

禽类产品及饲料中尼卡巴嗪药物检测 分析方法研究进展

尹永康[§], 王晓亮[§], 崔艳丽, 梁 晓*

(青岛农业大学动物医学院, 青岛 266109)

摘 要: 尼卡巴嗪(nicarbazin, NIC)是一类由 4,4'-二硝基苯胺(4,4'-dinitrocarbanilide, DNC)和 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶(2-hydroxyl-4,6-dimethylpyrimidine, HDP)组成的等分子复合物,其中 DNC 为其残留标志物。NIC 因安全高效被广泛应用于鸡和火鸡等禽类球虫病防治。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。目前,针对禽类产品和饲料中 NIC 分析方法主要包括仪器分析方法和免疫分析方法两大类。其中,仪器分析方法作为确证方法,具有高特异性、高灵敏度、结果可靠的优点,主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)等。免疫分析方法是 NIC 快速检测方法的主流技术,具有速度快、成本低、实用性强的优点,主要包括酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫层析方法(immunochromatography, IC)、表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、荧光免疫检测法(fluorescent immunoassay, FIA)和流式细胞术(flow cytometry, FCM)等。笔者综述了近 40 年来国内外禽类产品和饲料中 NIC 的检测分析方法,以期对 NIC 残留监控提供理论和实践指导依据。

关键词: 尼卡巴嗪;检测分析;禽类产品;饲料;仪器分析法;免疫分析法

中图分类号: S859

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2021.12.041

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research Progress on the Detection and Analysis Methods of Nicarbazine in Poultry Products and Feed

YIN Yongkang[§], WANG Xiaoliang[§], CUI Yanli, LIANG Xiao*

(College of Animal Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Nicarbazin (NIC) is a class of compounds composed of 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC) and 2-hydroxyl-4,6-dimethylpyrimidine (HDP), in which DNC is its residual marker. NIC is widely used in coccidiosis control of chickens and turkeys due to its safety and high efficiency. In recent years, its residue problem was high, which seriously threatened the safety of animal derived food and the safety of consumers' life and health. At present, the analysis methods for NIC in poultry products and feed mainly include instrumental analysis methods and immunoassay methods. Among them, instrumental analysis methods, as confirmatory methods, have the advantages of high specificity, high sensitivity and reliable results, mainly including high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography tandem mass

修回日期: 2021-09-01

基金项目: 基于二氢叶酸还原酶的磺胺增效剂类药物多残留快速检测分析研究(6631115026); 鸡肉中尼卡巴嗪荧光偏振免疫分析检测技术研究(201910435026)

作者简介: 尹永康(1997-), 男, 山东临沂人, 硕士, 研究方向: 兽医药理与毒理学, E-mail: 1758456718@qq.com

王晓亮(1999-), 男, 山东潍坊人, 本科, 研究方向: 动物药理学, E-mail: 229071486@qq.com

尹永康与王晓亮对本文具有同等贡献, 并列为第一作者

* 通信作者: 梁 晓(1987-), 女, 山东青岛人, 博士, 讲师, 研究方向: 兽医药理与毒理学, E-mail: liangxiao4000@163.com

spectrometry (LC-MS/MS). Immunoassay is the mainstream technology for rapid detection of NIC, which has the advantages of high inspection speed, low cost and strong practicability. It mainly includes enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunochromatography (IC), surface plasmon resonance (SPR), fluorescent immunoassay (FIA) and flow cytometry (FCM) etc. This paper summarized the detection and analysis methods of NIC in poultry products and feed at home and abroad in recent 40 years, so as to provide theoretical and practical guidance for NIC residue monitoring.

Key words: nicarbazine; detection and analysis; poultry products; feed; instrumental analysis methods; immunoassays

球虫病是禽类养殖业中一种常见且危害极大的寄生虫病,可导致禽类生产性能严重下降,目前控制该病的主要方法是在饲料中添加各种抗球虫药。尼卡巴嗪(nicarbazin, NIC)属于化学合成类抗球虫药,具有广谱、高效、性能稳定的特点,被广泛应用于鸡和火鸡等禽类养殖中。NIC 是 4,4'-二硝基苯脲(4,4-dinitrocarbanilide, DNC)和 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶(2-hydroxyl-4,6-dimethylpyrimidine, HDP)的复合物,DNC 是 NIC 发挥抗球虫效果的主要活性成分,且在鸡体内的排泄速度慢于 HDP,因此,将 DNC 作为 NIC 的残留标志物^[1]。

