

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定燕窝中 45种激素及其水平调查

徐敦明^{1*}, 曾三妹¹, 柳训才², 王鹭骁¹, 范群艳², 张小江², 方恩华¹

(1. 厦门海关技术中心, 福建 厦门 361026; 2. 厦门市燕之屋丝浓食品有限公司, 福建 厦门 361101)

摘要:建立了固相萃取-高效液相色谱-串联质谱(SPE-HPLC-MS/MS)同时测定食用燕窝中皮质激素、雌激素、雄激素及孕激素等5类45种激素的多残留分析方法。采用乙腈-乙酸乙酯(1:1, v/v)超声辅助提取、亲水亲脂平衡固相萃取柱净化,甲醇洗脱。分别在正、负电喷雾电离源、多反应监测模式下检测45种激素。正离子模式下的流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,负离子模式下的流动相为乙腈-水,色谱柱为Phenomenex Kinetex C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)。在优化条件下,45种激素在0.20~20.0 μg/L范围内线性关系良好,相关系数(R^2)≥0.999 0,方法的检出限(LOD)为0.04~0.70 μg/kg,定量限(LOQ)为0.16~2.00 μg/kg。按三水平(2.0、4.0、20.0 μg/kg)进行加标回收试验,氟米龙、布地奈德、醛固酮、醋酸氟轻松、炔雌醇的回收率为40.2%~63.6%,可对这5种激素进行定性分析,其余40种激素的平均加标回收率为72.2%~112.3%,相对标准偏差(RSD)为2.5%~11.6%,该方法可对40种激素进行准确定性定量,精密度高,灵敏度高,简便、快速。从2017~2021年,通过研究建立的方法对来自马来西亚、印度尼西亚、泰国和越南等国家的1021个燕窝样品进行监测,仅勃地酮、雄烯二酮、孕酮有检出(大于检出限),其他激素均小于检出限。孕酮检出率为100%,勃地酮、雄烯二酮检出率分别为79%和89%,3种激素含量范围分别为0.097~3.58、0~0.096和0~1.77 μg/kg。与同为动物源性食品的鸡蛋、纯牛奶、乳制品相比,所有测定的鸡蛋样品中均检出雄烯二酮,含量比其他3类产品略高;勃地酮在4类产品中的含量差别不大,均为微量;孕酮含量在鸡蛋中最高,其次是纯牛奶,燕窝中含量最低。研究表明,食用燕窝带入的激素种类少,含量低,对健康影响小。

关键词:高效液相色谱-串联质谱;含量水平;激素;燕窝

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2022)05-0423-10

Determination and level investigation of 45 hormones in edible bird's nest by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Dunming^{1*}, ZENG Sanmei¹, LIU Xuncai², WANG Luxiao¹, FAN Qunyan², ZHANG Xiaojiang², FANG Enhua¹

(1. Technical Center, Xiamen Customs, Xiamen 361026, China;

2. Nest Technology Center, Yan Palace Seelong Food Co., Ltd., Xiamen 361101, China)

Abstract: Edible bird's nests (EBNs), a food of animal origin, are temporary nests built by swiftlets to foster their offspring. As EBNs and their products are widely accepted by consumers, the safety of hormones in EBNs has also received increasing attention. The establishment of a method for hormone analysis in EBNs and the investigation of hormone levels based on the analytical method are the most effective measures to eliminate any safety concerns. In this study, a multi-residue method was developed for the simultaneous determination of 45 hormones in

收稿日期:2021-08-26

* 通讯联系人.Tel:(0592)6800818, E-mail:49213971@qq.com.

基金项目:海关总署科技项目(2020HK223,2021HK198);福建省科技项目(2020I0032).

Foundation item: Science and Technology Project of the General Administration of Customs (Nos. 2020HK223, 2021HK198); Science and Technology Project of Fujian (No. 2020I0032).

EBNs, including estrogens, progesterones, androgens, and cortical hormones. EBN samples (1.0 g) were weighed into 50 mL polypropylene centrifuge tubes and mixed with 8 mL of pure water. Then, the samples were extracted twice with 15 mL of acetonitrile and ethyl acetate (1:1, v/v) under ultrasonic-assisted conditions for 30 min, and the protein in the EBN samples was precipitated at 4 000 r/min for 5 min. The clear supernatants were loaded onto a hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) SPE column, which was previously activated with methanol (3 mL) followed by pure water (3 mL). The cartridge was washed with 3 mL of pure water and 3 mL of 50% methanol aqueous solution. The hormones were eluted with 3 mL of methanol. A rapid analysis was performed using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The hormones in the extracting solution were separated on a Phenomenex Kinetex C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) and eluted by gradient elution with acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (ESI⁺) or acetonitrile-water (ESI⁻). Qualitative and quantitative analyses were performed using the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The HPLC-MS/MS results showed good linearity in the range of 0.20–20.0 μg/L with correlation coefficients (R^2) ≥0.999 0. For the 45 hormones, the limits of detection (LODs, $S/N \geq 3$) were 0.04–0.70 μg/kg and the limits of quantification (LOQs, $S/N \geq 10$) were 0.16–2.00 μg/kg. The recoveries of five hormones, namely, fluorometholone, budesonide, aldosterone, fluciclonide, and ethinylestradiol, were 40.2%–63.6%. Owing to the low recoveries, this method might be suitable only for qualitative testing of the five hormones. The recoveries of the other 40 target analytes were between 72.2% and 112.3% at spiked levels of 2.0, 4.0, and 20.0 μg/kg with relative standard deviations (RSDs) of 2.5%–11.6%. The method is characterized by easy operation, rapidness, high precision, and high sensitivity for the 40 compounds. Thus, this method is suitable for determination of the 40 hormones from EBNs for qualitative testing and quantitation. The proposed method was used to analyze 1 021 EBN samples from Malaysia, Indonesia, Thailand, and Vietnam from 2017 to 2021. Only three hormones, progesterone, boldenone, and androstenedione, were identified in the EBN samples, while the levels of the other hormones were lower than their individual LODs. The detected rates of progesterone, boldenone, and androstenedione were 100%, 79%, and 89%, respectively. The contents of progesterone, boldenone, and androstenedione in the EBN samples were 0.097–3.58 μg/kg, 0–0.096 μg/kg and 0–1.77 μg/kg, respectively. The levels of hormones in EBNs were compared with those in eggs, pure milk, and dairy products, which were also animal-derived foods. Androstenedione was detected in all egg samples monitored, and its content was higher than that in EBN samples, pure milk, and dairy products. The content of boldenone was similar among the four products investigated in this study. Based on risk assessment using progesterone, the dietary intake was found to be 3.54 μg/d from milk >1.09 μg/d from eggs >0.003 0 μg/d from EBNs. The results showed that the levels of hormones in EBNs were much lower than those in eggs, milk, and dairy products for daily consumption. Based on this investigation, the health effect of the hormones in EBNs may be insignificant.

