

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

测定牛奶中的17种激素残留

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-8040 联用测定牛奶中 17 种激素残留的分析方法。牛奶基质经样品前处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定性定量分析。17 种激素在各自的标准溶液浓度范围内具有良好的线性相关性,相关系数在 0.9974-0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验,17 种激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.0102%~0.161%和 0.563%~6.55%之间,仪器精密度良好。采取牛奶基质加标的方法计算回收率进行方法验证,17 种激素的回收率范围为 61.00%~110.9%,方法定量限范围为 0.14~0.97 $\mu\text{g/kg}$,可以满足牛奶中激素类药物的检测需求。

关键词: 激素 牛奶 固相萃取 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

近年来国内发生的奶粉疑致“婴儿性早熟”事件成为继 2008 年三聚氰胺事件以来乳制品行业面临的又一重大食品安全事件。奶粉事件危机频出,严重挫伤了消费者对国内奶粉质量的信心和奶粉业的发展。从利益、动机的角度而言,商家虽然不会在奶粉加工过程中添加激素,但是在原料奶生产环节,养殖户为了提高奶牛产奶量,滥用抗生素和激素等不法行为却可能发生。奶粉中除了含有内源性孕激素、雌性激素与雄性激素外,其他所有化学合成类激素均属于禁用药物。2002 年我国农业部第 235 号公告中已禁止使用乙烯雌酚、醋酸甲孕酮、甲基睾丸酮、群勃龙、玉米赤霉醇等化学合成类激素物质,并规定这些化合物在动物性食品中不得检出。同时欧盟第 96/22/EC 指令,美国药物管理局(FDA)也禁止在食品源性动物中使用激素类药物。

本文在结合国家标准 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》基础上,采用固相萃取进行净化,超高效液相色谱进行分离,三重四极杆进行定性和定量,成功地建立了固相萃取与串联质谱联用测定牛奶中 17 种激素的分析方法。

1. 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-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 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-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×75mmL.,2.2μm

流动相：A—0.1%甲酸水溶液，B—甲醇，A/B=50%/50%（V/V）

流速：0.4 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

进样体积：5 μL

柱温：40℃

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
8	Pumps	Pump B Conc.	64
11	Pumps	Pump B Conc.	64
12.5	Pumps	Pump B Conc.	100
14.5	Pumps	Pump B Conc.	100
15	Pumps	Pump B Conc.	50
20	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
雄烯二酮	287.1	97.0*	-15.0	-25.0	-20.0
	287.1	109.2	-15.0	-25.0	-23.0
勃地酮	287.1	121.1*	-26.0	-25.0	-26.0
	287.1	135.1	-26.0	-15.0	-15.0
达那唑	338.3	148.2*	-26.0	-30.0	-16.0
	338.3	120.0	-26.0	-35.0	-24.0
氟甲睾酮	337.2	241.2*	-13.0	-25.0	-18.0
	337.2	131.0	-13.0	-35.0	-28.0
睾酮	289.3	97.0*	-25.0	-25.0	-20.0
	289.3	109.1	-25.0	-25.0	-22.0
甲睾酮	303.3	109.2*	-25.0	-30.0	-21.0
	303.3	97.2	-25.0	-25.0	-19.0
美雄酮	301.3	121.2*	-26.0	-25.0	-13.0
	301.3	149.2	-26.0	-15.0	-16.0
诺龙	275.1	109.1*	-13.0	-30.0	-22.0
	275.1	257.2	-13.0	-15.0	-20.0
去甲雄烯二酮	273.1	109.2*	-10.0	-25.0	-23.0
	273.1	197.1	-10.0	-20.0	-15.0
群勃龙	271.2	253.2*	-27.0	-20.0	-19.0
	271.2	199.1	-27.0	-25.0	-15.0
乙酸甲地孕酮	385.1	267.2*	-23.0	-20.0	-20.0
	385.1	325.2	-23.0	-15.0	-25.0
甲羟孕酮	345.3	123.0*	-13.0	-25.0	-13.0
	345.3	97.2	-13.0	-25.0	-19.0
甲羟孕酮乙酸酯	387.3	123.0*	-15.0	-30.0	-13.0

	387.3	327.3	-15.0	-10.0	-25.0
甲基炔诺酮	313.3	109.2*	-12.0	-35.0	-24.0
	313.3	245.2	-12.0	-25.0	-18.0
氯地孕酮乙酸酯	405.1	345.2*	-24.0	-15.0	-18.0
	405.1	309.2	-24.0	-20.0	-23.0
炔诺酮	299.1	109.1*	-19.0	-35.0	-22.0
	299.1	91.2	-19.0	-25.0	-11.0
孕酮	315.2	97.2*	-12.0	-25.0	-20.0
	315.2	109.0	-12.0	-30.0	-21.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度各为 100 mg/L 的 17 种激素，用超纯水依次稀释至 1000 µg/L 的混合标样。将 1000 µg/L 的 17 种激素混合标样，用超纯水逐级稀释成不同浓度点的标准工作液用于建立标准曲线，线性浓度点见表 3。

表 3. 17 种激素的线性浓度点 (µg/L)

化合物名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6	浓度 7
去甲雄烯二酮	1	2	4	10	20	50	100
群勃龙	1	2	4	10	20	50	100
勃地酮	1	2	4	10	20	50	100
诺龙	1	2	4	10	20	50	100
雄烯二酮	1	2	4	10	20	50	100
美雄酮	1	2	4	10	20	50	100
睾酮	1	2	4	10	20	50	100
甲睾酮	1	2	4	10	20	50	100
甲羟孕酮	1	2	4	10	20	50	100
乙酸甲地孕酮	1	2	4	10	20	50	100
甲羟孕酮乙酸酯	1	2	4	10	20	50	100
孕酮	1	2	4	10	20	50	100

