

LCMS-8050 测定猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留

LCMSMS-454

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的方法，该方法可在 4 min 内完成对待测物的检测。醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮在 1.0 $\mu\text{g/L}$ ~100.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留的快速检测。

关键词：三重四极杆质谱 猪肉 醋酸甲地孕酮 醋酸甲羟孕酮

食用动物饲养中促生长性激素的滥用已成为全球性的食品安全问题。醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮都是人工合成的甾体药物，能促进畜禽生长，提高饲料转化率，有利于蛋白质沉积。但该类激素在动物食品中的残留可能会危害消费者健康，甚至具有潜在的致畸性与致癌性。有研究表明儿童性早熟、妇女乳腺癌和子宫癌发病率上升也与食品中性激素残留有关。我国农业农村部早在 2002 年发布的第 235 号文件中就规定醋酸甲地孕酮不得在动物性食品中检出。

目前检测性激素的前处理方法主要有固相萃取法、

QuEChERs 法、液液萃取法等。固相萃取法由于方法可靠、操作简单、成本低，是目前最普遍采用的前处理方法。

本文参照国家标准检测方法 GB 31660.4-2019《食品安全国家标准 动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的测定 液相色谱-串联质谱法》，试样经乙腈提取，正己烷除脂，混合阳离子柱净化，甲醇洗脱后使用岛津 LCMS-8050 液质联用系统测定，内标法定量。此方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留的快速检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-40D X3 \times 2 输液泵，DGU-405 在线脱气机，SIL-40C X3 自动进样器，CTO-40C 柱温箱，SCL-40 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (50 mm \times 2.1 mm I.D., 1.9 μm , SGLC, P/N: 227-30048-01)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液

流速：0.30 mL/min

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

DL 管温度：250°C

离子源接口电压：3.5 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

驻留时间：47 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	化学式	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	595-33-5	385.40>267.30*	-11.0	-19.0	-19.0
				385.40>325.40	-11.0	-15.0	-23.0
醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone acetate	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	71-58-0	387.40>327.40*	-11.0	-13.0	-16.0
				387.40>285.40	-11.0	-19.0	-20.0
氘代醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate-D3	C ₂₄ H ₂₉ D ₃ O ₄	-	388.40>270.40*	-11.0	-18.0	-13.0

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

取试样 2 g (准确到 ±20 mg) 于 50 mL 离心管中，加内标工作液 (1 μg/mL) 40 μL，加 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液 4 mL，涡旋混匀后加入 β- 盐酸葡萄糖醛苷酶 / 芳基硫酸酯酶 40 μL，于 37°C 下避光水浴低速振荡，酶解 12 h。试样经酶解后，加乙酸乙酯 10 mL，于旋涡振荡器上剧烈振荡 10 min，4000 r/min 离心 5 min，取上清液至梨形瓶中。残渣加乙酸乙酯 10 mL 重复提取 1 次，合并上清液，50°C 旋转蒸发至干。加乙腈 10 mL、正己烷 5 mL 使溶解，转至 50 mL 离心管中，低速涡旋 10 s，3000 r/min 离心 2 min，弃正己烷层，下层液于 50°C 旋转蒸发至干，加 30% 甲醇水溶液 3 mL，溶解，备用。混合阳离子固相萃取柱用甲醇、水各 3 mL 活化，取备用液过柱，依次用水、50% 甲醇溶液各 3 mL 淋洗，抽干。用甲醇 5 mL 洗脱，洗脱液于 50°C 下氮气吹干。用 0.2 mL 初始流动相溶液溶解残余物，涡旋混匀，15000 rpm 高速离心 10 min，取上清液上机测定。

1.4 标准溶液的配制

精密量取适量混合标准工作液及内标标准工作液，用流动相稀释配制成浓度为 1、2、5、25、50 和 100 μg/L 的系列标准溶液 (内标均为 20 μg/L)。以待测物与内标的特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标，标准溶液浓度比为横坐标，内标法绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

