

同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定 鸡蛋中 3 种类固醇激素

刘宇尘, 周 剑, 王 敏*, 杨梦瑞, 王彤彤

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘 要: **目的** 建立一种同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法(isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, ID-UPLC-MS/MS)检测禽产品中典型类固醇激素(雌酮、孕酮和睾酮)的分析方法。**方法** 样品经乙腈提取, 甲醇洗脱后, 氮吹至干燥后用 1 mL 甲醇复溶, 上机检测。用 0.1% 甲酸水溶液(A)和甲醇(B)作流动相进行梯度洗脱, 在电喷雾正离子模式和多反应监测模式下采集离子对, 检测目标物。**结果** 建立的方法在 5 min 内完成了目标化合物(雌酮、孕酮和睾酮)的定量分析。3 种类固醇激素在 0.5~100.0 $\mu\text{g/kg}$ 范围内线性关系良好, r^2 均大于 0.996。雌酮、孕酮和睾酮的方法检出限分别为 0.052、0.023 和 0.048 $\mu\text{g/kg}$, 定量限分别为 0.173、0.077 和 0.160 $\mu\text{g/kg}$ 。在 1、5 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下, 3 种目标化合物的平均回收率在 96.62%~103.11%, 精密度在 1.36%~3.87%之间。**结论** 该方法简便快速、回收率高、稳定性好, 可有效测定禽产品中雌酮、孕酮和睾酮含量。

关键词: 同位素稀释法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 禽产品; 类固醇激素; 基质效应

Quantification of 3 kinds of steroid hormones in eggs by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Yu-Chen, ZHOU Jian, WANG Min*, YANG Meng-Rui, WANG Tong-Tong

(Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agri-food Safety and Quality, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the quantification of 3 kinds of typical steroid hormones (estrone, progesterone and testosterone) in poultry products by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted by acetonitrile, eluted by methanol, blown by nitrogen to dry, redissolved with 1 mL methanol, and tested on the machine. Gradient elution was performed with 0.1% formic acid aqueous solution (A) and methanol (B) as mobile phases, ion pairs were collected by electrospray positive ionization mode, and quantitative and qualitative ions were determined by multiple reaction monitoring mode. **Results** The established method completed the quantitative analysis of target compounds (estrone, progesterone and testosterone) within 5 min. The 3 kinds of steroid hormones had good linear relationships in the range of 0.5–100.0 $\mu\text{g/kg}$ with the correlation coefficients r^2 more than 0.996. The

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1604802)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1604802)

*通信作者: 王敏, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品科学。E-mail: wangmin@caas.cn

*Corresponding author: WANG Min, Master, Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China. E-mail: wangmin@caas.cn

limits of detection for estrone, progesterone and testosterone were 0.052, 0.023 and 0.048 $\mu\text{g/kg}$, respectively, and the limits of quantification were 0.173, 0.077 and 0.160 $\mu\text{g/kg}$, respectively. At the addition levels of 1, 10 and 50 $\mu\text{g/kg}$, the average recoveries of the 3 kinds of steroid hormones were 96.62%–103.11%, and the precision was between 1.36% and 3.87%. **Conclusion** The method is simple, rapid with high recovery rates and good stability, which can effectively determine the content of estrone, progesterone and testosterone in poultry products.

KEY WORDS: isotope dilution method; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; poultry products; steroid hormone; matrix effect

0 引言

类固醇激素又称甾体激素(steroid hormones, SHs)是一类结构相似的四环脂肪烃化合物,主要由雌激素、雄激素、孕激素和皮质激素构成^[1]。类固醇激素在自然界中以天然和人工合成 2 种方式存在,主要参与动物体的生长、发育与繁殖等过程^[2]。随着农业产业化发展,这类激素因其良好的调节作用而被广泛应用于农业生产中,达到促进生产、提高饲料转化率等目的^[2-3]。雌酮(estrone, E1)、孕酮(progesterone, P)和睾酮(testosterone, T)分别是典型性的雌激素、孕激素和雄激素。孕酮作为一种内源性孕激素,常参与调节哺乳动物的生殖周期、妊娠以及胚胎发育等过程^[3-4]。睾酮作为雄激素的代表物质,在下丘脑垂体性腺系统中发挥重要作用。如控制男性精子产生与性征等。然而畜禽产业中类固醇激素的过量使用会不可避免地产生激素的残留,随着食物链进入人体内,对人体健康造成危害,甚至导致乳腺癌、生长畸形、产生雌雄同体等疾病^[5]。

