

LC-MS/MS 检测猪肉中氯米芬残留

LCMSMS-792

摘要： 本文依据《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定猪肉中氯米芬残留量的方法，样品经甲醇提取，MCX固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定。结果显示：氯米芬在0.2~100 ng/mL浓度范围内线性良好，校准曲线相关系数大于0.999；精密度实验中，0.2、2、50 ng/mL的标准溶液，重复测定6次，保留时间RSD不大于0.13%，峰面积RSD不大于3.00%。该方法操作简单、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可为动物源性食品中氯米芬的残留量检测提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 兴奋剂 猪肉 氯米芬

技术特点：

- ❖ 本方法检测灵敏度优于《指南》中规定肉制品中氯米芬检出限2 μg/kg的要求。
- ❖ 本方法采用抗干扰能力更强的LCMSMS法进行测定，整个分析时间仅5 min，高效稳定。

氯米芬 (Clomiphene)，化学名称为N,N-二乙基-2-[4-(1,2-二苯基-2-氯乙烯基)苯氧基]乙胺，分子式为C₂₆H₂₈ClNO，由于化学稳定性比较差，通常以枸橼酸盐形式存在。氯米芬具有较强的抗雌激素作用和较弱的雌激素活性，临床上主要用于避孕药引起的闭经及月经紊乱。若食品中残留该物质或机体摄入量过多会导致内分泌紊乱，严重影响生育及胎儿的健康。

国家体育总局于2021年发布了《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》，要求大型赛事举办方对肉

食品中食源性兴奋剂进行检测，其中氯米芬参考检出限2 μg/kg。

目前，氯米芬的检测方法主要是液相色谱法，暂无文献报道使用液相色谱串联质谱进行测定，且动物源性食品基质的研究也尚未见报道。

本文采用液相色谱-串联质谱，建立了猪肉、中氯米芬残留的检测方法，该方法快速、准确、灵敏度高，可实现对肉制品中氯米芬残留的有效检测，为相关行业提供参考。

实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8050。具体配置为：

输液泵：	LC-30AD×2	系统控制器：	CBM-20A
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-20AC	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： Shim-pack GISS C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)，
岛津(上海)实验器材有限公司，P/N: 227-30048-02

流动相： A相-0.1%甲酸水溶液；B相-甲醇

流速： 0.3 mL/min

进样量： 2 μL

柱温： 40℃

洗脱方式： 梯度洗脱，初始40%B

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	40
1.00	Pumps	Pump B Conc.	80
2.50	Pumps	Pump B Conc.	80
2.60	Pumps	Pump B Conc.	40
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

质谱仪：LCMS-8050	DL管温度：250℃
离子源：ESI+	加热模块温度：400℃
雾化气：氮气 3 L/min	接口温度：300℃
干燥气：氮气 10 L/min	扫描模式：MRM
加热气：空气 10 L/min	MRM参数：见表 2

表 2 MRM 参数

中文名	英文名	CAS#	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
氯米芬	Clomiphen	50-41-9	406.19	100.10*	-15.0	-25.0	-18.0
				58.00	-15.0	-44.0	-10.0
				72.10	-15.0	-34.0	-13.0

* 表示定量离子对

1.3 主要标准品和耗材

标准品：氯米芬，购于岛津（上海）实验器材有限公司，PN：380-04457-53。

MCX 固相萃取柱：规格 150 mg，6 mL，购于岛津（上海）实验器材有限公司，PN：380-00853-07。

1.4 样品前处理方法

准确称取 2 g 左右试样置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 甲醇，涡旋 1 min，超声 30 min，4000 r/min 离心 5 min，转移上清液于另一具塞试管中。再加入 10 mL 甲醇，重复上述操作，合并 2 次上清液，并用甲醇定容到 25 mL，涡旋混匀，备用。依此用甲醇 5 mL，水 5 mL 活化 MCX 固相萃取柱。准确移取上述试液 12.5 mL 上柱，液体的过柱速度控制在 1 mL/min 以内，并依次用 2% 乙酸溶液 5 mL、甲醇 5 mL 淋洗柱子，用 5% 氨水甲醇 5 mL 洗脱，收集洗脱液，40℃ 氮气吹干。准确加入 1 mL 甲醇溶解残留物，涡旋 30 s，过 0.22 μm 有机滤膜，上液相色谱串联质谱分析。

