

凝胶渗透色谱净化-气相色谱-质谱法测定黄油中 6 种激素的残留

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: 建立了凝胶渗透色谱 (GPC)-气相色谱-质谱 (GC/MS) 同时测定黄油中雄酮 (A)、脱氢表雄酮 (DHEA)、睾酮 (T)、孕酮 (P)、雌酮 (E1)、17 β -雌二醇 (β -E) 6 种类固醇激素残留的方法。黄油样品用乙酸乙酯/环己烷 (1:1, V/V) 振荡辅助提取, 提取液经 GPC 柱净化除脂, GPC 浓缩液用氮气吹至尽干, 然后用乙酸酐和吡啶衍生化, 最后, 衍生化物经 GC 色谱柱 (HP-5MS, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m) 分离, 在 SIM 模式下进行定性和定量分析。6 种类固醇激素以外标法定量, 在 10~500 μ g/kg 线性范围内相关系数 (r) 均大于 0.999; 方法的定量限 LOQs ($S/N \geq 10$) 为 4~10 μ g/kg; 添加水平为 10 μ g/kg、50 μ g/kg、200 μ g/kg 时, 加标回收率范围为 77.2~112%, 相对标准偏差为 4.2~10%。结果表明, 所建方法准确、可靠, 已成功用于黄油中 6 种类固醇激素的检测分析。

关键词: 激素; 黄油; 凝胶渗透色谱; 气相色谱-质谱

文章编号: 1673-9078(2018)04-281-286

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.041

Detection of Six Steroid Hormone Residues in Butter Samples by Gel Permeation Chromatography Purification and Gas Chromatography-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, China) (2. Food Inspection Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China) (3. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (4. Shandong Shen County Agriculture Bureau, Liaocheng 252400, China)

Abstract: A gel permeation chromatography purification (GPC)-gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method was developed for the determination of 6 steroid hormone residues (androsterone (A), dehydroepiandrosterone (DHEA), testosterone (T), progesterone (P), estrone (E1) and β -estradiol (β -E)) in butter samples. The butter samples were extracted by oscillation with ethylacetate/cyclohexane (1:1, V/V). The extract was purified and degreased by GPC column. The GPC concentrate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Derivatization of the residue was carried out with pyridine and acetic anhydride. Finally, the derivative was separated using a GC column (HP-5MS, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m), and the qualitative and quantitative analysis was conducted under the model of selective ion monitor (SIM). Steroid hormone residues were quantified using external standard method, which had good linearity in the concentration range of 10-500 μ g/kg with correlation coefficient larger than 0.999. The quantification limit was 4-10 μ g/kg. At the spike levels of 10 μ g/kg, 50 μ g/kg and 200 μ g/kg, the recoveries of hormones were in the range of 77.2-112% and the relative standard deviation (RSD) was from 4.2% to 10%. The above results showed that the method was accurate, reliable and suitable for the determination of 6 hormone residues in

收稿日期: 2017-10-20

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)

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

butter samples.

Key words: hormones; butter; gel permeation chromatography; gas chromatography-mass spectrometry

性激素是甾体激素的主要组成部分,包括雄激素、雌激素和孕激素。这些物质具有强的蛋白质同化作用,畜牧业中常被用作促生长剂,以大幅度提高动物养殖经济效益^[1-5]。基于对动物源性食品中激素残留风险分析的深入研究,长期摄入此类激素类药物会导致消费者内分泌紊乱和性早熟,提高致癌、致畸的风险等^[6-8]。我国农业部明确规定,不得在动物源性食品中检出睾酮和雌二醇^[9]。睾酮、脱氢表雄酮和雄酮是主要的雄激素;雌二醇是活性最强的雌激素,与雌酮互为前体和代谢物;孕激素主要以孕酮为主,三类激素在代谢过程可相互转化(图1)。

目前关于动物源性食品中残留激素的研究报道,主要基质是动物肌肉组织(如猪肉、牛肉和羊肉等)、肝脏、牛奶、鸡蛋和水产品等^[10-13],对黄油中激素残留的分析报道还很少。黄油因其营养价值成为人们生活中的重要食品之一,其质量安全关乎消费者的饮食健康。