据报道,在日本和美国,鸡肉中的雌激素含量水平远远高于人体脂肪组织所含激素水平。因此,随着禽产品的摄入,人体内激素含量也存在超标风险^[6],同时,随着收入水平的提高,近 30 年来,我国居民肉类消费大幅增长,其中禽肉消费增长尤为迅速,成为继猪肉之后的第 2 大肉类消费品^[7-8]。据联合国粮农组织统计数据显示,鸡肉消费量占中国禽消费量的 70%,其中人均禽肉消费量是 23.5 kg。因此准确高效地检测禽产品中类固醇激素含量十分必要。

食品中激素残留常用的检测方法有气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-串联质谱法和液相色谱-质谱法^[8-10]。气相色谱常用于弱极性、低沸点化合物等的分析,具有灵敏度高,选择性好等优点,质谱法在痕量分析中应用广泛,其高的灵敏度与强的特异性使其成为检测复样品基质的得力工具,质谱技术与色谱技术的结合,进一步提高了检测技术的准确度^[11-12]。液相色谱与气相色谱均可应用于激素检测,但气相色谱需要进行衍生化反应,与液相色谱相比,在前处理操作步骤上更为耗时^[13-16],同时,超高效液相色谱-串联质谱法具有高灵敏度和高准确度。

同位素稀释质谱法是一种具有绝对测量性质的高准确度的定值方法,是唯一一种用于痕量和微量化合物测定的权威方法。因此本研究选择同位素稀释-液相色谱-质谱法对化合物进行检测。上述 3 种类固醇激素在畜禽产品中属于痕量存在的,且目前研究对于牛肉、鸡肉、牛奶和猪肉等产品中的类固醇激素研究较多,对鸡蛋基质研究较少。因此,基于目标化合物的痕量性与食品基质的复杂性,为保证质谱检测结果的准确性与稳定性,本研究拟建立检测禽产品中雌酮、孕酮和睾酮的同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法(isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, ID-UPLC-MS/MS),为禽产品质量安全提供了相应的监测技术手段。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪(美国安捷伦公司); IKA Vortex2 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); 高速冷冻离心机(日本 ASONE 公司); MS200 多管涡旋混匀仪(杭州瑞诚有限公司); DSY-III 水浴氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司); AP135W 电子天平(0.1 mg, 日本岛津公司); XS105 电子天平、AL104 电子天平(0.1 mg, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 色谱柱 Agilent Poroshell EC-C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm)、Agilent HLB C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm)(美国 Agilent 公司); Waters Oasis WAX 固相萃取柱(美国 Waters 公司); WelchPreFilter 双膜针头式过滤器、尼龙 66 针筒式滤膜过滤器(天津津腾公司)。

标准物质: 雌酮(纯度 99.3%)、睾酮(纯度 99.6%)、孕酮(纯度 99.2%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 同位素内标物: 睾酮-D3(纯度 98.0%, testosterone-16,16,17-D3)、孕酮-D9(纯度 96.8%, progesterone-2,2,4,6,6,17,21,21,21-D9), 雌酮-D4(纯度 98.4%, estrone-2,2,4,6,6,17,21,21,21-D4)(广州 CATO 公司); 甲醇、乙腈、正己烷(色谱纯, 美国 Sigma 公司)。

实验用的所有鸡蛋样品均购自北京某超市。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备液: 采用重量法配制 100 mg/kg 的雌酮、孕

酮和睾酮标准储备液,准确称取相应质量的目标物(精确到 0.01 mg),并用色谱级甲醇定容于容量瓶中,涡旋混匀,充分溶解后转移至聚乙烯离心管置于 4 ℃下保存,有效期 1 年。

同位素标记储备液:采用重量法配制 10 mg/kg 的雌酮-D4、孕酮-D9 和睾酮-D3 同位素标记储备液,准确称取相应质量的目标物(精确到 0.01 mg),并用色谱级甲醇定容于容量瓶中,涡旋混匀,充分溶解后转移至聚乙烯离心管置于 4 ℃下保存,有效期 1 年。

同位素标记工作液:10 μg/kg 的雌酮、孕酮和睾酮同位素标记标准工作溶液:采用重量法配制,准确称取雌酮-D4、孕酮-D9 和睾酮-D3 标准储备液和色谱级甲醇,将其稀释至 10 μg/kg,充分溶解混匀后置于 4 ℃下保存,有效期 3 个月。

1.2.2 样品前处理方法

把样品和内标工作溶液从冰箱中取出后置于干燥器中,在环境温度(20±2) ℃条件下充分平衡,涡旋混匀后再使用。准确称取 2.00 g(精确到 0.01 g)鸡蛋匀浆于 15 mL 离心管中。

