DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251029006
引用格式: 马晓年, 夏彬, 陈俊秀, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中 4 种雄性激素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 343–350.
MA XN, XIA B, CHEN JX, *et al*. Rapid determination of 4 kinds of androgen residues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 343–350. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中 4 种雄性激素残留量

马晓年[1#], 夏　彬[2#], 陈俊秀[1], 李　洁[1], 李　怡[1*], 李文廷[1*]
(1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明　650228; 2. 昆明医科大学公共卫生学院, 昆明　650000)

摘　要: 目的　建立 QuEChERS 的超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中睾酮、甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙 4 种雄性激素残留的检测方法。**方法**　猪肉样品经粉碎均质后, 依次加入水和乙腈溶液振荡提取, 无水硫酸镁和氯化钠脱水离心, 取上清液加入无水硫酸镁和中性氧化铝吸附净化, 净化液于 45 ℃水浴中氮气吹干, 乙腈-水(1:1, *V*:*V*)溶液涡旋复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜后待测。待测物采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱, 以乙腈和 0.1%甲酸水溶液为流动相分离, 电喷雾正离子模式下以多反应监测采集数据, 外标法定量。**结果**　目标化合物在 0.1~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.999, 检出限为 0.1~0.3 μg/kg, 定量限为 0.2~1.0 μg/kg; 在加标量为 2、8 和 20 μg/kg 时, 回收率为 84.12%~109.75%, 相对标准偏差为 1.72%~9.62%。**结论**　该方法能够同时测定 4 种雄性激素, 且前处理简便, 具有较高灵敏度、重复性、准确度, 可为相关检测提供参考。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 雄性激素; 猪肉

Rapid determination of 4 kinds of androgen residues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MA Xiao-Nian[1#], XIA Bin[2#], CHEN Jun-Xiu[1], LI Jie[1], LI Yi[1*], LI Wen-Ting[1*]
(1. *Kunming Center for Disease Control and Prevention*, *Kunming* 650228, *China*;
2. *School of Public Health*, *Kunming Medical University*, *Kunming* 650000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for determination the 4 kinds of androgen residues, namely testosterone, methyltestosterone, trenbolone and 17 *β*-trenbolone acetate in pork by QuEChERS-ultra performance

收稿日期: 2024-10-29
基金项目: 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目(2023-12-06-004)
#马晓年和夏彬为共同第一作者

第一作者: 马晓年(1985—), 女, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 179267837@qq.com
夏彬(2002—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 3246135741@qq.com
***通信作者:** 李怡(1976—), 男, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 1609064931@qq.com
李文廷(1982—), 男, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 99061417@qq.com

liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The pork samples were homogenized after comminution. Subsequently, water and acetonitrile solution were added sequentially for extraction by oscillation. Anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride were introduced for dehydration, followed by centrifugation. The supernatant was collected and purified by adsorption using anhydrous magnesium sulfate and neutral alumina. The purified solution was dried under nitrogen in a water bath at 45 ℃, then redissolved by vortexing in an acetonitrile-water mixture (1:1, *V*:*V*). After filtration through a 0.22 μm microporous membrane, the solution was ready for analysis. For the determination of analytes, an ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was adopted. Acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution were used as the mobile phase for chromatographic separation. Data acquisition was performed in the electrospray ionization positive mode with multiple reaction monitoring, and quantification was carried out via the external standard method. **Results** The target compounds exhibited good linearity in the concentration range of 0.1–100.0 ng/mL, with all correlation coefficients (r^2) greater than 0.999. The limits of detection were 0.1–0.3 μg/kg, and the limits of quantitation were 0.2–1.0 μg/kg. At the spiking levels of 2, 8 and 20 μg/kg, the recoveries were between 84.12% and 109.75%, with the relative standard deviations varying from 1.72% to 9.62%. **Conclusion** This method can simultaneously determine 4 kinds of androgens and the pretreatment is simple. It has high sensitivity, repeatability and accuracy and can provide a reference for related detection.

KEY WORDS: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; androgens; pork

0 引 言

雄性激素，作为一类主要由睾丸间质细胞合成与分泌的类固醇激素，按来源与功能划分为内源性与外源性两类。内源性雄性激素主要为睾酮，外源性雄性激素主要包括甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙等。雄性激素在动物生长发育及生殖方面发挥重要作用[1–3]，例如甲睾酮、群勃龙通过蛋白质同化作用增强动物的食欲，提高饲料转化率与瘦肉率，通过促进动物发情，缩短生殖周期，提高产量规模和迭代速度，从而增加禽畜养殖的经济效益。然而，残留的雄性激素通过食物链进入人体，被吸收后导致机体内分泌紊乱，生殖系统功能异常，儿童性早熟，甚至存在致畸致癌等健康风险[4–5]，危及儿童身体健康与发育过程。因此，加强对动物性食品中雄性激素残留的监管与检测具有重要的公共卫生意义。欧盟于 1998 年全面禁止生长激素用于食用动物的饲养[6]，我国《农业农村部公告第 250 号——食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》中将甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙等激素列为禁用兽药。

