

LC-MS/MS 测定牛奶中的 α - 群勃龙和 β - 群勃龙药物残留

LCMSMS-671

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定牛奶中 α - 群勃龙和 β - 群勃龙药物残留量的方法。两个化合物在 2 $\mu\text{g/L}$ ~100.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。在高、中、低三个浓度下，基质标样保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.04%~0.07% 和 1.14%~2.33% 之间，仪器精密程度良好。加标浓度为 1 和 5 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，回收率在 73.0~79.8% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于牛奶中的 α - 群勃龙和 β - 群勃龙药物残留的准确定量检测。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 牛奶 α - 群勃龙 β - 群勃龙

群勃龙 (Trenbolone) 的化学名称为去甲雄三烯醇酮，是广泛应用的甾类同化激素，具有促进畜禽生长、提高饲料转化率等功能，能促进动物体内蛋白的沉积，在养殖业中普遍使用。但是激素的滥用会对动物、人及生态环境带来危害，长期摄入同化甾体激素会导致动物机体代谢紊乱、发育异常，甚至肿瘤。中华人民共和国农业农村部公告第 250 号已明确将群勃龙列入《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》。

为了保障人们的食品安全，农业农村部首次发布了《GB 31658.14-2021 动物性食品中 α - 群勃龙和 β - 群勃龙残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

本文参考该标准，建立了牛奶中 α - 群勃龙和 β - 群勃龙残留量的测定的方法。试料中残留的 α - 群勃龙和 β - 群勃龙在弱酸性条件下酶解，用叔丁基甲醚提取，正己烷除脂，HLB 和氨基固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法上机测定，方法灵敏度高，定量准确。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40 自动进样器：SIL-40C X3
 输液泵：LC-40DX3×2 质谱仪：LCMS-8050
 柱温箱：CTO-40C 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99
 在线脱气机：DGU-405

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm)

岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30001-04

流动相：A 相 - 水, B 相 - 乙腈 流速：0.3 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 进样体积：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始 45%B，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	45
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.51	Pumps	Pump B Conc.	90
6.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式	DL 管温度：250°C
接口电压：2 kV	加热模块温度：400°C
雾化气：氮气 3.0 L/min	接口温度：300°C
干燥气：氮气 10 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
加热气：空气 10 L/min	MRM 参数：见表 2
碰撞气：氩气 (230 kPa)	

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	化学式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	α- 群勃龙	17α-Trenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	80657-17-6	271.2	199.2*	-10.0	-24.0	-21.0
						253.2	-10.0	-21.0	-17.0
2	β- 群勃龙	17β-Trenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	10161-33-8	271.2	199.2*	-10.0	-24.0	-21.0
						253.2	-10.0	-21.0	-17.0

* 表示定量离子

■ 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制：

取 α- 群勃龙及 β- 群勃龙浓度为 1 mg/mL 的标准储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 100 μg/mL 的混合标准中间液。分别精密量取混合标准中间液适量，用甲醇稀释配制成浓度分别为 20、50、100、200、500 和 1000 ng/mL 的混合标准工作液。

样品前处理：

参考 GB 31658.14-2021 《动物性食品中 α- 群勃龙和 β- 群勃龙残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中试样的处理与净化方法。

基质加标标准曲线溶液的制备：

准确量取混合标准工作液适量，分别加入 6 份空白试料中，添加浓度分别为 0.4、1、2、4、10 和 20 μg/kg，充分混匀。按酶解、提取和净化步骤操作，制成浓度分别为 2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 的系列基质添加标准溶液。