称取 2.00 g 蛋液至 15 mL 聚乙烯离心管中,再加入 6 mL 乙腈与适量的同位素标记工作液。涡旋 3 min,超声 100W 20 min 混匀后,在 4 ℃ 12000 r/min 条件下冷冻离心 5 min。将上清液转移至另一 15 mL 离心管,用上述步骤重复提取剩余鸡蛋匀浆,合并两次上清液。在上清液中加入 1 mL 正己烷,涡旋混匀 1 min 静置 10 min,12000 r/min 4 ℃条件下冷冻离心 5 min 后取下层清液,待净化。

分别取 5 mL 的甲醇和 5 mL 水活化 Oasis WAX 固相萃取小柱,活化后在萃取柱中添加样品提取液,调节溶液流速至约 1 滴/s。加入 3 mL 水和 3 mL 20%甲醇水淋洗小柱。用真空泵抽小柱 5~10 min 后,用 6 mL 甲醇进行洗脱,并将洗脱液收集到 10 mL 离心管中,于 45 ℃下水浴条件下氮吹至近干,最后甲醇定容至 1.0 mL,超声复溶,过 0.22 μm 的安谱双层滤膜,待上机检测。

1.2.3 仪器条件

液相色谱条件:色谱柱 Agilent Poroshell EC C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm);水相设定为 0.1%甲酸水(A),有机相为甲醇(B),流速为 0.25 mL/min;进样体积为 5 μL。液相洗脱程序如表 1 所示。

质谱条件:Waters Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪,离子源:电喷雾正离子(electrospray ionization, ESI⁺)模式;多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式;离子源喷射电压为 3500 V;离子源温度为 500 ℃;雾化器压力为 35 psi;辅助气压力为 20 psi;气帘气压力为 25 psi;离子驻留时间为 150 ms。

1.2.4 滤膜的选择

本研究考察了 3 种常用滤膜对目标物吸附的影响,滤

膜规格信息如表 2 所示。取 1、5 和 10 μg/kg 的标准溶液直接过膜,每组 3 个平行,计算平均回收率。

表 1 液相色谱洗脱程序
Table 1 Liquid chromatography elution procedures

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	0.25	50.0	50.0
2.00	0.25	25.0	75.0
6.00	0.25	05.0	95.0
11.00	0.25	05.0	95.0
11.10	0.25	50.0	50.0
12.00	0.25	50.0	50.0

表 2 不同滤膜的规格信息
Table 2 Specifications of different membranes

名称	膜类型	孔径/μm	直径/mm	生产厂家
尼龙 66	尼龙	0.22	13	安谱
双膜尼龙	尼龙	0.22	13	Welch
GHP	聚丙烯	0.22	13	Waters

2 结果与分析

2.1 仪器条件优化

2.1.1 色谱条件优化

本研究比较了在不同流动相(0.1%甲酸水-甲醇、0.1%甲酸水-乙腈和 0.1%甲酸铵水-乙腈)条件下色谱峰的响应情况。结果如图 1 所示,0.1%甲酸水-甲醇作为流动相对睾酮的洗脱能力最强,且 A 相均为 0.1%甲酸水溶液的条件下,甲醇比乙腈所对应的色谱响应大、色谱峰峰形无拖尾(雌酮和孕酮结果相同)。同时,0.1%甲酸铵水较于 0.1%甲酸水对目标物的洗脱能力较差,因此本研究初步选择了 0.1%甲酸水-甲醇作为雌酮、孕酮和睾酮的流动相。洗脱程序见表 1。

2.1.2 质谱条件优化

目标物离子对采集信息如下表 3 所示。本研究对雌酮、孕酮和睾酮的质谱条件进行了优化。目标物分别在正负离子模式下扫描,结果显示,在正离子模式下,3 者易结合一个 H 生成较稳定的[M+H]⁺峰,离子响应较高,因此本研究选用正离子模式进行测定。扫描目标物的碎片离子,确定了定量离子对。在 MRM 模式下,进一步优化了去簇电压(decustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE),使得 3 种目标物的响应值均较高,峰形和分离度最好,详见表 1。

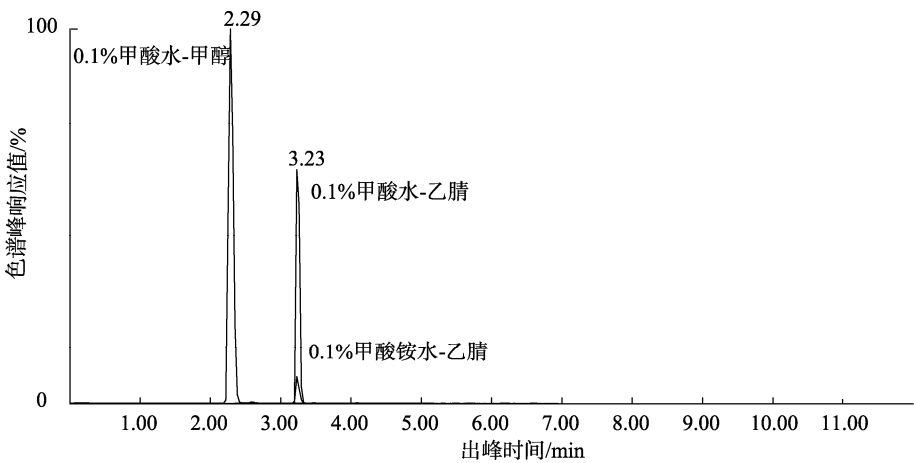


图 1 不同流动相条件下睾酮质谱响应值比较

Fig.1 Comparison of response values of mass spectrometry of T under different mobile phase conditions