1.5 标准溶液的制备

标准系列工作液的配制：吸取适量混合标准中间工作液，用 40% 甲醇水稀释定容，配制成浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准工作溶液，上液相色谱串联质谱分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

浓度为 0.2 ng/mL 氯米芬标准品的 MRM 色谱图如图 1 所示。

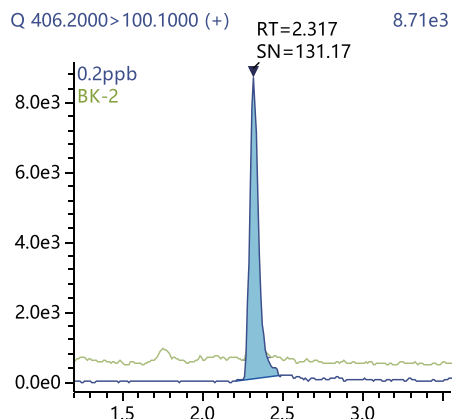


图 1 空白样品和 0.2 ng/mL 氯米芬标准品的 MRM 色谱图

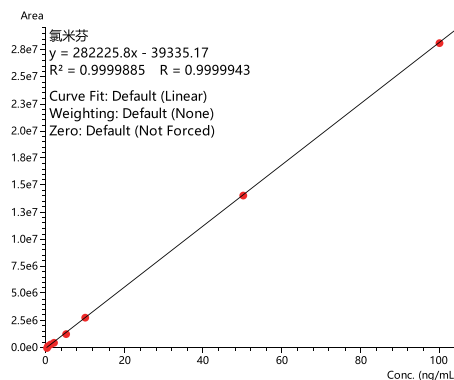


图 2 氯米芬的校准曲线

2.2 线性范围

按照 1.5 方法配制标准系列溶液，上机分析，采用外标法绘制氯米芬校准曲线。结果表明：氯米芬在 0.2 ~100 ng/mL 范围内，线性良好，校准曲线方程为 $Y = 282225.8X - 39335.17$ ，相关系数 R 为 0.9999，准确度 94.5%~114.4% 之间。通过 LabSolutions 软件依据信噪比 (ASTM) 自动计算，氯米芬检出限 (S/N=3) 为 0.02 ng/mL，定量限 (S/N=10) 为 0.06 ng/mL，氯米芬校准曲线见图 2。

2.3 精密度考察

取 0.2、2、50 ng/mL 的标准溶液，平行测定 6 次，计算保留时间 (R.T.) 和峰面积 (Area) 的 RSD。结果显示氯米芬的保留时间的 RSD 不大于 0.13%，峰面积的 RSD 不大于 3.00%，仪器精密度好。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD% (0.2 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氯米芬	0.12	3.00	0.13	1.00	0.06	1.00

2.4 加标回收率

选择空白猪肉，进行 0.50、1.00、3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的加标回收试验，每个加标浓度 3 个平行，按照前述前处理方式处理，上机测定，以校准曲线法定量，计算回收率。氯米芬加标回收率在 82.0%~106.0% 之间，符合《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》要求。

表 4 氯米芬加标回收率结果 (n=3)

基质	检出浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测得浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	RSD (%)
猪肉	N.D.	0.50	0.41	82.0	1.57
		1.00	0.89	89.0	1.42
		3.00	3.05	105.0	1.95

注：N.D. 表示未检出

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统，建立了猪肉中氯米芬残留量的检测方法。该方法具有较好的检出限、精密度和回收率，且样品前处理操作简单，分析速度快，可以为检测动物源性食品中氯米芬的残留量提供参考。

岛津应用云

