

LC-MS/MS 法测定牛奶中 2 种群勃龙 类兽药

参考标准:《GB 31658.14-2021》

1 前言

群勃龙是一种人工合成的三烯 19-去甾甲类化合物, 其特性复杂, 作用于丘脑下部, 垂体轴以减少促性腺素的释放, 导致排卵前高峰消失, 因而抑制排卵。动物实验表明它能抑制孕激素分泌, 使子宫内膜及异位病灶细胞失活、退化, 从而导致异位病灶萎缩。其抗生育作用可能是抑制排卵及抑制子宫内膜发育, 改变宫颈粘液性质, 影响卵子运行速度及拮抗内膜孕酮受体, 从而干扰孕卵着床。临床用于治疗子宫内膜异位症, 使之萎缩并吸收。由于其具有很强的促蛋白合成作用, 随着畜牧业规模化、集约化发展, 少数生产企业及饲养者、经营者为谋取最大利润, 置国家法律法规于不顾, 滥用或非法使用激素等违禁药品。作为同化激素类添加剂的群勃龙饲养家畜, 常常造成群勃龙在动物源性食品中残留超标。当人们食用了残留超标的动物性食品后, 会在人体内蓄积, 产生多种不良后果, 直接危害人的健康及生命, 因此, 本文参考《GB 31658.14-2021》, 建立了使用谱育科技的超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪测定牛奶中群勃龙类兽药含量的快速且高灵敏度的检测方法。

2 实验部分

2.1 标准品、试剂和设备

仪器：ULC 510 超高效液相色谱仪（具体配有二元超高压输液泵、超高压自动进样器（含冷却功能）、柱温箱）、EXPEC 5210 三重四极杆串联质谱仪。

样品：牛奶

标准品：2 种群勃龙类化合物购自上海安谱，于-20℃冰箱保存。试剂：甲醇（质谱级，安谱）、超纯水。



2.2 液相和质谱条件

LC 条件	流动相	水相 A（超纯水）和有机相 B（乙腈），梯度洗脱
	流速	0.3mL/min
	色谱柱	Waters BEH C18, 2.1* 100mm, 1.7 μ m
	柱温	40℃
	进样量	3 μ L
	运行时间	8min

MS 条件	雾化气流量	1.5 L/min
	去溶剂气流量	6.0 L/min
	反吹气流量	1.0 L/min
	去溶剂气温度	450℃
	碰撞气流量	0.50 mL/min
	电离模式	ESI+
	毛细管高压	4.8kV

梯度方法	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	70	30
	3.0	10	90
	4.0	10	90
	4.1	70	30
	8	70	30

监测模式为多反应监测(MRM), 各化合物监测离子对、碰撞电压(CE)等参数见下图。

化合物名称	母离子质量	子离子质量	驻留时间(s)	锥孔电压	碰撞能量	分辨率
1 α-群勃龙	271.2	199.1	0.15	50	20	Unit-Unit
2 α-群勃龙	271.2	253.2	0.15	50	18	Unit-Unit
3 β-群勃龙	271.2	199.1	0.15	48	20	Unit-Unit
4 β-群勃龙	271.2	253.2	0.15	48	18	Unit-Unit

2.3 样品前处理

样品前处理方法：具体参考《GB 31658.14-2021》。

取适量新鲜牛奶, 并使均质, 称取均质后的牛奶样品 5g 于 50ml 具塞离心管, 加入 0.04mol/L 乙酸钠溶液 10ml, 涡旋混匀, 用冰乙酸调节 pH 到 4.3~4.8, 再加入 β-葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯溶液 20μL, 于 37℃ 下震荡酶解 14 小时, 取出冷却至室温, 加入 5ml 乙腈后再加入 10mL 叔丁基甲醚, 涡旋混匀, 震荡 10min, 5000r/min 离心 10min, 取上层液于另一离心管中, 下层液用叔丁基甲醚, 10mL 重复提取一次, 合并两次上层液, 于 50℃ 水浴氮吹干, 加入 80% 甲醇水 4mL, 超声 2min, 溶解残余物。加入正己烷 5mL, 震荡 5min, 5000r/min 离心 10min, 弃上层正己烷, 再加入 5mL 正己烷重复上述操作, 取下层水相, 50℃ 氮吹至 0.5mL, 加入 10% 甲醇水 3mL 超声 5min, 溶解残余物备用。