表 3 目标分析物和同位素标记物 MRM 离子对信息

Table 3 MRM ion pair information for analytes and their internal standards

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/V
雌酮	269.1	145.0*/143.1	140	50
孕酮	315.2	97.1*/109.2	103	35
睾酮	289.08	96.95*/108.9	121	18
睾酮-D3	292.21	109.17/97.14*	52	22
孕酮-D9	324.29	113.21/100.14*	40	20
雌酮-D4	276.25	227.18/195.19*	32	14

注: *为定性离子。

2.2 前处理方法优化

2.2.1 提取条件优化

(1)提取剂的优化

本研究选用甲醇、乙腈、甲醇乙腈(50:50=V:V)、叔丁基甲醚、0.1%甲酸乙腈和 0.1%乙酸乙腈作为提取溶剂, 在 2.0 g 鸡蛋样品中加入 10 mL 上述提取剂来提取目标化合物。提取效率以不同提取剂提取后的色谱峰面积为比较依据。如图 2 所示, 乙腈作为提取剂时的提取效率明显高于其他提取剂, 叔丁基甲醚的回收率最低, 甲醇提取后的基质溶液中杂质较多, 且因甲醇挥发性较差, 相同氮吹条件下, 甲醇提取效率低于乙腈。同时乙腈除蛋白的效果高于甲醇, 适用于鸡蛋这种高蛋白的复杂基质, 因此本研究采用乙腈作为提取溶剂。

(2)提取次数的优化

在确定提取剂后, 本研究比较了不同提取次数对目标物质谱峰面积的影响, 对 1 次提取和 2 次提取效果进行对比。结果如图 3 所示, 2 次提取后雌酮、孕酮和睾酮的质谱峰面积分别是 1 次提取后的 1.23、1.08 和 1.37 倍。因此采用 2 次提取来检测禽产品中雌酮、孕酮和睾酮。

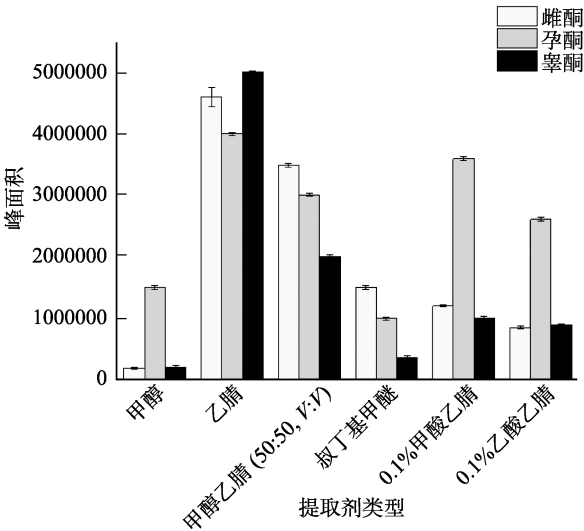


图 2 不同提取剂提取效率比较(n=3)

Fig.2 Comparison of extraction efficiencies with different extractants (n=3)

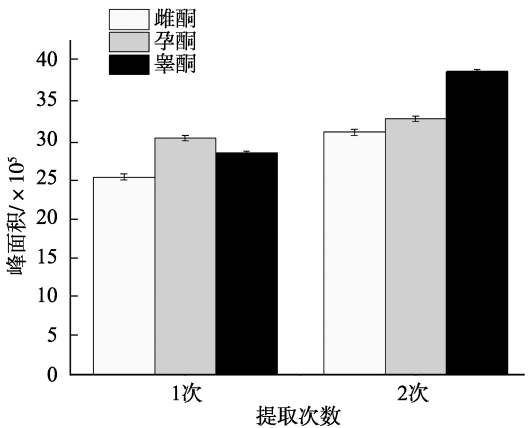


图 3 不同提取次数的提取效率比较(n=3)

Fig.3 Comparison of extraction efficiencies with different extraction times (n=3)