中国农业农村部、卫健委和国家市场监管总局在 2019 年公告《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》中规定,NIC 在各种可食用鸡组织(肌肉、皮、脂肪、肝脏和肾脏)中的最高残留限量(maximum residue limit, MRL)为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2],部分欧盟国家规定 NIC 在进口动物源食品中禁止检出,日本动物源性食品标准中明确规定水产品中 NIC 的 MRL 为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。2020 年中华人民共和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》通知中数据表明,NIC 残留存在超标现象^[4],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。近几年,国内外针对禽类产品及饲料中 NIC 的检测方法日益增多。笔者对国内外报道的禽类产品及饲料中 NIC 检测方法进行综述,主要包括仪器分析法和免疫分析法,以期为此类药物残留监控提供方法参考,保障动物源性食品安全。

1 仪器分析法

仪器分析法是指使用特殊仪器进行检测分析的方法。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)是 NIC 检测分析中应用最广泛的仪器

分析方法。其中 LC-MS/MS 主要包括高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)、超高效液相色谱-串联质谱(ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)等。此外,差示脉冲极谱法、比色法和分光光度测定法也曾用于 NIC 的分析检测,但随着更多高效检测技术的建立,已逐渐被代替。

1.1 液相色谱法

液相色谱法(performance liquid chromatography, LC)是指液体携带的化学混合物在固定液体周围或上方流动时,由于溶质分布不均匀而被分离成不同组分的一种定量仪器分析方法。NIC 的 LC 方法检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,该方法准确度不高,添加回收率低于 90%,与 HPLC 方法相比,LC 方法柱效低且分离能力较差。经典的 LC 方法基本不用于检测分析,自 2003 年鲜有关于采用 LC 法检测禽类产品及饲料中 NIC 的报道。HPLC 方法是在经典 LC 方法基础上进行了改进,使用高压流动相,极大提高了色谱柱效及分离能力。21 世纪初,HPLC 方法一般采用紫外检测器(ultraviolet detector, UVD)或荧光检测器(fluorescence detector, FLD)进行定量检测,方法灵敏度和准确度较同时期 LC 方法有所提高,灵敏度可达到 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。研究人员采用有机溶剂萃取、氧化铝柱层析法净化或过滤的方式对样品基质包括牛奶、鸡蛋、家禽肝脏和肉等进行前处理,这种方式可使药物残留与食品基质得到有效分离,但处理过程繁琐,需大量有机试剂(每个样品需约 100 mL 有机试剂),且处理效率低。

1.1.1 UVD 检测器 UVD 检测法具有灵敏度高、稳定性好、抗干扰能力强、准确度高和适用范围较广的优势。NIC 因具有很强的紫外吸收特性,可直接用于 UVD 测定,高效的样品前处理方式配合样品无需衍生化过程,可有效地提高检测灵敏度。

1987 年,Knupp 等^[5]建立 HPLC 方法检测 54 份样品(包括牛奶、鸡蛋和肉)中 NIC 残留,采用有机试剂萃取后过滤的方式对样品进行前处理,方法检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但添加回收率仅为 30%~40%。该样品前处理方法使用大量有机试剂、耗时且提取和净化效果差,是造成药物添加回收率低的主要原因,限制了 HPLC 的应用。采用固相萃取(solid phase extraction, SPE)方法对样品进行前处理,可有效降低有机试剂的使用量,减少样品前处理时间并提高药物添加回收率,开启了 HPLC 检测方法的新纪元。1989 年,Vertommen 等^[6]采用 HPLC 方法检测鸡蛋中 NIC 残留,首次使用 SPE 法对含有 NIC 残留的样品进行前处理,UV 在波长 343 nm 处检测该方法检测限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 88.2%~116.4%,使用该方法有效提高了 HPLC 方法的检测效率和准确度。2001 年,Primus 等^[7]建立 HPLC 方法检测鸡、鸭、鹅血浆中的 NIC 残留,前处理过程中每个样品有机试剂的使用量仅为 200 μL ,前处理时间仅 5 min,降低了有机试剂的使用量、提高了检测效率,该方法于波长 347 nm 处检测限为 27~35 $\mu\text{g}/\text{mL}$,添加回收率为 97.7%~101.4%。

1.1.2 FLD 检测器 FLD 检测器灵敏度较 UVD 检测器更高,具有良好的选择性,但需进行药物衍生化,且对通常发生在荧光测量中的一些干扰非常敏感,因此应用范围窄,不经常应用于 NIC 检测。2015 年,Protasiuk 等^[8]开发了一种高性能 HPLC 分析方法,采用 FLD 检测器检测饲料中 NIC 含量,该方法检测限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 98.3%~111%。抗球虫药物包括离子载体和化学合成两大类,与多数兽药相比,抗球虫药物较难从鸡蛋中分离,且没有适用于多种抗球虫药物的提取程序^[9],因此关于禽类产品及饲料中抗球虫药物多残留检测的报道并不多。2003 年,Anastassiades 等^[10]提出 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)方法,可同时提取样品中多种残留兽药,是目前应用较为广泛的样品前处理方法。2020 年,Silva 等^[9]优化 QuEChERS 前处理方法,建立高效液相色谱-紫外/荧光法(high performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence method, HPLC-UV/FL)同时检测鸡肝脏中地克珠利、NIC 和拉沙洛西 3 种抗球虫药物。该方法中 3 种药物的检测限分别为 20、15 和 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 91%。简便、节省时间、节省溶剂的样品前处理方法为 HPLC 方法检测效率、灵敏度和回收率的提高奠定了基础。

