

固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定饲料中5种雌激素

房克艳^{1,2}, 赵超敏², 邓晓军², 陈沁¹

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444)

(2. 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)

摘要: 建立了固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(SPE-UPLC-MS/MS)同时测定饲料中双烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚、17 α -雌二醇和17 β -雌二醇5种激素的检测方法。饲料样品采用乙醚振荡提取、三氯乙酸除蛋白和正己烷除脂,提取液通过Max固相萃取柱净化,经过Athena C18-WP色谱柱(2.1 \times 150 mm, 5 μ m)分离,以0.25%氨水和乙腈进行梯度洗脱,负离子电喷雾电离多反应监测模式进行定性和定量分析。同时优化液相色谱条件和质谱参数,以提高灵敏度,并以17 β -雌二醇-D₃和己烯雌酚-D₈为内标进行定量。结果显示,5种激素在0~10 μ g/L范围内线性相关系数(r) \geq 0.9994;5种雌激素的定量限均为1.0 μ g/kg;各雌激素的加标浓度为1.0 μ g/kg、2.0 μ g/kg、5.0 μ g/kg时,其加标回收率均在70.20%~114.37%之间,相对标准偏差为0.15%~9.08%($n=6$)。结果表明,该方法前处理简单、准确可靠,适用于饲料中5种雌激素的检测。

关键词: 超高效液相色谱-三重四极杆质谱; 固相萃取; 雌激素; 饲料

文章编号: 1673-9078(2018)11-255-261

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.037

Simultaneous Determination of Five Estrogens in Feed by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Coupled with Solid Phase Extraction

FANG Ke-yan^{1,2}, ZHAO Chao-min², DENG Xiao-jun², CHEN Qin¹

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China) (2. Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of five kinds of estrogens (dienestrol, diethylstilbetrol, hexestrol, 17 α -estradiol and 17 β -estradiol) in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. Estrogens were extracted by ethyl ether from the feed sample. The extract was deproteinized with trichloroacetic acid (TCA), defatted with n-Hexane, and then purified by Max phase extraction column. Five kinds of estrogens were derived by Athena C18-WP chromatographic column with gradient elution of acetonitrile/0.25% ammonia water. Finally, identification and quantification were performed using multiple reaction monitoring (MRM) with one precursor ion, and two product ions for each analyte and electrospray ionization in negative mode. The parameters of the liquid chromatography and mass spectrometry were also optimized to enhance detection sensitivity. The quantity of estrrogens were determined by internal standard method with 17 β -estradiol-D₃ and diethylstilbestrol-D₈ as reference. The results showed that the linear ranged from 0 to 10 μ g/L for five estrogens with the correlation coefficients (r) were no less than 0.9994. The limits of quantitation (LOQ) for all analytics were 1.0 μ g/kg. At the spike levels of 1.0 μ g/kg, 2.0 μ g/kg and 5.0 μ g/kg for each estrogen, the recoveries of estrogens were within the range of 70.20%~114.37%, and the relative standard deviation was no more than 9.08% ($n=6$). The results demonstrated that the developed method can simultaneously determine the five estrogens in feed with advantages of simple pretreatment and high accuracy.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); solid phase extraction; estrogens; feed

收稿日期: 2018-07-28

基金项目: 上海市科委科研项目(16142201500; 17DZ2293700); 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: 房克艳(1993-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品工程

通讯作者: 赵超敏(1979-),女,博士,工程师,研究方向:食品掺假溯源

雌激素是一种具有广泛生物学活性的类固醇化合物。如雌二醇、雌三醇等,具有促进和维持女性生殖器官和第二性征的生理作用,并对内分泌、心血管、代谢系统、骨骼的生长和成熟等均有明显的影响。另外,人工合成的雌激素,如己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚等,也具有干扰激素系统功能的作用。雌激素添加到饲料中可促进雌性动物排卵以提高发情动物的数量和受胎率;还具有促进动物生长和增加脂肪沉积等作用^[1]。但是,饲料中雌激素类药物的滥用或违法使用,会导致动物性食品中雌激素的残留,从而对人类健康产生危害^[2]。农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》(农业部公告第193号)中^[3],明确禁止使用雌激素;欧盟的报告中表明,激素类兽药残留不仅会扰乱人体内分泌、生长发育、免疫系统和生殖系统等方面的功能,还会直接危害人们的健康甚至生命^[4]。