引用本文:徐敦明,曾三妹,柳训才,王鹭骁,范群艳,张小江,方恩华.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定燕窝中45种激素及其水平调查.色谱,2022,40(5):423–432.

XU Dunming, ZENG Sanmei, LIU Xuncai, WANG Luxiao, FAN Qunyan, ZHANG Xiaojiao, FANG Enhua. Determination and level investigation of 45 hormones in edible bird's nest by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(5): 423–432.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); content level; hormones; edible bird's nest (EBN)

燕窝,又名燕菜、燕蔬菜及燕根,是由部分雨燕科金丝燕用其唾液及绒羽等混合凝结筑成用于繁衍后代的巢窝,含有丰富的氨基酸、蛋白质、唾液酸及微量的矿物质元素等^[1,2],具有抗氧化^[3-5]、改善免疫^[6]、延缓衰老^[7]、抗病毒^[8,9]、营养神经^[10]、防止胰岛素抵抗^[11]等功效,在《本草纲目拾遗》中有“大养肺阴,化痰止咳,补而能清,为调理虚损老擦之圣药”的记载。燕窝自引入中国以来就被奉为高档保健食品,广受人们青睐。燕窝作为一种动物源性食品,其中激素的安全性问题也受到更多人的关注。通过索引, Ma 等^[12]采用免疫技术对燕窝中6种激素进行测定,国内外有关采用液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)测定燕窝中激素含量的文献报道甚少,鉴于此,建立一种准确可靠的燕窝中多种激素同时确证的分析方法非常必要。

研究表明,长期摄入激素对于人体健康存在一定风险与隐患。如雌激素其化学稳定性高,不易降解,通过污水处理厂或养殖场废弃物进入环境后,在水体、土壤系统中将发生吸附、迁移等行为^[13],可在动物机体内存积,并通过食物链传递进入人体,干扰内分泌系统,并引起发育、生殖、行为等方面的异常变化^[14-16]。欧盟委员会禁止使用雌激素作为促生长剂用于动物育肥^[17],我国农业部公告250号^[18]也规定食品动物中禁止使用己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚及其盐、酯。目前,在环境领域研究较多的是雌激素,而对其他几种类固醇激素的研究偏少,且多是集中在少数几种物质上的基础研究,对于动物源性食品中激素的研究主要针对肉制品、牛奶、蛋等食品。我国现行的动物源性食品中激素的检测标准近30个,常用检测痕量残留激素的分析方法有主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)^[19,20]、电化学法^[21,22]、酶免疫分析法^[23]、放射免疫法^[24]、高效液相色谱法^[25]、液相色谱-三重四极杆质谱法^[26-30]等。其中,酶免疫分析法可测定范围较窄且易存在假阳性结果和交叉污染情况,适用于检测常见、单一性激素;高效液相色谱法对热稳定差、高沸点物质有较好分离度,但是紫外检测器灵敏度及准确性存在一定限制;GC-MS可对多种激素同时定性定量分析,但激素具有不易挥发及热不稳定性等特点,多数需要衍生,目前尚未有一种衍生试剂可对所有激素进行衍生化,

而且衍生化过程还会出现副反应,使分析底物复杂化,过程繁琐耗时。LC-MS/MS因具有检测灵敏度高、选择性和特异性好、分析时间短等特点,是目前应用最广泛的激素残留定量分析方法之一^[31-35]。

本研究以燕窝为对象,以LC-MS/MS技术为检测手段,建立了燕窝中皮质激素、雌激素、雄激素及孕激素类等45种激素的测定方法,该方法操作简单,灵敏度高,准确度高,对后续燕窝食品安全的监管,以及回应社会对燕窝中激素安全性的担忧具有重要参考意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), API5500 三重四极杆质谱仪(美国 AB 公司), CPX5800H 超声仪(美国 Branson Ultrasonics 公司), Supelco 24 位固相萃取仪(美国 Merck 公司), N-EVAP-24 氮吹仪(美国 Organomation 公司), MS3 Basic 涡旋振荡器(德国 IKA 公司), TDL-50B 离心机(中国上海安亭科学仪器厂), Milli-Q Reference 超纯水器(美国 Millipore 公司), CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

群勃龙等45种标准品(纯度 $\geq 98\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司、美国药典公司、英国药典公司、加拿大 TRC 公司)分别以甲醇溶解配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,使用时根据需要配成不同质量浓度的中间混合标准溶液及标准工作液。甲醇、乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯(美国 Merck 公司),其他试剂为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 3 mL/60 mg 亲水-亲脂平衡固相萃取柱(HLB,美国 Waters 公司)。本研究共收集 1 021 份燕窝样品,来自马来西亚、印度尼西亚、泰国和越南等国家,测定时间 2017~2021 年。

1.2 色谱条件

1.2.1 正离子模式

色谱柱: Phenomenex Kinetex C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μm);柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈;流速: 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 70% A; 2.0~2.1 min, 70% A~50% A; 2.1~7.0 min, 50% A~

36% A; 7.0 ~ 7.1 min, 36% A ~ 16% A; 7.1 ~ 8.6 min, 16% A ~ 0% A; 8.6 ~ 10.6 min, 0% A; 10.6 ~ 11.0 min, 0% A ~ 70% A; 11.0 ~ 14.0 min, 70% A。进样量: 10 μ L。

1.2.2 负离子模式

色谱柱: Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μ m); 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流动相: A 相为水, B 相为乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0 ~ 1.5 min, 98% A ~ 65% A; 1.5 ~ 3.5 min, 65% A; 3.5 ~ 3.8 min, 65% A ~ 35% A; 3.8 ~ 5.0 min,