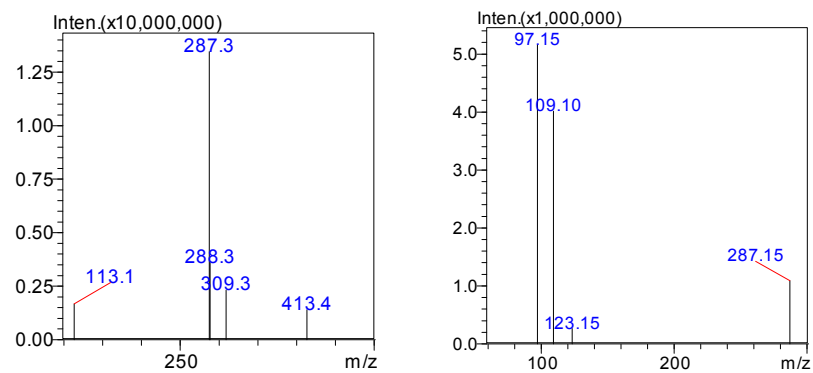
炔诺酮	5	10	20	50	100	250	500
甲基炔诺酮	5	10	20	50	100	250	500
氯地孕酮乙酸酯	5	10	20	50	100	250	500
氟甲睾酮	10	20	40	100	200	500	1000
达那唑	10	20	40	100	200	500	1000

1.3.2 样品前处理方法

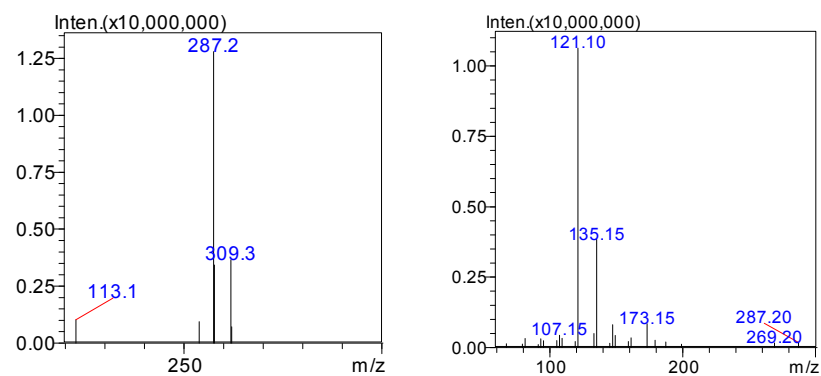
牛奶基质样品的前处理参照 GB/T 21981-2008《动物源性食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》进行处理。

2. 结果讨论

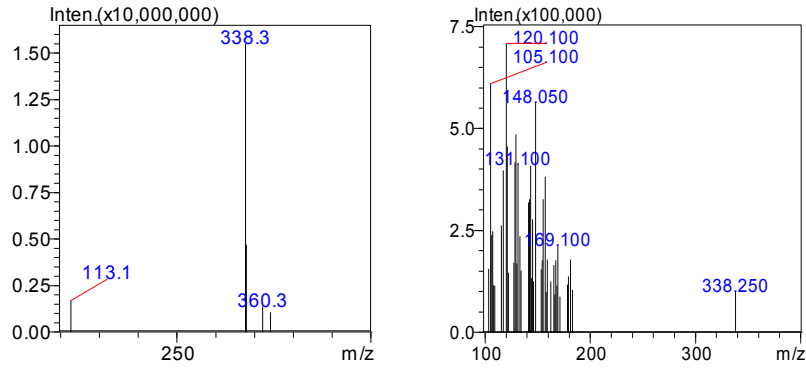
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



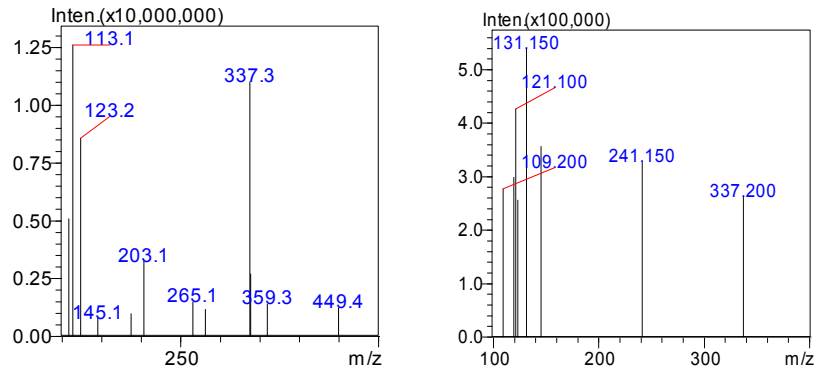
1. 雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-22V）（右图）



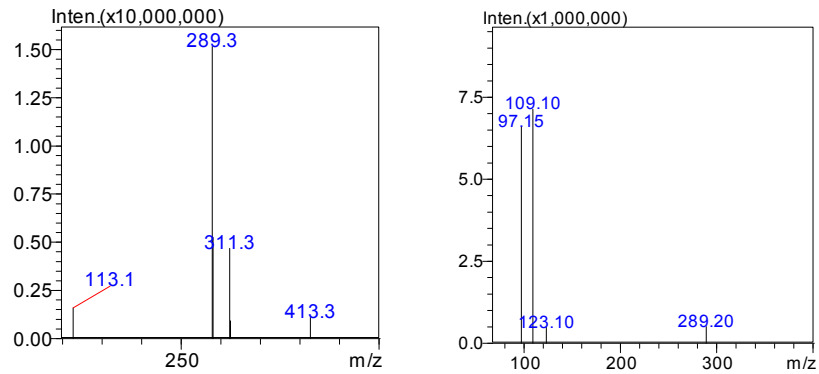
2. 勃地酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-21V）（右图）



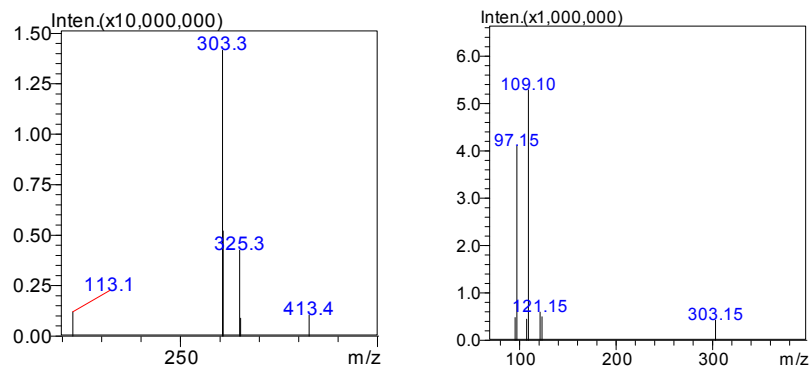
3. 达那唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-40V）（右图）