1.2 LC-MS/MS 方法

LC-MS/MS 方法是一种具有高选择性和灵敏度的定性和定量分析技术,主要包括 HPLC-MS/MS 和 UPLC-MS/MS 检测方法,具有高分离度、高速度、高精度度和高灵敏度的优势。随着 LC-MS/MS 法成为理想的残留确证方法,研究人员常采用该方法对包括 NIC 药物在内的多种兽药残留进行确证分析。与常规 HPLC-UV 或 HPLC-FL 相比,LC-MS/MS 方法具有样品前处理时间和色谱分析时间短的优势。

利用 HPLC-MS/MS 检测兽药残留时,需对复杂基质中的样品进行电离,对样品前处理要求较高。2017 年,Barreto 等^[11]建立的 HPLC-MS/MS 方法可检测鸡肉和鸡蛋中 14 种抗球虫药物残留,采用乙腈、低温清理的方式对样品进行前处理。该方法 NIC 在鸡肉中检测限和定量限分别为 55.51 和 61.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在鸡蛋中检测限和定量限分别为 12.3 和 13.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 102.45%~107.28%。目前,HPLC-MS/MS 方法是检测 NIC 残留较为成熟的方法,采用合适的样品前处理法可同时检测食品基质中 100 多种 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的药物残留,满足多残留分析检测的基本要求。

UPLC-MS/MS 检测方法集高效分离和结构鉴定于一体,具有高分离度、高速度、高精度度和高灵敏度的优势,且该方法最低浓度检出水平可达到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。此方法逐渐代替 HPLC-MS/MS 法,研究人员多使用该方法用于兽药多残留的确证分析。2015 年,Muharem 等^[12]将高分辨质谱仪与快速前处理方法相结合,建立了 UPLC-MS/MS 法测定鸡肉中包括 NIC 在内的 6 种抗球虫药物残留,其中 NIC 定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 67.7%~126.8%,相对标准偏差(RSD) $\leq 10.4\%$ 。2020 年,金晓峰等^[13]建立 UPLC-MS/MS 法,检测鸡蛋中包括 NIC 在内的 8 种兽药残留,其中 NIC 的检测限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加回收率为 91.8%~109.0%,批内相对标准偏差为 2.6%~3.8%,批间相对标准偏差为 4.1%~9.6%。UPLC-MS/MS 方法顺应当前兽药残留快速、简便、准确、高通量检测的发展趋势,在保证兽药残留检测方法性能标准要求的灵敏度、准确度和精密度的同时,有效提高试验效率,对畜禽产品质量安全监测监管具有重要意义。

2 免疫分析方法

基于抗原-抗体特异性识别的免疫分析是兽药快速检测分析的主流技术。该方法具有高特异性、

高灵敏度、快速和低成本的优点,无需复杂的样本提取及净化步骤,适用于大量样本的药物检测分析。目前,用于 NIC 药物检测的免疫分析方法主要包括酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫层析方法(immunochromatography, IC)、表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、荧光免疫检测法(fluorescent immunoassay, FIA)和流式细胞术(flow cytometry, FCM)等。

2.1 ELISA 检测方法

ELISA 方法是目前应用最广泛的免疫分析方法。在免疫分析方法中,抗体是决定方法灵敏度和特异性的核心试剂。NIC 属于小分子化合物,只有反应原性而无免疫原性,无法直接免疫动物产生抗体。将 NIC 化学衍生物与载体蛋白偶联制备免疫原,免疫动物后可产生特异性抗体。免疫原的制备过程中可能会导致功能基团或结构特性的缺失,从而影响抗体的亲和力和特异性。因此,在免疫分析方法中,半抗原的设计与免疫原的制备尤为重要。2001 年,Beier 等^[14]在计算机辅助分子建模研究的基础上合理设计并制备 DNC 半抗原,获得 DNC 单克隆抗体,建立 ELISA 方法检测 NIC 残留,该方法的检测限为 0.33 nmol/mL,与 15 种 DNC 化学结构类似物无交叉反应。2002 年,Connolly 等^[15]采用 3 种 DNC 半抗原制备免疫原,获得 5 种 DNC 多克隆抗体,建立竞争 ELISA 方法检测 NIC 残留,半数抑制浓度(IC₅₀)值为 2.3~7.6 ng/mL。2018 年,唐倩倩^[16]设计合成 5 种新型半抗原,制备 8 株 DNC 单克隆抗体,建立鸡肉中 NIC 检测的间接竞争 ELISA 方法,方法的 IC₅₀值为 0.19 ng/mL,线性检测范围为 0.06~0.61 ng/mL,该方法与其他抗球虫药及 DNC 结构类似物均无明显交叉反应,在鸡肉中的添加回收率为 94.8%~112.0%,变异系数为 6.3%~10.5%。ELISA 方法具有能大批处理样品等实用性强的优点,但其是非均相检测方法,操作过程中需进行多次分离和洗涤,费时长、难以实现自动化且易受到其他因素干扰导致结果出现假阳性,仍需继续完善。