35% A; 5.0 ~ 5.3 min, 35% A ~ 5% A; 5.3 ~ 7.0 min, 5% A; 7.0 ~ 7.1 min, 5% A ~ 98% A; 7.1 ~ 10.0 min, 98% A。进样量: 10 μ L。

1.3 质谱条件

电喷雾电离源, 正或负离子模式 (ESI⁺ 或 ESI⁻); 离子源温度: 650 $^{\circ}$ C; 雾化气压力: 413.7 kPa; 干燥气压力: 413.7 kPa; 气帘气压力: 275.8 kPa; 每个离子对驻留时间: 10 ms。每种化合物的保留时间、检测离子对、去簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 等质谱参数见表 1。

表 1 45 种激素的质谱参数
Table 1 MS parameters for the 45 hormones

No.	Compound	CAS No.	t_R /min	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/eV	Ionization mode
1	triamcinolone (曲安西龙)	124-94-7	2.52	439.2	363.3* 393.2	-66 -66	-20 -14	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
2	aldosterone (醛固酮)	52-39-1	3.05	405.2	331.1* 359.1	-60 -60	-30 -17	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
3	betamethasone (倍他米松)	378-44-9	3.20	393.2	337.3* 355.2	60 60	18 18	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
4	fluoymesterone (氟甲睾酮)	76-43-7	3.33	337.2	131.0* 241.3	40 40	47 33	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
5	prednisolone (泼尼松龙)	50-24-8	3.42	405.2	329.1* 359.0	-40 -40	-24 -17	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
6	estriol (雌三醇)	50-27-1	3.43	287.1	170.9* 144.9	-100 -100	-50 -57	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
7	prednisone (泼尼松)	53-03-2	3.46	403.2	327.1* 357.1	50 50	-19 -13	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
8	hydrocortisone (氢化可的松)	50-23-7	3.50	407.2	331.2* 361.1	-26 -26	-24 -17	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
9	boldenone (勃地酮)	846-48-0	3.62	287.2	121.0* 135.0	45 45	31 21	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
10	cortisone (可的松)	53-06-5	3.62	405.2	329.0* 359.2	-30 -30	-23 -13	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
11	19-nortestosterone (诺龙)	434-22-0	3.73	275.2	109.2* 134.9 257.3	50 50 50	33 28 24	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺ [M+H] ⁺
12	norethindrone (炔诺酮)	68-22-4	4.03	299.2	109.1* 231.1	20 20	32 24	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
13	21-hydroxyprogesterone (21-羟基孕酮)	64-85-7	4.09	331.2	97.0* 109.0	140 140	28 34	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
14	6 α -methylprednisolone (甲基泼尼松龙)	83-43-2	4.19	419.2	343.1* 373.3	-16 -16	-26 -17	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
15	androstenedione (雄烯二酮)	63-05-8	4.30	287.2	97.1* 109.1	110 110	31 31	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
16	methyltestosterone (甲睾酮)	58-18-4	4.33	303.2	97.1* 109.1	50 50	32 35	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
17	17 α -hydroxyprogesterone (17 α -羟基孕酮)	68-96-2	4.35	331.2	97.2* 109.2	100 100	33 38	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
18	dexamethasone (地塞米松)	50-02-2	4.40	437.2	361.1* 391.1	-25 -25	-25 -16	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
19	flumethasone (氟米松)	2135-17-3	4.46	455.2	379.1* 409.2	-40 -40	-27 -17	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
20	beclomethasone (倍氯米松)	4419-39-0	4.67	453.2	377.2* 407.1	-40 -40	-21 -18	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	Compound	CAS No.	t_R /min	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/eV	Ionization mode
21	levonorgestrel (左炔诺孕酮)	797-63-7	4.70	313.2	108.9* 245.3	41 20	39 24	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
22	5 α -androstan-17 β -ol-3-one (雄烯醇酮)	5295-66-9	4.74	291.1	159.2* 255.4	166 166	36 24	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
23	triamcinolone acetonide (醋酸曲安奈德)	3870-07-3	4.87	479.2	337.1* 413.1	-30 -30	-34 -31	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
24	medroxyprogesterone (甲羟孕酮)	520-85-4	4.98	345.3	97.0* 123.2	40 40	33 36	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
25	stanozolol (康力龙)	10418-03-8	5.06	329.3	81.1* 95.0	58 58	84 52	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
26	mesterolone (甲氢睾酮)	1424-00-6	5.11	305.2	173.3* 269.3 229.2	180 180 180	30 24 26	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺ [M+H] ⁺
27	17 β -estradiol (17 β -雌二醇)	50-28-2	5.12	271.1	183.2* 144.8	-160 -160	-53 -52	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
28	fluocinolone acetonide (醋酸氟轻松)	67-73-2	5.13	497.2	355.2* 431.2	-33 -33	-35 -28	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
29	estrone (雌酮)	53-16-7	5.28	269.1	144.9* 158.9	-30 -30	-18 -26	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
30	fluorometholone (氟米龙)	426-13-1	5.34	421.2	254.8* 354.9	-22 -22	-29 -22	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
31	fludrocortisone acetate (醋酸氟氢可的松)	514-36-3	5.41	467.3	349.0* 421.1	-30 -30	-36 -19	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
32	17 α -estradiol (17 α -雌二醇)	57-91-0	5.43	271.2	144.9* 182.9 239.1	-160 -160 -160	-50 -55 -54	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻ [M-H] ⁻
33	trenbolone acetate (醋酸群勃龙)	10161-34-9	5.62	313.2	253.3* 271.0	50 50	29 28	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
34	megestrol-17-acetate (醋酸甲地孕酮)	595-33-5	5.90	385.2	267.1* 325.2	90 90	25 19	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
35	progesterone (孕酮)	57-83-0	5.91	315.2	97.0* 109.0 297.3	35 35 35	31 32 22	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺ [M+H] ⁺
36	danazol (达那唑)	17230-88-5	5.95	338.2	120.2* 148.2	12 8	41 34	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
37	chloromadinone 17-acetate (乙酸氯地孕酮)	302-22-7	6.06	405.2	309.1* 345.2	90 90	23 19	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
38	melengestrol acetate (甲烯雌醇乙酸酯)	2919-66-6	6.16	397.2	279.2* 337.1	11 8	27 20	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
39	medroxyprogesterone-17-acetate (醋酸甲羟孕酮)	71-58-9	6.17	387.2	285.4* 327.3	80 80	24 20	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺
40	budesonide (布地奈德)	51333-22-3	6.36	475.2	339.3* 357.3	-40 -40	-31 -20	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
41	ethinylestradiol (炔雌醇)	57-63-6	6.44	295.1	145.0* 159.1	-40 -40	-51 -44	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
42	diethylstilbestrol (己烯雌酚)	56-53-1	7.05	267.3	237.1* 251.0	-40 -40	-42 -36	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
43	dienestrol (双烯雌酚)	84-17-3	7.06	265.2	92.7* 171.1	-32 -28	-50 -30	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
44	hexestrol (己烷雌酚)	84-16-2	7.08	269.1	118.8* 132.8	-47 -47	-59 -19	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻
45	clobetasol propionate (丙酸倍氯他索)	25122-46-7	7.27	511.2	429.0* 465.1	-45 -45	-27 -18	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻