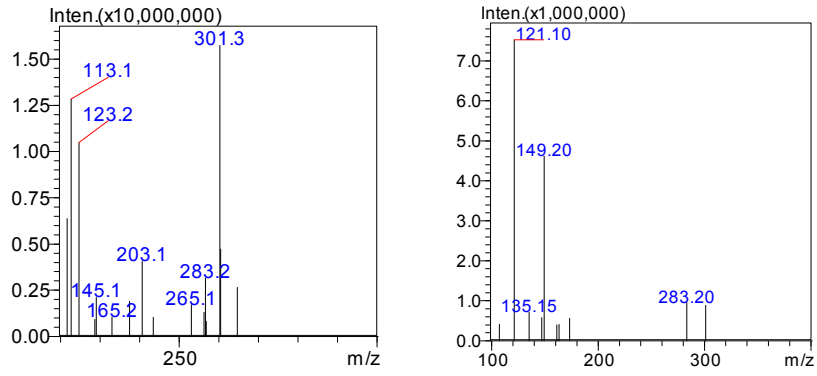
4. 氟甲睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



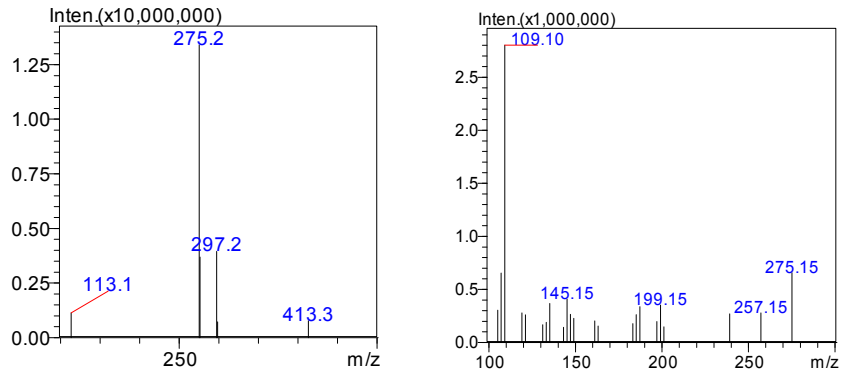
5. 睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



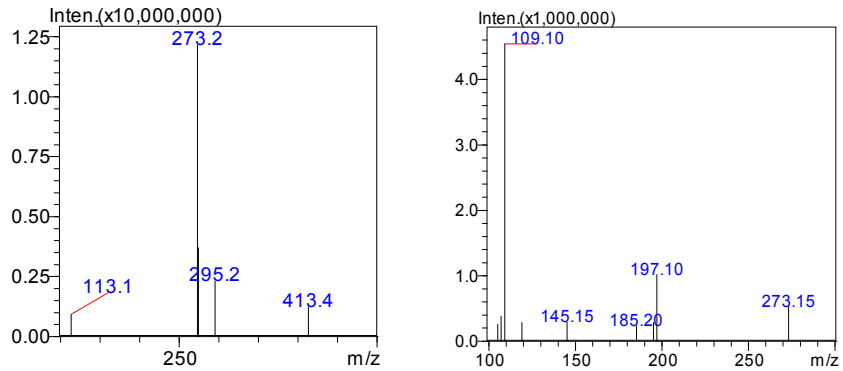
6. 甲睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



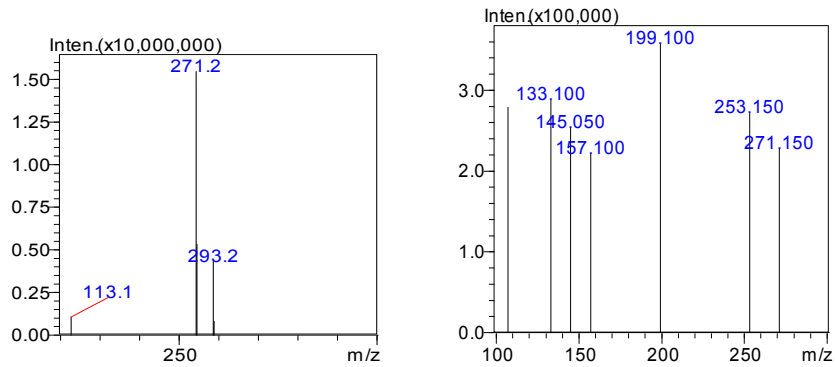
7. 美雄酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



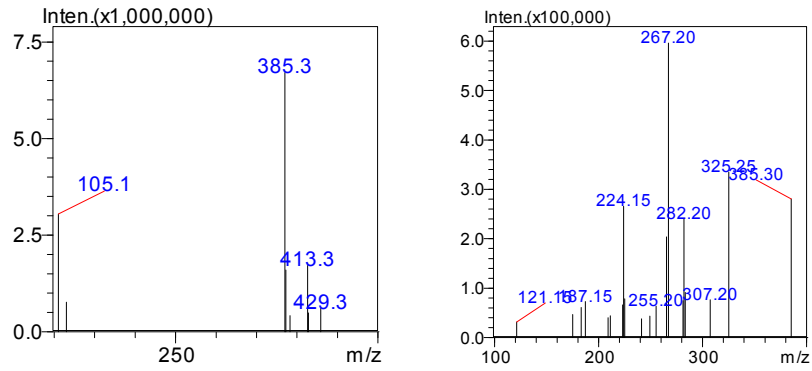
8. 诺龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-24V）（右图）



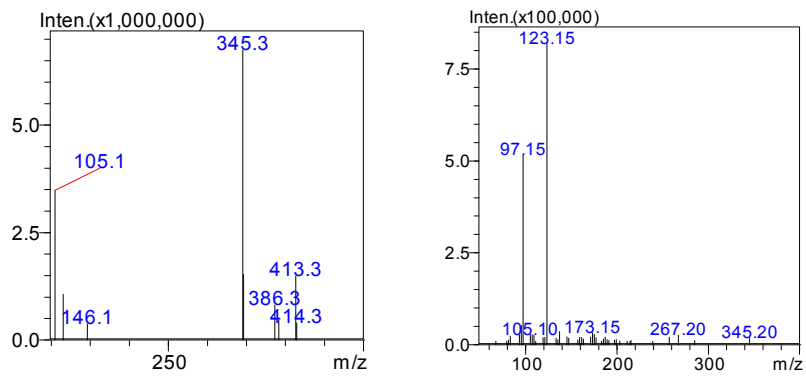
9. 去甲雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