HLB 固相萃取柱依次用甲醇 3ml，水 3ml 活化，取上述备用液过柱，依次用甲醇-2%氨水溶液（5:95）3ml、甲醇-2%氨水溶液（40:60）3ml 和水 3ml 淋洗，抽干，收集淋洗液，将淋洗液过丙酮-甲醇（80:20）5ml 活化的氨基固相萃取柱，用丙酮-甲醇（80：20）5ml 洗脱，最后收集洗脱液。收集的洗脱液于 50°C 水浴氮吹干，用 80% 甲醇溶液 1.0ml 溶解残余物，超声 5min，涡旋 1min，过 0.22 μ m 疏水性滤膜。

3. 结果

3.1 线性和检出限

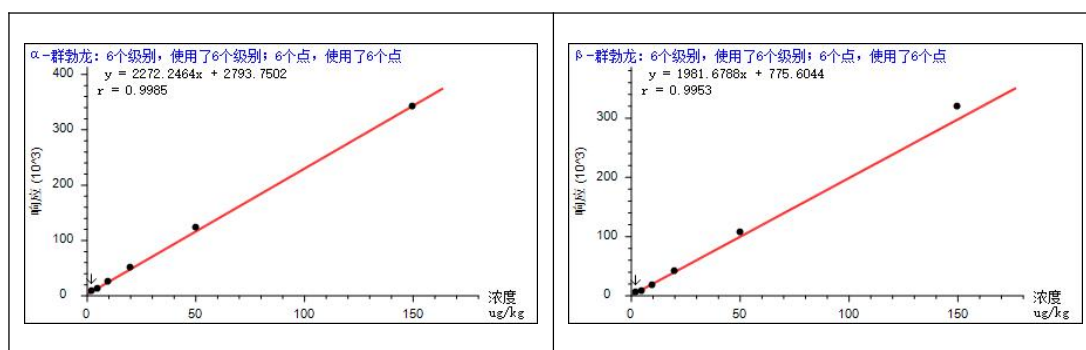
3.1.1 线性

用甲醇稀释标准品得到一定浓度的 2 种群勃龙类化合物的混标，准确量取配制好的标准溶液体积，使用牛奶空白基质溶液稀释，得到一系列浓度的群勃龙类化合物的标准溶液 2 ug/kg、5 ug/kg、10 ug/kg、20 ug/kg、50 ug/kg、100 ug/kg、150ug/kg 浓度的标准工作液，按照上述方法进样。以各目标物的定量离子色谱峰面积（Y），目标物标准溶液的质量浓度(X)为横坐标，权重系数为 1/x，采用外标法拟合后的标准曲线如下表 1，典型标准曲线图如表 2 所示，在对应的线性范围内，相关系数 r 在 0.995 以上。

表 1 2 种群勃龙类化合物的标准线性参数表

化合物名称	线性范围（ug/kg）	线性方程	相关系数 r
α -群勃龙	1-150	$y = 2272.2464x + 2793.7502$	$r = 0.9985$
β -群勃龙	1-150	$y = 1981.6788x + 775.6044$	$r = 0.9953$

表 2 群勃龙化合物的标准线性图



3.1.2 检出限

为检验灵敏度和检出限，2 种群勃龙类化合物将曲线最低点进样分析，在测试 1ug/kg 标品前先测试空白溶剂证明仪器无干扰，如下图 1 所示，标品的 MRM 叠加色谱图如图 2 所示，配置 2ug/kg 标准溶液进样，进样量 3 uL。两种化合物 S/N 截图如下图所示，2 种群勃龙类化合物将曲线最低点（1ug/kg）平行进样 3 针，按照 S/N=10 和 S/N=3 计算定量限和检出限，如下表 3 所示。