饲料是畜禽摄入外源性雌激素的主要途径,长期饲喂含有雌激素的饲料,会使其在畜禽体内累积。若人类食用含有雌激素的动物性食品,可扰乱人体的内分泌系统,导致女性性早熟、男性生育能力下降、女性乳腺癌和宫颈癌等^[5,6]。因此,要加强饲料中雌激素的检测和监管。目前对于雌激素检测方法的报道,大多为动物性食品中^[7,8]和环境中^[9,10],而对于饲料中雌激素的检测方法相对较少。饲料中激素检测的方法主要有气相色谱-串联质谱法^[11,12]、高效液相色谱法^[13,14]、酶联免疫法^[15]、液相色谱-串联质谱法^[16,17]。气相色谱法在检测时需要将样品进行衍生化,操作繁琐、耗时长;高效液相色谱法和酶联免疫法的灵敏度低、选择性差、受基质影响相对较大;液相色谱-串联质谱的方法分析范围广、选择性好、灵敏度高、分析结果可靠,既可定性、又可定量,是对饲料中雌激素进行快速检测分析的首选方法。对饲料中兽药的检测,目前报道最多的为雌酮,己烯雌酚,雌三醇等^[10,14,18],未见有对饲料中双烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚、17 α -雌二醇和17 β -雌二醇5种激素同时检测的报道。本文采用简单快速的固相萃取方法对饲料样品进行净化,通过优化提取和净化的前处理过程,提高回收率,降低基质效应;同时,还优化了液相色谱条件,使17 α -雌二醇与同分异构体17 β -雌二醇实现良好分离,建立了灵敏度高、准确、可靠的饲料中雌激素的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱配 QTRAP6500 质谱, 购自美国

AB Sciex 公司; 漩涡振荡器, 购自德国 Heidolph 公司; Supelco 固相萃取装置, 购自美国 Supelco 公司; Athena C18-WP 色谱柱色谱柱, 购自上海安谱科学仪器有限公司; Poly-Sery Max (60 mg, 30 mL) 固相萃取柱, 购自上海安谱科学仪器有限公司; 往复振荡器, 购自日本 Yamato 公司; 全自动氮吹仪, 购自美国 Caliper 公司; 低温离心机, 购自美国 Sigma 公司; 移液器, 购自法国 Gilson 公司。

激素标准品: 双烯雌酚 (DE, 纯度 96.6%)、己烯雌酚 (DES, 纯度 97.41%)、己烷雌酚 (HEX, 纯度 99.8%)、17 α -雌二醇 (α -E, 纯度 99.7%) 和 17 β -雌二醇 (β -E, 纯度 99.9%), 均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司; 17 β -雌二醇-D₃ (β -E-D₃, 纯度 99.9%), 购自美国 o2si 公司; 己烯雌酚-D₈ (HEX-D₈, 纯度 98.2%), 购自加拿大 TRC 公司; 乙醚、甲醇、三氯甲烷、叔丁基甲醚、乙腈和正己烷(HPLC 级), 均购自美国 TEDIA 公司; 乙酸铵、三氯乙酸、无水氯化钠和氢氧化钠(分析纯), 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 标准溶液的制备

储备液: 分别准确称取双烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇、己烯雌酚-D₈ 和 17 β -雌二醇-D₃ 各 1.00 mg (精确到 0.01 mg), 以甲醇配制浓度为 100.0 mg/L 的单标溶液, 密封, 于棕色瓶中 -30 °C 储存。

单标中间工作液: 分别移取 0.1 mL 100.0 mg/L 的单标储备液, 以甲醇配制浓度为 1.0 mg/L 的单标中间工作液, 密封, 于棕色瓶中 -30 °C 储存, 备用。

混合标准工作液: 使用前分别移取一定量 1.0 mg/L 的单标中间工作液, 用甲醇配制为 100.0 μ g/L 的混合标准溶液, 密封, 于棕色瓶中 -4 °C 储存。用乙腈/水 (1:1, V/V) 配制 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μ g/L 浓度梯度的混合标准溶液, 其中两种内标的添加浓度均为 10.0 μ g/L, 现用现配。