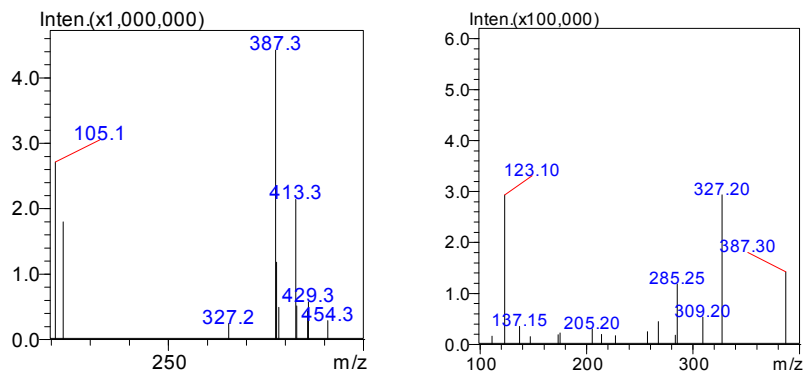
10. 群勃龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-30V）（右图）



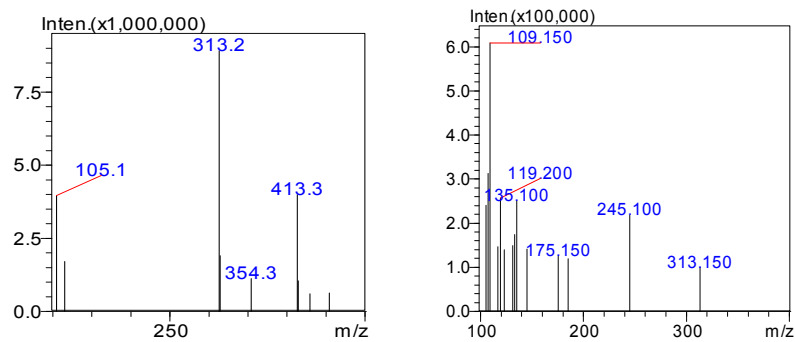
11. 乙酸甲地孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-19V）（右图）



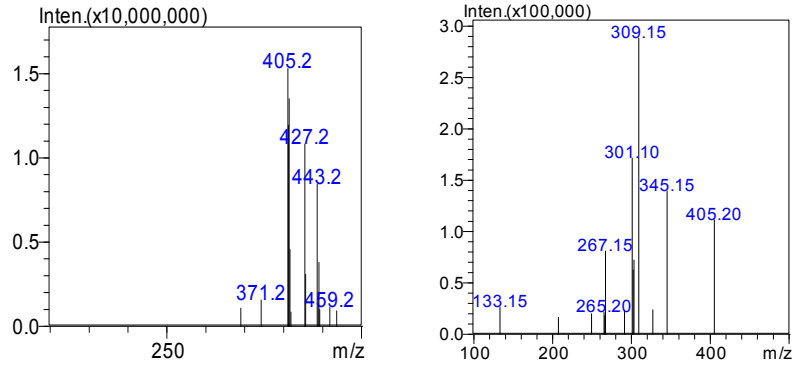
12. 甲羟孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-29V）（右图）



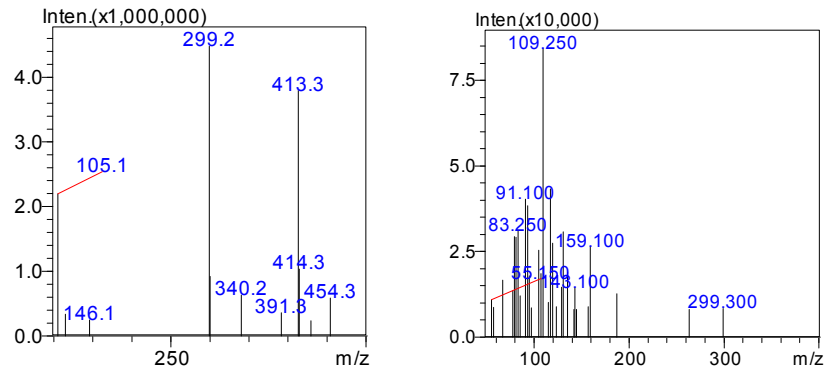
13. 甲羟孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-20V）（右图）



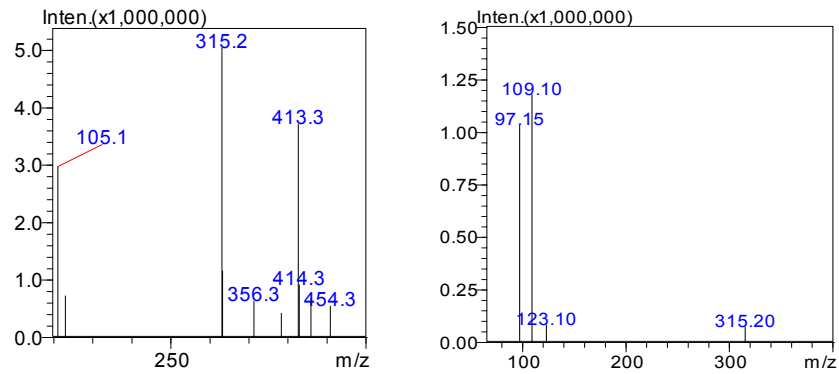
14. 甲基炔诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



