

牛肉中孕酮的气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱检测

赵超敏¹, 古淑青¹, 郑江¹, 邓晓军¹, 岳振峰², 赖富饶³, 闵甜³, 刘绍杰⁴

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

(2. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东深圳 518045)

(3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (4. 山东省莘县农业局, 山东聊城 252400)

摘要: 建立了牛肉中孕酮的气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱 (GC/C/IRMS) 检测方法。牛肉样品用乙腈振荡和超声辅助提取, 经 NaCl 脱水, 有机相离心和旋转蒸发后以 ZnCl₂ 脱脂, 然后用 LC-C₁₈、LC-Si、LC-NH₂ 固相萃取柱净化, 过滤液经半制备液相色谱 (Pre-HPLC) 的 C₁₈ 柱纯化, 最后分析物以 GC/C/IRMS 系统分析。牛肉中加标外源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-30.64 \pm 0.24\%$ ($n=6$), 牛肉内源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-25.70 \pm 0.13\%$ ($n=6$), 单因素方差分析 (ANOVA, p 值 $= 2.23 \times 10^{-14} < 0.05$) 显示, 内源性孕酮和外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在显著差异性, 且牛肉中加标外源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值与孕酮标准溶液的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无差异性。同时, 经模拟实验可知, 实际样品中内外源性孕酮混合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有同源性。结果表明, 本方法特异性和准确性好, GC/C/IRMS 是鉴别激素来源的有效工具, 该方法填补了国内鉴别激素来源技术空白。

关键词: 牛肉; 孕酮; 内源性; 外源性; GC/C/IRMS

文章编号: 1673-9078(2017)12-233-238

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.035

Determination of Progesterone in Beef Sample by Gas

Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry

ZHAO Chao-min¹, GU Shu-qing¹, ZHENG Jiang¹, DENG Xiao-jun¹, YUE Zhen-feng², LAI Fu-rao³, MIN Tian³,
LIU Shao-jie⁴

(1. Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135) (2. Food Inspection Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen

518045) (3. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

(4. Shandong Shen County Agriculture Bureau, Liaocheng 252400)

Abstract: The method of gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry was developed for the determination of progesterone in beef samples in this study. The beef samples were extracted by acetonitrile oscillation and ultrasonic-assisted extraction, and were dehydrated by NaCl to induce separation of water and organic layers. After centrifugation and evaporation, the extracts were further treated with ZnCl₂ to remove lipids and purified by solid phase extraction using LC-C₁₈, LC-Si and LC-NH₂ cartridges. After Pre-HPLC purification using a C₁₈ column, the samples were analyzed for progesterone by GC/C/IRMS system. The $\delta^{13}\text{C}$ value of endogenous progesterone in beef was about $-25.70 \pm 0.13\%$ ($n=6$), and the $\delta^{13}\text{C}$ value of exogenous progesterone spiked in the sample was about $-30.64 \pm 0.24\%$ ($n=6$). One-way analysis of variance (ANOVA, $p = 2.23 \times 10^{-14} < 0.05$) indicated that there was a highly significant difference between the endogenous and exogenous $\delta^{13}\text{C}$ value of progesterone, while there was no significant difference between the exogenous and standard solution $\delta^{13}\text{C}$ value of progesterone. Meanwhile, the simulation experiment showed that the $\delta^{13}\text{C}$ value of mixture (endogenous and exogenous) of progesterone in actual sample was homologous with the exogenous $\delta^{13}\text{C}$ value of progesterone. The results showed that the method was specificity and reliable. GC/C/IRMS can be a powerful tool to investigate the origin of natural hormones. The method will fill the domestic technical gap for identifying the origin of hormones.

