样品预处理

1. 称取5 g的处理均匀的猪肉样品，依次加入10 g无水硫酸钠，20 mL乙酸乙酯，混合均匀后均质1 min，振荡提取10 min，在10000 转/min下离心5 min。
2. 上清液转移至浓缩瓶中，再向残渣中加入10 mL乙酸乙酯重复上述操作一次，合并两次提取液，在40 ℃下旋转蒸发至干。
3. 将浓缩后的样品用5 mL 30 %甲醇水溶液溶解。

固相提取过程

（Oasis® HLB 6 cc/500 mg）

活化/平衡
A.3 mL甲醇 B.6 mL水

↓

上样
所有提取液

↓

清洗
A.5 mL水 B.5 mL甲醇/水（1/1，v/v）

↓

抽干小柱3分钟

↓

洗脱
10 mL 乙腈/甲醇（1/1，v/v）

↓

洗脱液在40℃氮气流下吹干，用乙腈/水（2:8）溶解定容至1 mL，过0.2 μm滤膜后上机分析测定

色谱条件：

仪器: 沃特世ACQUITY UPLC® 系统
色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18},2.1 mmx50 mm,1.7 μm
柱温: 30 ℃
流速: 0.5 mL/min
流动相A: 水
流动相B: 乙腈
梯度:

时间（分钟）	A%	B%
0.00	80	20
5.00	75	25
5.30	50	50
5.50	40	60
5.60	80	20
6.50	80	20

进样量: 10 μL

质谱条件

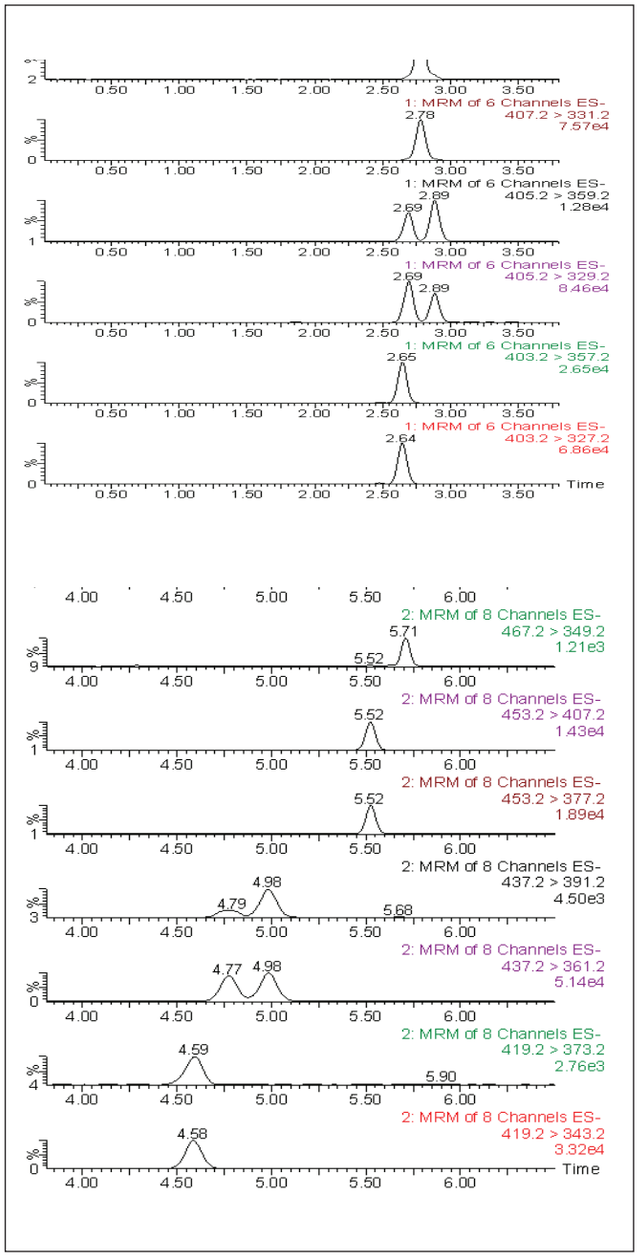
质谱系统: 沃特世ACQUITY® TQD检测器
电离模式: ESI^-

MassLynx™4.1软件用于数据采集，TargetLynx™应用管理软件用于数据处理。调节ACQUITY TQD使得母离子和子离子在半峰宽的分辨率为0.7 Da以内。本实验的多反应监测(MRM)、驻留时间、锥孔电压和碰撞能量列表参见表1。标注下划线的离子对用于定量分析。

	MRM 变化区间	保留时间 (min)	典型离子比值	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
泼尼松	403.2>327.2 403.2>327.2	2.65	2.7	0.05	20	15 8
泼尼松龙	405.2>329.2 405.2>359.2	2.68	9.8	0.05	28	17 11
氢化可的松	407.2>331.2 407.2>361.2	2.79	9.8	0.05	25	16 11
可的松	405.2>329.2 405.2>359.2	2.90	4.6	0.05	25	14 10
甲基泼尼松	419.2>343.2 419.2>373.2	4.59	13.0	0.05	28	15 11
倍他米松	437.2>361.2 437.2>391.2	4.76	28.5	0.05	26	17 11
地塞米松	437.2>361.2 437.2>391.2	5.00	11.0	0.05	28	16 11
倍氯米松	453.2>377.2 453.2>407.2	5.52	1.35	0.05	25	16 12
氟氢可的松	467.2>421.3 467.2>349.2	5.71	10.0	0.05	30	12 23

表1 ACQUITY TQD MRM参数。

结果



糖皮质激素素类混合标准品MRM色谱图。

9种糖皮质类激素混合标准品在1 ng/mL-100 ng/mL浓度范围内进样分析，得到线性方程和相关系数。采用空白样品添加10 μg/kg水平下，平行6次，计算添加回收率及RSD，结果如表2。

	线性方程 Linear equation	相关系数 r	相对标准偏差RSD%	回收率 Recovery%
泼尼松	Y=55.1594x-107.197	0.9994	3.27	73.4
泼尼松龙	Y=65.9314x-113.202	0.9994	2.79	75.4
氢化可的松	Y=65.6897x-116.869	0.9994	2.97	73.6
可的松	Y=44.1831x-84.8531	0.9993	4.03	80.2
甲基泼尼松	Y=34.9512x-58.3879	0.9995	3.83	95.5
倍他米松	Y=38.7269x-74.6360	0.9993	4.12	92.1
地塞米松	Y=44.6788x-87.9209	0.9994	3.84	98.8
氟氢可的松	Y=5.63984x-7.93426	0.9996	3.43	70.0

表2. 糖皮质类兴奋剂测定方法线性方程、相关系数、相对标准偏差和回收率。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/500 mg	186000115
ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm	186002350
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 检验合格样品瓶	600000751CV

参考资料：Waters Application Note