DP: declustering potential; CE: collision energy; * quantitative ion.

1.4 样品前处理

准确称取 1.0 g 燕窝样品,置于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 水,旋涡混匀,超声处理 30 min。萃取剂为 15 mL 乙腈-乙酸乙酯(1:1, v/v),均质提取 2 min,提取 2 次,室温下离心 5 min,转速为 4 000 r/min,合并上清液,于 45 °C 氮吹浓缩至近干,加入 5 mL 30% 甲醇水溶液溶解残渣。上样至用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化过的 HLB 小柱中,然后依次用 3 mL 水、3 mL 50% 甲醇水溶液淋洗,弃去淋洗液,再用 3 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,并于 45 °C 水浴中氮吹浓缩至近干,用 1 mL 50% 乙腈水溶液溶解残渣,旋涡混匀后经 0.22 μm 有机相滤膜过滤,滤液供 LC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 分析方法的建立

2.1.1 质谱分析条件的优化

用单针进样分析目标化合物标准溶液,分别在正离子和负离子模式下进行母离子全扫描,得到各化合物的准分子离子($[M+H]^+$ 或 $[M-H]^-$),比较两种模式扫描的灵敏度,选取响应值高的离子作为母离子。然后,对母离子施加一定的碰撞能量进行轰击,获得其相应的离子碎片,选择信号较强、干扰较小的两对子离子分别作为定量、定性离子。最后通过优化碰撞能量,使每种化合物的特征碎片离子对强度达到最大。优化后的质谱条件见表 1。

2.1.2 色谱条件的优化

在文献^[31-35]的基础上,实验对比了 Thermo Accucore-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)和 Phenomenex Kinetex C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)色谱柱对待测物分离的效果。发现采用 Phenomenex Kinetex C₁₈色谱柱时,待测物色谱峰的保留时间、分离度以及对称性都更优。因此本方法选择 Phenomenex Kinetex C₁₈色谱柱来分离待测物。

在正离子模式下,对比了水-乙腈、0.1% 甲酸水溶液-乙腈作为流动相时待测物的分离效果。结果表明,流动相甲酸化后有利于 $[M+H]^+$ 的形成,目标化合物的响应明显增强。在负离子模式下,比较了水-乙腈、0.1% 氨水溶液-乙腈为流动相时的分离效果,发现流动相添加氨水后对 $[M-H]^-$ 的形成并无促进作用。因此,在正、负离子模式下,分别采用 0.1% 甲酸水溶液-乙腈、水-乙腈为流动相。45 种化合物的总离子流色谱图(TIC)见图 1。

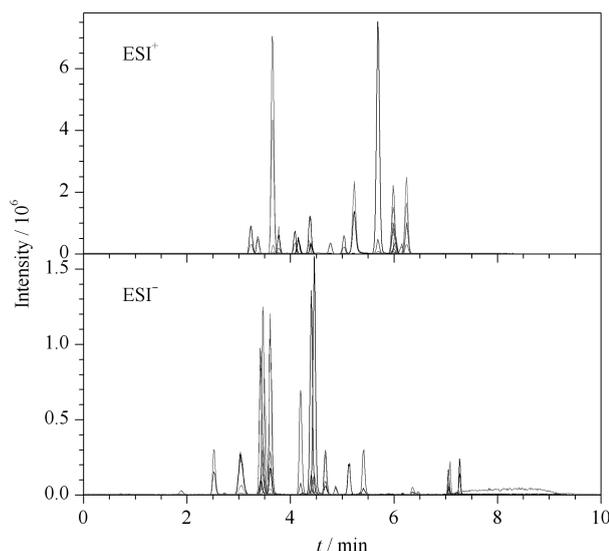


图 1 45 种激素的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatograms of the 45 hormones

2.1.3 提取溶剂的选择

根据现有的文献方法^[31-35],结合目标化合物的性质,实验比较了乙腈、甲醇、0.1% 乙酸乙腈、乙腈-乙酸乙酯(1:1, v/v)等 4 种不同提取溶剂对 45 种激素(10 μg/kg)的提取效果。结果表明,当提取溶剂为乙腈-乙酸乙酯(1:1, v/v)时,甲睾酮的回收率为 65%、布地奈德为 69%,其他 43 种目标物的回收率为 74%~92%。而以乙腈、甲醇、0.1% 乙酸乙腈为提取溶剂时,目标物回收率分别为 34%~64%、26%~59%和 42%~70%。故本文选择乙腈-乙酸乙酯(1:1, v/v)作为提取溶剂。