Key words: beef; progesterone; endogenous; exogenous; GC/C/IRMS

收稿日期: 2017-09-17

基金项目: 上海出入境检验检疫局科技项目 (HK004-2016); 上海市科委科研项目 (16142201500、15395810100、17DZ2293700、17DZ2201100); 长三角科技合作项目 (17395810102); 中央引导地方科技发展专项 (YDZX20173100004528)

通讯作者: 赵超敏 (1979-), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品质量与安全

孕激素是具有生物活性的 C₂₁ 类固醇激素, 以孕酮为主, 具有促进女性附性器官成熟、第二性征出现和维持生殖功能作用。孕酮在畜牧业中常被用于促进动物同期发情和排卵^[1-4]。残留于动物源性食品中的孕酮进入人体会提高致癌风险(如乳腺癌等)^[5-7]。目前, 检测动物源性食品中孕酮的残留浓度是唯一评价其滥用的途径, 由于动物自身也分泌天然孕酮, 当在动物源性食品(如牛肉)中检出孕酮后^[8], 仅根据其残留浓度难以判断其是违禁使用药物造成, 难以采取任何控制措施, 造成药物监管执法困难。

气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱法(gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometry, GC/C/IRMS)是目前鉴别物质来源的有效方法。待测物经气相色谱分离, 在高温燃烧炉被燃烧成 CO₂ 气体, 由质谱仪测定 CO₂ 中稳定同位素(如 ¹³C 与 ¹²C)比值的相对值, 仪器数据以 δ(‰) 值表示。它反映了样品和国际碳酸盐标准物质 PDB (Pee Dee Belemnite) 之间碳同位素比值的相对差异:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left\{ \frac{\left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{样品}} - \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{PDB}} \right) \right]}{\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{PDB}} \right)} \right\} \times 1000$$

该分析方法最早用于兴奋剂的控制^[9], 逐渐扩展到其他领域, 如生态系统中污染物的监测和保护, 在食品行业还是一个新型的分析技术, 近年来, 主要用于动物肌肉产地鉴别^[10]、蜂蜜真伪鉴别^[11]和葡萄酒产地鉴别等^[12], 国内外尚未见利用此方法对牛肉中残留孕酮进行来源鉴别的报道。

动物自身分泌的内源性孕酮的 ¹³C/¹²C 比值取决于动物不同来源的营养物质中 C3 植物和 C4 植物混合物的碳同位素^[13,14], 而作为药物用途的外源性孕酮通常从 C3 植物提取制得, 具有较低的 ¹³C/¹²C 比值^[15], 从而根据其差异性可鉴别孕酮的来源。固相萃取法(SPE)是目前常用的去除动物肌肉组织中基质共提物的前处理技术, 其净化效果好。因此, 本文选择液液提取-SPE 柱相结合的前处理平台与 GC/C/IRMS 鉴别技术相结合检测牛肉中孕酮, 方法特异性和准确性好, 满足稳定同位素比质谱鉴别技术要求, 该方法填补了国内牛肉中激素来源鉴别技术空白。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

IsoPrime 100 同位素比质谱仪配 GC-5 燃烧界面, 英国 IsoPrime 公司; 配 7890A 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 1200 型半制备高效液相色谱仪配紫外检测器(DAD)(Pre-HPLC), 美国 Agilent 公司; 漩涡振荡

器, 德国 Heidolph 公司; 往复式振荡器, 日本 Yamato 公司; 70H 超声清洗器, 德国 Elma 公司; 旋转蒸发器, 瑞士 Buchi 公司; 全自动氮吹仪, 美国 Caliper 公司; GL-18MC 高速离心机, 湖南沪康离心机有限公司; 低温离心机, 美国 Sigma 公司; 移液器, 法国 Gilson 公司; 固相萃取柱(SPE 柱): Bond Elut C₁₈ 柱(500 mg, 6 mL), 美国 Agilent 公司; Supelclean LC-Si 柱(500 mg, 6 mL)和 LC-NH₂ 柱(500 mg, 3 mL), 美国 Supelco 公司。