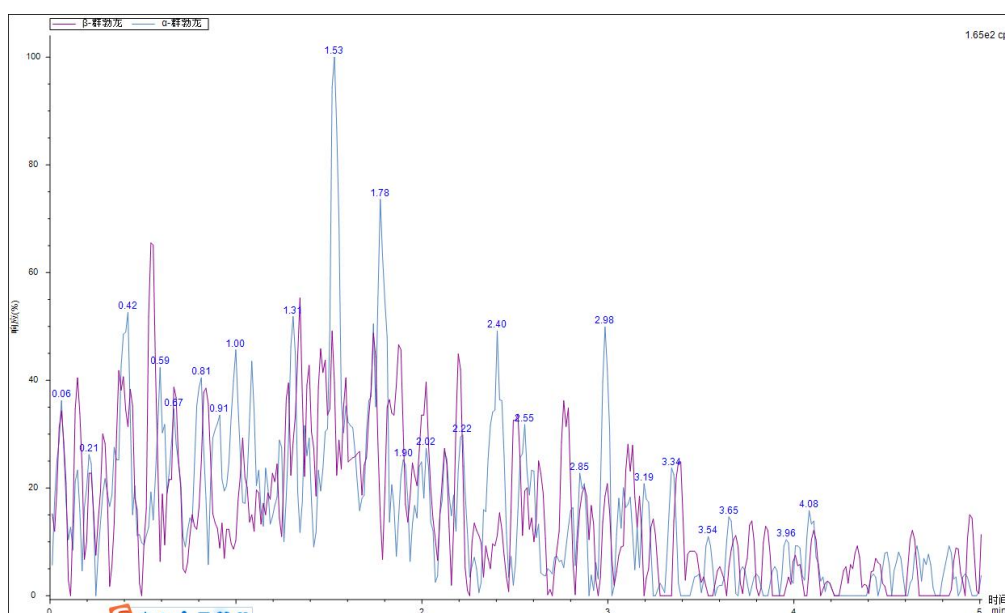


图 1 空白溶剂 MRM 叠加色谱图

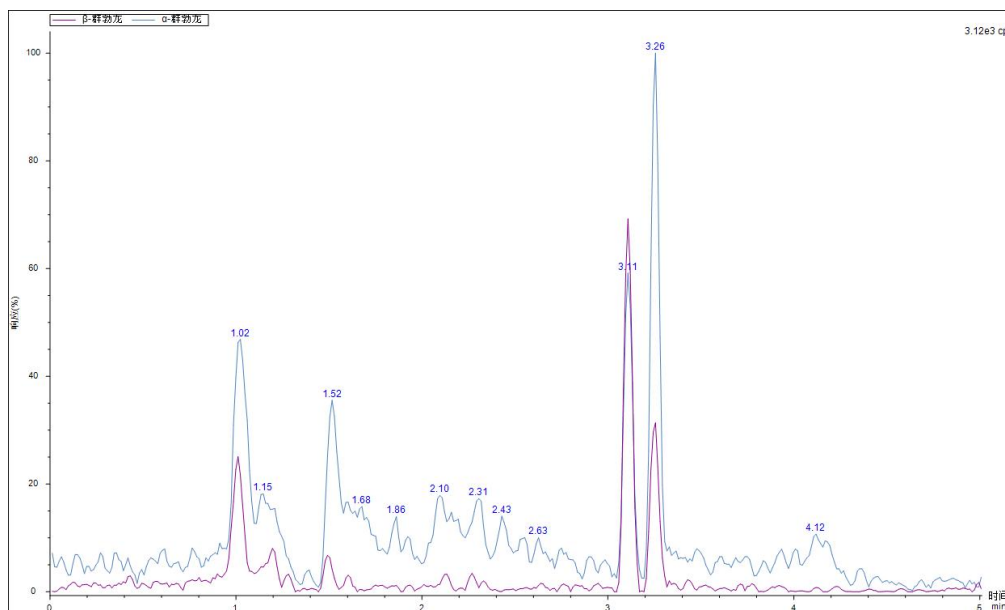


图 2 浓度为 2ug/kg 2 种群勃龙类化合物叠加色谱图

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙	
	🚨	🚩	数据文件	定量方法	峰面积	信噪比	峰面积	信噪比
1			<input checked="" type="checkbox"/> 2ppb-1	群勃龙类化合物	6636.98	102.5	9430.19	39.6
2			<input checked="" type="checkbox"/> 2ppb-2	群勃龙类化合物	7183.64	98.5	8476.05	40.6
3			<input checked="" type="checkbox"/> 2ppb-3	群勃龙类化合物	7474.94	103.3	8640.50	36.7
Min					6636.98	98.5	8476.05	36.7
Max					7474.94	103.3	9430.19	40.6
▶ AVG					7098.52	101.4	8848.91	39.0

图3 加标浓度为 2ug/kg 2 种群勃龙类信噪比截图

表 3 2 种群勃龙类化合物检出限和定量限

序号	化合物	信噪比 (S/N)	检出限 (ug/kg)	定量限 (ug/kg)
1	α-群勃龙	39.0	0.15	0.51
2	β-群勃龙	101.4	0.06	0.20

