

LC-MS/MS 法测定饲料中尼卡巴嗪残留量

LCMSMS-689

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用系统建立了一种测定饲料中尼卡巴嗪残留量的方法。该方法可以在 8 min 内完成样品的分析检测，尼卡巴嗪在 0.04~50 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.9996，各校准点准确度为 97.1~106.0，所有组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.055~0.075% 和 0.656~1.339% 之间，加标回收率在 87.3%~98.8% 之间。尼卡巴嗪残留物的 LOD 为 0.01 ng/mL，LOQ 为 0.02 ng/mL，满足 GB/T 19423-2020《饲料中尼卡巴嗪的测定 液相色谱 - 质谱联用法》规定要求。该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快，满足饲料中尼卡巴嗪残留物的定性定量分析。

关键词： 三重四极杆串联质谱 饲料 尼卡巴嗪

尼卡巴嗪 (Nicarbazin, NIC) 属于化学合成类抗球虫药，被广泛应用于鸡类养殖中。它是由 4, 4-二硝基苯脲 (DNC) 和 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶 (HDP) 两类物质按 1: 1 比例组成的混合物。HDP 在动物体内由尿液排出，代谢迅速；而 DNC 通过粪便排出，代谢缓慢，会在肌肉及其他组织中会出现不同程度的残留，人食用该食物后会产生潜在危害。联合国粮农组织以及新西兰、日本和我国等均以 DNC 单体作为尼卡巴嗪的残留标识物。

近年来，NIC 残留问题高发，严重威胁动物源性食品安全和消费者生命健康安全。2020 年我国农业农村部印发的《2019 年动物及动物产品兽药残留

监控计划》中表明，NIC 残留存在超标现象，且其被检阳性率还在逐年上升，因此，加强对此类药物的残留监控十分必要。

目前，针对饲料中 NIC 分析方法主要包括仪器分析方法 (HPLC 和 LC-MS/MS) 和免疫分析方法 (酶联免疫检测法、流式细胞术等)。其中，仪器分析方法作为确证方法，具有特异性高、灵敏度高、结果可靠的优点。本文参考 GB/T 19423-2020《饲料中尼卡巴嗪的测定 液相色谱 - 质谱联用法》，灵敏度、重复性和准确度均满足国标要求，可为尼卡巴嗪的安全使用、监督和检测提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

输液泵：LC-30AD×2

脱气机：DGU-20A_{SR}

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

系统控制器：CBM-20A

检测器：LCMS-8050 三重四极杆质谱仪

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.7 μm, P/N: 227-32009-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 - 水, B 相 - 乙腈

进样体积：5 μL

流速：0.3 mL/min

柱温：30℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	40
2.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.50	Pumps	Pump B Conc.	80
4.60	Pumps	Pump B Conc.	40
8.00	Controller	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI (-)

接口温度：300°C

接口电压：-2.1 kV

DL 温度：250°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热块温度：400°C

干燥气：氮气 10.0 L/min

扫描模式：MRM

加热气：空气 10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 优化参数

中文名	英文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
尼卡巴嗪	Nicarbazin	330-95-0	300.9>137.05*	15	14	15
			300.9>107.05	22	32	21

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理

1.3.1 提取

称取混合饲料试样 2 g，精确至 0.001 g，于 50 mL 离心管中，准确加入 25 mL 提取溶液，涡旋混匀 1 min，超声提取 20 min，每隔 5 min 充分振荡一次。于 8000 r/min 离心 5 min。取上清液于 100 mL 容量瓶中，残渣用 25 mL 提取溶液重复提取一次，合并两次提取液，并用提取溶液定容至刻度，混匀。准确移取 2 mL 提取液于 15 mL 离心管中，加入 0.1 mL 氢氧化钠溶液（0.2 mol/L），涡旋混匀后，得到试样待净化溶液，备用。

1.3.2 净化

Max 固相萃取小柱先用 3 mL 提取溶液预淋洗。将 1.3.1 得到的试样待净化溶液全部过柱，抽干，准确加入 5 mL 4% 甲酸乙腈溶液洗脱，收集洗脱液，准确移取洗脱液 2 mL，用乙腈定容至 10 mL，混匀后过 0.22 μm 微孔滤膜，得到试样溶液，用液相色谱 - 串联质谱测定。

1.4 标准品与试剂

标准储备溶液：液标（100 μg/mL）购于上海安谱，于 -20°C 冰箱保存，备用；

提取溶液：甲醇 - 乙腈溶液（50:50，v/v）；

氢氧化钠溶液（0.2 mol/L）：准确量取 0.8g 氢氧化钠，用水稀释并定容至 100 mL，混匀；

4% 甲酸乙腈溶液：准确量取 4mL 甲酸，用乙腈稀释并定容至 100 mL，混匀；

净化萃取装置：Max 固相萃取小柱（60 mg/3mL，购于岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-00854-01）。

1.5 标准溶液配制

标准中间溶液：将标准储备溶液用乙腈溶解稀释成 10 μg/mL；

标准工作溶液：将标准中间溶液用乙腈溶解稀释成 1 μg/mL；

基质匹配标准系列溶液：取适量标准工作溶液，以空白基质溶液进行稀释，配制质量浓度分别为 0.04 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 基质匹配标准系列溶液，待测，临用现配。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液 MRM 色谱图