2.2.2 净化条件优化

提取条件优化好后,再用正己烷除脂,提取液并未十分透明澄清,因此为了更大程度上消除基质效应,进一步提高回收率,本研究继续对洗脱剂、淋洗液和滤膜类型进行了优化。

(1)洗脱溶剂的优化

本研究采用固相萃取柱进行净化,比较 6 mL 的甲醇、甲醇乙腈(80:20, V:V)、乙腈、乙腈水溶液(80:20, V:V)、丙酮和 0.1%乙酸乙腈作为洗脱剂对提取液的净化效果。结果如图 4 所示,选用甲醇作为洗脱剂时洗脱效果最好,质谱峰面积最大,与其他报道结果相同^[10-12],因为雌酮、睾酮和孕酮含有羰基,羟基等活性基团,易与甲醇中的羟基等形成分子间氢键和疏水相互作用来结合目标物进行分离。类固醇激素脂溶性较低强,在基体体内多以原型药物的方式进行残留。由正己烷除脂后,甲醇的提取效率较高,因此本研究选择 6 mL 甲醇作为洗脱剂。

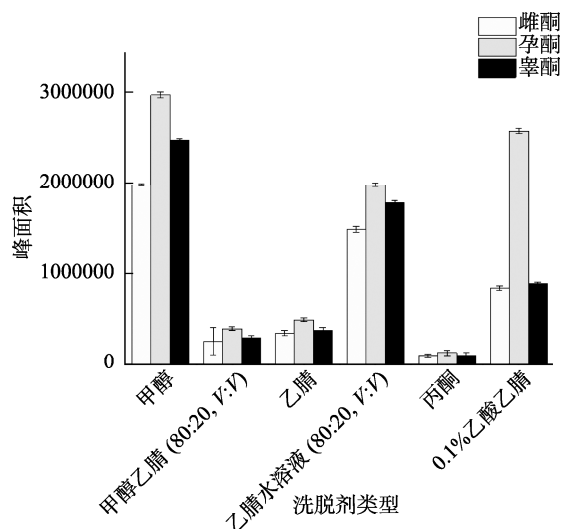


图 4 不同洗脱溶剂提取效率比较(n=3)

Fig.4 Comparison of extraction efficiencies with different elution solvents (n=3)

(2)淋洗液的优化

本研究比较了水、20%甲醇与 5%乙腈对样品溶液中杂质的淋洗效果。淋洗剂的选择用于除去蛋中多余杂质,较于其他复杂基质,研究证实水溶液即可对蛋类产品中的杂质进行淋洗^[17-20],图 5 结果显示,水溶液和 20%甲醇溶液淋洗效果较好,因此采用了水和 20%甲醇对目标物溶液进行淋洗。

2.2.3 滤膜的选择

3 种常用滤膜对目标物吸附结果如图 6。结果表明,不同滤膜对目标物的透过率不同, Waters GHP 滤膜对目标物的吸附效率最低,且该滤膜过滤后的溶液澄清度稍差,长时间储存后小瓶瓶底会产生部分沉淀。安谱尼龙滤膜对

5 $\mu\text{g/kg}$ 雌酮、孕酮和睾酮的回收率最高,分别为 128.7%、138.3%和 137.4%。因此,本研究确定安谱尼龙滤膜作为样品上机前的滤膜。

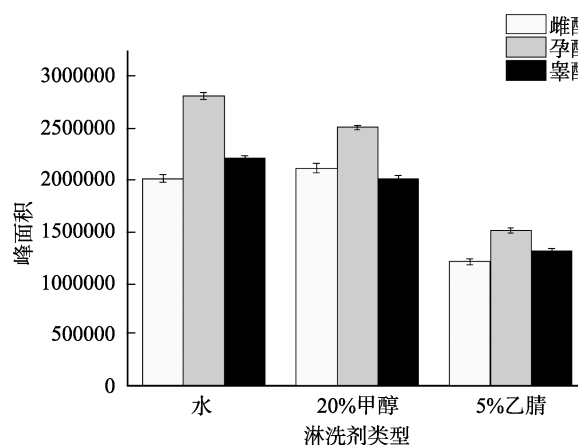


图 5 不同淋洗溶剂提取效率比较(n=3)

Fig.5 Comparison of extraction efficiencies with different eluants (n=3)

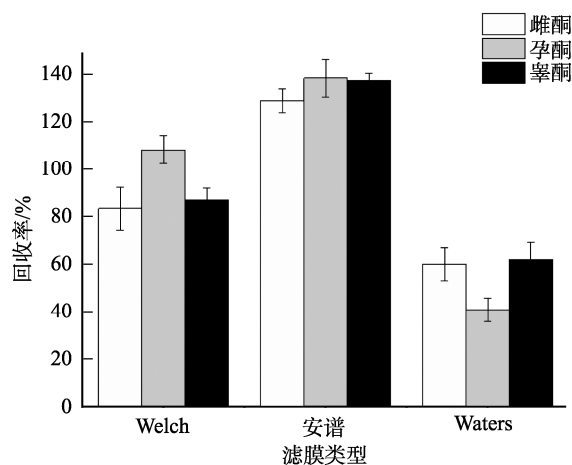


图 6 不同滤膜提取效率比较(n=3)