孕酮(progesterone, P)标准品(纯度 99.0%), 购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 甲醇、乙腈、异丙醇、乙酸乙酯、正己烷、叔丁基甲醚和环己烷(HPLC 级), 购自德国 Merck 公司; 氯化锌(ACS 级), 购自德国 CNW 公司; 氯化钠(AR 级), 购自天津福晨化学试剂厂。

牛肉样品: 购自当地农户(确保在生产过程未添加外源性孕酮)。

空白样品: 有时因样品中的内源性孕酮不能完全被排除, 因此, 选择没有孕酮检出或含量超低水平的样品为空白样, 用以制备验证用加标样品。

1.2 标准溶液的制备

孕酮标准溶液: 精确称取孕酮标准物质 5 mg(精确至 0.1 mg), 以甲醇配制浓度为 500.0 mg/L 的标准溶液, 于棕色瓶中-30 °C 储存。

孕酮工作液: 现用现配, 使用前移取适量孕酮标准溶液, 氮气吹至近干, 以液相初始流动相稀释成所需浓度, 以备 Pre-HPLC 所用; 或氮气吹至尽干以环己烷稀释成所需浓度, 以备 GC/C/IRMS 所用。

1.3 仪器参数

1.3.1 Pre-HPLC 条件

色谱柱, Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (21.2×250 mm、7 μm); 流动相, 75%乙腈水溶液; 运行时间, 15 min; 柱温, 室温; 流速, 15 mL/min; 进样量, 500 μL; 检测波长, 242 nm。

1.3.2 GC/C/IRMS 条件

色谱柱, Agilent HP-5MS (30 m×0.25 mm、0.25 μm); 进样模式, 不分流; 进样量, 5 μL; 进样口温度, 250 °C; 柱流量, 1 mL/min; 柱升温程序, 初始温度 80 °C, 保持 1 min, 以 15 °C/min 升至 250 °C, 保持 2 min, 以 2 °C/min 升至 272 °C, 保持 5 min, 最后以 2 °C/min 速度升至 275 °C, 保持 5 min。

质谱条件: 电子轰击(EI)能量, 100 eV; 燃烧炉温度, 850 °C; 燃烧界面温度, 350 °C。载气, 氦气

(纯度 99.999%); 参考气, 二氧化碳(纯度 99.999%); 校准物质, 咖啡因 (IAEA-600, $\delta^{13}\text{C}=-27.771\text{‰}$)。