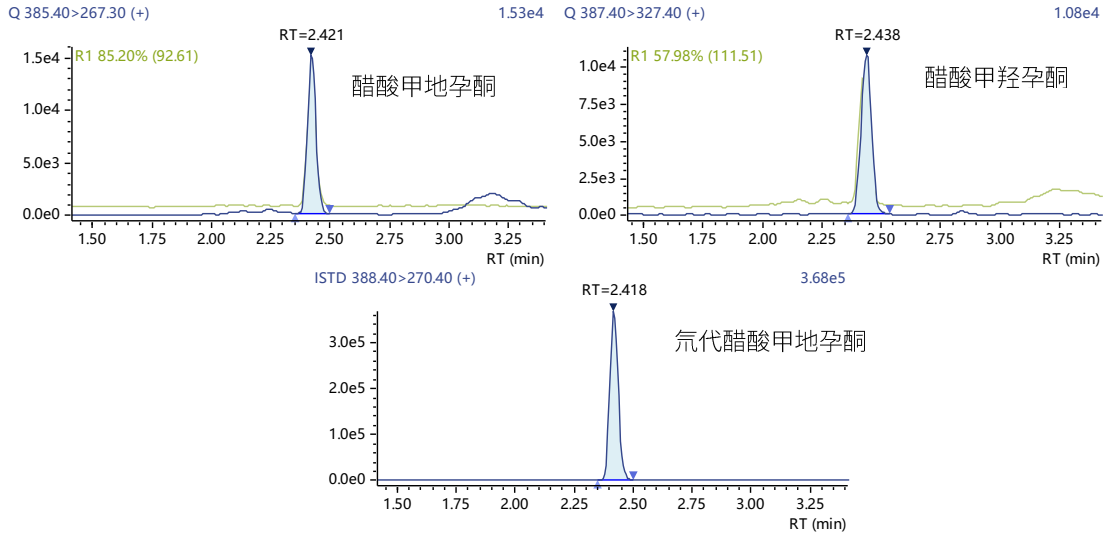


图 1 1 μg/L 醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮 MRM 色谱图 (内标 20 μg/L)

2.2 线性范围与检出限

将浓度为 2、5、25、50 和 100 μg/L 的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮标准工作液 (内标浓度为 20 μg/L), 按 1.2 中的分析条件进行测定。以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 制作标准曲线, 内标法定量, 绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表 3。图 3 为 0.2 μg/L 醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的 MRM 色谱图。根据检出限 MDL = 3.3 S/N, 定量限 LOQ=10 S/N 计算检出限和定量限, 结果见表 3。