黄油是高脂肪含量样品,传统的液液提取-固相萃取柱前处理净化技术难以有效去除油脂共提物,因此,本研究采用去除油脂效果良好的凝胶渗透色谱(GPC)净化技术,其根据分析物分子量大小不同而分离(色素和油脂分子量通常>600,而激素通常<500),可有效去除黄油中油脂和色素干扰。目前,常用的激素检测方法主要有液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)和气相色谱-质谱法(GC/MS)。虽然GC/MS法与HPLC-MS/MS法相比需要衍生化,灵敏度稍低,但是GC/MS仍然是检测类固醇激素的强有力工具,且在确证未知类固醇激素具有其不可替代的优势^[14]。因此,本文采用GPC净化技术与GC/MS相结合,同时测定黄油中6种类固醇激素,所建方法净化效果好,回收率高和重现性好,满足药物残留分析要求。

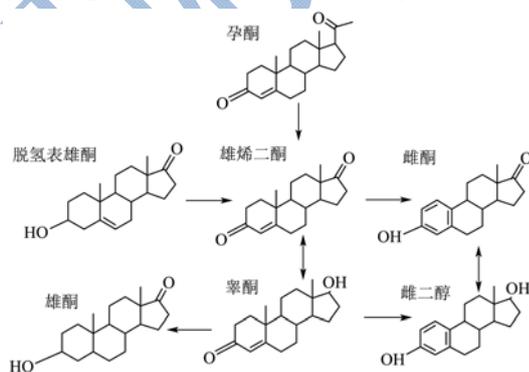


图1 6种激素的结构式

Fig.1 Structure formulas of six hormones

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

6890N型气相色谱配5975型质谱仪(GC/MS),美国Agilent公司;全自动凝胶净化系统(GPC),德国LCtech公司;漩涡振荡器,德国Heidolph公司;往复振荡器,日本Yamato公司;全自动氮吹仪,美国Caliper公司;恒温干燥箱,德国Binder公司;低温离心机,美国Sigma公司;移液器,法国Gilson公司。

激素标准品:睾酮(T)、雄酮(A)、脱氢表雄酮(DHEA)、孕酮(P)、雌酮(E1)、17 β -雌二醇(β -E)(纯度 \geq 96.0%)均购自德国Dr.Ehrenstorfer公司;甲醇、环己烷、乙酸乙酯、正己烷、丙酮、叔丁基甲醚和吡啶(HPLC级),购自美国TEDIA公司;乙酸酐(AR级),购自广州化学试剂厂。

黄油样品:市售进口黄油。

空白样品:选择没有激素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

储备液:分别准确称取各激素标准物质5mg(精确至0.1mg),以甲醇配制浓度为500.0mg/L的单标溶液,所有溶液于棕色瓶中-30℃储存。

单标工作液:现用现配,使用前分别移取10.0 μ L 500.0mg/L的激素单标溶液于2mL样品瓶中,40℃氮气吹干甲醇溶剂,残留物依次用100 μ L乙酸酐和100 μ L吡啶溶解,涡旋约1min充分混合,于70℃恒温干燥箱衍生化50min,取出冷却至室温,40℃下氮气吹至尽干,用环己烷定容至1mL,供GC/MS用。

混合标准工作液:现用现配,使用前分别移取20.0 μ L 500.0mg/L的各激素单标溶液于2mL样品瓶中,40℃氮气吹干甲醇溶剂,残留物依次用200 μ L乙酸酐和200 μ L吡啶溶解,涡旋约1min充分混合,于70℃恒温干燥箱衍生化50min,取出冷却至室温,40℃下氮气吹至尽干,用环己烷定容至1mL,并用环己烷逐级稀释成所需浓度,供GC/MS用。

1.3 仪器参数

1.3.1 GPC条件

GPC色谱柱:40010型(300mm \times 20mm,高24

cm, 24 g Bio-Beads SX-2 填料); 流动相: 乙酸乙酯/环己烷 (1:1, *V/V*); 流速: 4.7 mL/min; 定量环: 5.0 mL; 紫外检测波长: 254 nm; 柱预洗时间: 0.17 min; 前运行时间 10.67 min; 主收集时间: 33 min; 尾洗时间: 4 min; 溶剂交换周期: 3 次。

