

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 的含量

LCMSMS-140

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 4,4'-二硝基苯缩脲 (DNC) 残留量的方法。鸡肉和鸡蛋中残留的 DNC 经乙腈提取，正己烷除脂，75% 甲醇水溶液萃取，超高效液相色谱三重四极杆质谱仪进行测定，内标法定量。样品在 0.2~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好；对 1 ng/mL 标准溶液连续 6 次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.13% 和 2.10%。方法回收率好，在鸡肉和鸡蛋中 DNC 加标浓度为 1 µg/kg 和 10 µg/kg 时，回收率在 89.6%~109.9% 之间。

关键词：尼卡巴嗪 4,4'-二硝基苯缩脲超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪

尼卡巴嗪 (Nicarbazine) 作为一种抗球虫药，常用于禽饲料药物添加剂，具有较强的球虫病防治作用。尼卡巴嗪由 4,4'-二硝基苯缩脲 (DNC) 与 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶 (HDP) 以等物质的量包合而成。尼卡巴嗪复合物中的 HDP 成分在动物体内可迅速排出体外，而抗球虫活性成分 DNC 通过粪便排泄较缓慢，因此，国内外均规定尼卡巴嗪在禽组织中的残留标识物为 DNC。

近年来，美国食品与药品管理局公布禁止在进口动物源性食品中使用尼卡巴嗪。继美国之后，日本对中国的动物源性食品限定尼卡巴嗪药物也提出了最高限量。为此，尼卡巴嗪药残目前已被列为我国禽肉出口检验的重要内容之一。

本文建立了 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 4,4'-二硝基苯缩脲 (DNC) 残留量的方法。该方法具有操作简单、快速、可靠、准确等特点。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53

色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS
(3.0 mm I.D. × 75 mm L., 2.2 µm)

流动相：0.1 mol/L 乙酸铵：乙腈 = 25：75 (V/V)；

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 µL

柱温：30°C

洗脱方式：等度洗脱

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：-3.5kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：450°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

MRM 参数：见表 1

表1 MRM参数

| 编号 | 英文名称 | 缩写 | 化合物名称 | CAS No. | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bais(V) | CE (V) | Q3 Pre Bais(V) |
|----|-------------------------------|--------|-----------------|--------------|-------|-----------------|----------------|--------------|----------------|
| 1 | 1,3-Bis(4-nitrophenyl)urea | DNC | 4,4'-二硝基均二苯脲 | 587-90-6 | 301.1 | 137.1* 107.1 | 21.0 | 11.0 36.0 | 24.0 18.0 |
| 2 | 1,3-Bis(4-nitrophenyl)urea-D8 | DNC-D8 | 4,4'-二硝基均二苯脲-D8 | 1156508-87-0 | 309.2 | 141.1 | 11.0 | 11.0 | 25.0 |

*表示定量离子

1.3 样品前处理方法

称取试样 (2 0.02) g, 于 50 mL 离心管中, 添加 50 ng/mL DNC-D8 标准工作液 20 μ L, 加无水硫酸钠 2g, 乙腈 8 mL, 涡旋 0.5 min, 超声 5 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于 40 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加 75% 甲醇水溶液饱和的正己烷 1 mL, 涡旋 10 min, 再加 75% 甲醇水溶液 1 mL, 充分涡旋混合, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中静置 5 min, 2000 r/min 离心 5 min, 取下层清液, 滤膜过滤, 供液相色谱 - 串联质谱测定。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

0.2 ng/mL 标准样品的 MRM 色谱图如图 1 所示。

2.2 线性关系

配制 6 个不同浓度的标准溶液, DNC 的浓度分别为 0.2, 2, 5, 10, 20 和 50 ng/mL, DNC-D8 浓度为 1 ng/mL, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标制作内标法标准曲线。具体见图 2。DNC 在检测浓度范围内线性关系良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 2。

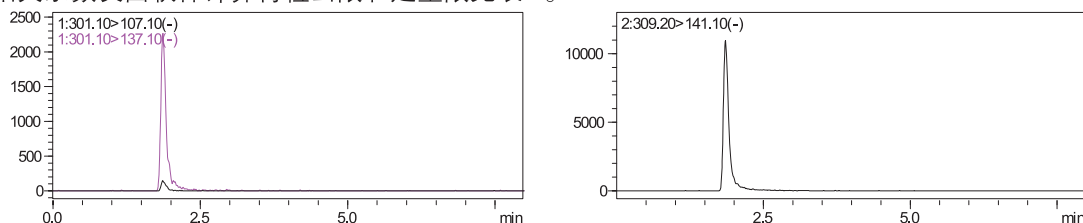


图1 标准样品的MRM图 (DNC 0.2 ng/mL, DNC-D8 1 ng/mL)

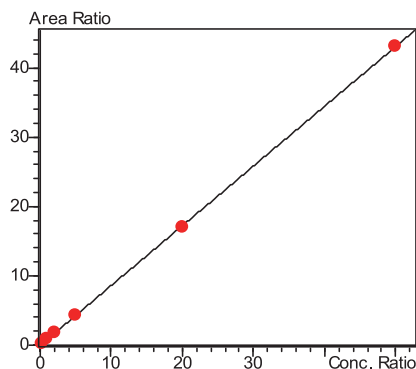


图2 DNC的标准工作曲线

表2 校准曲线参数

| No. | 名称 | 校准曲线 | 相关系数 r^2 | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
|-----|-----|-------------------------|------------|------------|------------|
| 1 | DNC | $Y = (0.86)X + (-0.01)$ | 0.9999 | 0.08 | 0.26 |