1.4 样品处理

称取 $6 \times 150 \text{ g}$ 样品 (精确到 0.01 g) 于 $6 \times 500 \text{ mL}$ 具塞离心管中, 分别加入 300 mL 乙腈, 平行振荡和超声提取各 20 min , 再分别加入 15 g NaCl , 振荡混匀, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 6000 r/min 下离心 10 min , 有机相转入 $6 \times 500 \text{ mL}$ 旋转蒸发瓶中, 加入 10 mL 异丙醇, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 用 $2 \times 2.5 \text{ mL}$ 甲醇清洗蒸发瓶, 转入 $6 \times 50 \text{ mL}$ 具塞离心管 (已称取 2 g ZnCl_2 于管中) 中, 加水稀释至 $6 \times 50 \text{ mL}$, 搅拌至 ZnCl_2 溶解, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 11000 r/min 下离心 5 min , 上清液迅速转入一洁净 $6 \times 50 \text{ mL}$ 离心管中, 此上层稀释液过 $6 \times \text{C}_{18}\text{-SPE}$ 柱 (5 mL 甲醇和 5 mL 水依次活化柱), 用 5 mL 10% 甲醇水溶液淋洗, 真空抽干, 然后用 10 mL 甲醇溶液洗脱柱, 洗脱液在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气吹至近干, 然后残渣用 3 mL 正己烷/乙酸乙酯 ($85/15, V/V$) 溶解, 涡旋约 1 min , 然后过 $6 \times \text{Si-SPE}$ 柱 (6 mL 正己烷活化), 以 3 mL 正己烷/乙酸乙酯 ($85/15, V/V$) 为淋洗液, 真空抽干, 以 10 mL 正己烷/乙酸乙酯 ($25/75, V/V$) 为洗脱液, 洗脱液在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气吹至近干, 然后用 2 mL 乙酸乙酯/甲醇溶液 ($80/20, V/V$) 溶解残留物, 溶解液经 $6 \times \text{NH}_2\text{-SPE}$ 柱 (依次用 4 mL 乙酸乙酯水饱和溶液 ($25/0.68, V/V$) 和 4 mL 乙酸乙酯/甲醇溶液 ($80/20, V/V$) 活化) 过滤, 滤液收集于洁净 $6 \times 15 \text{ mL}$ 离心管中, 过滤后用 4 mL 乙酸乙酯/甲醇溶液 ($80/20, V/V$) 淋洗 NH_2 柱, $6 \times 6 \text{ mL}$ 滤液于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气吹至一定量后合并于同一离心管中, 氮气吹至尽干, 用 $750 \text{ } \mu\text{L}$ 乙腈溶解残留物, 然后加入 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 水定容, 涡旋 1 min , 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜, 粗提液经 Pre-HPLC 浓缩、纯化, 分段接收孕酮的馏分于馏分接收管中, 合并孕酮的分段馏分于旋转蒸发瓶中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 用 1 mL 甲醇溶解残留物, 然后移入 2 mL 样品瓶中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 下氮气吹至尽干, 残留物用 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 环己烷定容, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜, 供 GC/C/IRMS 检测分析。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

选择合适的提取试剂和提取方法, 对牛肉中孕酮回收效率至关重要。孕酮是弱极性的脂溶性物质, 在不同提取试剂中分配系数不同, 孕酮在非极性溶剂中溶解度低, 选取试剂的极性与孕酮的极性匹配是建立最佳提取条件的基础。提取试剂考察了甲醇、乙腈、

乙酸乙酯和叔丁基甲醚的提取效果。由图 1 可知, 同甲醇、乙酸乙酯和叔丁基甲醚相比, 乙腈 (回收率: 117%) 是最合适的提取试剂。甲醇和乙腈由于极性较强对牛肉样品的穿透力强于乙酸乙酯和叔丁基甲醚, 但是, 牛肉中色素和脂肪等基质共提物易溶于甲醇, 增加了后续 SPE 柱净化强度, 乙腈提取效率高, 并具有沉淀蛋白作用, 且乙腈提取溶液最干净, 后续 SPE 柱净化容易, 因此, 选择乙腈为提取试剂, 同时提取液中加入 NaCl 以促进乙腈和水快速有效分层, 经过离心, 蛋白质沉淀和水溶性干扰物更易去除。

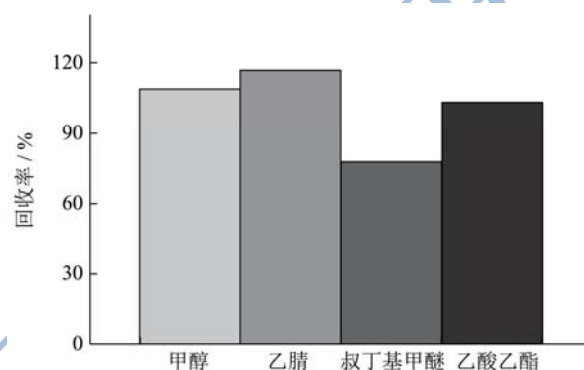


图 1 不同提取试剂对加标牛肉样品中孕酮的提取效果 (添加水平为 0.5 mg/kg)

Fig.1 Effects of the different extraction solvents on the recoveries of progesterone in spiked beef samples (spiked level: 0.5 mg/kg)