2.2 FIA 检测法

FIA 检测法是指以荧光物质或潜荧光物质作为标记物,根据标记物荧光产生方式的不同可分为荧光偏振免疫测定法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)、荧光淬灭增强免疫测定法(fluorescence quenching enhanced immunoassay)、时间分辨荧光免疫测定法(time resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)。2004 年,Hagren 等^[17]测定禽蛋和肝脏

中的 NIC 残留,建立 TRFIA 进行检测分析,该方法在鸡蛋和肝脏中 DNC 的检测限分别为 3.2 和 11.3 $\mu\text{g/kg}$,样品回收率高达 97.3%~115.6%,批内变异系数 $<10\%$,批间变异系数为 8.1%~13.6%之间。2021 年,Zhang 等^[18]建立 FPIA 检测鸡肉中 NIC 药物残留,方法的检测限为 5.7 ng/mL,在鸡肉中的添加回收率为 74.2%~85.8%,包括样品前处理在内的检测时间总共为 40 min。FIA 分析方法具有检测快速、灵敏度高、操作简便、成本较低等优点,常作为高通量筛选方法,但荧光标记物可能对环境造成放射性污染,需要不断改进。

2.3 生物传感器检测法

生物传感器(biosensor)以生物材料为敏感识别元件(包括抗原、抗体、酶等生物活性物质),把生物活性表达的信号转换为电信号的物理或化学测定装置,具有灵敏、快速、简便和适用于现场监控的特点。2003 年,McCarney 等^[19]采用 SPR 生物传感器法检测鸡蛋和禽肝脏中 NIC 药物残留,DNC 在鸡蛋和肝脏中的检测限分别为 19 和 17 $\mu\text{g/kg}$ 。2008 年,Danaher 等^[20]采用生物传感器法对鸡蛋和肝脏样本中 NIC 残留进行检测筛选,肝脏中 NIC 的检测限和定量限分别为 17.1 和 33.2 $\mu\text{g/kg}$,鸡蛋中的检测限和定量限分别为 18.9 和 34.8 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4 IC 检测方法

IC 检测技术是一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的快速免疫分析方法。主要包括胶体金技术、荧光素标记免疫层析技术、量子点标记技术、上转发光技术等,该方法操作简便、稳定性高、前处理简单、不需进行结合标记物与游离标记物的分离,省去了繁琐的加样和洗涤步骤,短时间(5~10 min)便可得到直观的试验结果。2018 年,Wu 等^[21]制备 DNC 单克隆抗体,建立胶体金免疫层析方法检测牛奶中 NIC,其 IC₅₀值为 3.4 ng/mL,其在缓冲液中的检测限为 10 ng/mL,在牛奶中的检测限为 100 ng/mL。

2.5 FCM 检测法

FCM 是利用流式细胞仪进行定性及定量分析的一种标准实验室工具,该方法降低对样品数量的要求且荧光重叠的干扰低,但由于其灵敏度存在局限性,很少用于 NIC 的检测分析。2012 年,Bienenmann-ploum 等^[22]用多重流式细胞免疫分析方法检测饲料和鸡蛋中的多种抗球虫药,鸡蛋中 NIC 的检测限为 53 $\mu\text{g/kg}$,饲料中 NIC 的检测限为 9 $\mu\text{g/kg}$ 。

禽类产品及饲料中 NIC 药物检测方法汇总信息见表 1。

表 1 禽类产品及饲料中 NIC 药物检测方法汇总表

Table 1 Summary information of detection methods for NIC drug in poultry products and feed

