

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙的残留

LCMSMS-320

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙的方法。该方法在 10 min 内完成分离，校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对不同浓度的丙酸诺龙和苯丙酸诺龙的混合标准溶液各平行测试 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.024 %~0.106 % 和 1.489 %~5.217%，仪器精密度良好。对于不同浓度下基质加标回收率范围在 87.60%~106.80% 之间。该方法可应用于牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙残留的同时检测。

**关键词：** 三重四极杆质谱 丙酸诺龙 苯丙酸诺龙 牛奶

丙酸诺龙和苯丙酸诺龙属于雌激素类药物，具有调节机体代谢和生理功能，在养殖业中常用于提高动物生长，促进蛋白转化率，以达到提高养殖的经济效率。然而，滥用雌激素类药物，会造成动物产品中有不同程度的残留，被人类食用后在人体内发挥着类似雌性激素的作用，能干扰体内荷尔蒙分泌，使生殖机能异常。牛奶作为奶牛的营养分泌物，是否会因食用非法添加的饲料而吸收分泌到牛奶中去，需要对牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙含量的准确测定。

牛奶作为我国大量饮用的乳制品，对牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙药物的残留检测，具有重要的意义。农

业部 1031 号公告 -1-2008 《动物源性食品中 11 种激素残留检测液相色谱 - 串联质谱法》中对丙酸诺龙和苯丙酸诺龙均有用串联质谱法进行高灵敏度的测定。高效液相色谱 - 串联质谱联用技术是近些年来快速发展的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基质中的丙酸诺龙和苯丙酸诺龙残留具有很强的定性和定量能力，准确度高，是目前超痕量残留分析的首选方法。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙的方法。

## 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-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 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-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Inertsil C8 2.1 mm I.D.× 100 mm L., 2 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.25 mL/min

柱温：40℃

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6.10	Pumps	Pump B Conc.	70
10.00	Controller	Stop	

**质谱条件**

分析仪器: LCMS-8050

离子化模式: ESI(+)

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

Analyte	CAS No.	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
				Bias (V)	(V)	Bias (V)
丙酸诺龙	7207-92-3	331.20	109.10*	-15	-27	-23
			145.30	-15	-22	-30
苯丙酸诺龙	62-90-8	407.10	105.15*	-11	-25	-21
			257.30	-16	-18	-29

注: \*表示定量离子

**1.3 标准溶液的配制**

分别称取丙酸诺龙和苯丙酸诺龙标准品适量, 用甲醇溶解、配制成 1.0 mg/mL 的混合标准储备液, 置于 -18°C 冰箱中保存。取准确体积的标样储备液, 加入到经 1.4 前处理后空白牛奶基质中, 依次配制成 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL 浓度的混合标准工作液。

**1.4 样品前处理方法**

牛奶样品称取均质试样 5.0 g(精确到 0.1 g), 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 3 mL 10% 碳酸钠溶液和 25 mL 叔丁基甲醚, 均质 30 s, 振荡 10 min, 4°C、6000 r/min 离心 10 min, 残渣用 25 mL 叔丁基甲醚重新提取一次, 合并上清液。将上清液于 40°C 水浴中旋转蒸干。70% 甲醇水溶液 2.0 mL 溶解残余物, 旋转混匀后 16000 r/min 离心 5 min, 溶液经 0.22 μm 滤膜过滤, 然后进液相色谱 - 串联质谱测定。

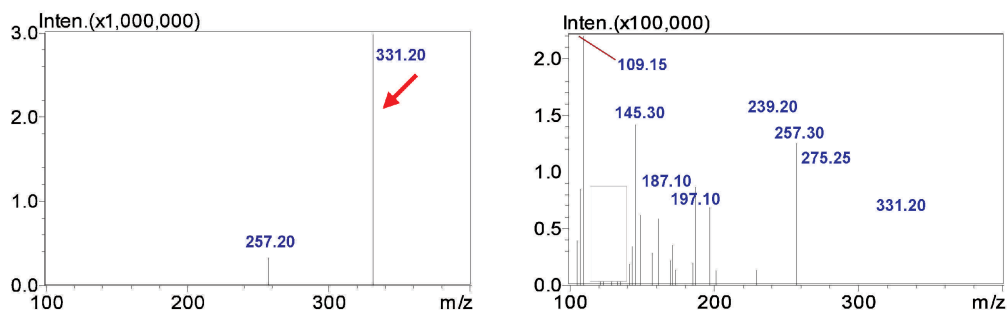
**结果与讨论**
**2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图**


图1 丙酸诺龙的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-25V)(右图)

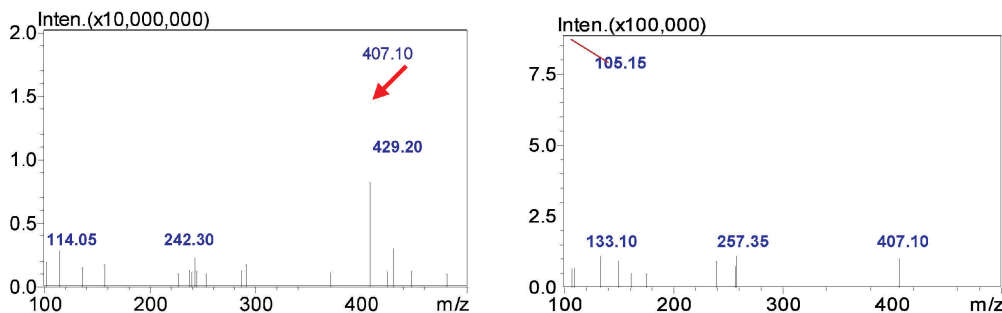


图2 苯丙酸诺龙的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-30V)(右图)