当前性激素残留检测主要有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[7–11]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[12–16]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)[17–21]、高分辨线性离子阱质谱法[22–23]及超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)[24–27]。然而，由于雄性激素经生物代谢后残留浓度极低，含量普遍处于痕量水平[28–29]，ELISA 因交叉反应导致的假阳性问题，难以实现多目标激素同步检测; HPLC 易受复杂基质干扰，前处理过程要求烦琐的净化步骤，并且 HPLC 缺乏结构确证能力易受干扰物影响; GC-MS 要求目标物具备挥发性而多数雄性激素极性较强、沸点高，需进行衍生处理才能检测，操作较为烦琐耗时; 在多级质谱扫描与结构解析方面，高分辨线性离子阱法更有优势，但对痕量级检测灵敏度不足，且操作复杂性与维护成本亦限制其广泛应用。UPLC-MS/MS 作为痕量化合物分析的主流技术，在雄性激素检测中具有显著优势，液相色谱法的高效分离能力结合质谱的特异性，通过多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式可有效排除复杂基质中干扰物的影响，支持多目标化合物的同步分离与准确定量，能满足痕量物质残留的检测要求，且采用 UPLC-MS/MS 同时检测群勃龙、醋酸群勃龙、睾酮、甲睾酮的分析方法尚不完善，缺乏针对样品前处理条件及色谱-质谱分析条件的系统性优化。

本研究采用 QuEChERS 前处理技术，通过优化样品前处理及色谱、质谱分析条件，建立了同时测定猪肉中 4 种雄性激素的 UPLC-MS/MS，为动物性食品安全的监管提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪肉(昆明市市售)。

群勃龙(纯度 99.9%)、醋酸群勃龙(纯度 79.88%)、睾酮(纯度 98.3%)、甲睾酮(纯度 99.8%)、乙腈、甲醇(色谱级)(美国 Sigma-Aldrich 公司); 氯化钠[分析纯，重庆川东化工(集团)有限公司]; 中性氧化铝(色谱纯，上海陆都化学

试剂厂); 无水硫酸镁(分析纯, 西陇科学股份有限公司); N-丙基乙二胺(N-propylethylenediamine, PSA)(美国 Agela Technologies 公司); 甲酸(色谱级, 西亚试剂有限责任公司); 冰乙酸(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 实验用水为超纯水。

1.2　仪器与设备

QSight 210 质谱分析仪、QSight LX 50 超高效液相色谱仪(美国 PerkinElmer 公司); ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Allegra X-30R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Auto EVA-30Plus 氮气浓缩仪[睿科集团(厦门)股份有限公司]; Multi reax EU 多位试管振荡器(德国 Heidolph 公司); BS-124S 电子天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); PURELAB Chorus 1 Complete 超纯水仪(英国 Elga 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　标准溶液的配制

标准储备液(1 mg/mL): 分别称取 4 种雄性激素标准品 10 mg(精确至 0.1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得到 4 种标准储备液, 于–18 ℃避光保存。

混合标准中间液(1 μg/mL): 分别准确吸取 4 种标准储备液各 0.10 mL, 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成 1 μg/mL 的混合标准中间液, 于–4 ℃冷藏保存。

基质匹配混合标准工作溶液配制: 准确吸取适量混合标准中间液, 用空白样品基质提取液定容, 配制成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的基质匹配混合标准工作曲线。

混合标准曲线溶液配制: 准确吸取适量混合标准中间液(混合标准中间液为 4 种待测组分的混合标准, 4 组分质量浓度均为 1 μg/mL), 用乙腈水溶液(1:1, *V*:*V*)定容, 配制成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的混合标准曲线。

1.3.2　样品提取与净化

称取 5.0 g 猪肉样品(精确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 超纯水涡旋混匀 30 s。样品中准确加入 20 mL 乙腈溶液, 振荡提取 15 min, 加入 1.0 g 氯化钠和 4.0 g 无水硫酸镁, 快速混匀, 继续振荡提取 10 min 后于 8000 r/min 离心 5 min。移取上清液 10 mL 于另一装有净化剂(150 mg 中性氧化铝+50 mg 无水硫酸镁)的离心管中, 振荡混匀 10 min, 8000 r/min 离心 5 min。准确移取上清液 5 mL 于 45 ℃恒温水中氮吹至近干, 加入 5 mL 乙腈水溶液(1:1, *V*:*V*), 涡旋复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 待进样检测。

1.3.3　基质空白提取液的制备

取不含待测物的猪肉样品, 按照 1.3.2 样品提取与净化处理, 得到基质空白提取液, 配制基质标准工作溶液。

1.4　仪器条件

1.4.1　色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样量: 10 μL。

表 1　梯度洗脱程序
Table 1　Program of gradient elution

时间/min	流速/(mL/min)	A 相(0.1%甲酸水溶液)/%	B 相(乙腈)/%
0.00	0.2	90	10
0.50	0.2	90	10
1.00	0.2	60	40
2.00	0.2	10	90
4.00	0.2	10	90
4.10	0.2	90	10
7.00	0.2	90	10