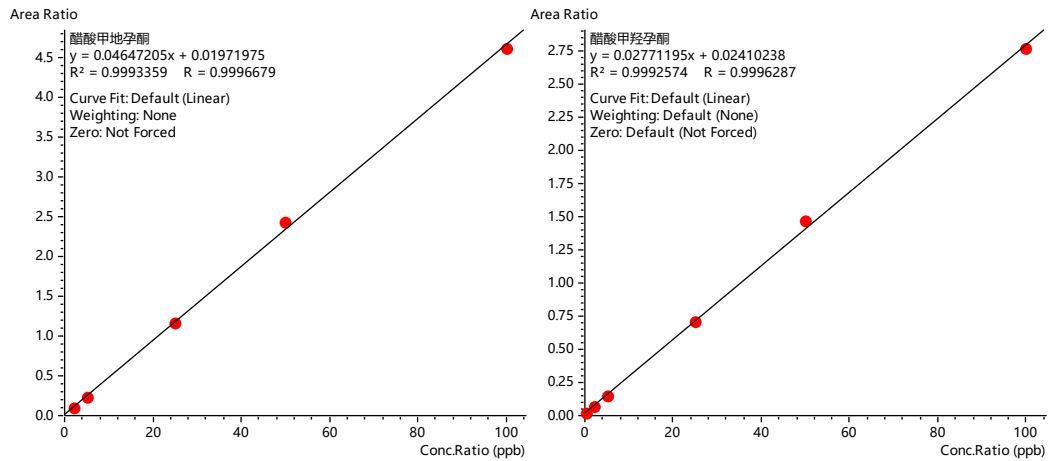


图 2 醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮校准曲线

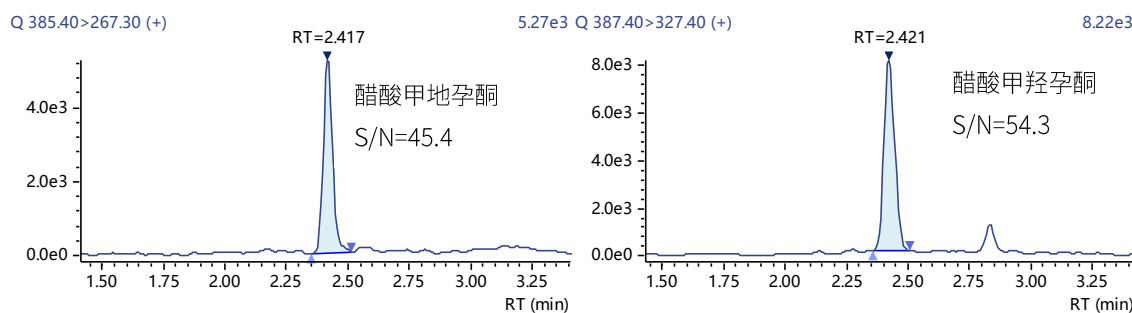


图3 0.2 µg/L 醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮标样 MRM 色谱图

表3 标准曲线与检出限信息

化合物	校准曲线	R	线性范围 (µg/L)	准确度	定量限 (µg/L)	检出限 (µg/L)
醋酸甲地孕酮	$Y = 0.0464X + 0.0197$	0.9997	2.0~100	87.3-104.4%	0.04	0.01
醋酸甲羟孕酮	$Y = 0.0278X + 0.0241$	0.9996	2.0~100	86.6-104.4%	0.04	0.01

2.3 精密度实验

对浓度为 0.2 µg/L、2 µg/L 和 25 µg/L 的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：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 0.10%~0.18% 和 1.25%~5.19% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

	0.2 µg/L		2 µg/L		25 µg/L	
	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
醋酸甲地孕酮	0.18	5.19	0.13	2.50	0.10	1.85
醋酸甲羟孕酮	0.13	3.25	0.14	1.71	0.11	1.25

2.4 回收率实验

称取空白猪肉样品，加入醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮标准溶液，使加标浓度分别为 1 µg/kg，5 µg/kg 和 20 µg/kg。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的加标回收率。空白猪肉样品和加标浓度为 1 µg/kg 猪肉样品 MRM 色谱图如 3 所示，加标回收率结果见表 5。由结果可知，该方法灵敏度高，准确率好，可以满足猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留的快速检测。

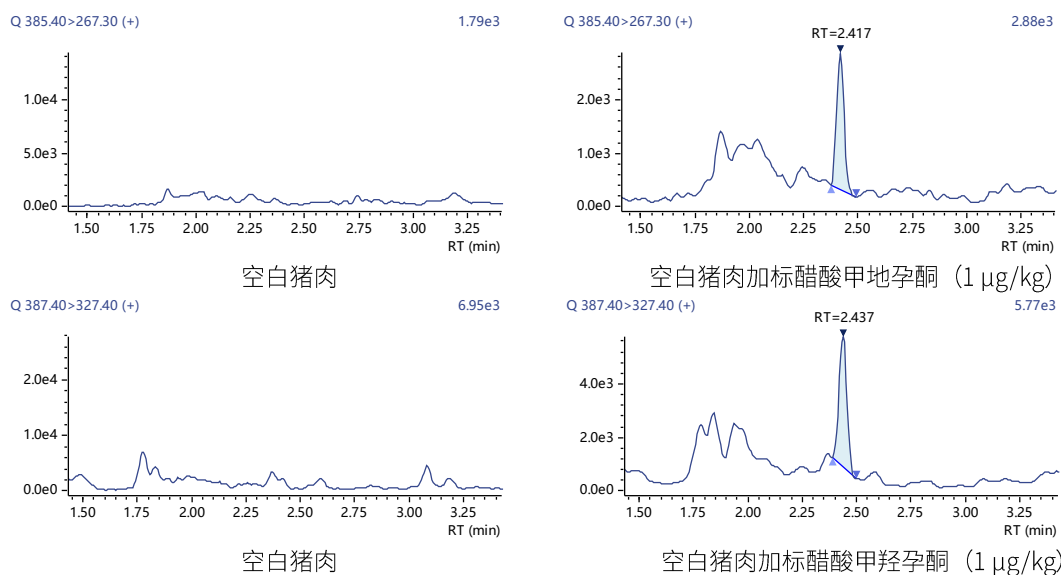


图 3 空白猪肉及加标浓度为 1 µg/kg 猪肉样品 MRM 图谱

表 5 醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的加标回收率结果 (n=3)

	平均回收率 %		
	1 µg/kg	5 µg/kg	20 µg/kg
醋酸甲地孕酮	82.2	90.6	97.7
醋酸甲羟孕酮	81.7	85.8	89.2

■ 结论

本文根据 GB 31660.4 -2019《食品安全国家标准 动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的测定》建立了使用岛津超高效液相色谱 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的方法。该方法使用 Shim-pack GISS C18 色谱柱，可在 4 min 内完成对待测物的检测。醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮在 1.0 ~100 µg/L 浓度范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的快速分析。

岛津应用云