方法 Methods	样品 Samples	检测药物 Medicines	检测限 LOD	回收率 Recovery/%	参考文献 References
HPLC	鸡蛋、组织	DNC	1 000 μg/kg	—	Knupp 等 ^[5]
HPLC	蛋类和肉类中 54 种不同物质	DNC	5 μg/kg	—	Vertommen 等 ^[6]
HPLC	鸡血浆、鸭血浆、鹅血浆	DNC	27~35 μg/mL	99.7、99.5、101.4	Primus 等 ^[7]
HPLC	饲料	DNC	50 μg/kg	98.3~111	Protasiuk 等 ^[8]
HPLC	鸡肝脏	DNC 等 3 种	15 μg/kg	91	Silva 等 ^[9]
HPLC	鸡肝脏、肌肉	DNC	—	87.4、87.1	Leadbetter 等 ^[23]
HPLC	饲料	DNC	1 000 μg/kg	95	Dusi 等 ^[24]
HPLC	饲料	DNC	250 μg/kg	91~108	Krabel 等 ^[25]
HPLC	鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋	DNC	0.015~0.035 μg/g	92、88、87	Primus 等 ^[26]
HPLC	饲料	DNC	400~2 000 μg/kg	91~108	Jong 等 ^[27]
HPLC	饲料、鸡蛋和组织	DNC	0.4 μg/g	98、100、99	Matabudul 等 ^[28]
HPLC	鸡蛋	DNC	0.005 μg/mL	90.2	Kondo 等 ^[29]
HPLC	鸭血浆	DNC	—	91~97	Stahl 等 ^[30]
HPLC	鸡蛋壳	DNC	0.189 μg/g	—	Stahl 等 ^[31]
HPLC	鸡肝脏	DNC	12.5 μg/kg	>70	Capurro 等 ^[32]
HPLC	鸡肝脏、饲料	DNC	100 μg/kg	95	O'keeffe 等 ^[33]
HPLC	鸡组织	DNC	20 μg/kg	80~110	祁冰等 ^[34]
HPLC	鸡组织	DNC、HDP	0.011 μg/mL、0.12 μg/mL	—	徐金雷等 ^[35]
HPLC	鸡皮、脂肪、肌肉、肝脏、肾脏	DNC	10 μg/kg	80.77~93.33	蒋永嘉等 ^[36]
HPLC-MS/MS	鸡肉、鸡蛋	DNC 等 14 种	55.51 和 12.3 μg/kg	—	Barreto 等 ^[11]
HPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC	10 μg/kg	—	Blanchflower 等 ^[37]
HPLC-MS/MS	饲料	DNC	—	88~101	Cannavan 等 ^[38]
HPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC	10 μg/kg	105.9	Cannavan 等 ^[39]
HPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC 等 5 种	1 μg/kg	92~118	Matabudul 等 ^[40]
HPLC-MS/MS	鸡肉	DNC 等 8 种	11~71 ng/L	—	Martinez-Villalba 等 ^[41]
HPLC-MS/MS	鸡蛋、肝脏	DNC	1.85 和 21.1 μg/kg	—	Bilandzic 等 ^[42]
HPLC-MS/MS	鸡肉	DNC	<3.0 μg/kg	93~99	Coleman 等 ^[43]
HPLC-MS/MS	家禽肌肉、肝脏	DNC 等 17 种	91 μg/kg	98	Matus 等 ^[44]

续表

方法 Methods	样品 Samples	检测药物 Medicines	检测限 LOD	回收率 Recovery/%	参考文献 References
HPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC	0.10 μg/kg	89.7~96.1	张宗明等 ^[45]
HPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC	18 μg/kg	—	Dmitrovic 等 ^[46]
HPLC-MS/MS	鸡肌肉	DNC	3.75 μg/kg	95~99	Lima 等 ^[47]
HPLC-MS/MS	鸡皮脂组织	DNC	2.5 μg/kg	98.10	侯婷等 ^[48]
UPLC-MS/MS	鸡肉	DNC 等 6 种	0.2~6 μg/L	67.7~126.8	Muharem 等 ^[12]
UPLC-MS/MS	鸡蛋	DNC	5.0 μg/kg	91.8~109.0	金晓峰等 ^[13]
UPLC-MS/MS	鸡肉	DNC	0.11 μg/kg	91.4~103.0	曹爱巧等 ^[49]
UPLC-MS/MS	鸡蛋、鸡肉	DNC	5.0 μg/kg	83.2~96.8	谭美玲等 ^[50]
ELISA	—	DNC	0.33 nmol/mL	—	Beier 等 ^[14]
ELISA	—	DNC	2.3~7.6 ng/mL	—	Connolly 等 ^[15]
ELISA	鸡肉	DNC	0.06~0.61 ng/mL	94.8~112.0	唐倩倩 ^[16]
ELISA	鸡蛋、鸡肉	DNC	<3 μg/kg、10 μg/kg	—	Huet 等 ^[51]
ELISA	鸡蛋	DNC	3 μg/kg	—	Gaudin 等 ^[52]
ELISA	鸡肉	DNC	9.2 μg/kg	49.4~118.0	王鹤佳等 ^[53]
FIA	鸡蛋、肝脏	DNC	3.2 和 11.3 μg/kg	97.3~115.6	Hagren 等 ^[17]
FIA	鸡肉	DNC	5.7 ng/mL	74.2~85.8	Zhang 等 ^[18]
Biosensor	鸡蛋、肝脏	DNC	19 和 17 μg/kg	—	McCarney 等 ^[19]
Biosensor	肝脏、鸡蛋	DNC	17.1 和 18.9 μg/kg	—	Danaher 等 ^[20]
FCM	鸡蛋、饲料	DNC	53 和 9 μg/kg	—	Bienenmann-ploum 等 ^[22]