1.4.2　质谱条件

电离模式: 电喷雾(electron spray ionization, ESI^+); 扫描模式: MRM; 电离电压: 5000 V, 热表面诱导去溶剂质谱接口温度: 200 ℃, 离子源温度: 320 ℃, 干燥气流速: 100 L/min, 雾化气流速: 180 L/min。其他质谱分析参数见表 2。

表 2　4 种雄性激素的质谱参数
Table 2　Mass spectrometry parameters for the 4 kinds of androgens

分析物	保留时间/min	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	碰撞能量/V	入口电压/V
睾酮	3.70	289.1	96.9*	31	34
			108.9	36	36
甲睾酮	3.82	302.9	96.9*	6	40
			109.0	20	41
群勃龙	3.50	271.2	199.2*	31	31
			253.1	36	31
醋酸群勃龙	4.15	313.0	253.2*	11	27
			271.3	22	26

注: *为定量离子。

1.5　数据处理

实验数据处理采用 Microsoft® Excel® 2019, 制表采用 Microsoft® Word 2019, 绘图软件采用 OriginPro 2024, 实验重复次数大于等于 6。

2　结果与分析

2.1　UPLC-MS/MS 条件选择

2.1.1　质谱条件优化

分别将 500 μg/L 单一标准溶液(另配)注入离子源, 进

行一级质谱全扫描，在最佳碰撞电压下确认目标化合物的母离子 *m*/*z* 值，然后进行二级质谱优化，通过优化碰撞能量，对碎片离子进行全扫描，选取响应最强与次强的碎片离子作为定量和定性离子，经优化后得到的质谱条件参数见表 2。本研究发现所有被测物均在 ESI^+下具有较强的信号值，大部分被测物可获得较高丰度的$[M+H]^+$峰。

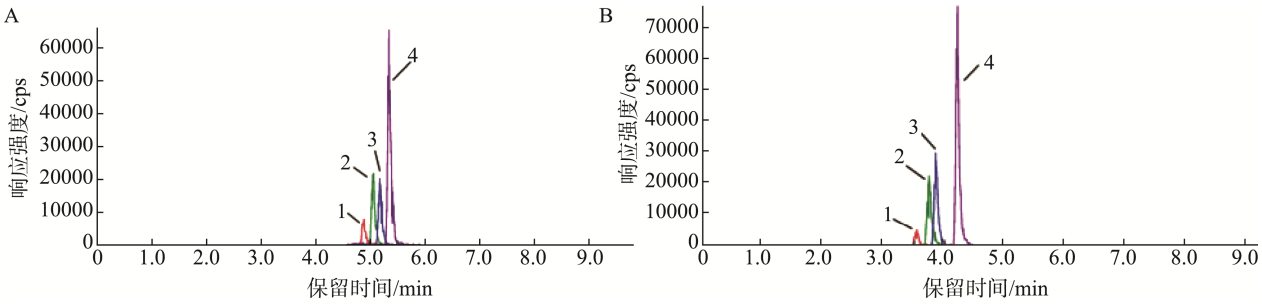
2.1.2 液相条件优化

猪肉样本中基质较为复杂，在前处理中通常需要去除干扰杂质。甲醇极性较强，能与雄性激素分子中的羟基(睾酮的 17 *β*-羟基)形成氢键，对极性较高的雄激素及水溶性较强的雄性激素衍生物具有更强的溶解能力。乙腈极性略低于甲醇，但对蛋白质的变性沉淀作用更强，有效减少蛋白质对雄性激素的包裹或吸附，降低基质效应，并且乙腈与脂肪不互溶，在提取过程中可减少脂类物质的溶出，能降低净化过程中脂类对色谱柱的污染，延长色谱柱使用寿命。本研究分别采用甲醇、乙腈与 0.1%甲酸水溶液作为流动相，观察标准溶液各个色谱峰的峰形、分离度、出峰时间等。结果发现，乙腈作为流动相分析，4 种待测物的峰信号、离子化效率与分离度均明显增强，且能在更短时间内完成检测，如图 1、图 2。考虑到乙腈作为流动相 B 相时表现出更优的峰形、分离度和离子化效率，且乙腈与 0.1%甲酸水体系的兼容性好，本研究最终选择乙腈与 0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱。

2.2 前处理方法的优化

2.2.1 提取溶剂的优化

甲酸和乙酸可通过调节提取体系的 pH(通常降至 2~4)，破坏雄性激素与基质中蛋白质、脂质的氢键或疏水相互作用，减少目标物的吸附与包裹，释放结合态的雄激素，提高目标物的提取效率。本研究考察了乙腈、乙腈(0.5%甲酸)、乙腈(0.5%乙酸)、乙腈(0.5%甲酸乙酸，1:1，*V*:*V*) 4 种提取剂的提取效果。结果发现，经酸性提取液处理后，醋酸群勃龙提取率均较低，未酸化的乙腈为提取剂时，4 种待测物均有较好提取效果，提取效率大于 85%，结果见图 2。且前处理过程中，猪肉样本经酸性溶液提取后，溶液呈浅红色，而不含酸性物质的乙腈提取液，则呈现较为清澈。其原因可能是猪肉组织中含有丰富的肌红蛋白和少量血红蛋白，而甲酸、乙酸作为酸性添加剂破坏肌红蛋白质结构，促进了色素释放，使得提取液呈现浅红色状态，对于下一步净化过程，可能导致干扰，色素的存在可能对后续仪器分析造成影响。实验选择乙腈作为提取剂，其对 4 种雄性激素目标化合物的提取效率均稳定良好，降低后续样品净化的干扰，减小基质干扰效应。