2.3 精密度实验

对标准溶液 (DNC 1 ng/mL, DNC-D8 1 ng/mL) 连续 6 次进样, 保留时间和峰面积比的相对标准偏差分别为 0.13% 和 2.10%, 仪器精密度良好。

表3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

| ID | Ret. Time (min) | Area Ratio |
|------|-----------------|------------|
| 1 | 1.861 | 0.828 |
| 2 | 1.859 | 0.853 |
| 3 | 1.857 | 0.838 |
| 4 | 1.862 | 0.814 |
| 5 | 1.860 | 0.815 |
| 6 | 1.856 | 0.853 |
| RSD% | 0.131 | 2.104 |

2.4 回收率考察

在鸡肉和鸡蛋中加入标准溶液, DNC 的加标浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DNC-D8 的加标浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 按 1.3 前处理方法进行处理, 得到空白鸡肉及加标样品色谱图如图 3~4 所示。各浓度平行处理 6 次, 加标回收率结果见表 4。

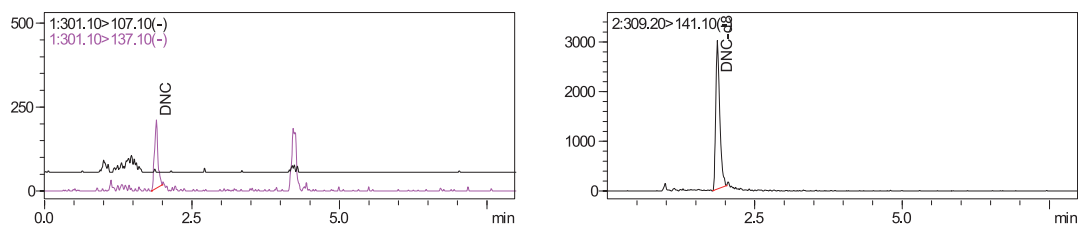


图3 空白鸡肉MRM图 (DNC-D80.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

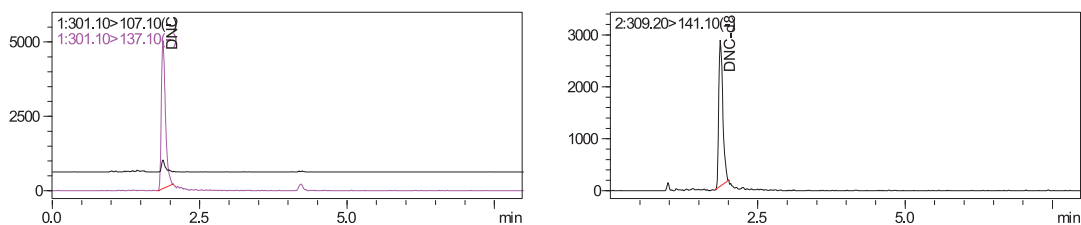


图4 鸡肉加标MRM图 (加标浓度: DNC 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DNC-D80.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

表4 回收率结果 (n=6)

| 样品 | 鸡蛋 | | 鸡肉 | |
|---------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| 回收率 (%) | 102.2 \pm 7.7 | 95.2 5.6 | 102.8 4.9 | 94.9 \pm 2.5 |

2.5 实际样品分析

分析市场中鸡蛋及鸡肉中 DNC 的含量, 具体结果见表 5。图 5 为某品牌鸡蛋的 MRM 图。

表5 实际样品分析结果

| 样品 | 鸡蛋 | 鸡肉 |
|-------------------------------|------|------|
| 浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 0.23 | 0.09 |

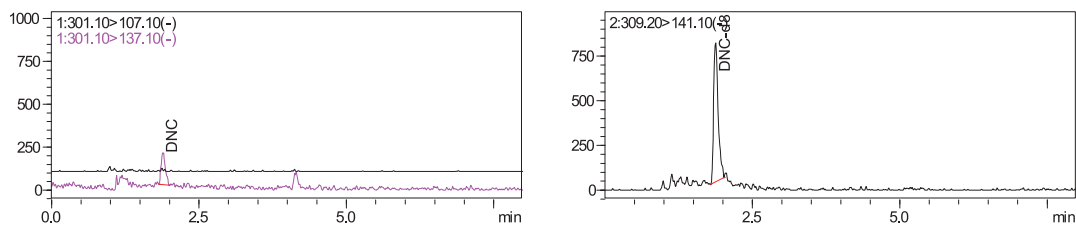


图5 某品牌鸡蛋的MRM图

■ 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定鸡蛋和鸡肉中尼卡巴嗪残留标志物 4,4-二硝基苯缩脲残留量的方法。DNC 在 0.2~50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好；对标准溶液连续 6 次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.13% 和 2.10%，仪器精密度良好；鸡蛋和鸡肉在加标浓度为 1 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，回收率在 89.6%~109.9% 之间，可准确用于动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物 4,4-二硝基苯缩脲残留量的检测。