—,无具体数据

—,No specific data

3 小 结

自 1950 年以来,NIC 在畜禽球虫病防治方面发挥重要作用。动物源食品中的 NIC 残留引发的食品安全问题越来越受到人们的关注,建立高效的检测分析方法可有效监控 NIC 残留,保障食品安全。目前,HPLC-MS/MS 是国内外应用最广泛的 NIC 残留检测确证方法,该方法具有高灵敏度、高特异性、高速度、高稳定性的优点,但是仪器设备昂贵、难以移动,导致检测成本较高,且检测样品前处理过程繁琐,不适用于大量样本的现场筛查,只适合在省部级以上和有条件的企业实验室使用。免疫分析方法具有耗费低、便携、快速、灵敏、易于操作等优点,适合乡镇级以上基层的检测机构,是目前 NIC 快速检测方法的主流技术,但该方法在现场快速筛查过程中常出现假阳性的问题。因此,迫切需要构建高灵敏的免疫层析技术平台和智能化新型样本前处理平台,进行兽药残留的监测,保证动物源性食品安全。同时,从根本上解决问题还需政府职能部门的政策引导,宣传普及合理用药知识,确保养殖户遵守休药期规定,不断提高人们的食品安全意识。

参考文献(References):

- [1] PORTER C C, GILFILLAN J L. The absorption and excretion of orally administered nicarbazin by chickens[J]. *Poultry Science*, 1955, 34(5): 995-1001.
- [2] 中华人民共和国农业农村部, 卫健委, 国家市场兼管总局. 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量: GB 31650—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL AFFAIRS, HEALTH COMMISSION, STATE ADMINISTRATION FOR MARKET REGULATION, PRC. National food safety standard maximum residue limit of veterinary drugs in food: GB 31650—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019. (in Chinese)
- [3] 曲志娜, 郭福生, 郑增忍, 等. 欧盟等国家和地区对动物源性食品中药残的若干规定[J]. 山东畜牧兽医, 2005, 5: 35-36.
QU Z N, GUO F S, ZHENG Z R, et al. The regulation of Chinese herbal residues in food of animal origin in EU and other countries and regions[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2005, 5: 35-36. (in Chinese)
- [4] 中华人民共和国农业农村部. 农业农村部办公厅关于 2019 年畜禽及蜂产品兽药残留监控结果的通报[EB/OL]. [2020-03-31]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202003/t20200331_6340273.htm.
- MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL AFFAIRS, PRC. Announcement of the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the monitoring results of veterinary drug residues in livestock, poultry and bee products in 2019[EB/OL]. [2020-03-31]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202003/t20200331_6340273.htm. (in Chinese)
- [5] KNUPP G, BUGL-KREICKMANN G, COMMICHAU C, et al. The determination of the coccidiostat nicarbazin in animal tissue and eggs. I. Determination by pulse polarography and high pressure fluid chromatography with electrochemical detection[J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1987, 185(6): 472-476.
- [6] VERTOMMEN M H, VAN DER LAAN A, VEENENDAAL-HESELMAN H M. High-performance liquid chromatographic screening method for low levels of nicarbazin in eggs with off-line cartridge sample clean-up[J]. *Journal of Chromatography A*, 1989, 481: 452-457.
- [7] PRIMUS T M, KOHLER D J, GOODALL M A, et al. Determination of 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC), the active component of the antifertility agent nicarbazin, in chicken, duck, and goose plasma[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(8): 3589-3593.
- [8] PROTASIUK E, OLEJNIK M, SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ T, et al. Determination of nicarbazin in animal feed by high-performance liquid chromatography with interlaboratory evaluation[J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(14): 2183-2194.
- [9] SILVA J M, AZCARATE F J, KNOBEL G, et al. Multiple response optimization of a QuEChERS extraction and HPLC analysis of diclazuril, nicarbazin and lasalocid in chicken liver[J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 126014.
- [10] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(2): 412-431.
- [11] BARRETO F, RIBEIRO C, HOFF R B, et al. A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS): Validation according to European Union