1.3 仪器工作条件

1.3.1 色谱条件

Athena C18-WP 色谱柱 (2.1 \times 150 mm, 5 μ m); 柱温 35 °C; 进样体积 10 μ L; 流动相 A 为 0.25% 氨水, B 为 100% 乙腈; 洗脱程序: 0~3 min, 35%~50% B; 3.0~6.5 min, 50%~55% B; 6.5~7.0 min, 55%~99% B; 7.0~9.0 min, 99% B; 9.0~9.1 min, 99%~50% B; 9.1~10.0 min, 50%~35% B, 保持 4 min, 流速为 0.30 mL/min。

1.3.2 质谱条件

电离模式: 电喷雾电离负离子模式 (ESI-); 多反应监测 (MRM); 电喷雾电压 (IS): -4500 V; 雾化气压力 (GS1): 50 V; 气帘气压力 (CUR): 35 V;

辅助气流速度 (GS2): 60 V; 离子源温度 500 °C; 碰撞气 (CAD): Medium; 入口电压 (EP): -10 V; 其它条件见表 1。

表 1 5 种雌性激素及两种内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for five estrogens and two internal standards

化合物名称	元素组成	分子质量	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	解簇电压 DP/V	碰撞气能	出口电压	CAS
						CE/eV	CXP/V	
双烯雌酚 ^①	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	266.33	265.2	93.0*	-120	-31	-12	84-17-3
				249.0	-120	-36	-12	
己烯雌酚 ^①	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268.35	267.3	251.1*	-80	-33	-32	56-53-1
				237.1	-80	-42	-27	
己烷雌酚 ^①	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	269.1	119.1*	-90	-55	-18	84-16-2
				133.0	-90	-25	-16	
己烯雌酚-D ₈	C ₁₈ H ₁₂ D ₈ O ₂	276.40	275.3	259.1*	-120	-36	-19	91318-10-4
				245.2	-120	-41	-18	
17 α -雌二醇 ^②	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	271.2	145.1*	-100	-45	-15	57-91-0
				183.1	-100	-45	-18	
17 β -雌二醇 ^②	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	271.1	183.2*	-120	-50	-19	50-28-2
				145.1	-120	-51	-21	
17 β -雌二醇-D ₃	C ₁₈ H ₂₁ D ₃ O ₂	275.40	274.2	185.0*	-100	-54	-22	79037-37-9
				145	-100	-53	-15	

注: *标注的碎片离子为定量离子; 定量内标: ①己烯雌酚-D₈; ②17 β -雌二醇-D₃。

1.4 样品处理

称取 5 g (精确到 0.01 g) 饲料样品于 50 mL 具塞塑料离心管中, 准确加入 100 μ L 100.0 μ g/L 己烯雌酚-D₈ 和 17 β -雌二醇-D₃ 内标, 均质 5 min, 加入 10 mL 0.2 mol/L 的乙酸铵缓冲溶液 (pH=5.2 \pm 0.2), 涡旋 30 s。加入 10 mL 乙醚、700 μ L 10% 三氯乙酸, 涡旋 30 s, 加入 5.0 g 无水氯化钠, 涡旋 30 s, 振荡提取 5 min, 4500 r/min 离心 5 min, 吸取乙醚层于另一试管中。乙醚重复提取一次, 合并的乙醚相在常温下用氮气吹至近干。加入 2 mL 三氯甲烷溶解残余物, 涡旋 1 min, 加入 5 mL 1.0 mol/L 氢氧化溶液, 涡旋 1 min, 4500 r/min 离心 3 min, 将上层水相移入另一试管中。氢氧化钠溶液重复提取一次, 合并氢氧化钠溶液提取液, 待净化。

1.5 净化

固相萃取柱使用前依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化, 合并氢氧化钠提取液过固相萃取柱, 依次用 5 mL 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液和 5 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液/水 (7:3, V/V) 淋洗固相萃取柱, 待溶液流过固相萃取柱后, 减压抽干。加入 5 mL 2% 甲酸-叔丁基

甲醚/甲醇溶液洗脱 (9:1, V/V), 收集洗脱液, 流速均应控制在 2 mL/min。洗脱液在低于 40 °C 下, 用缓和氮气流吹干, 加入 1 mL 乙腈-水溶液 (1:1, V/V) 溶解残渣, 加入 1 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 涡旋混匀 30 s, 转移至 2 mL 连盖塑料离心管中, 于 4 °C 15000 r/min 离心 3 min, 取下层溶液过 0.22 μ m 滤膜, 待测定。

1.6 数据统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2010, 图表的绘制采用 GraphPad Prism 6 和 Origin 9.0 软件。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