Fig.6 Comparison of extraction efficiencies with different filter membranes (n=3)

2.3 基质效应

本研究采用标准曲线法对 3 种目标物的基质效应进行考察,基质效应是由样品中除去目标物的其他成分引发的。基质效应(matrix effects, ME)值在 85%~115%之间时可认为该基质不存在基质效应^[17-21]。

在未加入正己烷除脂的情况下,雌酮、孕酮和睾酮呈现出显著的基质抑制效应,空白基质液的质谱响应值高于甲醇溶液的质谱响应。当加入 1 mL 正己烷后,基质效应明显降低,用甲醇溶液和空白基质液配制的 5 $\mu\text{g/kg}$ 雌酮、孕酮和睾酮的质谱响应比值分别为 87%、112%和 99%。图 7 为孕酮和睾酮(雌酮同上)在甲醇和空白基质液中的色谱图,因此认为该方法条件下基质效应不明显。

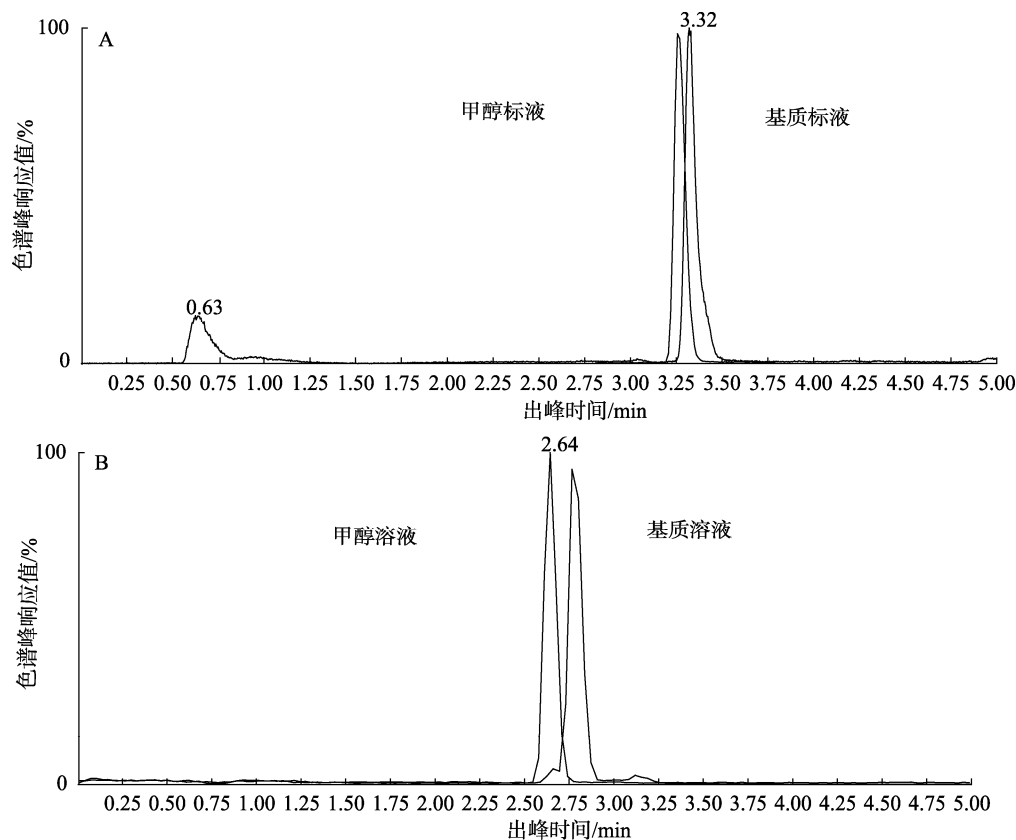


图 7 孕酮(A)和睾酮(B)在甲醇和样品基质液中的色谱图
Fig.7 Chromatograms of P (A) and T (B) in methanol and sample matrix liquid