- 2002/657/EC[J]. *Talanta*, 2017, 168: 43-51.
- [12] MUHAREM M, YAN H, XU S, et al. Determination of six anticoccidials in chicken using QuEChERS combined with ultra high liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(11): 1199-1204.
- [13] 金晓峰, 焦仁刚, 赵 贵, 等. 通过式固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鸡蛋中的 8 种兽药残留[J]. *分析科学学报*, 2020, 36(6): 906-911.
- JIN X F, JIAO R G, ZHAO G, et al. Rapid determination of eight veterinary drug residues in eggs by solid phase extraction/ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Sciences*, 2020, 36(6): 906-911. (in Chinese)
- [14] BEIER R C, RIPLEY L H, YOUNG C R, et al. Production, characterization, and cross-reactivity studies of monoclonal antibodies against the coccidiostat nicarbazin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10): 4542-4552.
- [15] CONNOLLY L, FODEY T L, CROOKS S R H, et al. The production and characterisation of dinitrocarbanilide antibodies raised using antigen mimics[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 264(1-2): 45-51.
- [16] 唐倩倩. 尼卡巴嗪单克隆抗体的制备及酶联免疫方法的建立[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- TANG Q Q. Preparation of monoclonal antibody against nicarbazine and establishment of enzyme-linked immunosorbent assay[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [17] HAGREN V, CROOKS S R H, ELLIOTT C T, et al. An all-in-one dry chemistry immunoassay for the screening of coccidiostat nicarbazin in poultry eggs and liver[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(9): 2429-2433.
- [18] ZHANG Q, ZOU M, WANG W, et al. Design, synthesis, and characterization of tracers and development of a fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of 4, 4'-dinitrocarbanilide in chicken muscle[J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1822.
- [19] MCCARNEY B, TRAYNOR I M, FODEY T L, et al. Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483(1): 165-169.
- [20] DANAHER M, CAMPBELL K, O'KEEFFE M, et al. Survey of the anticoccidial feed additive nicarbazin (as dinitrocarbanilide residues) in poultry and eggs[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2008, 25(1): 32-40.
- [21] WU A H, WU X L, ZHENG Q K, et al. Preparation of an anti-4, 4'-dinitrocarbanilide monoclonal antibody and its application in an immunochromatographic assay for anticoccidial drugs[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 1162-1172.
- [22] BIENENMANN-PLOUM M E, HUET A C, CAMPBELL K, et al. Development of a five-plex flow cytometric immunoassay for the simultaneous detection of six coccidiostats in feed and eggs[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(5): 1361-1373.
- [23] LEADBETTER M G, MATUSIK J E. Liquid chromatographic determination and liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric confirmation of nicarbazin in chicken tissues: Interlaboratory study[J]. *Journal of AOAC International*, 1993, 76(2): 420-423.
- [24] DUSI G, FAGGIONATO E, GAMBA V, et al. Determination of nicarbazin and clopidol in poultry feeds by liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 882(1): 79-84.
- [25] KRABEL B J, DICKSON D A, ZIMMERMANN A G, et al. Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds[J]. *Journal of AOAC International*, 2000, 83(5): 1027-1038.
- [26] PRIMUS T M, KOHLER D J, GOODALL M A, et al. Liquid chromatographic determination of 4, 4'-dinitrocarbanilide, the active component of the infertility agent nicarbazin, in chicken, duck, goose, and snake eggs[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(6): 1144-1148.
- [27] JONG D J, TOMASSEN M, DRIESSEN J, et al. Liquid chromatographic method for nicarbazin in broiler feeds and premixtures: Development, validation, and interlaboratory study[J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 87(6): 1269-1277.
- [28] MATABUDUL D K, CROSBY N T, SUMAR S. A new and rapid method for the determination of nicarbazin residues in poultry feed, eggs and muscle tissue using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Analyst*, 1999, 124(4): 499-502.
- [29] KONDO F, HAMADA E, TSAI C E, et al. A reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of nicarbazin residues in eggs[J]. *Cytobios*, 1993, 76(306-307): 175-182.