2.2 基质效应

与其他分析手段不同的是,质谱分析尤其是以电喷雾电离为离子源的质谱分析可能会存在基质效应。燕窝是天然材料,基质中的杂质会对目标化合物的分析产生一定干扰,影响分析的准确度、灵敏度和精密度。本实验选取了燕窝基质溶液与 50% 乙腈水溶液分别配制相同浓度的标准溶液。采用公式 $ME = (\text{基质匹配曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率} - 1) \times 100\%$ 计算基质效应^[28,33]。基质效应为负值时,表示存在基质抑制效应;基质效应为正值时,表示存在基质增强效应。基质效应的研究表明,醛固酮、醋酸氟轻松、炔诺酮、地塞米松、醋酸甲羟孕酮表现为增强效应;其他 40 种化合物均表现为抑制效应,其中 21-羟基孕酮、17α-羟基孕酮、康力龙等 3 个分析目标物的 $ME > 15\%$,但 $< 20\%$ 。总体评估,燕窝基质对多数分析目标物基质效应不明显,对回收率

的影响在可接受范围内,考虑到检测的效率与成本,故本研究采用溶剂配制标准溶液,外标法定量。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限及定量限

配制 45 种激素的系列混合标准溶液,以各分析物的质量浓度 (x , $\mu\text{g/L}$) 为横坐标,各激素定量离子对的峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线,得到的线性回归方程和相关系数 (R^2) 见表 2。线性相关系

表 2 45 种激素的回归方程、相关系数、检出限、定量限及回收率 ($n=6$)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (R^2), LODs, and LOQs, and recoveries of the 45 hormones ($n=6$)

No.	Compound	Regression equation	R^2	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recoveries/%		
						2.0 $\mu\text{g/kg}$	4.0 $\mu\text{g/kg}$	20.0 $\mu\text{g/kg}$
1	triamcinolone	$y=7.98\times 10^3x+3.26\times 10^3$	0.9996	0.30	0.97	78.0	85.7	89.2
2	aldosterone	$y=2.41\times 10^3x+3.95\times 10^3$	0.9996	0.31	1.02	58.5	61.3	61.6
3	betamethasone	$y=7.82\times 10^3x+3.36\times 10^3$	0.9994	0.13	0.53	87.1	86.6	89.3
4	fluoxyesterone	$y=3.41\times 10^3x+4.45\times 10^3$	0.9995	0.11	0.42	91.7	87.0	88.5
5	prednisolone	$y=7.10\times 10^3x+2.91\times 10^3$	0.9997	0.05	0.23	108.9	89.0	88.4
6	estriol	$y=5.33\times 10^3x+4.33\times 10^3$	0.9997	0.14	0.44	85.8	87.1	95.4
7	prednisone	$y=4.21\times 10^3x+3.46\times 10^3$	0.9998	0.04	0.18	91.0	80.4	88.1
8	hydrocortisone	$y=5.41\times 10^3x+2.89\times 10^3$	0.9996	0.05	0.18	91.2	89.6	87.8
9	boldenone	$y=7.42\times 10^3x+3.78\times 10^3$	0.9999	0.08	0.34	90.6	92.3	87.4
10	cortisone	$y=3.87\times 10^3x+3.39\times 10^3$	0.9992	0.04	0.19	77.9	77.1	86.6
11	19-nortestosterone	$y=6.41\times 10^3x+4.35\times 10^3$	0.9995	0.05	0.17	85.9	75.6	91.8
12	norethindrone	$y=1.90\times 10^3x+4.62\times 10^3$	0.9996	0.20	1.01	112.3	84.3	108.7
13	21-hydroxyprogesterone	$y=6.12\times 10^3x+3.40\times 10^3$	0.9996	0.08	0.37	78.0	79.8	77.7
14	6 α -methylprednisolone	$y=3.51\times 10^3x+3.28\times 10^3$	0.9995	0.06	0.16	86.8	87.7	91.3
15	androstenedione	$y=2.13\times 10^3x+4.20\times 10^3$	0.9993	0.05	0.16	98.1	87.8	90.0
16	methyltestosterone	$y=1.49\times 10^3x+3.80\times 10^3$	0.9998	0.07	0.25	89.3	78.7	91.1
17	17 α -hydroxyprogesterone	$y=6.24\times 10^3x+3.33\times 10^3$	0.9994	0.13	0.48	72.2	73.2	86.6
18	dexamethasone	$y=4.21\times 10^3x+3.41\times 10^3$	0.9998	0.06	0.21	102.3	86.0	100.3
19	flumethasone	$y=8.21\times 10^3x+3.19\times 10^3$	0.9996	0.08	0.17	90.4	86.7	90.6
20	beclomethasone	$y=8.74\times 10^3x+3.21\times 10^3$	0.9998	0.10	0.36	76.4	87.1	80.4
21	levonorgestrel	$y=4.23\times 10^3x+3.61\times 10^3$	0.9998	0.20	1.03	90.8	70.5	88.4
22	5 α -androstan-17 β -ol-3-one	$y=5.42\times 10^3x+3.44\times 10^3$	0.9990	0.61	2.00	99.5	86.2	101.6
23	triamcinolone acetonide	$y=3.11\times 10^3x+4.09\times 10^3$	0.9994	0.12	0.46	85.7	89.0	90.0
24	medroxyprogesterone	$y=1.24\times 10^3x+3.39\times 10^3$	0.9992	0.13	0.52	91.0	78.6	89.8
25	stanozolol	$y=6.78\times 10^3x+3.88\times 10^3$	0.9994	0.17	0.76	81.3	79.7	79.4
26	mesterolone	$y=7.96\times 10^3x+3.19\times 10^3$	0.9996	0.70	1.95	78.6	86.9	106.7
27	17 β -estradiol	$y=6.11\times 10^3x+4.21\times 10^3$	0.9998	0.05	0.15	107.6	87.5	87.6
28	fluocinolone acetonide	$y=4.64\times 10^3x+3.73\times 10^3$	0.9996	0.10	0.48	40.2	51.1	62.7
29	estrone	$y=2.16\times 10^3x+3.02\times 10^3$	0.9998	0.14	0.46	87.9	88.3	89.0
30	fluorometholone	$y=1.50\times 10^3x+4.45\times 10^3$	0.9998	0.32	0.96	62.4	60.4	63.3
31	fludrocortisone acetate	$y=6.24\times 10^3x+4.26\times 10^3$	0.9996	0.31	1.00	107.9	86.2	106.9
32	17 α -estradiol	$y=5.96\times 10^3x+3.62\times 10^3$	0.9991	0.13	0.49	90.2	86.3	97.5
33	trenbolone acetate	$y=4.18\times 10^3x+4.16\times 10^3$	0.9992	0.05	0.15	77.7	76.0	89.5
34	megestrol-17-acetate	$y=5.78\times 10^3x+4.31\times 10^3$	0.9996	0.05	0.21	90.2	88.9	89.0
35	progesterone	$y=1.23\times 10^3x+2.84\times 10^3$	0.9996	0.08	0.37	107.6	98.1	87.4
36	danazol	$y=5.13\times 10^3x+3.67\times 10^3$	0.9993	0.13	0.45	88.4	91.5	87.8
37	chloromadinone 17-acetate	$y=2.41\times 10^3x+4.06\times 10^3$	0.9996	0.10	0.52	85.5	78.5	98.5
38	melengestrol acetate	$y=2.23\times 10^3x+3.17\times 10^3$	0.9996	0.13	0.35	85.4	89.1	90.7
39	medroxyprogesterone-17-acetate	$y=6.74\times 10^3x+4.41\times 10^3$	0.9998	0.05	0.51	86.3	107.8	98.7
40	budesonide	$y=3.62\times 10^3x+3.27\times 10^3$	0.9978	0.14	0.48	60.1	62.5	63.6
41	ethinylestradiol	$y=6.45\times 10^3x+3.32\times 10^3$	0.9997	0.30	0.96	54.1	54.7	58.8
42	diethylstilbestrol	$y=4.21\times 10^3x+3.28\times 10^3$	0.9997	0.11	0.39	88.3	85.6	77.0
43	dienestrol	$y=4.32\times 10^3x+2.64\times 10^3$	0.9992	0.13	0.36	85.1	84.8	90.1
44	hexestrol	$y=3.45\times 10^3x+3.08\times 10^3$	0.9995	0.40	0.97	85.7	76.8	98.9
45	clobetasol propionate	$y=4.12\times 10^3x+3.40\times 10^3$	0.9995	0.17	0.42	86.5	85.8	109.8