质谱条件均在兼顾所有目标化合物具有良好响应的情况下进行优化。将 100.0 μ g/L 的单标准溶液用流动注射泵连续注入质谱仪, 分别在正、负离子模式下进行一级质谱全扫描, 确定母离子。

将化合物的二级质谱丰度较高的两个碎片离子用于定性和定量 (图 1), 再优化每一种化合物的 DP、CE 和 CXP 参数。

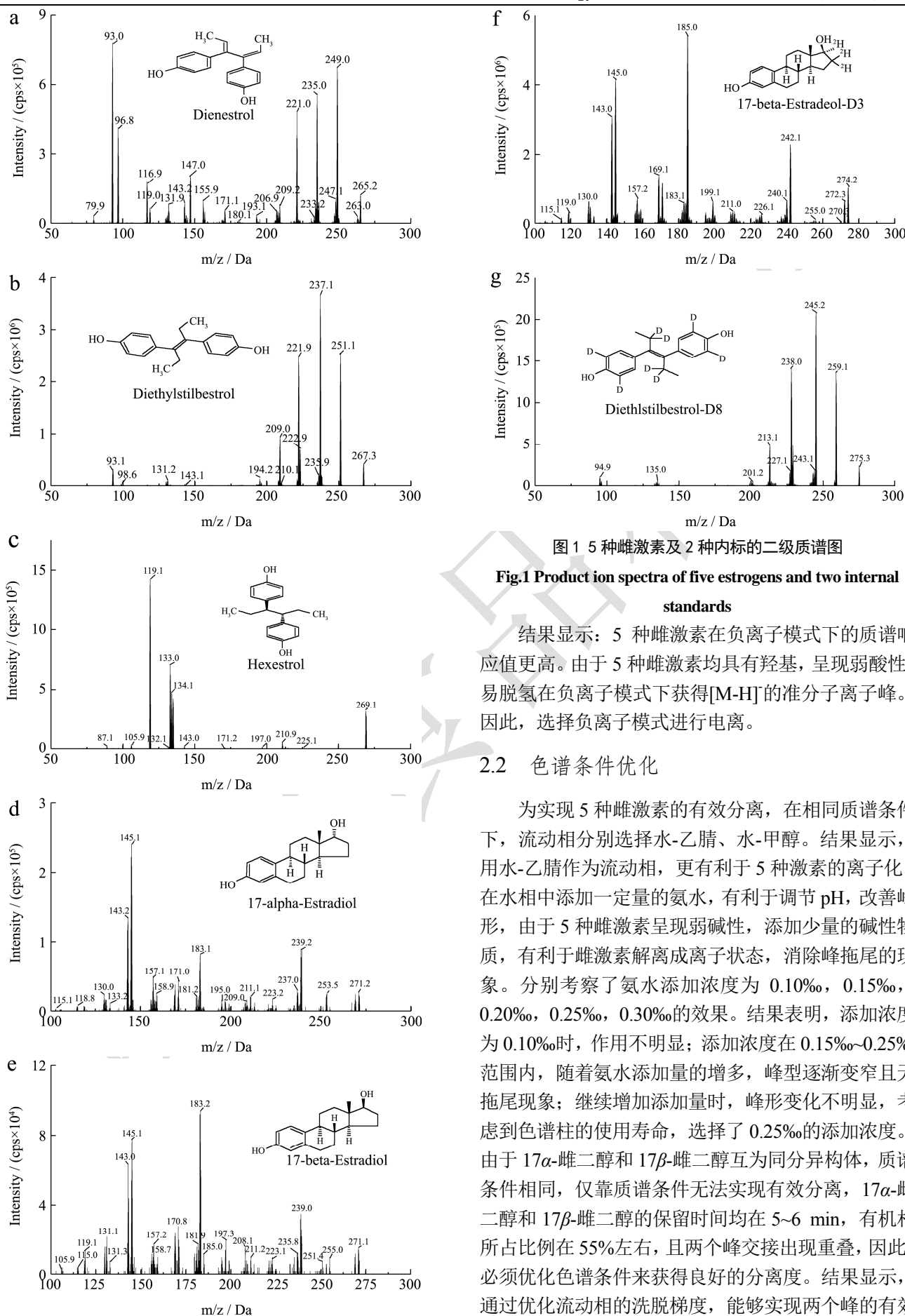


图1 5种雌激素及2种内标的二级质谱图

Fig.1 Product ion spectra of five estrogens and two internal standards

结果显示: 5种雌激素在负离子模式下的质谱响应值更高。由于5种雌激素均具有羟基, 呈现弱酸性, 易脱氢在负离子模式下获得[M-H]⁻的准分子离子峰。因此, 选择负离子模式进行电离。