1.3.2 GC 条件

气相色谱柱: Agilent HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样量: 2 μL; 进样模式: 不分流; 前运行时间: 280 °C; 离子源温度: 230 °C; MS 四级杆

温度: 150 °C; 辅助通道温度: 280 °C; 色谱柱流量: 1 mL/min; 色谱柱升温程序: 80 °C (保持 1 min) → 15 °C/min → 250 °C (保持 2 min) → 2 °C/min → 272 °C (保持 3 min); 溶剂延迟时间: 5 min。

1.3.3 MS 条件

电子轰击 (EI) 能量: 70 eV; 载气: 氦气 (纯度 99.999%); 全扫描 (Scan) 质量范围: 50~500 *m/z*, 选择离子扫描 (SIM) 参数如表 1; 离子驻留时间: 50 ms。

表 1 类固醇激素衍生物的 MS 采集参数

Table 1 Optimized mass spectrometer parameters of steroid hormone derivatives

化合物	缩写	保留时间/min	特征离子(<i>m/z</i>)	定量离子(<i>m/z</i>)
睾酮醋酸酯	TAc	20.665	124/147/228/330 (M^+)	124
雄酮醋酸酯	AAc	18.136	201/257/272/332 (M^+)	272
脱氢表雄酮醋酸酯	DHEAAc	18.784	121/255/270/330 (M^+)	270
孕酮	P	21.605	124/229/272/314 (M^+)	124
雌酮醋酸酯	E1Ac	19.733	146/185/270/312 (M^+)	270
17β-雌二醇醋酸酯	β-EAc	22.031	146/172/314/356 (M^+)	314

1.4 样品处理

称取 1 g 样品 (精确到 0.01 g) 于 15 mL 具塞离心管中, 加入 5 mL 乙酸乙酯/环己烷 (1:1, *V/V*) 涡旋 1 min, 溶解后定容至 8 mL, 往复振荡提取 15 min, 于 10000 r/min 下离心 5 min, 收集上清液至 GPC 样品瓶中, 经 GPC 净化、浓缩, 收集 2 mL 浓缩液于收集瓶中, 于 40 °C 下氮气吹至约 0.5 mL, 移入 2 mL 进样品中, 40 °C 下氮气吹至尽干, 依次用 200 μL 乙酸酐和 200 μL 吡啶溶解残留物, 涡旋约 1 min, 于 70 °C 恒温干燥箱衍生化 50 min, 取出冷却至室温, 40 °C 下氮气吹至尽干, 用 200 μL 环己烷定容, 过 0.22 μm 有机滤膜, 供 GC/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

激素是低分子量的脂溶性物质, 含量与样品脂含量成正比^[15]。

黄油是高脂含量样品, 提取效率的关键因素是选择合适的提取试剂和提取方法。选择具有脂溶性的丙酮、正己烷、乙酸乙酯、环己烷、叔丁基甲醚为提取试剂, 结果显示, 虽然 5 种提取试剂均可以溶解黄油, 但是乙酸乙酯/环己烷 (1:1, *V/V*) 溶解效果最好, 溶解液为澄清溶液, 同时, 乙酸乙酯/环己烷也是 GPC 常用流动相, 因为选择乙酸乙酯/环己烷 (1:1, *V/V*) 为提取试剂。