- [30] STAHL R S, JOHNSTON J J. High-performance liquid chromatography-based determination of nicarbazin excretion in waterfowl[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 775(1): 103-108.
- [31] STAHL R S, VERCAUTEREN K, BUETTGENBACH T L, et al. Determination of 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC), a component of nicarbazin, in Canada goose (*Branta canadensis*) eggshells using high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(5): 1130-1135.
- [32] CAPURRO E, DANAHER M, ANASTASIO A, et al. Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 822(1): 154-159.
- [33] O'KEEFFE M, CAPURRO E, DANAHER M, et al. Investigation of the causes for the occurrence of residues of the anticoccidial feed additive nicarbazin in commercial poultry[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(9): 923-934.
- [34] 祁冰, 李梅, 郭平叶, 等. 高效液相色谱法快速检测鸡可食性组织中尼卡巴嗪残留物[J]. 食品安全导刊, 2018, 30: 87-88.
- QI B, LI M, GUO P Y, et al. Rapid determination of nicarbazine residues in edible tissues of chickens by high performance liquid chromatography[J]. *China Food Safety Magazine*, 2018, 30: 87-88. (in Chinese)
- [35] 徐金雷, 赵梅仙, 马佳颖, 等. 高效液相色谱法同时测定尼卡巴嗪中 4,4'-二硝基均苯二胺和 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶的含量[J]. 化学试剂, 2019, 41(7): 716-720.
- XU J L, ZHAO M X, MA J Y, et al. Simultaneous determination of 4,4'-dinitrobenzene diurea and 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine in nicarbazine by HPLC[J]. *Chemical Reagents*, 2019, 41(7): 716-720. (in Chinese)
- [36] 蒋永嘉, 肖霞, 蓝玮璇, 等. 鸡可食性组织中尼卡巴嗪残留的测定高效液相色谱法[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 73-79.
- JIANG Y J, XIAO X, LAN W X, et al. Determination of nicarbazine residues in edible chicken tissues by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2020, 28(3): 73-79. (in Chinese)
- [37] BLANCHFLOWER W J, HUGHES P J, KENNEDY D G. Determination of nicarbazin in eggs by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 1997, 80(6): 1177-1182.
- [38] CANNAVAN A, BALL G, KENNEDY D G. Determination of nicarbazin in feeds using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Analyst*, 1999, 124(10): 1431-1434.
- [39] CANNAVAN A, BALL G, KENNEDY D G. Nicarbazin contamination in feeds as a cause of residues in eggs[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2000, 17(10): 829-836.
- [40] MATABUDUL D K, LUMLEY I D, POINTS J S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)[J]. *Analyst*, 2002, 127(6): 760-768.
- [41] MARTINEZ-VILLALBA A, MOYANO E, GALCERAN M T. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009, 23(9): 1255-1263.
- [42] BILANDZIC N, DOLENC J, GACNIK KS, et al. Feed additives diclazuril and nicarbazin in egg and liver samples from Croatian farms[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B-Surveillance*, 2013, 6(2): 90-97.
- [43] COLEMAN M R, RODEWALD J M, BRUNELLE S L, et al. Determination and confirmation of nicarbazin, measured as 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC), in chicken tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: First Action 2013.07[J]. *Journal of AOAC International*, 2014, 97(2): 630-640.
- [44] MATUS J L, BOISON J O. A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry[J]. *Drug Testing and Analysis*, 2016, 8(5-6): 465-476.
- [45] 张宗明, 欧锐君, 罗岭丰. 液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中尼卡巴嗪残留标志物[J]. 食品安全导刊, 2018, 33: 76-77.
- ZHANG Z M, OU R J, LUO L F. Determination of nicarbazine residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *China Food Safety Magazine*, 2018, 33: 76-77. (in Chinese)
- [46] DMITROVIC J, DURDEN D A. A new approach to the analysis of nicarbazin and ionophores in eggs by HPLC/MS/MS[J]. *Journal of AOAC International*, 2011, 94(2): 428-435.
- [47] LIMA A L D, FABIANO B, BATISTA R R, et al. Determination of the residue levels of nicarbazin and combination nicarbazin-narasin in broiler chickens after oral administration[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181755.

- [48] 侯 婷,王霄旸,张丽芳,等. 鸡皮脂组织中尼卡巴嗪残留量的测定高效液相色谱-串联质谱法[J]. 中国动物传染病学报,2018,26(2):74-79.
- HOU T, WANG X Y, ZHANG L F, et al. Determination of nicarbazine residues in chicken skin fat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2018, 26(2): 74-79. (in Chinese)
- [49] 曹爱巧,黄 婷,吴雯娟,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中尼卡巴嗪残留标志物[J]. 中国动物检疫,2019,36(5):99-102.
- CAO A Q, HUANG T, WU W J, et al. Determination of nicarbazine residue markers in chicken by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(5): 99-102. (in Chinese)
- [50] 谭美龄,蒋忠岑,超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中尼卡巴嗪的残留标志物[J]. 现代食品,2021,5: 151-153.
- TAN M L, JIANG Z C. Determination of nicarbazine residues in food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Modern Food*, 2021, 5: 151-153. (in Chinese)
- [51] HUET A C, MORTIER L, DAESELEIRE E, et al. Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle; Development of an ELISA[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2005, 22(2): 128-134.
- [52] GAUDIN V, LAURENTIE M. Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(23): 2358-2362.
- [53] 王鹤佳,刘智宏,汪 霞,等. 酶联免疫法测定鸡肉中尼卡巴嗪残留[J]. 中国兽药杂志,2014,48(3):59-61.
- WANG H J, LIU Z H, WANG X, et al. Determination of nicarbazine residue in chicken by enzyme-linked immunoassay[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2014, 48(3): 59-61. (in Chinese)

(责任编辑 董晓云)