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围、定量限和方法检出限

配制一系列浓度梯度的目标物溶液(0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、80.0、100.0 μg/kg), 其中内标物浓度均设定为 10 μg/kg, 每个样品重复检测 3 次进行线性关系的考察, 以 3 种目标物与对应内标物的浓度比值作 X 轴(0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、8.00、10.00), 各浓度下二者的质谱峰面积之比作 Y 轴来绘制标准曲线。根据软件积分自动计算出信噪比, 通过 3 倍信噪比和 10 倍信噪比对应的样品中的雌酮、孕酮和睾酮浓度, 以此作为检出限和定量限。0.30 μg/kg 添加浓度的雌酮、0.20 μg/kg 添加浓度的睾酮和 5.00 μg/kg 的孕酮信噪比计算结果分别为: S/N=14.24、S/N=9.97 和 S/N=648.7。结果显示, 雌酮、孕酮和睾酮的检出限(limits of detection, LODs)分别为 0.052、0.023、0.048 μg/kg, 定量限(limits of quantitation, LOQs)分别为 0.173、0.077、0.160 μg/kg。由表 4 可知, 3 种目标物(雌酮、孕酮和睾酮)在 0.5~100.0 μg/kg 内的线性相关系数 r^2 分别为 0.9988、0.9967 和 0.9981, 均大于 0.996。表明雌酮、孕酮和睾酮在该范围内线性范围良好, 方法检出限及定量限较低。

2.4.2 回收率和精密度

本研究考察了该方法在鸡蛋中雌酮、孕酮和睾酮的测量重复性。3 个平行样品, 每个样品重复测量 3 次。鸡蛋中的雌酮、孕酮和睾酮测量结果如表 5 所示, 组间和组内

的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)均在 3.24%以内, 方法精密度较好。

表 4 3 种目标物的线性范围
Table 4 Regression equations of the 3 kinds of targets

化合物	线性方程
雌酮	$Y=0.464X+0.129$
孕酮	$Y=1.281X+0.497$
睾酮	$Y=0.465X+0.028$

在阴性鸡蛋样品中添加 3 个浓度水平 1、5 和 50 μg/kg(标准曲线最高点的 0.1 倍、0.5 倍、0.9 倍)的标准各 7 个, 通过上述方法检测后, 计算相应的回收率与精密度(RSDs, $n=7$), 结果显示, 雌酮、孕酮和睾酮的平均回收率为 96.62%~103.11%, 精密度在 1.36%~3.87%之间, 该结果表明建立的方法具有较高的回收率、精密度和稳定性。

2.5 实际样品检测

按照以上建立的同位素稀释超高效液相色谱串联质谱的方法对采集的不同种类禽产品进行分析, 检测结果显示 18 种鸡蛋样品中均未检测出雌酮, 但含有少量的睾酮和孕酮, 其含量分别 0.91~1.57、3.01~6.32 μg/kg 范围内, 并没有超出国家标准规定的 10 μg/kg 的限量标准。

表 5 鸡蛋中雌酮、孕酮和睾酮含量测定结果
Table 5 Results of determination of E1、P and T in eggs

目标物	编号	批次	加标样品浓度/(μg/kg)	平均值/(μg/kg)	总平均值/(μg/kg)	总标准偏差	总 RSDs/%
E1	1	1-1	5.01	5.13	5.16	0.11	2.20
		1-2	5.23				
		1-3	5.16				
	2	2-1	4.98	5.11			
		2-2	5.10				
		2-3	5.25				
	3	3-1	5.33	5.18			
		3-2	5.02				
		3-3	5.18				
P	1	1-1	5.54	5.18	5.17	0.13	2.60
		1-2	5.09				
		1-3	5.26				
	2	2-1	5.18	5.13			
		2-2	5.23				
		2-3	4.98				
	3	3-1	5.03	5.20			
		3-2	5.27				
		3-3	5.31				
T	1	1-1	4.89	5.10	5.16	0.13	2.55
		1-2	5.02				
		1-3	5.19				
	2	2-1	5.11	5.14			
		2-2	5.32				
		2-3	4.99				
	3	3-1	5.21	5.23			
		3-2	5.14				
		3-3	5.35				

3 结 论

本研究建立了测定禽产品中 3 种典型类固醇激素的同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法。经验证, 该方法线性范围广、回收率和精密度良好, 可以同时准确定性雌酮、孕酮和睾酮, 为禽产品中类固醇激素的安全评价提供证据。

参考文献

[1] NEZAMI A, DARAEI B, RAZAVI-AZARKHIAVI K, *et al.* Optimization of QuEChERS extraction of steroid hormones from infant formulae for

mass spectrometric analysis [J]. *Toxicol Environ Chem*, 2021, 103(1): 1–17.

[2] WANG H, BUSSY U, CHUNG-DAVIDSON YW, *et al.* Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of natural steroid hormones in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) plasma and tissues [J]. *J Chromatogr B Anal*, 2016, 1009-1010: 170–178.

[3] SWEENEY CL, BENNETT JL, BROWN CAM, *et al.* Validation of a QuEChERS method for extraction of estrogens from a complex water matrix and quantitation via high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128315.

[4] LOPEZ-GARCIA M, ROMERO-GONZALEZ R, GARRIDO A.