注: A. 甲醇-0.1%甲酸水, B. 乙腈-0.1%甲酸水; 1 为群勃龙, 2 为睾酮, 3 为甲睾酮, 4 为醋酸群勃龙。图 8 同。

图 1 不同流动相色谱图

Fig.1 Chromatograms of different mobile phases

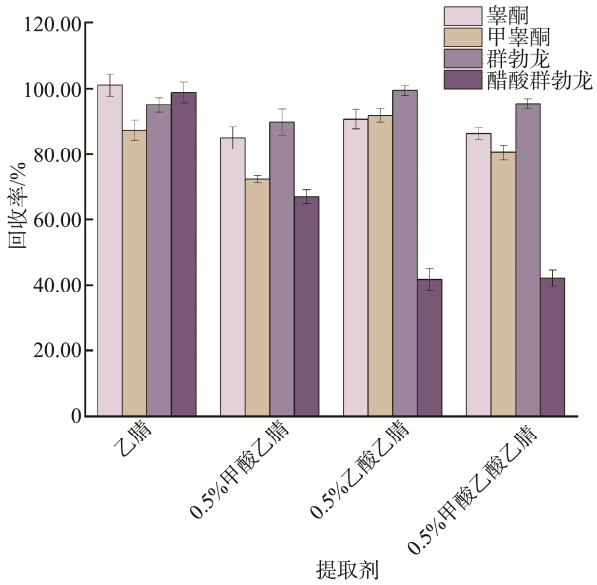


图 2 不同提取剂对目标化合物的提取效率

Fig.2 Extraction efficiency of different extraction solvents for the target compounds

2.2.2 提取剂用量的优化

本研究对比了 15、20、25、30 mL 的乙腈提取溶剂对目标物质量浓度为 20 ng/mL 的提取效果影响。提取剂为 15 mL 时，睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙提取率较低，回收率均低于 80%。随着提取剂用量增加，4 种目标物的提取效率均有所提高，回收率在 87.00%~103.03%之间，当提取剂用量大于 20 mL 时，4 种目标物的回收率无显著提高，结果见图 3。考虑

到耗材成本及提取效果, 最终选择 20 mL 乙腈作为提取剂。

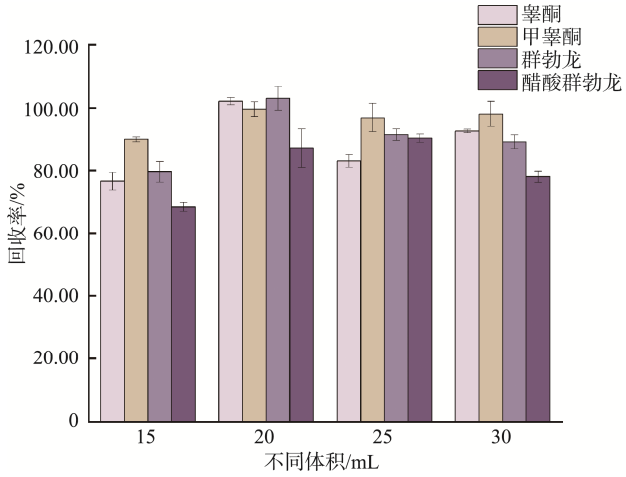


图 3　不同体积乙腈对目标化合物的提取效率

Fig.3　Extraction efficiency of different acetonitrile volumes for the target compounds

2.2.3　提取次数的优化

依据张丽姬等[30]的提取方式, 本研究分别考察了 20 mL 乙腈提取一次, 20 mL 乙腈分两次提取, 以及重复两次加入 20 mL 乙腈提取质量浓度为 20 ng/mL 的目标物。本研究发现 3 种提取方式对 4 种目标物的提取效果均为良好, 无显著差别, 结果见图 4。综合考虑前处理操作时间以及耗材成本, 选择 20 mL 乙腈提取一次为前处理提取方式。

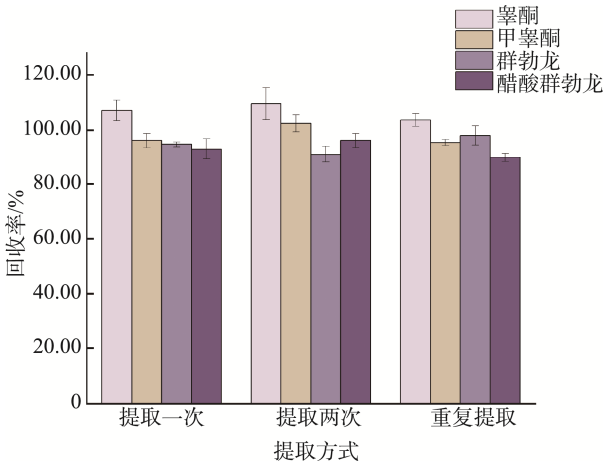


图 4　不同提取方式对目标化合物的提取效率

Fig.4　Extraction efficiency of different extraction modes for the target compounds