15. 氯地孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



16. 快诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



17. 孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）

图 1. 17 种激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

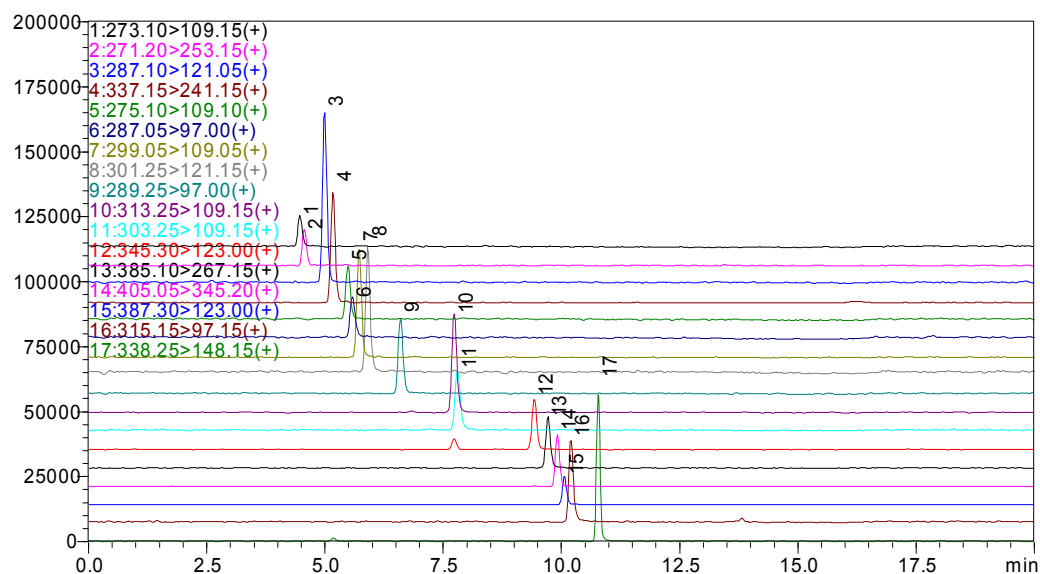
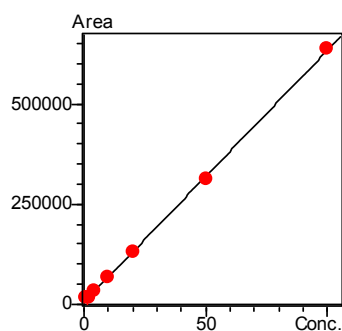


图 2. 标准样品 MRM 色谱图

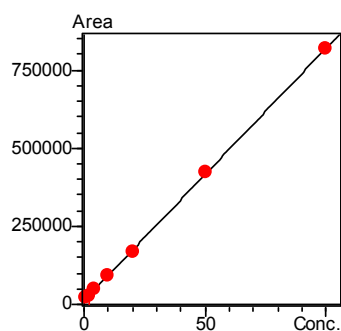
峰归属:1、去甲雄烯二酮 (10 $\mu\text{g/L}$); 2、群勃龙 (10 $\mu\text{g/L}$); 3、勃地酮(10 $\mu\text{g/L}$); 4、氟甲睾酮(100 $\mu\text{g/L}$); 5、诺龙(10 $\mu\text{g/L}$); 6、雄烯二酮 (10 $\mu\text{g/L}$); 7、炔诺酮 (50 $\mu\text{g/L}$); 8、美雄酮(10 $\mu\text{g/L}$); 9、睾酮(10 $\mu\text{g/L}$); 10、甲基炔诺酮(50 $\mu\text{g/L}$); 11、甲睾酮(10 $\mu\text{g/L}$); 12、甲羟孕酮 (10 $\mu\text{g/L}$); 13、乙酸甲地孕酮(10 $\mu\text{g/L}$); 14、氯地孕酮乙酸酯(50 $\mu\text{g/L}$); 15、甲羟孕酮乙酸酯 (10 $\mu\text{g/L}$); 16、孕酮 (10 $\mu\text{g/L}$); 17、达那唑 (100 $\mu\text{g/L}$)

2.3 线性关系

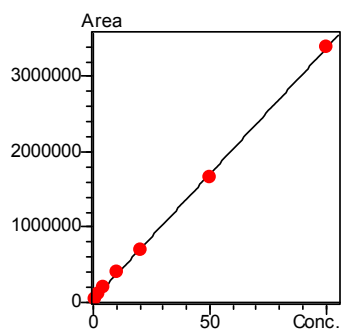
按 1.2 项下的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，七点外标法建立校准曲线，如图 3 所示。17 种激素在不同的线性浓度点下（见表 3），线性相关性良好，相关系数均在 0.9974-0.9999 之间（见表 4）。