3.3 精密度

分别配置 5ug/kg (低浓度)、20ug/kg (中浓度)、100ug/kg (高浓度) 不同浓度对照品, 分别连续进样 6 次, 考察仪器精密度, 保留时间和峰面积的重复性, 结果如下图所示, 峰面积的 RSD 值小于 4.57%, 保留时间的 RSD 值小于 0.16%, 仪器精密度良好。

5ug/kg 重复性: 峰面积的 RSD 值小于 3.65%, 保留时间 RSD 值为 0。

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙	
	🚨	🚩	数据文件	定量方法	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-1	群勃龙类化合物	3.11	11154.03	3.26	13684.99
2			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-2	群勃龙类化合物	3.11	11086.26	3.26	14434.23
3			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-3	群勃龙类化合物	3.11	11218.87	3.26	14530.08
4			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-4	群勃龙类化合物	3.11	11155.44	3.26	13305.81
5			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-5	群勃龙类化合物	3.11	11857.38	3.26	14446.91
6			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性1-6	群勃龙类化合物	3.11	12038.59	3.26	13790.90
Min					3.11	11086.26	3.26	13305.81
Max					3.11	12038.59	3.26	14530.08
AVG					3.11	11418.43	3.26	14032.15
SD					0.00	416.30	0.00	507.53
▶ RSD					0.00	3.65	0.00	3.62
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00

图4 浓度为 5 ug/kg 群勃龙化合物的重复性

20ug/kg 重复性：峰面积的 RSD 值小于 4.57%，保留时间 RSD 值为 0。

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙	
	!	🚫	数据文件	定量方法	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-1	群勃龙类化合物	3.11	49133.41	3.26	58511.92
2			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-2	群勃龙类化合物	3.11	52016.13	3.26	61480.85
3			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-3	群勃龙类化合物	3.11	48557.04	3.26	61529.48
4			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-4	群勃龙类化合物	3.11	50042.56	3.26	57363.39
5			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-5	群勃龙类化合物	3.11	45548.53	3.26	57056.94
6			<input checked="" type="checkbox"/> 重复性2-6	群勃龙类化合物	3.11	47300.33	3.26	58645.12
Min					3.11	45548.53	3.26	57056.94
Max					3.11	52016.13	3.26	61529.48
AVG					3.11	48766.34	3.26	59097.95
SD					0.00	2230.33	0.00	1965.37
▶ RSD					0.00	4.57	0.00	3.33
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00

图 5 浓度为 20 ug/kg 群勃龙化合物的重复性

100ug/kg 重复性：峰面积的 RSD 值小于 2.99%，保留时间的 RSD 值小于 0.16%

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙	
	!	🚫	数据文件	定量方法	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-1	群勃龙类化合物	3.11	447224.20	3.26	545063.80
2		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-2	群勃龙类化合物	3.11	470796.90	3.26	524604.60
3		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-3	群勃龙类化合物	3.10	469100.10	3.24	521662.60
4		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-4	群勃龙类化合物	3.11	451482.60	3.26	559652.60
5		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-5	群勃龙类化合物	3.11	460177.30	3.26	555398.00
6		🚫	<input checked="" type="checkbox"/> 重复性3-6	群勃龙类化合物	3.11	459544.90	3.26	530847.60
Min					3.10	447224.20	3.24	521662.60
Max					3.11	470796.90	3.26	559652.60
AVG					3.11	459721.00	3.25	539538.20
SD					0.01	9326.57	0.01	16153.83
▶ RSD					0.16	2.03	0.15	2.99
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00

图 6 浓度为 100ug/kg 群勃龙化合物的重复性

3.4 加标回收率测试

选取牛奶空白基质样品，加入一定量的 2 种群勃龙类化合物的标准品，参照 2.3 步骤将样品进行处理，加标浓度为 30ug/kg，平行 3 次试验，考察该浓度下的回收率，其结果如下图所示，各化合物的回收率处于 60~120%之间。

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙		
	!	▼	☑	数据文件	定量方法	峰面积	回收率	峰面积	回收率
1		▼	☑	回收率1-1	群勃龙类化合物	208322.90	71.52	410265.20	113.78
2		▼	☑	回收率1-2	群勃龙类化合物	231964.60	79.68	431741.00	119.77
3		▼	☑	回收率1-3	群勃龙类化合物	215810.50	74.11	366070.30	101.47
Min						208322.90	71.52	366070.30	101.47
Max						231964.60	79.68	431741.00	119.77
▶ AVG						218699.40	75.11	402692.10	111.67