2.2.4　盐析剂的优化

在 QuEChERS 前处理方法中, 无水硫酸镁作为常用的添加剂, 能够优化提取效率与体系稳定性, 促使有机相与水相快速分层, 本研究探究了不同添加量的无水硫酸镁对目标物的提取效果。随着无水硫酸镁用量的增加, 4 种目标物的回收率均有所提高。当无水硫酸镁用量达到 4 g 时, 4 种雄性激素的回收率均在 89.47%~95.12%之间, 而大于 4 g 时, 回收率无显著改善, 结果见图 5, 故本研究最终选择 4 g 无水硫酸镁作为盐析剂。

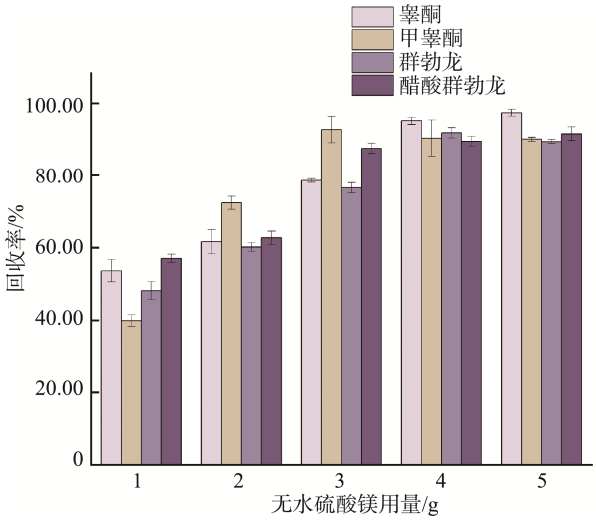


图 5　无水硫酸镁不同用量对目标化合物的提取效率

Fig.5　Extraction efficiency of different amounts of anhydrous magnesium sulfate on the target compounds

2.2.5　净化剂的选择

在 QuEChERS 前处理方法中, 常用的净化吸附剂[31–32]主要为 PSA 和中性氧化铝。PSA 作用为吸附猪肉基质中水溶性色素与糖类, 去除脂肪酸类和糖类干扰; 中性氧化铝作用为吸附猪肉基质中的脂溶性杂质与非极性色素, 以及去除农药与兽药残留干扰物。本研究探究了 PSA 和中性氧化铝对猪肉样本基质的净化效果。PSA 为净化剂时, 4 种雄性激素的回收率在 92.51%~102.84%之间; 中性氧化铝为净化剂时, 4 种雄性激素的回收率在 95.38%~115.78%之间; PSA、中性氧化铝为净化剂时, 4 种雄性激素的回收率在 88.77%~118.16%之间, 结果见图 6。结果表明, PSA 和中性氧化铝对猪肉样本

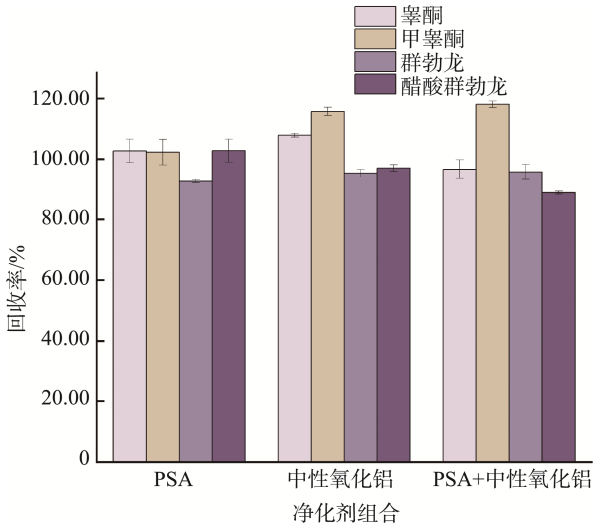


图 6　不同净化剂对目标化合物回收率的影响

Fig.6　Effects of different cleanup sorbents on the recovery of target compounds

基质的净化效果无显著差异, 考虑到 PSA 和中性氧化铝的使用成本, 最终选择中性氧化铝作为净化剂。

2.2.6 净化剂的优化

适量中性氧化铝能提高雄性激素的净化效果, 但过量中性氧化铝可能会导致群勃龙等脂溶性激素被吸附除去。本研究考察了不同用量的中性氧化铝(50、100、150、200、250 mg)的净化效果。随着中性氧化铝的用量增加, 4 种目标物的回收率有所增加, 当使用量达到 150 mg 时, 提取效果达到最佳, 回收率在 96.73%~106.58%之间, 超过 150 mg 后随着净化剂用量的增加, 目标物的回收率无显著改善, 结果见图 7。因此, 最终选择 150 mg 中性氧化铝作为净化剂。