2.2 色谱条件优化

为实现5种雌激素的有效分离, 在相同质谱条件下, 流动相分别选择水-乙腈、水-甲醇。结果显示, 用水-乙腈作为流动相, 更有利于5种激素的离子化。在水相中添加一定量的氨水, 有利于调节pH, 改善峰形, 由于5种雌激素呈现弱碱性, 添加少量的碱性物质, 有利于雌激素解离成离子状态, 消除峰拖尾的现象。分别考察了氨水添加浓度为0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25%, 0.30%的效果。结果表明, 添加浓度为0.10%时, 作用不明显; 添加浓度在0.15%~0.25%范围内, 随着氨水添加量的增多, 峰型逐渐变窄且无拖尾现象; 继续增加添加量时, 峰形变化不明显, 考虑到色谱柱的使用寿命, 选择了0.25%的添加浓度。由于17 α -雌二醇和17 β -雌二醇互为同分异构体, 质谱条件相同, 仅靠质谱条件无法实现有效分离, 17 α -雌二醇和17 β -雌二醇的保留时间均在5~6 min, 有机相所占比例在55%左右, 且两个峰交接出现重叠, 因此, 必须优化色谱条件来获得良好的分离度。结果显示, 通过优化流动相的洗脱梯度, 能够实现两个峰的有效

分离(图2)。另外,对比了流速为0.20 mL/min、0.25 mL/min、0.30 mL/min和0.35 mL/min的分离效果,确定流速为0.30 mL/min时的效果最佳。

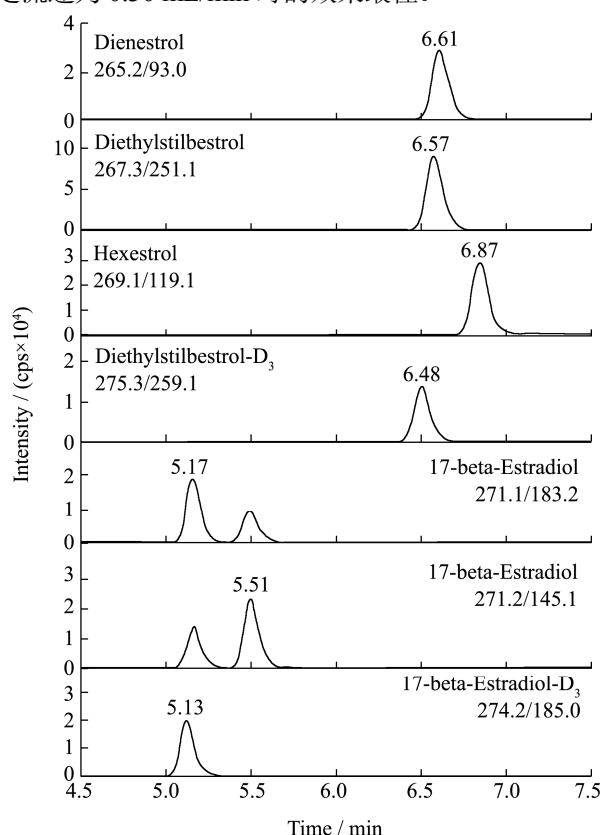


图2 5种雌激素和2种内标的二级质谱提取离子流图

Fig.2 MS/MS extraction ion spectra of the five estrogens and the two internal standards

2.3 样品的提取和净化方法的选择

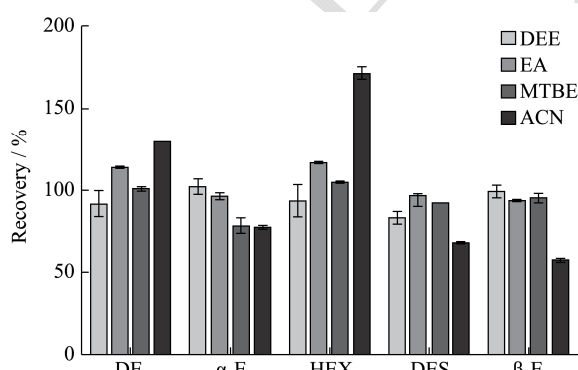


图3 不同提取溶剂对回收率的影响

Fig.3 Effect of different extraction solvents on recovery

提取: 由于5种雌激素在弱极性和中等极性的溶剂中均具有良好的溶解性,因此选择了乙醚(DEE)、乙酸乙酯(EA)、叔丁基甲醚(MTBE)和乙腈(ACN)作为提取溶剂进行提取。结果显示,以上4种溶剂的提取回收率分别在85.80%~101.95%、92.86%~117.23%、75.14%~104.60%和55.40%~174.20%(图