y : peak area; x : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

数均 ≥ 0.9990 ,在线性范围内线性良好。通过向燕窝样品中添加 45 种激素考察方法的检出限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$),分析目标物检出限和定量限分别为 $0.04\sim 0.70\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $0.16\sim 2.00\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3.2 准确度和精密度

分别添加适量混合中间标准溶液至燕窝样品中,添加水平为 2.0 (灵敏度最差目标物的 LOQ)、 4.0 和 $20.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$,按照本文建立的方法进行测定,通过添加回收试验考察方法的准确度和精密度($n=6$),结果见表 2。醛固酮、醋酸氟轻松、氟米龙、布地奈德、炔雌醇的回收率为 $40.2\%\sim 63.6\%$,其他 40 种激素的平均加标回收率为 $72.2\%\sim 112.3\%$,相对标准偏差(RSD)为 $2.5\%\sim 11.6\%$,40 种分析目标物的准确度和精密度均符合残留分析要求。

在多残留分析时,涉及的化合物性质存在差异,取得统一良好的回收率有一定难度。本研究中醛固酮等 5 种目标物的回收率偏低,但考虑到其定量限分别为 1.02 、 0.48 、 0.96 、 0.48 、 $0.96\ \mu\text{g}/\text{kg}$,根据最低回收率折算($\text{LOQ}\times 40.2\%$),检出值分别为 0.41 、 0.19 、 0.39 、 0.19 、 $0.39\ \mu\text{g}/\text{kg}$,均高于 5 种化合物的检出限 0.31 、 0.10 、 0.32 、 0.14 、 $0.30\ \mu\text{g}/\text{kg}$,故本方法不会造成假阴性,可对醛固酮等 5 种目标物进行定性分析。如需准确定量可以考虑使用同位素内标、基质匹配、标准加入等方法。

2.4 燕窝中激素含量

2.4.1 燕窝中激素含量情况

2017~2021 年期间,采用本文建立的方法对 1 021 个样品进行了测定,仅勃地酮、雄烯二酮、孕酮有检出(测定值 $\geq\text{LOD}$),其他激素水平均小于检出限。勃地酮、雄烯二酮与孕酮有检出的样品个数分别为 807 个(检出比率 79%)、909 个(检出比率 89%)、1 021 个(检出率为 100%),测定值范围分别为 $0\sim 0.096$ 、 $0\sim 1.77$ 、 $0.097\sim 3.58\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。将检出的测定值分成 5 等,统计每一等所占比例,结果见图 2。检

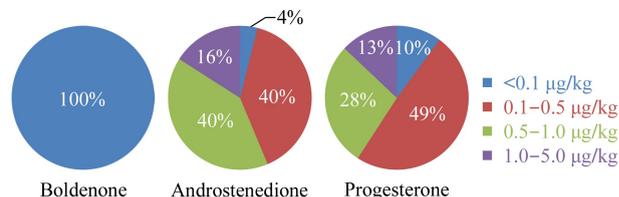


图 2 燕窝中勃地酮、雄烯二酮和孕酮的含量分布
Fig. 2 Content distributions of boldenone, androstenedione, and progesterone in edible bird's nest (EBN)

出的结果中,所有样品中勃地酮测定值均 $< 0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}$; 764 个样品中雄烯二酮测定值 $< 1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$; 888 个样品中孕酮测定值 $< 1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。所有样品中检出的激素含量均未超过 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。此外,本次研究未检出国家或地区禁止的类固醇激素。

2.4.2 燕窝中检出激素的质谱解析

勃地酮、雄烯二酮与孕酮的相对分子质量分别为 286.4 、 286.4 和 314.5 ,其形成的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 通过碰撞池时发生裂解生成产物离子,见图 3。勃地酮的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 丢失一个 H_2O ,得到 m/z 为 269.1 的二级离子,丢失质量数为 152 ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 135.0 的二级离子,丢失质量数为 166 ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 121.0 的二级离子。雄烯二酮的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 丢失一个 H_2O ,得到 m/z 为 269.2 的二级离子,丢失质量数为 178 ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 109.1 的二级离子,丢失质量数为 190 ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 97.1 的二级离子。孕酮的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 丢失一个 H_2O ,得到 m/z 为 297.3 的二级离子,丢失质量数为 206 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 109.0 的二级离子,丢失质量数为 218 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$) 的中性碎片,得到 m/z 为 97.0 的二级离子。