2.3 方法学验证

2.3.1 基质效应

在 UPLC-MS/MS 中, 基质效应是非目标分析物与目标物共同流出喷雾针, 二者之间竞争电荷, 导致雾滴表面张力改变, 抑制或增强离子化效率, 引起响应降低或增高, 便产生了所谓的基质抑制效应或基质增强效应。为了评价基质效应, 本研究采用基质标准曲线斜率与溶剂标准曲线斜率的比值考察了目标物在基质中的信号增强或抑制的程度。计算 1.3.3 节基质混合工作溶液与溶剂混合标准曲线溶液绘制的曲线斜率比值, 结果见表 3, 基质效应在 80%~120%之间表明基质效应影响不大, 当其高于 120%时显示基质增强效应, 当其低于 80%时显示基质抑制效应。实验发现 4 种化合物基质效应均在 80%~120%之间, 无显著影响, 因此本文采用外标法配制标准曲线。

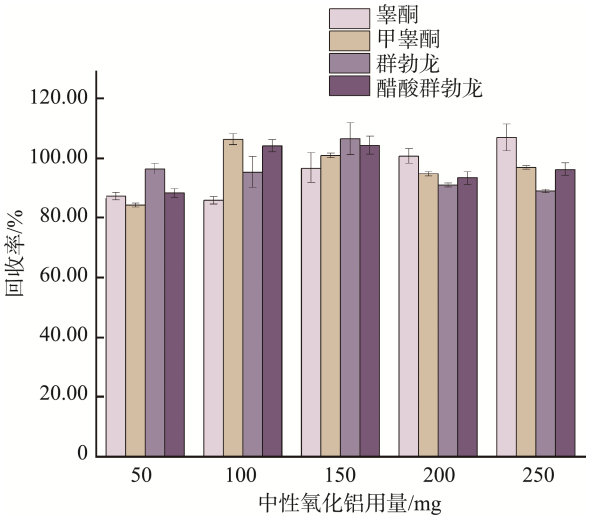


图 7 不同净化剂用量对目标化合物回收率的影响

Fig.7 Effects of different sorbent amounts on the recovery of target compounds

表 3 4 种雄性激素基质曲线、标准曲线的回归方程及基质效应

Table 3 Regression equations for 4 kinds of androgens matrix curves, standard curves and matrix effect

化合物	基质曲线回归方程	标准曲线回归方程	基质效应/%
睾酮	Y=7531.2X–1766.00	Y=7130.3X+11059	105.62
甲睾酮	Y=8888.3X+238.43	Y=9579.4X–2330	92.78
群勃龙	Y=1994.3X–803.00	Y=2075.7X+2307	96.09
醋酸群勃龙	Y=13011.0X–9869	Y =15037X+26104	86.52

2.3.2 标准物质色谱图

如图 8 所示 4 种雄性激素 50 μg/L 混合标准溶液的 MRM 色谱图, 各物质分离良好, 可用于 4 种雄性激素的分析检测。

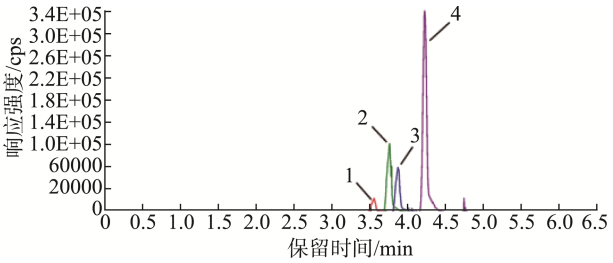


图 8 4 种雄性激素的 MRM 色谱图

Fig.8 MRM chromatograms of the 4 kinds of androgens

2.3.3 方法的线性关系与检出限、定量限

将配制的含有睾酮、甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙激素类药物的混合标准溶液上机测试, 以 4 种雄性激素类组分的质量浓度为横坐标(X, ng/mL), 以相对应测得的被测组分峰面积的比值为纵坐标(Y), 回归方程与相关系数(r^2)见表 4, 结果显示 4 种雄性激素类在 0.1~100.0 ng/mL 线性关系良好, 相关系数 r^2 均在 0.999 以上, 满足相关标准对线性关系的要求。

称取 5.00 g 经检测不含睾酮、甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙的阴性猪肉样本, 添加适量 4 种激素混合标准中间液, 按照 1.3.2 节的前处理操作上机分析。由于定性离子对比定量离子对的信号弱, 为了确保能够准确定性, 本研究以定性离子对的 3 倍信噪比(S/N=3)对应的浓度作为检出限, 10 倍信噪比 S/N=10 对应的浓度作为定量限, 检出限为 0.1~0.3 μg/kg, 定量限为 0.2~1.0 μg/kg, 满足实验要求, 见表 4。

2.3.4 加标回收率及精密度

称取 5.00 g 经检测不含睾酮、甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙的阴性猪肉样本, 添加适量 4 种激素混合标准中间液, 制备低(2 μg/kg)、中(8 μg/kg)、高(20 μg/kg) 3 个含量

水平的加标试样, 每个水平重复做 6 次, 按照 1.3.2 节的前处理操作上机分析, 结果见表 5, 测得方法的平均回收率为 84.12%~109.75%, RSDs 为 1.72%~9.62%, 符合国家标准规定要求。

表 4　4 种雄性激素的线性方程、相关系数以及检出限、定量限

Table 4　Linear equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation for the 4 kinds of androgens