3);乙醚和叔丁基甲醚除色素的效果良好;乙腈除蛋白能力稍强。但是,经叔丁基甲醚提取的样品,质谱响应值低,且峰形乱,表明提取时基质共提物较多;乙腈对17β-雌二醇和己烷雌酚的提取效果差,回收率低;乙酸乙酯提取液中基质共提物多,氮吹时不易吹干。考虑到回收率、基质效应和提取效率等综合效果,最终选择乙醚作为提取溶剂。

浓缩饲料、配合饲料、精料补充料等饲料中含有大量的蛋白质,如果不去除干净,不仅会产生沉淀物和气泡,堵塞固相萃取小柱,影响净化效果;而且会损伤仪器。考察了500 μL、600 μL、700 μL、800 μL、900 μL和1000 μL 10%三氯乙酸除蛋白的效果。结果显示,当添加量为500 μL时,提取液中仍有絮状蛋白沉淀,堵塞萃取小柱,过柱困难;当添加量为600 μL时,提取液中有少量气泡,影响萃取效率;当添加量为900 μL及以上时,由于三氯乙酸添加量过多,使蛋白迅速沉淀、凝结,容易将目标物包裹在其中,导致雌激素的回收率低;添加量为700 μL和800 μL时,除蛋白效果差别不大,且前者目标物的回收率更高。因此,选择添加700 μL 10%三氯乙酸去除基质中的蛋白质。另外,对比了2 mL、5 mL、8 mL、10 mL、15 mL和20 mL的提取溶剂对回收率的影响。结果显示,除己烷雌酚外,提取溶剂体积在2~10 mL范围内,回收率均呈现上升的趋势,且10 mL、15 mL和20 mL之间对回收率的影响效果无明显差别(图4)。当提取溶剂体积低于10 mL时,己烷雌酚,质谱峰宽而乱,重复性差;当提取溶剂体积≥10 mL时,峰形明显改善,重复性好。因此,为节省溶剂和提高检测效率,选择提取溶剂体积为10 mL。

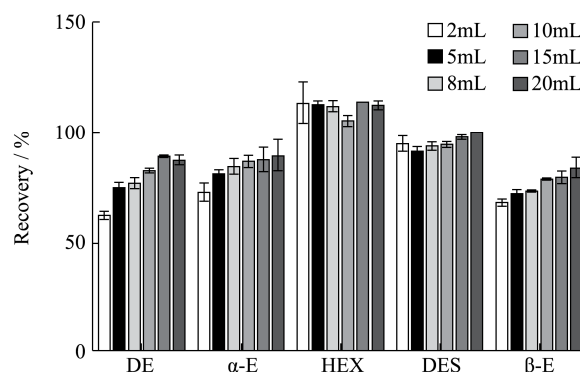


图4 不同体积提取剂对回收率的影响

Fig.4 Effect of different volume extractants on recovery rate

净化方法: 采用固相萃取的净化方法,分别用HLB和Max小柱对提取液进行净化。结果显示,HLB小柱对17α-雌二醇和17β-雌二醇有较好的净化效果,回收率在71.90%~116.30%范围内,但对其它3种雌激素的净化效果均不理想,峰宽且响应值低;而Max柱

不仅能够良好的去除饲料基质中的色素和有机酸，而且对 5 种雌激素的净化效果好，过柱速度快，回收率均在 76.30%~114.38%之间。因此，选择 Max 柱作为固相萃取小柱。

2.4 线性关系、检出限和定量限

按照 1.2 中的方法将混合标准溶液逐级稀释，配成系列混合标准工作液，按照本方法依次进行测定，

以得到的目标物质的峰面积与加入内标的峰面积的比值为纵坐标 (y)，对应目标物质的浓度与内标物质的浓度的比值为横坐标 (x)，绘制工作曲线。

由表 2 可以看出，该方法的线性相关系数均在 0.999 以上，线性关系良好。以信噪比 (S/N) ≥10 所对应的待测物浓度为该方法的定量限 (LOQ)，5 种雌激素的 LOQ 均为 1 μg/kg。