2.4.3 燕窝、乳制品与鸡蛋中激素水平比较分析

随着人类活动范围越来越大,人工合成激素被大量使用并通过环境传播或食物链富集导致食品污染,即便在非直接接触的食品中亦可检出其存在,且通过食品加工措施并不能改变其含量和性质,直接或间接影响到人体生理代谢。

本研究按 GB/T 21981-2008 方法对市售的 16 批纯牛奶、70 批乳制品以及 15 批鸡蛋中的勃地酮、雄烯二酮和孕酮进行测定,结果见表 3。勃地酮在 4 类产品中的含量差别不大,均为微量;15 批鸡蛋中均检出雄烯二酮,含量比其他 3 类产品略高;孕酮含量在鸡蛋中最高,其次是纯牛奶,燕窝中含量最低,部分乳制品中未检出,可能是产品含乳量低的原因。

以检出的 3 种激素中含量最高的孕酮的平均含量进行分析,常人每人每天燕窝食用量为 $5\ \text{g}$ ^[36],鸡蛋为 $40\sim 50\ \text{g}$ ^[37],牛奶为 $300\ \text{g}$ ^[37],根据安全风险评估方法^[38],估算出每人每天孕酮的摄入量为牛奶 ($3.54\ \mu\text{g}/\text{d}$) > 鸡蛋 ($1.09\ \mu\text{g}/\text{d}$) > 燕窝 ($0.0030\ \mu\text{g}/\text{d}$),由此可知食用燕窝时激素的摄入量远低于食用牛奶或鸡蛋时激素的摄入量,对健康的影响较小。

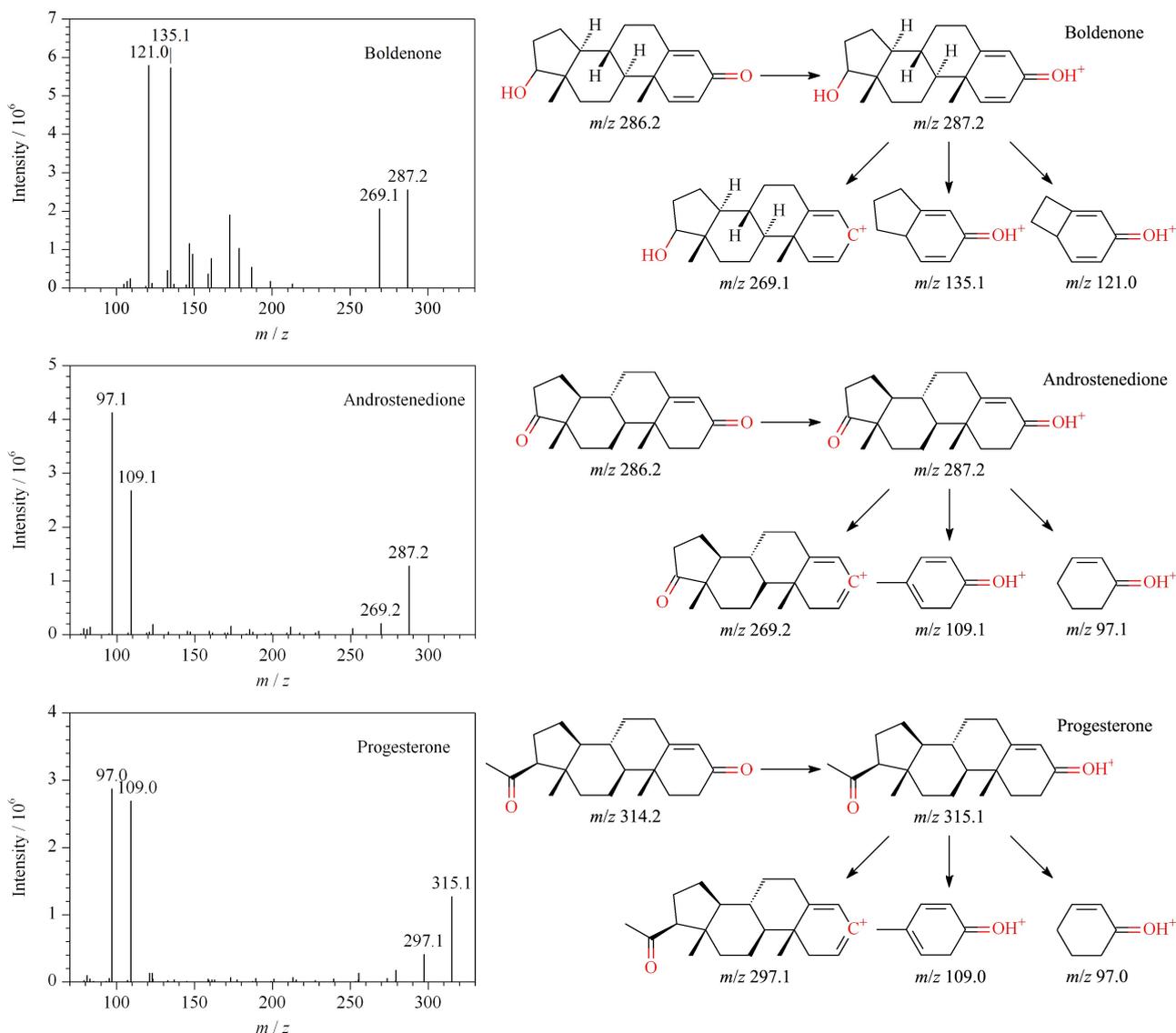


图 3 勃地酮、雄烯二酮、孕酮的二级碎片质谱图和裂解示意图

Fig. 3 Secondary fragment ion mass spectra and fragmentation schematics of boldenone, androstenedione, and progesterone

表 3 不同动物源食品中勃地酮、雄烯二酮和孕酮的含量

Table 3 Contents of boldenone, androstenedione, and progesterone in different animal origin foodstuffs

Product	Boldenone/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Androstenedione/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Progesterone/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
EBN	0-0.096	0-1.77	0.097-3.58
Pure milk	0-0.20	0-1.88	1.82-32.9
Dairy	0-0.14	0-1.43	0-20.1
Eggs	0-0.25	1.86-5.36	16.9-36.2