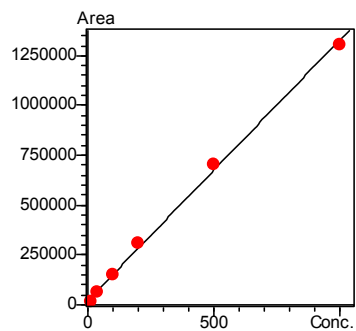
1、去甲雄烯二酮



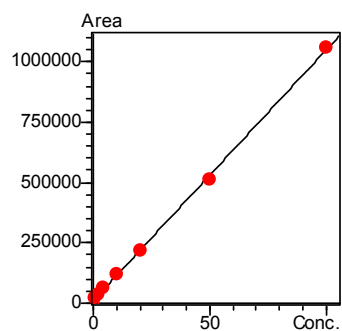
2、群勃龙



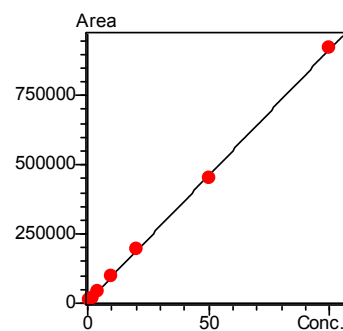
3、勃地酮



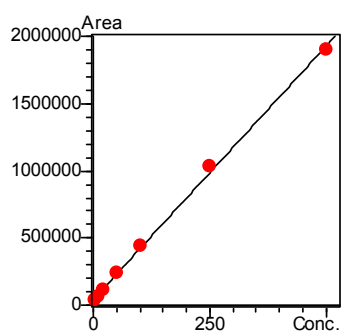
4、氟甲萆酮



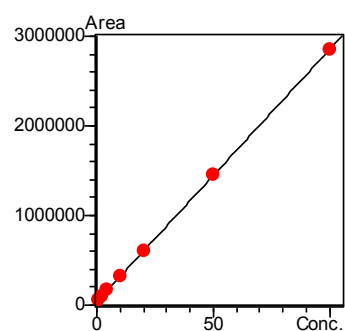
5、诺龙



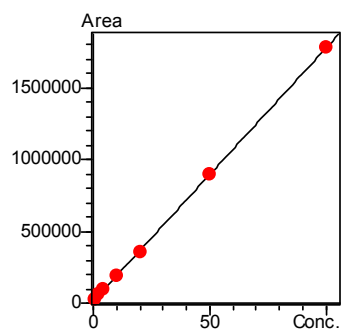
6、雄烯二酮



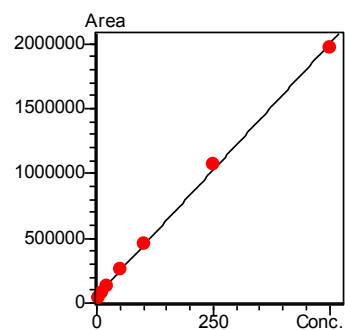
7、炔诺酮



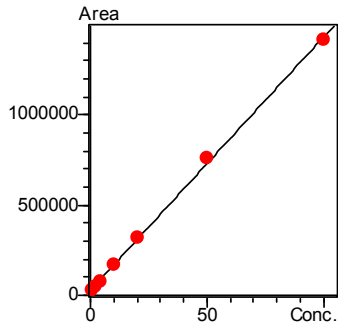
8、美雄酮



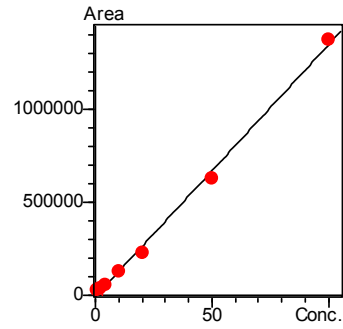
9、萆酮



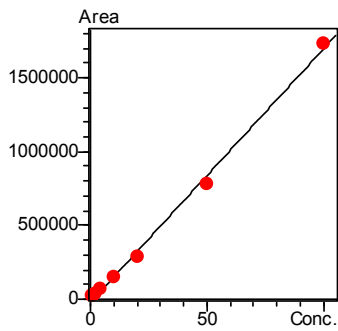
10、甲基炔诺酮



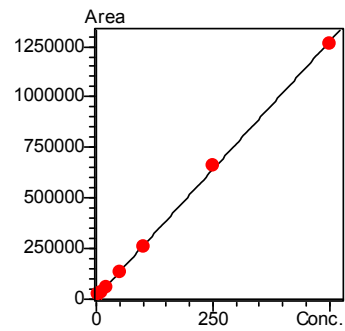
11、甲睾酮



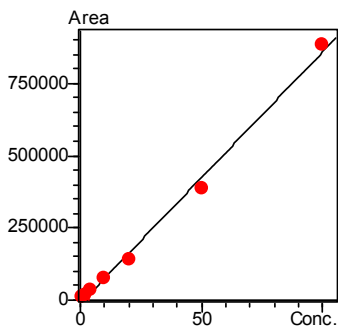
12、甲羟孕酮



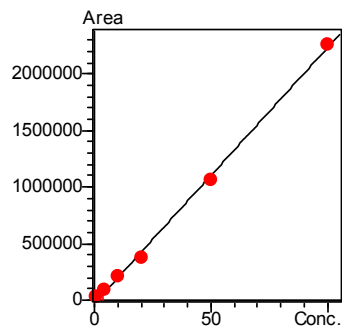
13、乙酸甲地孕酮



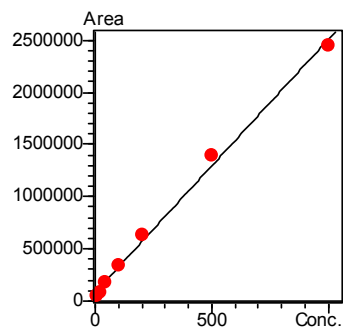
14、氯地孕酮乙酸酯



15、甲羟孕酮乙酸酯



16、孕酮



17、达那唑

图 3. 17 种激素的标准工作曲线

表 4. 17 种激素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围($\mu\text{g/L}$)	相关系数(R)
1	去甲雄烯二酮	$Y = (6291.94)X + (5045.17)$	1.0~100	0.9998
2	群勃龙	$Y = (8093.28)X + (11702.5)$	1.0~100	0.9999
3	勃地酮	$Y = (33290.1)X + (39696.4)$	1.0~100	0.9997
4	氟甲睾酮	$Y = (1304.96)X + (21697.4)$	10~1000	0.9991
5	诺龙	$Y = (10371.7)X + (11750.5)$	1.0~100	0.9997
6	雄烯二酮	$Y = (9140.16)X + (4939.96)$	1.0~100	0.9999
7	炔诺酮	$Y = (3771.80)X + (44103.2)$	5.0~500	0.9993
8	美雄酮	$Y = (28151.5)X + (39506.0)$	1.0~100	0.9999
9	睾酮	$Y = (17610.0)X + (13733.6)$	1.0~100	0.9999
10	甲基炔诺酮	$Y = (3882.87)X + (56327.6)$	5.0~500	0.9992
11	甲睾酮	$Y = (14053.9)X + (28168.1)$	1.0~100	0.9996
12	甲羟孕酮	$Y = (13545.6)X + (-8027.14)$	1.0~100	0.9985
13	乙酸甲地孕酮	$Y = (17153.8)X + (-18765.8)$	1.0~100	0.9984
14	氯地孕酮乙酸酯	$Y = (2524.61)X + (10654.8)$	5.0~500	0.9998
15	甲羟孕酮乙酸酯	$Y = (8715.12)X + (-11254.1)$	1.0~100	0.9974
16	孕酮	$Y = (22587.5)X + (-25767.7)$	1.0~100	0.9991
17	达那唑	$Y = (2422.08)X + (85881.9)$	10~1000	0.9977

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表 5），平行测定 6 次，结果表明仪器具有良好的精密度（见表 5）。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%(低浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(中浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(高浓度- $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
去甲雄烯二酮	0.161	5.82	0.115	2.32	0.0458	0.887
群勃龙	0.125	4.83	0.0787	3.17	0.0400	1.12
勃地酮	0.0958	4.48	0.0767	2.60	0.0384	1.57
氟甲睾酮	0.106	4.14	0.0700	2.40	0.0392	1.85