■ 结果与讨论

3.1 α- 群勃龙及 β- 群勃龙标准溶液谱图

图 1 为 2 ng/mL α- 群勃龙及 β- 群勃龙标准溶液的 MRM 色谱图，色谱峰分离良好，通道无干扰。

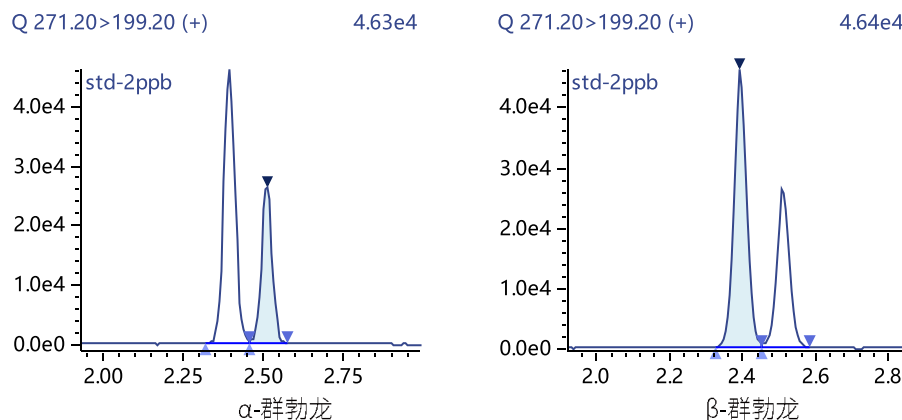


图 1 2 ng/mL α- 群勃龙及 β- 群勃龙标准溶液 MRM 色谱图

3.2 线性关系

将 2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 的基质混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。 α -群勃龙及 β -群勃龙校准曲线及在基质中的检测限、定量限的结果见表 3。

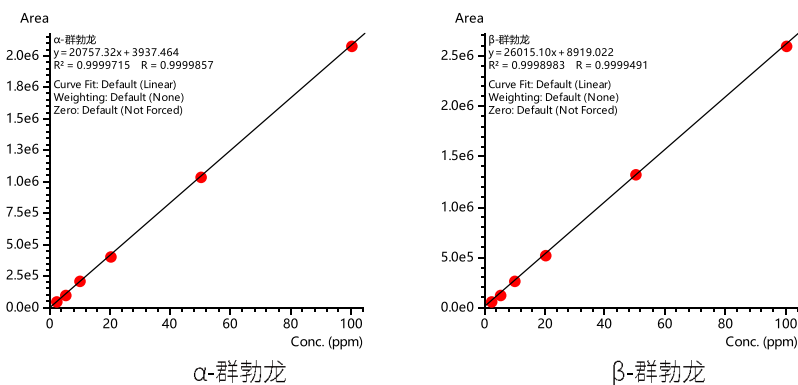


图 2 α -群勃龙及 β -群勃龙校准曲线

表 3 α -群勃龙及 β -群勃龙校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	校准曲线	相关性系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	α -群勃龙	$Y = (20757.3)X + (3937.46)$	0.9999	96.8~105.8	0.21	0.63
2	β -群勃龙	$Y = (26015.1)X + (8919.02)$	0.9999	94.1~102.4	0.19	0.56

3.3 精密度

浓度为 2、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 基质标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。不同浓度样品中待测物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04%~0.07% 和 1.14%~2.33% 之间，仪器精密度良好。

表 4 α -群勃龙及 β -群勃龙保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	α -群勃龙	0.07	1.78	0.04	2.23	0.04	1.14
2	β -群勃龙	0.05	2.33	0.04	2.05	0.04	1.74

3.4 回收率

取空白牛奶 5 g，加入混标工作液，使加标浓度为 1 $\mu\text{g/kg}$ 和 5 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取与净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 α -群勃龙及 β -群勃龙的加标回收率，平行测定 3 次。两个化合物的回收率在 73.0~79.8% 之间，具体结果见表 5。

表 5 α -群勃龙及 β -群勃龙回收率结果 (n=3)

编号	化合物	加标浓度 1 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 5 $\mu\text{g/kg}$	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	α -群勃龙	73.0	8.84	75.4	4.30
2	β -群勃龙	75.2	6.45	79.8	2.63

■ 结论

依据国家标准《GB 31658.14-2021 动物性食品中 α - 群勃龙和 β - 群勃龙残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定牛奶中 α - 群勃龙和 β - 群勃龙残留的方法。样品经酶解后用叔丁基甲醚提取，HLB 和氨基 SPE 小柱净化，三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 进行检测。 α - 群勃龙和 β - 群勃龙在 $2 \mu\text{g/L} \sim 100.0 \mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。加标浓度为 1 和 $5 \mu\text{g/kg}$ 的样品，回收率在 73.0~79.8% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于牛奶中群勃龙残留的准确检测。

岛津应用云