2.2 净化条件的优化

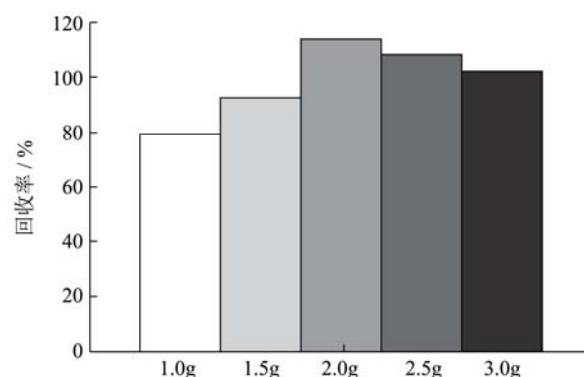


图 2 ZnCl_2 添加量对加标牛肉中孕酮提取效果的影响 (添加水平为 0.4 mg/kg)

Fig.2 Effects of ZnCl_2 additions on the recoveries of progesterone in spiked beef samples (spiked level: 0.4 mg/kg)

牛肉中主要脂肪是磷脂和三酰甘油, 是粗提液中最重要亲脂性基质共提干扰物。由于样品中残留孕酮水平为痕量, GC/C/IRMS 检测方法样品处理量大, 基质共提物干扰物多, SPE 柱净化前应脱脂以减少脂质共提物的色谱干扰和降低 SPE 净化困难, 避免堵塞 SPE 柱和减少净化时间, 常用去脂方法 (如正己烷法、

冷冻过滤法)均无法满足净化要求,由于孕酮具有亲脂性,正己烷在脱脂时有部分孕酮损失,冷冻法脱脂耗时。研究发现, $ZnCl_2$ 的去脂效果非常好,方法简单且耗时短,同时,色素可与脂肪一起沉淀,经离心去除。研究考察了加入 $ZnCl_2$ 的时间,旋转蒸发前加入乙腈提取液中或 SPE 柱净化前加入甲醇稀液中,乙腈提取液中加入 $ZnCl_2$ 后,旋转蒸发上清液时因溶液黏性增加而易产生气泡导致沸腾,造成孕酮损失,在甲醇稀液中加入时,除脂效果好,离心即可除去沉淀,过 SPE 柱溶液澄清,过柱容易,耗时短。图 2 显示 $ZnCl_2$ 的添加量对牛肉样品中孕酮加标回收率的影响,结果显示,当加入 2 g 时去脂效果最佳,提取效率最高 (114%)。

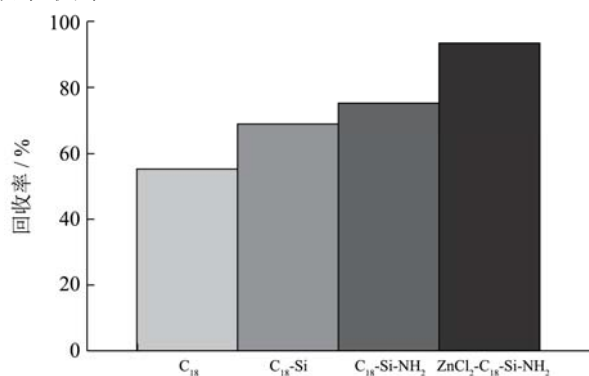


图 3 SPE 柱对加标牛肉中孕酮提取效果的影响(添加水平为 0.6 mg/kg)

Fig.3 Effects of the SPE cartridges on the recoveries of progesterone in spiked beef samples (spiked level: 0.6 mg/kg)