2.2 GPC 净化条件的确定

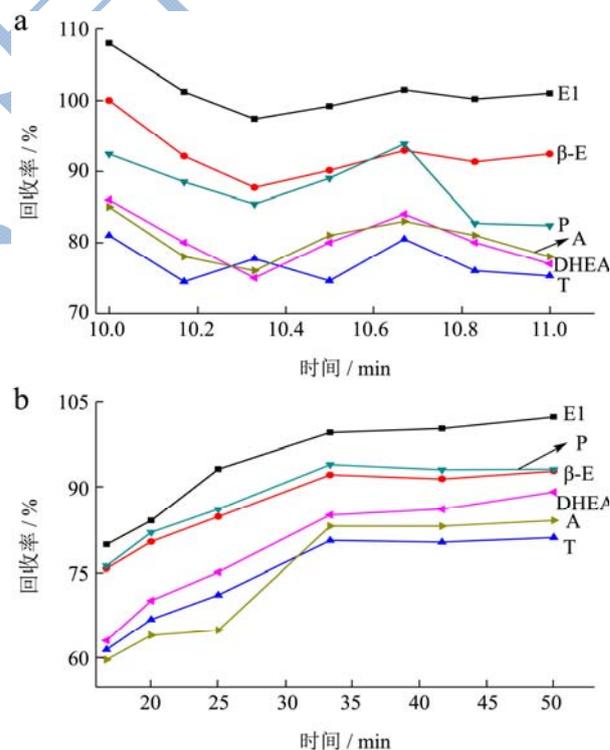


图 2 GPC 前运行时间 (a) 和主收集时间 (b) 对黄油中激素加标回收率的影响

Fig.2 Influences of GPC-forerun time (a) and GPC-main fraction time (b) on the recovery of hormones in butter

油脂是检测黄油中激素主要的基质共提干扰物。GPC 以多孔凝胶作为固定相, 分离过程, 色素和油脂等大分子物质不易进入凝胶颗粒孔内而分布在颗粒

间, 首先洗脱下来, 激素等小分子物质不仅在颗粒间隙扩散, 还进入凝胶颗粒微孔中, 洗脱速度慢后流出, 因此, 净化效果好。同时, 流动相乙酸乙酯和环己烷沸点一致, 一定比例混合后洗脱条件稳定。

GPC 净化效果的决定因素是基质共提干扰物与目标分析物切割点的选择。当流速为 4.7 mL/min 时, 大分子物质油脂和色素在 10 min 时被洗脱去除。前运行时间设计为 10、10.17、10.33、10.5、10.67、10.83、11 min; 主收集时间设计为 16.7、20、25、33、42、50 min。由图 2A 可知, 前运行时间为 10 min 时加标回收率最高, 但仍有部分油脂被接收, 根据除脂效果和加标回收率, 前运行时间为 10.67 min; 图 2B 所示随着主收集时间的延长加标回收率逐渐增大, 当主收集时间延长至 50 min 时, 加标回收率与 33 min 时相差不大, 为减少分析时间和节约成本, 选择主收集时间为 33 min。优化流速 (4.3、4.5、4.7 mL/min) 结果显示, 相近加标回收率时, 增大流速, 可以大大减少样品处理时间和减少试剂消耗, 流速选择 4.7 mL/min。