- Determination of steroid hormones and their metabolite in several types of meat samples by ultra high performance liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1540: 21–30.
- [5] GU Y, CHENG Y, ZHEN X, *et al.* Determination of progesterin residues in fish by UPLC-Q-TOF/MS coupled with QuEChERS [J]. *J Anal Methods Chem*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6426958>
- [6] YAN W, LI Y, ZHAO L, *et al.* Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(44): 7539–7545.
- [7] TAN X, LI Z, DENG L, *et al.* Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS [J]. *J Integr Agric*, 2016, 15(9): 2163–2174.
- [8] WANG H, WANG P, ZHAO X, *et al.* Determination of anabolic androgenic steroids in dietary supplements and external drugs by magnetic solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2016. DOI: 10.1002/jssc.202001062
- [9] ZHANG C, DENG Y, ZHENG J, *et al.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 118: 517–537.
- [10] BOGGS ASP, SCHOCK TB, SCHWACKE LH, *et al.* Rapid and reliable steroid hormone profiling in *Tursiops truncatus* blubber using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(21): 5019–5029.
- [11] DALLLE LG, BOGGS ASP, KUCKLICK JR, *et al.* Androstenedione and testosterone but not progesterone are potential biomarkers of pregnancy in Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) approaching parturition [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2954.
- [12] MESA R, KABIR A, SAMANIDOU V, *et al.* Simultaneous determination of selected estrogenic endocrine disrupting chemicals and bisphenol A residues in whole milk using fabric phase sorptive extraction coupled to HPLC-UV detection and LC-MS/MS [J]. *Sep Sci*, 2019, 42(2): 598–608.
- [13] 姚小龙, 韩磊, 刘旭东, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 法同时测定刺梨中 11 种农药残留[J/OL]. *食品科学*, 2021: 1-12. [2021-08-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210913.1156.034.html>
- YAO XL, HAN L, LIU XD, *et al.* Simultaneous determination of 11 pesticide residues in *Roxburgh* rose by QuEChERS-UPLC-MS /MS method [J]. *Food Sci*, 2021: 1-12. [2021-08-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210913.1156.034.html>
- [14] 张盈, 魏进, 段婷婷, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测辣椒中 5 种杀菌剂残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(15): 6049–6055.
- ZHANG Y, WEI J, DUAN TT, *et al.* Simultaneous determination of five fungicides in pepper by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(15): 6049–6055.
- [15] 何家国, 杜鑫, 周凤荣, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定柑橘中 6 种农药残留[J]. *农药科学与管理*, 2021, 42(5): 35–44.
- HE JG, DU X, ZHOU FR, *et al.* Simultaneous determination of six pesticide residues in Citrus by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Pest Sci Manage*, 201, 42(5): 35–44.
- [16] 何晓明, 余鹏飞, 杨鲁琼, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定双壳类水产品中 40 种药物及个人护理品的残留量[J]. *环境化学*, 2021, 40(5): 1575–1582.
- HE XM, YU PF, YANG LQ, *et al.* Determination of 40 drugs and personal care products residues in bivalve aquatic products by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2021, 40(5): 1575–1582.
- [17] 黄永桥, 宋光林, 毛敏霞, 等. 基于 QuEChERS 结合 UHPLC-MSMS 法测定猪肉中 8 种抗真菌药物残留[J]. *食品科学*, 2021: 1-11. [2021-12-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210712.0943.002.html>
- HUANG YQ, SONG GL, MAO MX, *et al.* Determination of antifungal residues in meat by QuEChERS combined with UHPLC-MSMS [J]. *Food Sci*, 2021, 1-11. [2021-12-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210712.0943.002.html>
- [18] 曹晓琴, 方振峰, 张涛, 等. UPLC-MS/MS 同时测定 14 种药食同源动物性食品中 4 种甾体激素[J]. *食品工业*, 2021, 42(5): 422–426.
- CAO XQ, FANG ZF, ZHANG T, *et al.* Simultaneous determination of four steroid hormones in 14 kinds of animal food homologous to medicine and food by UPLC-MS/MS [J]. *Food Ind*, 2021, 42(5): 422–426.
- [19] LI IC, YANG WY, CHOU CH, *et al.* Analysis of steroid hormones in shell eggs from layer breeds common to Taiwan by liquid chromatography -tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(7): 2319–2326.
- [20] BLASCO C, POUCKE CV, VAN PC. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1154(1-2): 230–239.
- [21] LIU K, KANG K, LI N, *et al.* Simultaneous determination of five hormones in milk by automated online solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103(1): 265–271.

(责任编辑: 郑 丽 于梦娇)

作者简介



刘宇尘, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: liuyuchen_0212@163.com



王 敏, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: wangmin@caas.cn