化合物	线性范围 /(ng/mL)	回归方程	r^2	检出限 /(μg/kg)	定量限 /(μg/kg)
睾酮	0.1~100.0	Y=7130.3X+11059	0.9991	0.1	0.3
甲睾酮	0.1~100.0	Y=9579.4X–2330	0.9990	0.3	1.0
群勃龙	0.1~100.0	Y=2075.7X+2307	0.9994	0.3	1.0
醋酸群勃龙	0.5~100.0	Y=15037X+26104	0.9991	0.1	0.2

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

表 5　4 种雄性激素的回收率范围及精密度(n=6)

Table 5　Recovery ranges and precision of the 4 kinds of androgens (n=6)

化合物	2 μg/kg		8 μg/kg		20 μg/kg	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
睾酮	108.50	6.80	108.78	4.45	94.65	7.26
甲睾酮	84.12	9.62	86.21	1.72	100.73	5.16
群勃龙	101.13	8.36	109.75	7.39	91.24	4.89
醋酸群勃龙	90.90	9.28	106.89	5.10	98.92	3.92

3　结　论

相较于传统净化方式, 本研究采用的净化剂中性氧化铝在保证净化效果的同时更具经济性。与现有检测方法相比, 本研究将 4 种重点禁用激素整合于同一快速分析流程, 避免了分别检测的烦琐。方法学验证表明, 该方法回收率良好(84.12%~109.75%)、精密度稳定(RSD≤9.62%), 目标化合物在 0.1~100 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.999, 能够满足国内外对动物源性食品中激素残留的严格限量要求, 在食品安全风险监测与监管工作中具有良好的应用前景, 可为监测猪肉中睾酮、甲睾酮、群勃龙、醋酸群勃龙的残留情况提供技术参考。由于缺乏进行标记示踪或高分辨质谱等实验条件, 本研究的方法学讨论均基于外部添加, 后续研究可进一步探索基质中蛋白质、脂质与药物的相互作用, 并在专业实验环境中进行试验验证。

参考文献

[1] 马春芳, 陈海燕, 张慧宁, 等. 饲料中非法添加激素类药物检测方法的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2025(1): 31–33.
MA CF, CHEN HY, ZHANG HN, *et al*. Research progress on detection methods of illegally added hormone drugs in feed [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2025(1): 31–33.

[2] SUN SX, WU JL, LV HB, *et al*. Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 394: 122537.

[3] SAKAI H, IMAI Y. Cell-specific functions of androgen receptor in skeletal muscles [J]. Endocrine Journal, 2024, 71(5): 437–445.

[4] 王业兴. 饲料中非法添加激素类药物的危害及检测方法[J]. 中国饲料, 2024(23): 87–93.
WANG YX. Hazards and detection methods of illegally added hormone drugs in feed [J]. China Feed, 2024(23): 87–93.

[5] GRANT B, HYAMS E, DAVIES R, *et al*. Androgen abuse: Risks and adverse effects in men [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2024, 1538(1): 56–70.

[6] 王湘如, 赵月, 冯家伟, 等. 欧盟禁用饲料药物添加剂的历史和法规[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(6): 72–79.
WANG XR, ZHAO Y, FENG JW, *et al*. History and regulations of feed drug additives banned in the European Union [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(6): 72–79.

[7] 吴钰瑶, 盘焯晖, 林浩标, 等. 间接竞争酶联免疫吸附法检测保健食品中糖皮质激素类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(16): 45–54.
WU YY, PAN CH, LIN HB, *et al*. Detection of glucocorticoids in health foods by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(16): 45–54.

[8] 谭攀, 张世伟. 基于异源包被的地索奈德间接竞争酶联免疫检测方法[J]. 中国食品工业, 2022(17): 96–99, 104.
TAN P, ZHANG SW. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of desonide based on heterologous coating [J]. China Food Industry, 2022(17): 96–99, 104.

[9] 云瀚漩, 盖雪姣, 韩振宇, 等. 量子点荧光免疫检测牛奶中己烯雌酚、雌二醇[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(3): 130–136.
YUN HX, GAI XJ, HAN ZY, *et al*. Quantum dot fluorescence immunoassay for detection of diethylstilbestrol and estradiol in milk [J]. Food Research and Development, 2021, 42(3): 130–136.

[10] FU BF, GAO HJ, FANG CL, *et al*. Development of a monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening of diethylstilbestrol in animal-derived foods [J]. Heliyon, 2024, 10(22): e39769.

[11] BROUILLARD A, DAVIGNON LM, CERNIK R, *et al*. Comparing immunoassay and mass spectrometry techniques for salivary sex hormone analysis [J]. Psychoneuroendocrinology, 2025(174): 107379.

[12] 刘丽秋, 谢志权, 梁铭扬, 等. HPLC 法检测面膜中非法添加的 6 种糖皮质激素[J]. 广州化工, 2024, 52(10): 69–71.
LIU LQ, XIE ZQ, LIANG MY, *et al*. Determination of 6 illegally added glucocorticoids in facial mask by high performance liquid chromatography [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2024, 52(10): 69–71.

