合物的质谱条件进行了优化。确定各化合物的母离子和子离子后,又优化了去溶剂温度(TEM)、喷雾电压(IS)、气帘气压力(CUR)、雾化气压力(GS1)、加热气压力(GS2)条件。实验分别在 TEM 为 300、400、500、600  $^{\circ}\text{C}$ , IS 为 2 500、3 500、4 500、5 500 V, CUR 为  $2.068\times 10^5$ 、 $2.413\times 10^5$ 、 $2.758\times 10^5$  Pa, GS1 为  $3.447\times 10^5$ 、 $3.792\times 10^5$ 、 $4.137\times 10^5$  Pa, GS2 为  $3.447\times 10^5$ 、 $3.792\times 10^5$ 、 $4.137\times 10^5$  Pa 的条件下进样检测。由于利巴韦林、奥司他韦和司他夫定在检测时会分解成几个子离子,所以对其分别标记为利巴韦林1、利巴韦林2;奥司他韦1、奥司他韦2、奥司他韦3;司他夫定1、司他夫定2,并且以峰面积大的子离子作为化合物的定量离子。结果表明,TEM 为 400  $^{\circ}\text{C}$ 、IS 为 3 500 V、CUR 为  $2.413\times 10^5$  Pa、GS1 为  $3.792\times 10^5$  Pa、GS2 为  $3.792\times 10^5$  Pa 时8种抗病毒药物的子离子综合峰面积值都相对较高,有利于子离子的检测。最终确定了目标化合物的多离子反应检测(MRM)条件(见表2)。

2.5 目标物总离子流图

在液相色谱质谱优化的条件下,8种抗病毒药物都实现了有效分离,响应值较好,总离子流图见图1。

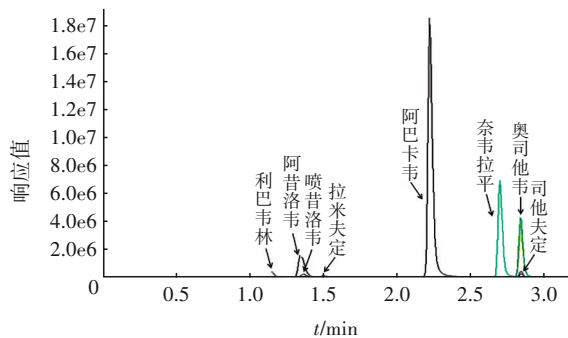


图1 总离子流图

Fig.1 Total ion flux diagram

2.6 方法性能指标

2.6.1 线性关系、检出限和测定下限

采用优化的分析条件,对不同浓度的混合药物进行检测,同一浓度进行6次平行实验,经计算每个浓度的相对标准偏差(RSD)在0%~10%,以药物峰面积为纵坐标、药物浓度为横坐标绘制标准曲线,然后进行10次空白实验,将各测定结果换算成样品的浓度,计算其相对标准偏差(RSD)和检出限(MDL),测定下限采用IUPAC的建议,以空白实验测量值标准偏差的10倍相对应的浓度值作为分析方法的测定下限,约为3.3倍的MDL。8种药物的线性关系、相关系数、检出限和测定下限见表3。

表3 8种药物的线性关系、检出限、测定下限

Tab.3 Linear relationship, detection limit, and lower limit of determination of eight drugs

项 目	回归方程	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	相关系 数 $r$	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	测定下 限/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
利巴韦林	$y = 11\,268x$	0~10	0.998 8	0.081	0.267
奥司他韦	$y = 591\,620x$	0~10	0.997 0	0.054	0.178
奈韦拉平	$y = 266\,509x$	0~10	0.998 0	0.034	0.112
拉米夫定	$y = 17\,635x$	0~10	0.995 0	0.014	0.046
阿巴卡韦	$y = 2\times 10^6x$	0~10	0.997 5	0.055	0.182
司他夫定	$y = 61\,689x$	0~10	0.996 9	0.044	0.145
阿昔洛韦	$y = 217\,759x$	0~10	0.999 0	0.005	0.016
喷昔洛韦	$y = 87\,761x$	0~10	0.999 4	0.004	0.013

可见,方法的线性相关性好( $r\geq 0.995\,0$ ),目标物检出限在0.004~0.081  $\mu\text{g/L}$ ,测定下限在0.013~

0.267  $\mu\text{g/L}$ ,可满足水体低浓度样品的检测需求。

2.6.2 精密度和准确度

对深圳市龙岗区布吉水质净水厂的进出水口、深圳市第三人民医院排水口三种不同类型的实际水样中目标化合物的浓度进行测定,结果均为未检出,可能是因为水样中8种抗病毒药物浓度过低,甚至是不含8种抗病毒药物。在三份100 mL的空白样品(纯水)中分别加入0.1、0.5、1 mL浓度为1 mg/L的混合标准溶液,并在三份100 mL实际湖泊水样中加入0.1 mL浓度为1 mg/L的混合标准溶液,分别进行加标回收实验,进行8次平行实验,根据测量结果计算平均加标回收率和RSD,结果见表4、5。可见,纯水水样的加标回收率为85.25%~115.82%,RSD为2.15%~9.94%,实际水样的加标回收率为81.61%~113.03%,RSD为0.84%~8.12%,表明该方法的测定精密度和准确度良好。