## 2.2 丙酸诺龙和苯丙酸诺龙标准溶液的 MRM 色谱图

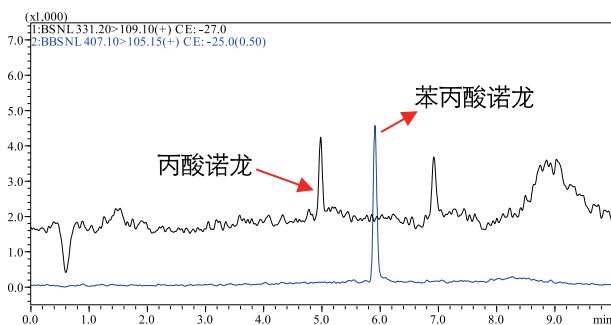


图3 0.2 ng/mL丙酸诺龙和苯丙酸诺龙的MRM色谱图

## 2.3 线性范围

称取 20 g 空白牛奶基质 1 份，按上述提取净化过程进行处理，得到约 8 mL 空白基质提取液。用该空白基质溶液稀释标准储备液，配制成 0.2 ng/mL，0.5 ng/mL，1 ng/mL，5 ng/mL，10 ng/mL，20 ng/mL，50 ng/mL 浓度的混合标准工作液。以工作溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线（见下图 4 和图 5），所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

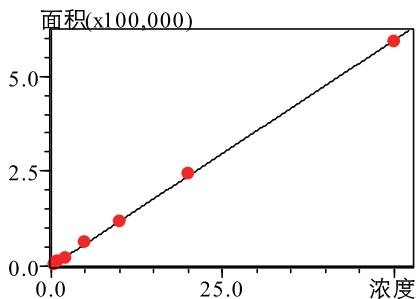


图4 丙酸诺龙标准曲线

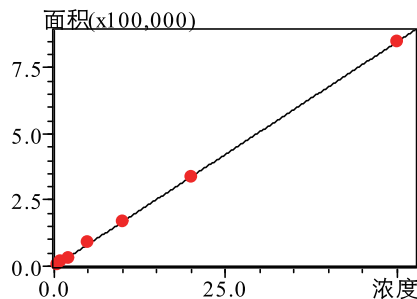


图5 苯丙酸诺龙标准曲线

表3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度%
1	丙酸诺龙	$Y = 11892.6X - 355.162$	0.2~50	0.9997	94.1~103.2
2	苯丙酸诺龙	$Y = 16975.5X - 1025.15$	0.2~50	0.9995	90.3~105.1

## 2.4 精密度实验

对不同浓度混合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: 不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.024%~0.106% 和 1.489%~5.217% 之间, 仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性及灵敏度结果

样品名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
丙酸诺龙	0.106	4.513	0.024	1.489	0.038	1.925
苯丙酸诺龙	0.089	5.217	0.041	4.921	0.026	3.089

## 2.5 灵敏度实验

配制 0.2 ng/mL 抗生素的混合标准溶液进样, 为考察仪器的灵敏度, 将低浓度混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver.5.86 软件计算信噪比 (采用 RMS 计算方式), 检出限和定量限, 2 种化合物的信噪比和方法检出限如下表 5 所示。

表5 信噪比(S/N)和方法检出限以及定量限

名称	浓度水平(ng/mL)	S/N	检出限 (ng/mL)	定量限(ng/mL)
丙酸诺龙	0.20	12.02	0.05	0.16
苯丙酸诺龙	0.20	32.85	0.03	0.10

## 2.6 基质加标实验

按照 1.4 中样品制备方法, 加标浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL 和 40 ng/mL, 各平行测定 3 次。测试结果显示: 2 种化合物样品的加标回收率在 87.60%~106.80% 之间, 结果如表 6。

表6 基质加标实验结果

名称	加标浓度 0.5 ng/mL		加标浓度 5 ng/mL		加标浓度 40 ng/mL	
	检测平均值	回收率	检测平均值	回收率	检测平均值	回收率
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	(%)
丙酸诺龙	0.438	87.60	4.690	93.80	39.603	99.00
苯丙酸诺龙	0.534	106.80	4.608	92.20	42.508	106.30

## 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙残留的方法。该方法校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 0.5 ng/mL、5 ng/mL、40 ng/mL 抗生素的混合标准溶液, 各平行测试 6 次, 2 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.024%~0.106% 和 1.489%~5.217% 之间, 仪器精密度良好。对于加标浓度为 0.5 ng/mL, 5 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品, 各平行测定 3 次, 加标回收率在 87.60%~106.80% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势, 且完全满足农业部 1031 号公告 -1-2008 《动物源性食品中 11 种激素残留检测液相色谱 - 串联质谱法》中关于丙酸诺龙和苯丙酸诺龙中 1 ng/mL 的最低定量限的检测要求, 可用于牛奶中丙酸诺龙和苯丙酸诺龙兽药残留检测。