诺龙	0.131	6.55	0.0977	2.45	0.0444	0.715
雄烯二酮	0.149	5.24	0.0333	1.71	0.0325	1.51
炔诺酮	0.123	0.909	0.0737	1.24	0.0364	0.745
美雄酮	0.0942	2.83	0.0635	1.88	0.0405	0.713
睾酮	0.141	1.58	0.0578	3.53	0.0532	0.563
甲基炔诺酮	0.112	1.86	0.0414	2.14	0.0461	0.659
甲睾酮	0.160	2.27	0.0269	2.46	0.0472	1.54
甲羟孕酮	0.116	0.946	0.0147	3.65	0.0264	2.68
乙酸甲地孕酮	0.120	5.25	0.0172	5.61	0.0271	2.78
氯地孕酮乙酸酯	0.0622	4.03	0.0196	5.27	0.0116	1.56
甲羟孕酮乙酸酯	0.0862	6.54	0.0102	4.08	0.0169	2.51
孕酮	0.0658	4.99	0.0177	4.05	0.0138	2.04
达那唑	0.0566	5.09	0.0124	5.36	0.0168	2.74

1、低浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 20 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 2 $\mu\text{g/L}$;

2、中浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 50 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$;

3、高浓度: 除氟甲睾酮和达那唑浓度为 500 $\mu\text{g/L}$, 炔诺酮、甲基炔诺酮和氯地孕酮乙酸酯浓度为 250 $\mu\text{g/L}$, 其余物质浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度, 配制如下浓度的标准测试样品 7 份 (见表 6), 平行进样 7 次, 色谱图如图 4 所示。由 7 次进样测定的标准偏差(S)计算出检出限和定量限, 此时检出限 $\text{MDL}=3.14\times\text{S}$, 定量限 $\text{LOQ}=4\times\text{MDL}$ 。测定结果如表 6 所示。

表 6. 17 种激素的检出限和定量限

No.	名称	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	标准偏差 (S)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	去甲雄烯二酮	1	0.076	0.24	0.96
2	群勃龙	1	0.062	0.19	0.76
3	勃地酮	1	0.060	0.19	0.76
4	氟甲睾酮	10	0.069	0.22	0.87
5	诺龙	1	0.054	0.17	0.68

6	雄烯二酮	1	0.089	0.28	1.12
7	炔诺酮	5	0.082	0.26	1.04
8	美雄酮	1	0.020	0.06	0.24
9	睾酮	1	0.043	0.14	0.54
10	甲基炔诺酮	5	0.11	0.34	1.36
11	甲睾酮	1	0.035	0.11	0.44
12	甲羟孕酮	1	0.060	0.19	0.76
13	乙酸甲地孕酮	1	0.10	0.31	1.24
14	氯地孕酮乙酸酯	5	0.071	0.22	0.88
15	甲羟孕酮乙酸酯	1	0.079	0.25	1.00
16	孕酮	1	0.059	0.19	0.76
17	达那唑	10	0.16	0.50	2.00

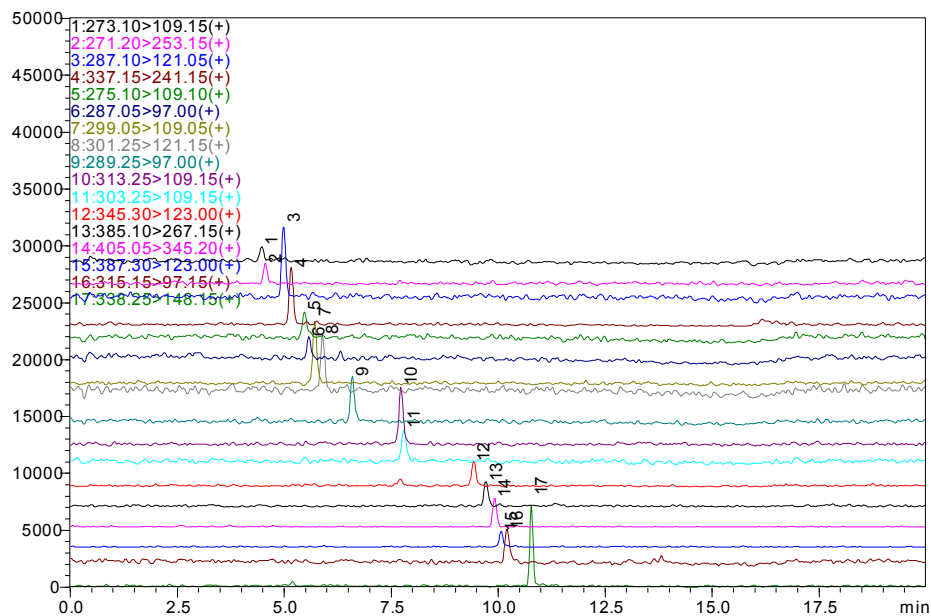


图 4. 标准测试样品的 MRM 色谱图（浓度见表 6）

峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、雄烯二酮; 7、炔诺酮;
8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮;
14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

2.6 基质加标实验

图 5 为牛奶基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图，由实验结果可知检测出上述 17 种激素中的孕酮。往牛奶基质中添加 17 种激素标样，加标 MRM 色谱图如图 6 所示。牛奶