表 2 5 种雌激素的线性方程、线性范围、线性相关系数

Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r) of 5 compounds

化合物名称	线性范围/(μg/L)	回归方程	相关系数 (r)
17α-雌二醇	0~10	y=0.122x+0.000238	0.9995
17β-雌二醇	0~10	y=0.0956x+0.00503	0.9999
己烷雌酚	0~10	y=0.0233x+0.000267	0.9994
己烯雌酚	0~10	y=0.0717x+0.000363	0.9997
双烯雌酚	0~10	y=0.0213x+0.00242	0.9999

2.5 回收率与精密度

单一植物源饲料、饲料添加剂、浓缩饲料、配合饲料和精料补充料空白样品，分别添加 1 μg/kg、2 μg/kg、5 μg/kg 标准物质，按照 1.4 和 1.5 的方法对加

标样品进行前处理和净化，每个水平平行测定 6 次，其加标回收率均在 70.20%~114.37%之间，相对标准偏差为 0.15%~9.08%，保留时间的可变性小于 1%。该方法准确度和精密度符合饲料中激素残留检测的要求。

表 3 5 种雌激素的加标回收率和相对标准偏差

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD, n=6) of five estrogens spiked in feed samples

雌激素	添加量/(μg/kg)	单一植物源性饲料		饲料添加剂		浓缩饲料		配合饲料		精料补充料	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
17α-雌二醇	1	85.07	2.52	87.73	2.70	85.80	0.86	77.30	3.38	85.87	3.90
	2	103.63	4.00	90.33	2.21	90.93	2.70	87.13	1.43	94.00	0.61
	5	106.00	2.78	93.10	0.40	90.80	1.80	93.77	2.71	98.93	1.69
17β-雌二醇	1	84.75	0.59	92.93	0.94	85.47	0.15	85.80	1.00	82.67	1.23
	2	95.45	0.59	96.20	2.31	93.33	6.32	95.87	2.77	82.87	2.51
	5	99.52	1.25	100.27	1.32	97.30	1.51	100.13	1.47	94.60	3.11
己烷雌酚	1	97.27	0.79	77.63	2.19	83.53	3.03	88.77	1.66	94.81	5.12
	2	99.10	0.95	91.30	9.08	107.03	3.76	91.24	4.34	96.54	1.61
	5	104.87	0.90	103.97	0.45	114.37	2.89	103.17	2.78	114.31	0.41
己烯雌酚	1	72.90	1.84	71.97	2.39	75.57	2.20	76.07	1.38	86.97	1.70
	2	79.67	2.21	79.10	5.00	81.10	2.73	85.40	0.48	89.13	1.61
	5	88.33	0.51	77.07	2.34	90.40	1.80	102.67	0.92	94.53	2.04
双烯雌酚	1	75.33	1.69	71.07	1.33	73.67	1.80	76.37	0.59	74.61	2.38
	2	88.07	2.15	70.20	0.31	77.93	1.23	94.43	0.50	79.18	3.42
	5	89.20	0.16	90.50	1.15	86.53	1.39	101.77	2.59	109.51	0.75

2.6 实际样品分析

采用所建方法对法定监管的5种饲料分别抽取10个样品进行检测分析,均未检出上述5种激素。

3 结论

本文建立了饲料样品中 17α -雌二醇、 17β -雌二醇、己烷雌酚、己烯雌酚、和双烯雌酚的超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)的方法。该方法简单、快速,灵敏度高;前处理净化效果好,能有效的降低基质效应;应用范围广,可作为饲料中5种雌激素的常规检测方法。