2.3 衍生条件的选择

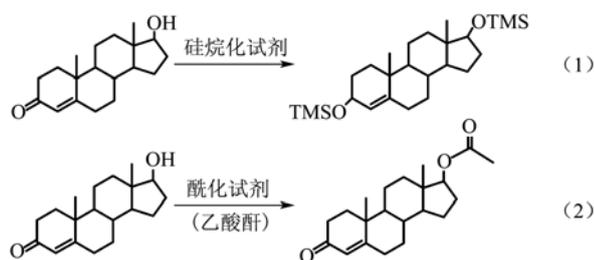


图 3 激素的衍生化公式

Fig.3 Derivatization formulas of hormones

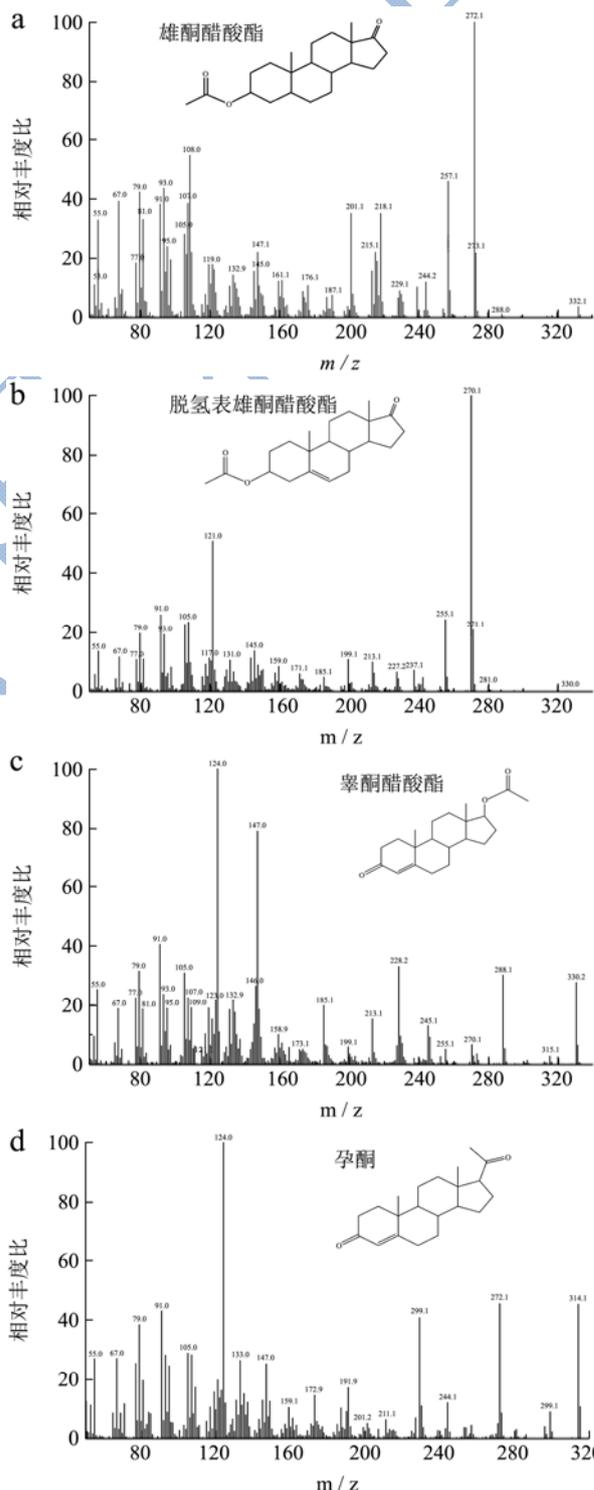
激素具有弱挥发性和热不稳定性, 含有羟基和酮基等官能团, 极性较大, 沸点较高, 直接用 GC/MS 分析灵敏度较低, 且峰型差, 需要衍生化转化为极性较低热稳定性好的衍生物, 以提高检测灵敏度和改善色谱峰型。常用的衍生化法主要有硅烷化法和酰化法。硅烷化法主要采用三甲基硅烷衍生化技术 (TMS), 同时衍生激素结构中羟基和酮基而生成烯醇化-三甲基硅烷产物 (如公式 1), 而酰化试剂主要是酸酐类, 衍生激素结构中的羟基而生成酯类物质 (如公式 2)。TMS 衍生物可能会堵塞气相色谱柱末端或用于反吹的毛细管, 酰化衍生物对气相色谱毛细管柱影响小, 因此, 试验选择常用的酰化试剂乙酸酐和催化试剂吡啶作为衍生化试剂。

通过对比不同衍生化温度 (50、60、70、80、90 °C) 和衍生化时间 (20、30、40、50、60 min) 时目标分析物的峰面积, 结果显示, 随着衍生化温度和衍生化时间的延长, 目标分析物的峰面积增加, 当 70 °C 衍生

化 50 min 时效果最好。

2.4 质谱条件的优化

为确证目标分析物的特征离子, 首先采用 Scan 扫描对 0.5 mg/L 的激素单标衍生物进行定性分析, 根据目标分析物的全质谱图, 选择干扰少、选择性好的离子作为特征离子进行 SIM 扫描, 以相对丰度比为 100 的特征离子作为定量离子, 另外选取 2 个相对丰度较高的特征离子作为定性离子, 如图 4 所示。