中 17 种激素检测与加标回收率结果见表 7。由信噪比的三倍计算得出该方法的定量限范围为 0.14~0.97 $\mu\text{g/kg}$ (见表 8)。

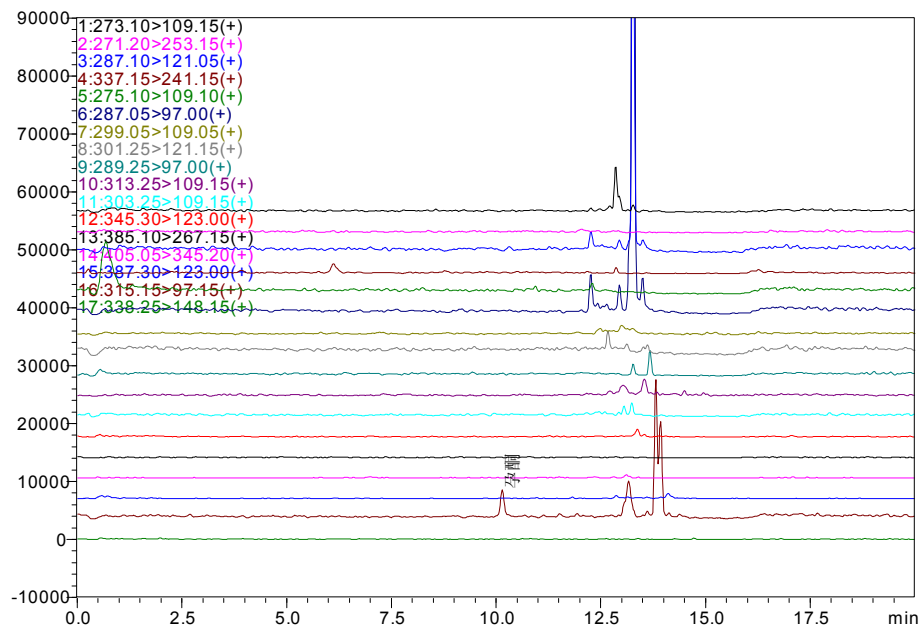


图 5. 牛奶基质的 MRM 色谱图

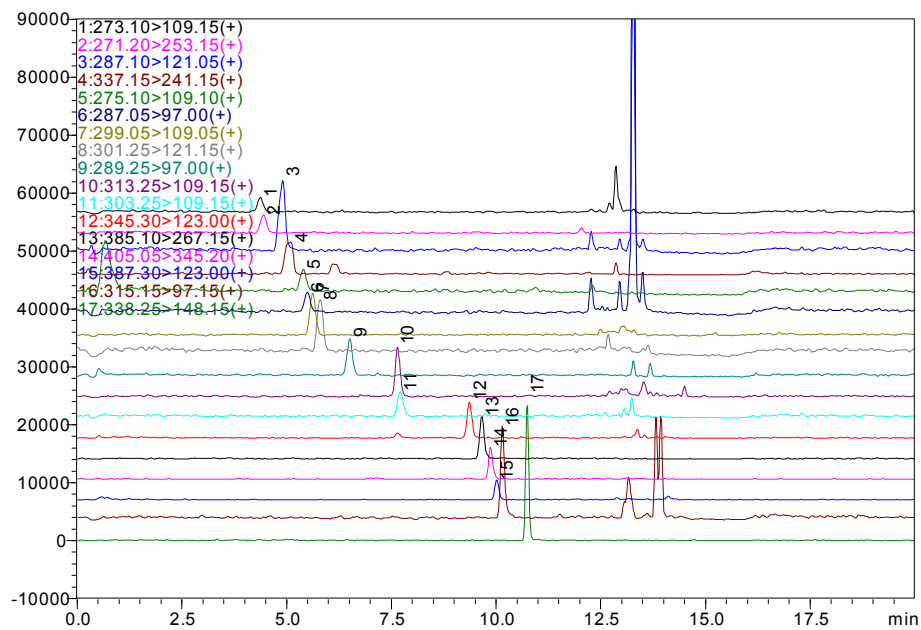


图 6. 牛奶加标的 MRM 色谱图 (浓度见表 7, 峰归属同图 4)

表 7. 牛奶中激素类药物检测与加标回收率结果

No.	名称	牛奶检测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	样品加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)
1	去甲雄烯二酮	N.D.	3.2	2.77	86.6
2	群勃龙	N.D.	3.2	2.39	74.7
3	勃地酮	N.D.	3.2	2.59	80.9
4	氟甲睾酮	N.D.	32	27.1	84.7
5	诺龙	N.D.	3.2	3.10	96.9
6	雄烯二酮	N.D.	3.2	3.00	93.8
7	炔诺酮	N.D.	16	10.5	65.6
8	美雄酮	N.D.	3.2	2.06	64.4
9	睾酮	N.D.	3.2	2.87	89.7
10	甲基炔诺酮	N.D.	16	10.9	68.1
11	甲睾酮	N.D.	3.2	2.25	70.3
12	甲羟孕酮	N.D.	3.2	3.55	110.9
13	乙酸甲地孕酮	N.D.	3.2	3.50	109.4
14	氯地孕酮乙酸酯	N.D.	16	14.5	90.6
15	甲羟孕酮乙酸酯	N.D.	3.2	3.30	103.1
16	孕酮	1.5	3.2	4.74	101.2
17	达那唑	N.D.	32	19.5	61.0

注: N.D.表示未检出

表 8. 方法检出限和定量限

No.	名称	样品加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	信噪比 (S/N)	方法检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	方法定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
1	去甲雄烯二酮	1.6	48	0.10	0.33
2	群勃龙	1.6	54	0.09	0.30
3	勃地酮	1.6	41	0.12	0.40
4	氟甲睾酮	16	168	0.29	0.97
5	诺龙	1.6	55	0.09	0.30

6	雄烯二酮	1.6	60	0.08	0.27
7	炔诺酮	8	140	0.17	0.57
8	美雄酮	1.6	89	0.05	0.17
9	睾酮	1.6	116	0.04	0.14
10	甲基炔诺酮	8	139	0.17	0.57
11	甲睾酮	1.6	96	0.05	0.17
12	甲羟孕酮	1.6	40	0.12	0.40
13	乙酸甲地孕酮	1.6	54	0.09	0.30
14	氯地孕酮乙酸酯	8	202	0.12	0.40
15	甲羟孕酮乙酸酯	1.6	56	0.09	0.30
16	孕酮	1.6	47	0.10	0.34
17	达那唑	16	171	0.28	0.93

3. 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-8040 联用快速测定牛奶中 17 种激素残留的分析方法。17 种激素线性范围宽，相关系数在 0.9974-0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.0102%~0.161% 和 0.563%~6.55% 之间，仪器精密度良好。牛奶基质加标回收率范围为 61.00%-110.9%，方法定量限范围为 0.14~0.97 $\mu\text{g/kg}$ ，测定限低于国家标准 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》。实验结果表明该方法灵敏度高，可以满足牛奶中激素类药物的检测需求。