尽管大部分脂类可通过 $ZnCl_2$ 沉淀去除,但是仍有一定量的类固醇类脂类干扰物如胆固醇等仍存在提取物中,进一步的 SPE 柱净化必不可少。反相 C_{18} 柱、正相 LC-Si 柱和弱阴离子交换 LC-NH₂ 柱是生物样品(尿液、血浆和组织等)粗提液常用净化柱。本研究考察评估了三个传统 SPE 柱的净化效果。 C_{18} 柱主要截留牛肉组织中的三酰基甘油脂肪酸和甘油磷脂酰胆碱; Si 柱可有效去除牛肉提取液中的脂肪和色素, C_{18} 和 NH₂ 柱不能截留色素; NH₂ 柱可以有效去除提取物中的酸性物质,这些酸性物质不能通过 C_{18} 和 Si 柱净化去除。所以,本实验选择 $ZnCl_2$ 去脂, C_{18} 、Si 和 NH₂ 串联固相萃取柱净化样品粗提物(图 3,回收率: 93.2%)。

2.3 纯化条件的优化

GC/C/IRMS 检测方法是将待测物高温燃烧为气体进行分析,无法对待测物进行定性定量分析,因此对待测物的纯度要求非常高,为了确保检测结果的特异性和准确性,样品提取物虽然经过有效的样品前处

理技术净化,仍需进一步的浓缩纯化。因半制备高效液相色谱操作简单,样品处理量大而作为浓缩纯化手段。Pre-HPLC 配备 DAD 检测器,可同时对待测物进行定性和定量分析,以验证前期样品提取和净化方法效果。

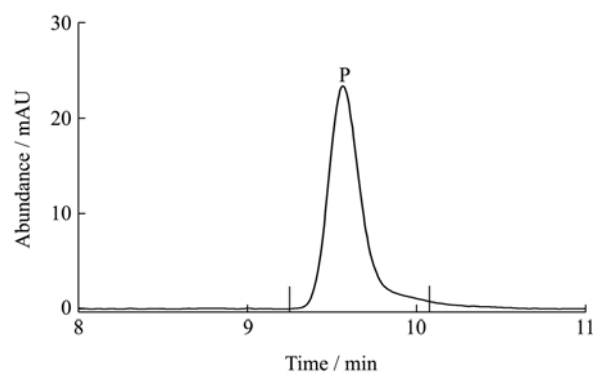


图 4 孕酮标准溶液的 Pre-HPLC 色谱图(浓度: 50 mg/L, 进样量为 100 μ L, 馏分接收如竖线所示)

Fig.4 Pre-HPLC chromatograms of progesterone standard solution (concentration: 50 mg/L, injection volume: 100 μ L, the fractions were collected as vertical bar demonstrated)

为了有效确定孕酮馏分接收段,优化了孕酮最佳紫外吸收波长,研究发现,在 242 nm 时孕酮获得最大紫外吸收,因此,孕酮馏分接收时间的设定根据 242 nm 扫描时的色谱图来确定。为获得最好的浓缩、纯化效果,选择色谱柱 Agilent Eclipse XDB- C_{18} (21.2 \times 250 mm, 7 μ m),此柱可在大流速和高压下使用,分析速度快,进样量大,大大缩短了目标分析物的浓缩纯化时间,满足了样品需高倍浓缩的要求。流动相对比了甲醇和乙腈,研究发现,乙腈粘度相对较小,传质阻抗小,有利柱效提高,且峰型较窄,甲醇长时间在大流速下检测易在泵中产生气泡,造成检测基线波动大和检测稳定性降低,导致孕酮馏分接收的准确性差,进而影响 GC/C/IRMS 检测结果的准确性和有效性。孕酮极性较低,经考察孕酮与基质共提干扰物分离度、分析时间和馏分接收的有效性,流动相选择 75%乙腈水溶液。在较低流速分析时易产生气泡导致检测稳定性和色谱峰型差,经优化流动相为 15 mL/min。同时研究发现,柱温的改变对结果影响不大,因此选择室温。由图 4 可知,所建 Pre-HPLC 浓缩、纯化方法色谱峰型好,馏分接收准确性好,满足 GC/C/IRMS 高纯度检测分析要求。

2.4 GC/C/IRMS 条件的优化

选择非极性 HP-5MS 色谱分析孕酮。研究发现,气相色谱程序升温速度不能太快,应 <20 $^{\circ}$ C/min,柱温不能接近色谱柱最高温度;程序升温太快或较高温