3 结论

本文建立了燕窝中 45 种激素的 HPLC-MS/MS 分析方法, 对醛固酮、醋酸氟轻松、氟米龙、布地奈

德、炔雌醇可进行定性分析, 对其他 40 种激素可进行定性定量分析。该方法的线性范围、检出限、回收率及精密度等方法学指标均满足燕窝中 40 种激素的定性定量分析要求, 且方法简便快速, 溶剂用量少, 激素检测的种类广、数量多, 可望为燕窝中激素的监测和风险评估提供方法学基础。采用本研究建立的方法对燕窝中激素进行监测, 结果表明燕窝中激素含量水平低于蛋与乳制品, 对健康影响较小。

参考文献:

- [1] Mei X M, Wu X X, Qiao L, et al. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 277
梅秀明, 吴肖肖, 乔玲, 等. 现代食品科技, 2020, 36(2): 277

- [2] Dai Y W, Cao J, Wang Y Y, et al. *Food Res Int*, 2021, 140: 109875
- [3] Hou Z P, Imam M U, Ismail M, et al. *Biosci Biotechnol, Biochem*, 2015, 79(10): 1570
- [4] Zhao R, Li G, Kong X J, et al. *Drug Des, Dev Ther*, 2016 (10): 371
- [5] Dong J H, Tian Q J, Duan S F, et al. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(17): 73
董建辉, 田巧基, 段素芳, 等. *食品工业与发酵*, 2019, 45(17): 73
- [6] Albishtue A, Yimer N, Zakaria M Z A, et al. *Veterinary World*, 2019, 12(7): 1013
- [7] Hou Z P, Imam M U, Ismail M, et al. *Food & Funct*, 2015, 6(5): 1701
- [8] Haghani A, Mehrbod P, Safi N, et al. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 22(17): 1498
- [9] Haghani A, Mehrbod P, Safi N, et al. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185: 327
- [10] Yew M Y, Koh R Y, Chye S M, et al. *Food Biosci*, 2019 (32): 100466
- [11] Zhang Y D, Imam M U, Ismail M, et al. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 1
- [12] Ma F C, Liu D C. *Asian J Chem*, 2012, 24(1): 117
- [13] Tong X, Hu B Y, Chen X C, et al. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*, 2017, 43(6): 734
童心, 胡柏杨, 陈兴财, 等. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2017, 43(6): 734
- [14] Adeel M, Song X M, Wang Y Y, et al. *Environ Int*, 2017, 99: 107
- [15] Wang Z W, Yan R X, Liao S W, et al. *Appl Surf Sci*, 2018, 457: 323
- [16] Lu X, Sun J D, Sun X L, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2020, 127: 115882
- [17] 96/22/EC
- [18] Ministry of Agriculture. Announcement No. 250 of the Ministry of Agriculture and Rural Areas of the People's Republic of China. (2020-01-06) [2021-08-10]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202001/t20200106_6334375.htm
农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第 250 号. (2020-01-06) [2021-08-10]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202001/t20200106_6334375.htm
- [19] Matraszek-Zuchowsha I, Wozniak B, Posyniak A. *Food Anal Methods*, 2017, 10: 727
- [20] Wolecki D, Caban M, Pazdro K, et al. *Talanta*, 2019, 200: 316
- [21] Li J H, Jiang J B, Zhao D, et al. *J Alloy Compound*, 2018, 769: 566
- [22] Özcan A, Topcuoullai D. *Sensor Actuat B*, 2017, 250: 85
- [23] Wu H Y. [MS Dissertation]. Guangzhou: Southern Medical University, 2018
伍华颖. [硕士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2018
- [24] Wang R J, Liu Q Z, Xu N, et al. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine*, 2020, 36(3): 482
王任晶, 刘秋泽, 许宁, 等. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(3): 482
- [25] Razmkhah K, Sereshti H, Soltani S, et al. *Food Anal Methods*, 2018(11): 3179
- [26] Chen X P. [MS Dissertation]. Guangzhou: Guangzhou University, 2017
陈晓鹏. [硕士学位论文]. 广州: 广州大学, 2017
- [27] He P, Aga D S. *Anal Methods*, 2019, 11(11): 1436
- [28] Danezis G P, Anagnostopoulos C J, Liapis K, et al. *Anal Chim Acta*, 2016, 942: 121
- [29] Goh S X L, Duarah A, Zhang L F, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1465: 9
- [30] Li X Q, Sun H, Zhang X R, et al. *Quality and Market*, 2020, 271: 40
李晓倩, 孙菡, 张西如, 等. *质量与市场*, 2020, 271: 40
- [31] Zhou Q L, Lou T T, Wang S Y, et al. *Food Research and Development*, 2018, 39(9): 183
周秋玲, 娄婷婷, 王素英, 等. *食品研究与开发*, 2018, 39(9): 183
- [32] Cui X L, Shao B, Zhao R, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24(3): 213
崔晓亮, 邵兵, 赵榕, 等. *色谱*, 2006, 24(3): 213
- [33] Liu H C, Li N, Lin T, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(11): 1163
刘宏程, 李宁, 林涛, 等. *色谱*, 2015, 33(11): 1163
- [34] Han S Y, Yu H M, Song Y L, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(3): 285
韩疏影, 俞慧敏, 宋易霖, 等. *色谱*, 2018, 36(3): 285
- [35] Zhu W X, Liu Y F, Yuan P, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(11): 1031
祝伟霞, 刘亚凤, 袁萍, 等. *色谱*, 2010, 28(11): 1031
- [36] Zhejiang Food and Drug Administration. Zhejiang Provincial Standard for Processing Traditional Chinese Medicine. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2006
浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2006
- [37] Chinese Nutrition Society. Dietary Guidelines for Chinese Residents. Beijing: People's Health Press, 2017
中国营养学会. 中国居民膳食指南. 北京: 人民卫生出版社, 2017
- [38] Qian Y Z, Li Y. Risk Assessment of Quality and Safety of Agricultural Products-Principles, Methods and Applications. Beijing: China Standards Press, 2007
钱永忠, 李耘. 农产品质量安全风险评估-原理、方法和应用. 北京: 中国标准出版社, 2007