参考文献

- [1] Lammers B P, Heinrichs A J, Kensing R S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifer growth, feed efficiency, and blood parameters [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(8): 1746-1752
- [2] Tashiro Y, Takemura A, Fujii H, et al. Livestock wastes as a source of estrogens and their effects on wildlife of Manko tidal flat, Okinawa [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 47(1): 143-147
- [3] 中华人民共和国农业部公告第193号,2002
The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC193, 2002
- [4] European Union. Commission Regulations (EU) No 37/2010 of 22 December 2009
- [5] Hashemi S R, Davoodi H. Phytoestrogens as new class of feed additive in poultry industry [J]. *Journal of Animal & Veterinary Advances*, 2010, 9(17): 2295-2304
- [6] Wang L, Wang X, Yuan X, et al. Simultaneous analysis of diosgenin and sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* byproduct by thin-layer chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22(1): 14-17
- [7] 赵超敏,岳振峰,吴晖,等.液相色谱-串联质谱法测定牛奶中4种雌激素残留[J].*现代食品科技*,2014,30(6):244-249
ZHAO Chao-min, YUE Zhen-feng, WU Hui, et al. Determination of four estrogens residues in milk samples by liquid chromatography-tandem mass Spectrometry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(6): 244-249
- [8] 陈才军,周勇,陈翔,等.UPLC-MS/MS法测定美容养颜类保健食品中9种雌激素[J].*食品工业*,2017,38(12):292-295
CHEN Cai-jun, ZHOU Yong, CHEN Xiang, et al. Determination of 9 estrogens in beautifying health products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Industry*, 2017, 38(12): 292-295
- [9] 贾彦博,王红青,韩里明.液相色谱-串联质谱法快速测定饮用水中6种雌激素[J].*分析测试学报*,2011,30(7):808-712
JIA Yan-bo, WANG Hong-qing, HAN Li-ming. Determination of six estrogens in drinking water by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2011, 30(7): 808-712
- [10] 韩疏影,俞慧敏,宋易霖,等.基质固相分散萃取和固相萃取-高效液相色谱-三重四极杆-复合线性离子阱质谱同时测定奶制品中6种雌激素[J].*色谱*,2018,36(3):285-291
HAN Shu-ying, HAN Hui-min, SONG Yi-lin, et al. Simultaneous determination of six estrogens in dairy products by high performance liquid chromatography-triple quadrupole-ion trap mass spectrometry coupled with matrix solid-phase dispersion and solid phase extraction [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(3): 285-291
- [11] 林小莉,李宁,霍峰,等.气相色谱-质谱法同时测定饲料中6种雌激素类药物[J].*分析测试学报*,2016,35(3):322-326
LIN Xiao-li, LI Ning, HUO Feng, et al. Simultaneous determination of six estrogens in feed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2016, 35(3): 322-326
- [12] HuoFeng, LinXiao-Li. Simultaneous determination of hexoestrol, diethylstilbestrol, estrone and 17-beta-estradiolin feed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 23(1): 44-49
- [13] 张建勋,田颖,李雪兰,等.高效液相色谱法测定饲料中雌二醇含量的方法研究[J].*饲料工业*,2005,26(13):47-48
ZHANG Jian-xun, TIAN Ying, LI Xue-lan, et al. Study on determination of estradiol content in feed by HPLC [J]. *Feed Industry*, 2005, 26(13): 47-48
- [14] 刘红菊,闫冲,刘宏果.反相高效液相色谱法同时测定饲料中的10种性激素[J].*中国饲料*,2010,21(18):34-36
LIU Hong-ju, YAN Chong, LIU Hong-guo. Simultaneous determination of 10 sex hormones in feed by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Feed*, 2010, 21(18): 34-36
- [15] 李宁,霍峰,董艳峰,等.饲料中己烯雌酚 ELISA 检测方法的建立[J].*黑龙江畜牧兽医*,2016,59(9):284-286
LI Ning, HUO Feng, DONG Yan-feng, et al. Establishment of ELISA assay for diethylstilbestrol in feed [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry*, 2016, 59(9): 284-286
- [16] 张毅,蓝芳,张峰,等.液相色谱-串联质谱法测定谷物类饲料中的41种激素[J].*色谱*,2011,29(6):523-534

- ZHANG Yi, LAN Fang, ZHANG Feng, et al. Determination of 41 hormones in cereal feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(6): 523-534
- [17] 薛毅,张玥,吕燕,等.同位素稀释液相色谱串联质谱法同时测定饲料中雌激素类药物[J].中国畜牧杂志,2017,53(10): 101-105
- XUE Yi, ZHANG Yue, LV Yan, et al. Simultaneous determination of estrogen drugs in feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution [J]. Chinese Veterinary Medicine, 2017, 53(10): 101-105
- [18] 肖全伟,吴文林,杨万林,等.固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中的3种雌激素[J].色谱, 2014,32(11):1209-1213
- XIAO Quan-wei, WU Wen-lin, YANG Wan-lin, et al. Simultaneous determination of three estrogens in feed by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(11): 1209-1213