度下检测分析,虽然大大缩短了检测时间,但其稳定性差,基线波动大,易产生大且无规律的干扰峰,造成检测灵敏度降低、重复性和准确性差。经优化,所建检测条件色谱峰型窄而无拖尾,目标峰起始位置和终止位置明确(图5),更有利于GC/C/IRMS集成软件识别目标峰,以提高检测结果的重复性和精确性,同时也进一步验证了Pre-HPLC浓缩纯化方法的可行性和有效性。

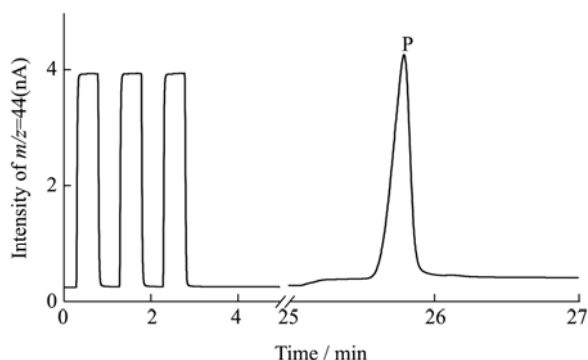


图5 孕酮标准溶液的GC/C/IRMS色谱图(m/z 44)

Fig.5 GC/C/IRMS chromatograms of (m/z 44) of progesterone standard solution

2.5 $\delta^{13}\text{C}$ 值的检测分析

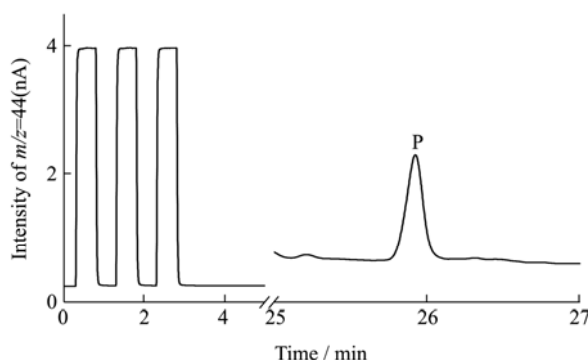


图6 样品中孕酮的GC/C/IRMS色谱图(m/z 44)

Fig.6 GC/C/IRMS chromatograms of (m/z 44) of progesterone in sample

应用所建方法对4个购自当地农户的牛肉样品中本底内源性孕酮进行分析,结果显示,只有一个样品中内源性孕酮获得有效的 $\delta^{13}\text{C}$ 值($-25.70\pm 0.13\%$, $n=6$),这与文献推荐的牛自然产生的内源性激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围在 -15% 和 -26% 之间一致^[16],同时,方法的准确性满足GC/C/IRMS检测分析要求($SD < 0.5\%$),且色谱峰周围无干扰(图6),说明所建检测方法的可行性和检测结果的准确性,但其余样品因本底含量太低而没有获得有效的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

空白样品中引入外源性孕酮(标准品 $\delta^{13}\text{C} = -30.75 \pm 0.11\%$, $n=6$)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-30.64 \pm 0.24\%$ ($n=6$),单

因素方差分析(ANOVA, P 值= $2.23 \times 10^{-14} < 0.05$)显示,外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和内源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间存在显著差异性,同时,样品中外源性引入孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和孕酮标准品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无差异,具有同源性。

实际上,当牛在饲养过程引入外源性孕酮时,实际样品中残留孕酮是孕酮混合物(外源性和内源性),由于内源性孕酮在样品中为痕量,外源性引入的孕酮含量远高于内源性孕酮的残留水平,通过模拟实验可知,混合不同比例(1:1~1:90, ng/ng)的内源性孕酮和外源性孕酮,其 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 -29.15% 和 -30.60% 之间,与参考文献外源性类固醇激素的范围(-28% 到 -34% 之间)一致^[16],进一步验证了所建方法的可行性和有效性。