按照 1.2 分析条件，分析浓度为 0.04 ng/mL（定量限）的饲料基质标准溶液，色谱图如图 1 所示。

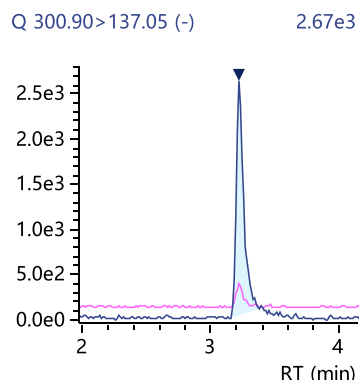


图 1 饲料基质中尼卡巴嗪标准溶液色谱图

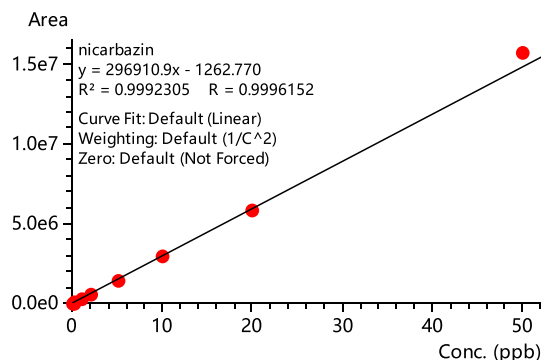


图 2 尼卡巴嗪校准曲线

2.2 线性范围和灵敏度

将不同浓度的基质匹配标准系列溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，所有化合物均采用外标法定量，以标准系列溶液中尼卡巴嗪的质量浓度 (ng/mL) 为横坐标，以其对应的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线。结果如图 2 所示，尼卡巴嗪在 0.04~50 ng/mL 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.9996，具体结果见表 2。

表 2 校准曲线参数

化合物	标准曲线	相关系数 r	准确度 (%)	线性范围 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
尼卡巴嗪	Y=296911X-1262.77	0.9996	97.1~106.0	0.04~50	0.01	0.02

2.3 精密度实验

将浓度分别为 0.1 ng/mL、2 ng/mL 和 50 ng/mL 的基质匹配标准溶液参照分析条件连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.055~0.075% 和 0.656~1.339% 之间，仪器精密度良好，完全满足国标要求。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	RSD% (0.1 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
尼卡巴嗪	0.072	1.339	0.055	0.656	0.075	0.973

2.4 样品测试和加标回收实验

按照 1.3 中样品前处理方法对某混合饲料进行处理，上机分析，该饲料样品中未检测到尼卡巴嗪残留。对空白样品进行加标回收实验，加标量为 0.05、1、25 mg/kg，按照 1.2 分析条件进行测试，重复实验 3 次，计算平均回收率。饲料空白基质和基质前加标色谱图如下图 4 所示。计算结果显示，尼卡巴嗪的平均回收率在 87.3%~98.8% 之间，回收率良好，具体结果见表 4。

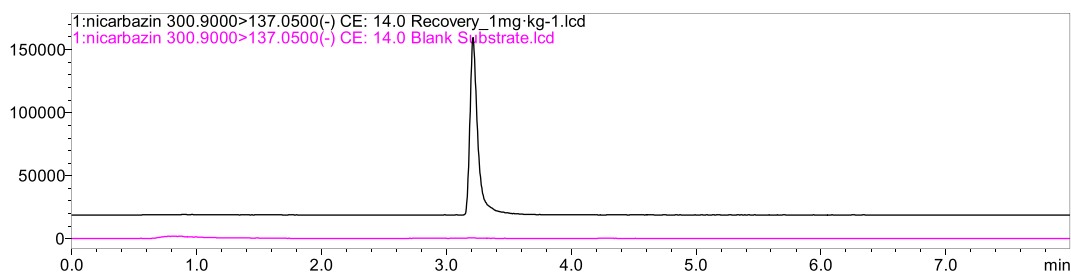


图3 饲料空白基质和基质前加标色谱图 (1 mg/kg)

表4 回收率结果 (n=3)

化合物名称	样品中浓度 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	平均加标回收率 (%)
尼卡巴嗪	N.D.	0.05	87.3
		1	98.8
		25	92.4

N.D. 表示未检出

■ 结论

本文参照 GB/T 19423-2020, 采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了饲料中尼卡巴嗪的定量分析方法。结果表明, 尼卡巴嗪在 0.04~50 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系, 线性相关系数大于 0.9996, 准确度在 97.1~106.0%, 且检出限和定量限 (LOD 为 0.01 ng/mL, LOQ 为 0.02 ng/mL) 均低于国标规定值, 体现了 LCMS-8050 的高灵敏度。选 0.1、2 和 50 ng/mL 三个浓度水平, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.055~0.075% 和 0.656~1.339% 之间, 系统精密度良好。同时考察了空白饲料基质加标, 回收率在 87.3%~98.8% 之间。该方法准确可靠, 灵敏度高, 重现性强, 完全满足食品安全国家标准 GB/T 19423-2020 的检测需求, 可供相关人员参考。

岛津应用云