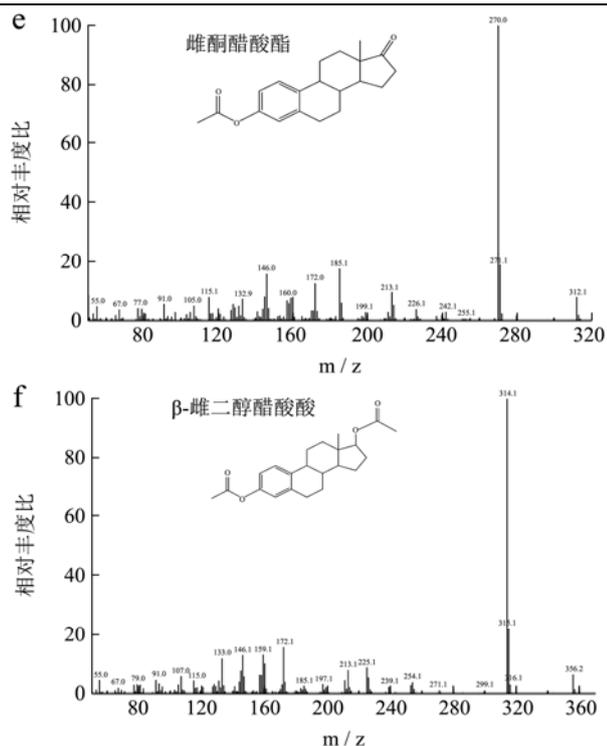


图4 激素衍生物的Scan扫描 (m/z 50~500) 质谱图

Fig.4 Mass spectrums of hormone derivatives in full-scan mode (m/z 50~500)

无规律的干扰峰, 导致检测灵敏度低和重复性差。经优化, 建立的色谱柱升温程序为: 初始温度为 80 °C, 保持 1 min, 以 15 °C/min 速度升至 250 °C, 保持 2 min, 以 2 °C/min 速度升至 272 °C, 保持 3 min。色谱柱流量选择 0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.2 mL/min, 分析结果显示在 1.0 mL/min 时, 目标分析物分离度好。同时, 经优化前样口温度为 280 °C, 离子源温度为 230 °C, MS 四级杆温度为 150 °C, 辅助通道温度为 280 °C 时, 目标分析物灵敏度高、分离度好, 色谱峰型窄而无拖尾 (图 5)。

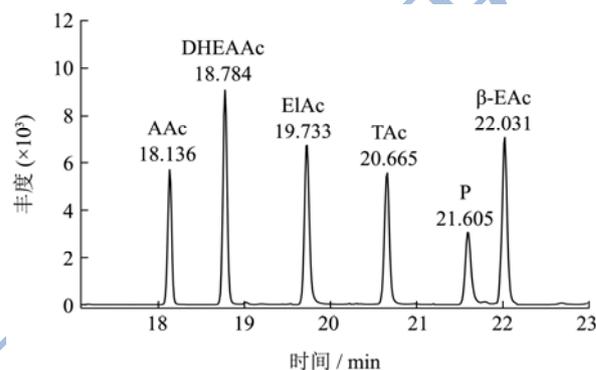


图5 激素衍生物的SIM扫描总离子流色谱图(TIC)(浓度: 0.5 mg/L, 进样 2 μL)

Fig.5 Total ion current (TIC) chromatograms of hormone derivatives in selected ion monitoring (SIM) scan mode (concentration: 0.5 mg/L, injected volume: 2 μL)

2.5 色谱条件的优化

激素衍生物极性低, 应选择非极性色谱柱进行分离, HP-5MS 气相色谱柱是非极性的, 且具有较低的柱流失, 本实验选择 HP-5MS 为分析色谱柱。

为使目标分析物之间和基质共提干扰物之间获得良好的分离度, 对气相色谱柱升温程序进行了优化, 研究发现, 在气相色谱检测分析过程中, 气相色谱柱程序升温速度应 < 20 °C/min, 且柱温不能长时间在接近色谱柱最高温度时分析, 程序升温太快或较高温度下检测分析, 虽然大大缩短了分析时间且获得良好分离度, 但是其基线波动大, 稳定性差, 并易产生大且

2.6 线性范围和定量限

采用外标法定量。回归方程的获得是利用浓度范围为 10~500 μg/kg 的混合标准溶液, 以浓度为横坐标 (x, μg/kg) 和定量离子对峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归计算, 所得回归方程和相关系数见表 2, 所得相关系数均大于 0.999, 线性关系良好。定量限根据信噪比 S/N ≥ 10 确定, 6 种激素的 LOQs 为 4~10 μg/kg。

表 2 类固醇激素衍生物的线性方程、相关系数和 LOQ

Table 2 Calibration equations, correlation coefficients and LOQ of steroid hormone derivatives