表4 纯水的加标回收率及相对标准偏差

Tab.4 Spike recoveries and RSDs of pure water %

项目	加标1 $\mu\text{g/L}$		加标5 $\mu\text{g/L}$		加标10 $\mu\text{g/L}$	
	加标回 收率	RSD	加标回 收率	RSD	加标回 收率	RSD
利巴韦林	95.50	5.61	111.86	2.23	112.92	2.19
奥司他韦	96.85	7.13	108.07	5.19	102.99	3.28
奈韦拉平	90.87	9.17	93.42	5.08	88.44	2.34
拉米夫定	96.08	3.56	85.25	3.83	99.57	4.77
阿巴卡韦	107.52	9.91	112.72	3.00	106.70	2.15
司他夫定	94.65	8.48	103.50	3.38	98.90	5.04
阿昔洛韦	107.33	9.94	104.93	3.08	105.43	4.22
喷昔洛韦	102.48	8.74	111.89	3.01	115.82	4.02

表5 实际水样的加标回收率及相对标准偏差

Tab.5 Spiked recoveries and RSDs of actual water samples %

项目	湖泊1		湖泊2		湖泊3	
	加标回 收率	RSD	加标回 收率	RSD	加标回 收率	RSD
利巴韦林	99.80	5.74	103.02	8.12	92.09	2.76
奥司他韦	112.15	2.04	113.03	1.19	107.00	1.38
奈韦拉平	86.54	2.41	91.76	0.84	87.33	4.98
拉米夫定	97.76	3.98	93.25	3.38	97.00	3.96
阿巴卡韦	82.06	2.82	82.14	1.32	92.34	2.82
司他夫定	99.90	5.14	106.40	2.30	104.36	0.92
阿昔洛韦	98.43	5.64	104.06	3.86	102.57	4.47
喷昔洛韦	81.61	1.75	84.29	1.78	84.61	2.43

### 3 结论

① 在采用 Kinetex® 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A (3.0 mm $\times$ 100 mm) 作为色谱分析柱、2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液(9/1)作为样品基质、2 mmol/L 甲酸铵+0.02% 甲酸水溶液(A)和 0.1% 甲酸乙腈溶液(B)作为流动相、TEM 为 400  $^{\circ}\text{C}$ 、IS 为 3 500 V、CUR 为  $2.413\times 10^5$  Pa、GS1 为  $3.792\times 10^5$  Pa、GS2 为  $3.792\times 10^5$  Pa 的条件下,8 种抗病毒药物的子离子响应值相对较高,更有利于目标化合物的检测。

② 8 种抗病毒药物的标准曲线的相关系数  $r\geq 0.995$ , MDL 和测定下限分别在 0.004~0.081、0.013~0.267  $\mu\text{g/L}$  范围内,可满足水体低浓度样品的检测需求。对实际水样的检测结果表明,方法的测定精密度和准确度良好。

③ 水中抗病毒类药物同步检测方法的建立,为研究抗疫药物的环境次生风险提供了有效的方法学基础,对于提升国家应对重大公共卫生事件的保障能力具有重要的理论与实际价值。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版 修订版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2021, 14(2): 81-88.  
National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment plan for COVID-19 (trial version 8th revision) [J]. Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases, 2021, 14(2): 81-88 (in Chinese).
- [2] CHIBA S. Effect of early oseltamivir on COVID-19-suspected outpatients without hypoxia [J]. Research Square, 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-33046/v1.
- [3] RAO A, SAIPRADEEP V G, JOSEPH T, *et al.* Text and network-mining for COVID-19 intervention studies [J]. Biological and Medicinal Chemistry, 2020. DOI: 10.26434/chemrxiv.12234564.
- [4] GARCÍA-TREJO J J, ORTEGA R, ZARCO-ZAVALA M. Putative repurposing of lamivudine, a nucleoside/nucleotide analogue and antiretroviral to improve the outcome of cancer and COVID-19 patients [J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 664794.
- [5] PANDEY P, KHAN F, RANA A K, *et al.* A drug repurposing approach towards elucidating the potential of flavonoids as COVID-19 spike protein inhibitors [J]. Biointerface Research in Applied Chemistry, 2021, 11(1): 8482-8501.
- [6] TOOR H G, BANERJEE D I, RATH S L, *et al.* Computational drug re-purposing targeting the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 as an effective strategy to neutralize COVID-19 [J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 890: 173720.
- [7] HEIDARY F, MADANI S, GHAREBAGHI R, *et al.* Acyclovir as a potential add-on treatment for COVID-19: a narrative review [J]. SSRN Electronic Journal, 2021. DOI: 10.2139/ssrn.3767875.
- [8] DEY S K, SAINI M, DHEMBLA C, *et al.* Suramin, penciclovir, and anidulafungin exhibit potential in the treatment of COVID-19 via binding to nsp12 of SARS-CoV-2 [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021. DOI: 10.1080/07391102.2021.2000498.
- [9] JUNG B H, REZK N L, BRIDGES A S, *et al.* Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Biomedical Chromatography, 2007, 21(10): 1095-1104.
- [10] ACQUAVIA M A, FOTI L, PASCALE R, *et al.* Detection and quantification of COVID-19 antiviral drugs in biological fluids and tissues [J]. Talanta, 2021, 224: 121862.

作者简介: 侯云鹤(1998-), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生在读, 主要研究方向为水污染处理。

E-mail: houyunnelyx@163.com

收稿日期: 2022-02-27

修回日期: 2022-04-19

(编辑: 孔红春)