3 结论

建立了牛肉中孕酮的气相色谱/燃烧炉/同位素质谱(GC/C/IRMS)检测方法。所建液液提取-SPE柱相结合的前处理净化平台,净化效果好,有效降低了样品中基质共提物的干扰,同时所建半制备液相色谱浓缩纯化技术,浓缩纯化效果好,满足了目标分析物高纯度要求。牛肉中外源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $< -30\%$,内源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $> -27\%$,单因素方差分析结果显示内源性孕酮和外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在显著差异性。结果表明,该方法特异性和准确性好,满足稳定同位素质谱检测分析要求,同时也验证了GC/C/IRMS是鉴别激素来源的有效工具。

参考文献

- [1] Maarten FA Andringa, Frank JCM Van Eerdenburg, Elisa Fernández, et al. Comparison between two progesterone sources and two oestradiol formulations in a heatsynch protocol for postpartum cycling dairy cows in pasture [J]. Journal of Veterinary Science, 2013, 14(2): 161-166
- [2] R C Escalante, S E Poock, D J Mathew, et al. Reproduction in grazing dairy cows treated with 14-day controlled internal drug release for presynchronization before timed artificial insemination compared with artificial insemination after observed estrus [J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(1): 300-306
- [3] A Kendrick Sudderth, Allison M Kise, Steven P Brinsko, et al. Efficacy of long-acting formulations of estradiol or progesterone plus estradiol on estrous synchronization in broodmares [J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2013, 33(8): 670-672
- [4] M H C Pereira, A D P Rodrigues, T Martins, et al. Timed

- artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(11): 6904-6914
- [5] W Yue, R J Santen, J P Wang, et al. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 86(3-5): 477-486
- [6] Davaasambuu Ganmaa, Akio Sato. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers [J]. *Medical Hypotheses*, 2005, 65(6): 1028-1037
- [7] Nason F G, Nelson B E. Estrogen and progesterone in breast and gynecologic cancers. Etiology, therapeutic role, and hormone replacement [J]. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 1994, 21(2): 245-270
- [8] Chaomin Zhao, Zhenfeng Yue, Hui Wu, et al. Simultaneous determination of fourteen steroid hormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(19): 8030-8038
- [9] Michel Becchi, Rodrigue Aguilera, Yves Farizon, et al. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, 8(4): 304-308
- [10] Shumin Sun, Boli Guo, Yimin Wei, et al. Multi-element analysis for determining the geographical origin of mutton from different regions of China [J]. *Analytical Methods*, 2011, 124(3): 1151-1156
- [11] IGonzález Martín, EMarqués Macías, JSánchez Sánchez, et al. Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology [J]. *Food Chemistry*, 1998, 61(3): 281-286
- [12] 吴浩,谢丽琪,靳保辉,等.气相色谱-燃烧-同位素比率质谱法测定葡萄酒中 5 种挥发性组分的碳同位素比值及其在产地溯源中的应用[J].*分析化学*,2015,43(3):344-349
- WU Hao, XIE Li-qi, JIN Bao-hui, et al. Gas chromatography-combustion-Isotope ratio mass spectrometry for determination of five volatile components in wine and its application in geographical origin traceability [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(3): 344-349
- [13] Gabor Balizs, Annett Jainz, Peter Horvatovich. Investigation of the feeding effect on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067(1-2): 323-330
- [14] Christophe Saudan, Matthias Kamber, Giulia Barbati, et al. Longitudinal profiling of urinary steroids by gaschromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: diet change may result in carbon isotopic variations [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 831(1-2): 324-327
- [15] A Kleemann, HJRoth. *Arzneistoffgewinnung: Naturstoffe und Derivate* [M]. Thieme: Stuttgart, 1983
- [16] HNoppe, BLe Bizec, KVerheydena, et al. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 1-16