化合物	线性范围/(μg/kg)	回归方程	相关系数 (r)	LOQ/(μg/kg)
雄酮醋酸酯	10~500	$Y=1.43 \times 10^5 X - 1.42 \times 10^3$	0.9994	10
脱氢表雄酮醋酸酯	10~500	$Y=2.55 \times 10^5 X - 1.35 \times 10^3$	0.9993	5
睾酮醋酸酯	10~500	$Y=1.23 \times 10^5 X - 1.45 \times 10^3$	0.9991	10
孕酮	10~500	$Y=7.24 \times 10^4 X - 8.54 \times 10^2$	0.9990	10
雌酮醋酸酯	10~500	$Y=7.29 \times 10^5 X - 7.57 \times 10^3$	0.9991	5
17β-雌二醇醋酸酯	10~500	$Y=4.59 \times 10^5 X - 2.40 \times 10^3$	0.9991	4

2.7 回收率与精密度

在空白样品中添加 10 μg/kg、50 μg/kg、200 μg/kg

三个浓度水平进行回收试验, 每个水平平行测定 6 次, 结果见表 3, 回收率为 77.2~112%, 相对标准偏差为 4.2~10%, 方法的准确度和精密度符合国内外对激素

残留分析的要求。

表 3 空白样品中 6 种类固醇激素加标的回收率和精密度 (n=6)

Table 3 The recoveries and accuracies of 6 steroid hormones in spiked butter (n=6)

化合物	加标水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	相对标准偏差/%
雄酮醋酸酯	10、50、200	77.3~105	5.4~10
脱氢表雄酮醋酸酯	10、50、200	79.7~99.8	4.2~9.5
睾酮醋酸酯	10、50、200	77.2~90.3	6.1~8.0
孕酮	10、50、200	83.0~112	7.1~9.3
雌酮醋酸酯	10、50、200	90.1~106	4.2~10
17 β -雌二醇醋酸酯	10、50、200	78.7~109	5.1~9.2

2.8 实际样品分析

采用所建方法对 4 个市售黄油样品进行检测, 4 个样品均含有孕酮, 其他激素未检出, 范围为 110~127 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 这与文献报道的黄油中孕酮含量值 (132.9 \pm 5.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 相接近^[16]。

3 结论

本文建立了黄油中雄酮、脱氢表雄酮、睾酮、孕酮、雌酮和 17 β -雌二醇的气相色谱-质谱 (GC/MS) 检测方法。所建凝胶渗透色谱前处理技术, 操作简单、净化效果好, 大大简化了高脂肪含量样品的前处理过程, 提高了高脂肪含量样品中激素的提取效率, 该方法准确可靠, 满足高油脂样品中激素残留检测要求。

参考文献

- [1] Heinrich H D Meyer. Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production [J]. APMIS, 2001, 109(S103): S336-S344
- [2] M N Sillence. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock [J]. The Veterinary Journal, 2004, 167(3): 242-257
- [3] Maarten F A Andringa, Frank J C M 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
- [4] H F De Brabander, B Le Bizec, G Pinel, et al. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2007, 42(8): 983-998
- [5] D Courtheyn, B Le Bizec, G Brambilla, et al. Recent developments in the use and abuse of growth promoters [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 473(1-2): 71-82
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 2002 The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC 235, 2002
- [10] Lynn Vanhaecke, Julie Vanden Bussche, Klaas Wille, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high-throughput confirmation and quantification of 34 anabolic steroids in bovine muscle [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 700(1-2): 70-77
- [11] P Marchand, Ble Bizec, C Gade, et al. Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry [J]. 2000, 867(1): 219-233
- [12] E M Malonea, C T Elliott, D G Kennedy, et al. Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(15-16): 1077-1084
- [13] Quan-lin Wang, Ai-zhi Zhang, Xu Pan, et al. Simultaneous determination of sex hormones in egg products by ZnCl₂ depositing lipid, solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 678(1): 108-116
- [14] Nils Krone, Beverly A Hughes, Gareth G Lavery, et al. Gas

chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 121(3-5): 496-504

- [15] Sonja Hartmann, Markus Lacorn, Hans Steinhart. Natural occurrence of steroid hormones in food [J]. *Food Chemistry*, 1998, 62(1): 7-20
- [16] O J Ginther, L C Nuti, M C Garcia, et al. Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products [J]. *Journal of Animal Science*, 1976, 42(1): 155-159

现代食品科技