[13] FATIMA H, SAHAR H, SORAYA A, *et al*. High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection for quantification of steroids in clinical, pharmaceutical, and environmental samples: A review [J]. Molecules, 2022, 27(6): 1807–1807.

[14] DALANHOL CS, SCHEID C, MERIB J. Effervescent-assisted liquid-phase microextraction employing switchable hydrophilicity solvent for the determination of cortisol and testosterone in oral fluid by high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. Journal of Separation Science, 2024, 47(21): e70022.

[15] RAO DM, YANG C, LIU SX, *et al*. Determination of environmental estrogens by polybenzothiophene-based solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Analytical Letters, 2024, 57(1): 41–57.

[16] YU SQ, YOU JM, SHI XX, *et al*. Rapid analysis of estrogens in meat samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Fluorescence, 2023, 34(1): 425–436.

[17] 黄秋研, 邱启东, 陈卫强. 气相色谱-质谱法检测某市自来水厂生活饮用水中 20 种环境激素[J]. 轻工标准与质量, 2020(2): 80–84.
HUANG QY, QIU QD, CHEN WQ. Determination of 20 kinds of environmental hormones in drinking water of a city tap water plant by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Light Industry Standard and Quality, 2020(2): 80–84.

[18] THAMER FH, THAMER N. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) profiling reveals newly described bioactive compounds in *Citrullus colocynthis* (L.) seeds oil extracts [J]. Heliyon, 2023, 9(6): e16861.

[19] ZHANG YH, WU XP, WANG W, *et al*. Simultaneous detection of 93 anabolic androgenic steroids in dietary supplements using gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, 211: 114619–114679.

[20] WU ZB, MA AX, XING LL, *et al*. Development an automated and high-throughput analysis methods for detecting 64 anabolic androgenic steroids in urine using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Talanta Open, 2024, 10: 100362–100362.

[21] MARTÍNEZ-BRITO D, LEOGRANDE P, JARDINES D, *et al*. Simultaneous quantification of endogenous biomarkers and detection of testosterone esters in human serum using gas chromatography-high-resolution mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2024, 38(6): e9685.

[22] 刘静, 董宇, 王震红. 液相色谱-离子阱质谱法同时检测食品和药品中非法添加的 17 种激素[J]. 食品与药品, 2025, 27(1): 31–37.
LIU J, DONG Y, WANG ZH. Simultaneous determination of 17 kinds of illegally added hormones in food and drugs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. Food and Drug, 2025, 27(1): 31–37.

[23] PAN XD, HAN JL. Determination of steroid hormone residues in farmed fish using high-resolution orbital ion trap mass spectrometry [J]. Analytical Methods, 2022, 14(41): 4146–4152.

[24] 姜光丽, 何小琴, 郗存显, 等. QuEchERS/超高液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中 6 种 *β*-阻断剂类药物[J]. 中国饲料, 2015(12): 33–36.
JIANG GL, HE XQ, XI CX, *et al*. Simultaneous determination of six *β*-blockers in feed by QuEChERS/ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Feed, 2015(12): 33–36.

[25] 仵军红, 李琦, 赵世红, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中 13 种糖皮质激素[J]. 食品安全导刊, 2024(20): 76–79.
WU JH, LI Q, ZHAO SH, *et al*. Determination of 13 glucocorticoids in fish by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2024(20): 76–79.

[26] TEMERDASHEV A, DMITRIEVA E, AZARYAN A, *et al*. Determination of oxprenolol, methandienone and testosterone in meat samples by UHPLC-Q-ToF [J]. Heliyon, 2023, 9(2): e13260.

[27] KHANH NV, HAI NT, THUY NTD, *et al*. Highly sensitive simultaneous measurement of steroid hormone in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, 2022, 38(1): 54–64.

[28] 刘贵州, 丘东蔚. 肉类食品中激素残留的检测技术分析[J]. 现代食品, 2023, 29(8): 202–204.
LIU GZ, QIU DW. Analysis of detection technology for hormone residues in meat food [J]. Modern Food, 2023, 29(8): 202–204.

[29] XUE Y, LI J, MA M, *et al*. Recent advances on rapid detection methods of steroid hormones in animal origin foods [J]. Biosensors, 2025, 15(4): 216.

[30] 张丽姬, 邱小元, 黄鑫, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 8 种糖皮质激素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(22): 211–219.
ZHANG LJ, QIU XY, HUANG X, *et al*. Determination of 8 glucocorticoid residues in animal-derived foods by QuEChERS-UPLC-MS/MS [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(22): 211–219.

[31] 蔡小明, 吴少明, 余清, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定运动营养食品中 60 种类固醇激素[J]. 色谱, 2024, 42(12): 1173–1188.
CAI XM, WU SM, YU Q, *et al*. Determination of 60 steroid hormones in sports nutrition foods by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(12): 1173–1188.

[32] 冯月超, 王建凤, 侯帆, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 44 种食源性兴奋剂和 6 种孕激素[J]. 色谱, 2022, 40(5): 409–422.
FENG YC, WANG JF, HOU F, *et al*. Simultaneous determination of forty-four food-borne stimulants and six progestogens in livestock and poultry meat by QuEChERS-UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(5): 409–422.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)