图 7 浓度为 30ug/kg 群勃龙类化合物的回收率

3.5 样品测试

按照 2.3 中样品制备方法处理牛奶样品，平行测定 3 次，批处理结果如下图所示，未发现牛奶有群勃龙类化合物残留。

	样品信息				β-群勃龙		α-群勃龙		
	!	▼	☑	数据文件	定量方法	峰面积	计算浓度	峰面积	计算浓度
1		▼	☑	样品-1	群勃龙类化合物	193.10		287.41	
2		▼	☑	样品-2	群勃龙类化合物	277.56		329.59	
3		▼	☑	样品-3	群勃龙类化合物	180.42		1280.32	
Min						180.42	0.0000	287.41	0.0000
Max						277.56	0.0000	1280.32	0.0000
▶ AVG						217.03	0.0000	632.44	0.0000

图 8 牛奶样品批处理结果图

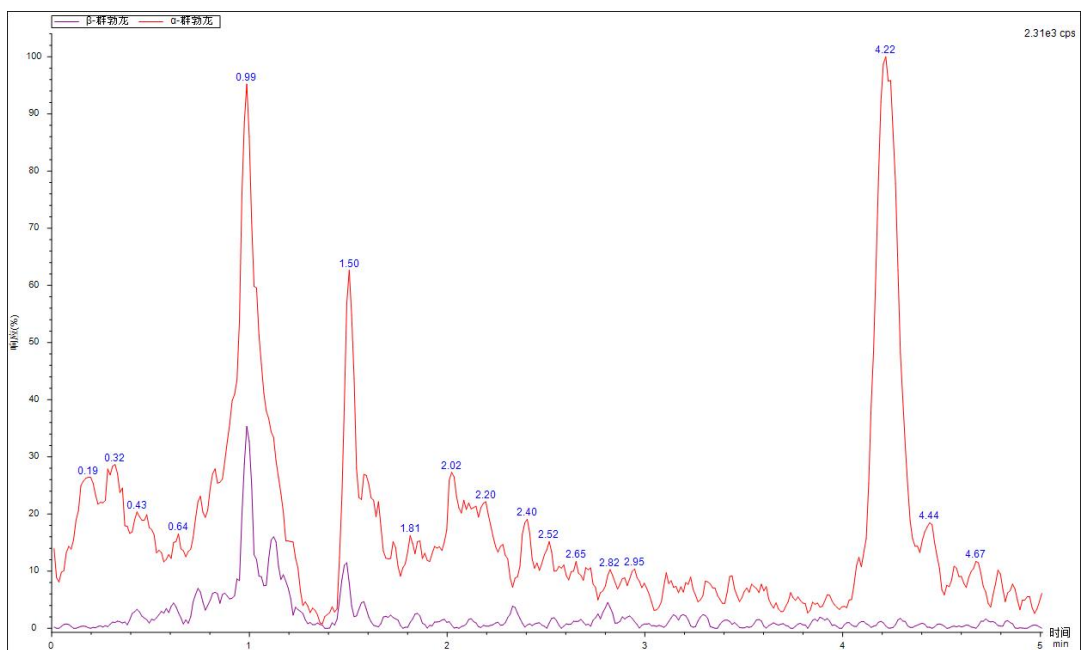


图 9 牛奶样品 MRM 叠加色谱图

4 结论

牛奶样品经 HLB、氨基固相萃取柱等前处理过程，使用谱育科技三重四极杆液质联用仪 EXPEC 5210 系统对牛奶中 2 种群勃龙类化合物进行测定。本文考察了方法的线性、精密度、灵敏度、回收率和实际样品测试等，结果表明:2 种群勃龙类化合物在检测范围内线性良好，相关系数均在 0.995 以上；对不同浓度的混合标准溶液各平行测定 6 次，方法精密度在 5%以内，仪器精密度良好。对于样品加标前处理后上机分析，加标浓度 30ug/kg 时， α -群勃龙回收率为 111.67%， β -群勃龙回收率为 75.11%，回收率均处于 60%~120%之间，符合标准。 α -群勃龙检出限为 0.15ug/kg，测定下限为 0.51 ug/kg； β -群勃龙检出限为 0.06ug/kg，测定下限为 0.20 ug/kg；因此使用谱育科技高灵敏、高抗污染能力的 EXPEC 5210 系统，可用于牛奶样品中群勃龙类化合物残留含量进行快速、灵敏、准确的定量检测。