DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260109003
引用格式: 刘一冉, 于泓, 黄帆, 等. QuEChERS 联合增强型除脂固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定地龙中 19 种性激素残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 184–192.
Liu Yiran, Yu Hong, Huang Fan, et al. Simultaneous determination of 19 kinds of sex hormone residues in *Pheretima* by QuEChERS combined with enhanced matrix removal-lipid cleanup and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 184–192. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS 联合增强型除脂固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定地龙中 19 种性激素残留

刘一冉[1,2], 于 泓[2*], 黄 帆[2], 胡 青[1,2], 季 申[1,2*]

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 国家药品监督管理局监管科学创新研究基地, 上海市药品检验研究院, 上海 201203)

摘 要: 目的 建立 QuEChERS 联合增强型除脂(enhanced matrix removal-lipid, EMR-lipid)固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定地龙中 19 种性激素残留。**方法** 采用 QuEChERS 分散固相萃取联合 EMR-lipid 固相萃取净化方法前处理, Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm), 以 0.02%氨水溶液-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 在电喷雾离子化正负离子模式下, 以多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)检测。**结果** 19 种待测物在各自浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数均在 0.999 以上; 3 水平平均加样回收率为 71.39%~118.78%, 相对标准偏差为 0.90%~14.33%, 检出限为 2.5~25.0 μg/kg, 定量限为 5.0~50.0 μg/kg。**结论** 该方法专属性强, 结果准确, 适用于地龙等富脂的药食同源复杂基质, 已应用于实际样品的检测。

关键词: 地龙; 性激素; QuEChERS 分散固相萃取; 增强型除脂固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法
中图分类号: R155.5 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0184–09

Simultaneous determination of 19 kinds of sex hormone residues in *Pheretima* by QuEChERS combined with enhanced matrix removal-lipid cleanup and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Yi-Ran[1,2], YU Hong[2*], HUANG Fan[2], HU Qing[1,2], JI Shen[1,2*]

收稿日期: 2026-01-09
基金项目: 上海市科委研发平台专项(21DZ2290200); 国家药典委员会药品标准制修订研究课题项目(2025Z20); 全国老药工传承工作室项目

第一作者: 刘一冉(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为中药质量控制和标准制订研究。E-mail: 763709280@qq.com
***通信作者:** 于泓(1987—), 女, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为中药质量控制和分析评价技术。E-mail: yuhong-918@163.com
季申(1963—), 女, 博士, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为中药质量控制和标准制订的研究。E-mail: jishen2021@126.com

(1. *School of Pharmacy*, *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai* 201203, *China*; 2. *National Medical Products Administration Center for Innovation and Research in Regulatory Science*, *Shanghai Institute for Drug Control*, *Shanghai* 201203, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for the determination of 19 kinds of sex hormone residues in *Pheretima* by QuEChERS combined with enhanced matrix removal-lipid (EMR-lipid) and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods**　The samples were pretreated using a QuEChERS dispersive solid-phase extraction combined with an EMR-lipid solid-phase extraction cleanup method. Separation was achieved on a Zorbax Eclipse Plus C_{18} column (3.0 mm×150 mm, 1.8 μm) using a gradient elution with a mobile phase consisting of 0.02% ammonia solution and methanol. Detection was performed by multiple reaction monitoring (MRM) in positive and negative electrospray ionization modes. **Results**　The 19 kinds of analytes were showed good linearity within their respective concentration ranges, with correlation coefficients all above 0.999. The average recoveries at 3 spiked levels ranged from 71.39% to 118.78%, with relative standard deviations ranging from 0.90% to 14.33%. The limits of detection were 2.5 μg/kg to 25.0 μg/kg, and the limits of quantitation were 5.0 μg/kg to 50.0 μg/kg. **Conclusion**　This method exhibits high specificity and accurate results. It is suitable for the complex matrix of lipid-rich traditional Chinese medicines such as *Pheretima* and has been successfully applied to the detection of practical samples.

KEY WORDS: *Pheretima*; sex hormones; QuEChERS dispersive solid-phase extraction; enhanced matrix removal-lipid solid-phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0　引　言

地龙是临床常用的动物类中药材[1], 为钜蚓科动物参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲环毛蚓的干燥体, 前 1 种习称“广地龙”, 后 3 种习称“沪地龙”, 具有清热熄风、通络、平喘、利尿等功效[2]。同时, 地龙也可作为食品原料, 提纯制成地龙蛋白, 已于 2009 年被卫生部列为新资源食品[3]。

地龙基原动物主要来自于野生, 因其多以土壤中的有机质、腐烂植物和畜粪等为食[4], 兽药等环境污染物易随食物链迁移至地龙体内。同时, 随着资源的紧张, 人工养殖也成为地龙的重要来源[5], 养殖过程中使用兽药防病治病同样会造成兽药残留安全风险。但目前, 中药中兽药残留安全风险尚未受到与动物源性食品同等的关注。

性激素是一类促进性发育、维持性功能的兽药, 可利用其增强食欲、抑制发情、提高饲料转化率等作用来促进养殖动物的生长[6]。根据其化学结构和来源可分为内源性激素、人工合成类固醇激素、人工合成非类固醇激素[7]。食用含外源性激素的动物源性食品会干扰人的内分泌系统, 对人体存在潜在的致癌、损害生殖系统等问题[8]。农业农村部第 250 号公告[9]规定了食品动物中禁止使用的药品及其化合物, 包括类固醇激素醋酸美仑孕酮、甲基睾丸酮、群勃龙、玉米赤霉醇和非类固醇激素己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚, GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定了苯甲酸雌二醇、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮等不得在食品中检出的性激素。

动物类中药材多为干基, 基质中小分子代谢成分对检测形成严重的干扰; 另外, 因该类化合物普遍极性较小, 易受到基质中脂肪等成分的干扰, 对其前处理技术提出了挑战, 但鲜少有文献报道动物类中药中性激素类残留的检测方法。而文献报道的食品中性激素类残留检测方法包括: 样品经乙腈[10]、正己烷[11]、乙酸乙酯[12–13]、甲基叔丁基醚[14]、乙酸乙酯-甲基叔丁基醚[15]提取, 根据不同样品的基质特点, 采用正己烷液液萃取除脂[16], 或采用 C_{18}、伯仲胺基吸附剂(primary secondary amine, PSA)、无水硫酸镁等吸附剂进行分散固相萃取净化[17–19], 或采用亲水亲脂平衡基质(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)[20–22]、石墨化炭黑-氨基复合柱(graphitized carbon black/aminopropyl composite spe column, GCB/NH_2)[23]、凝胶渗透色谱[24]等固相萃取净化方法, 亦有文献采用 PRiME HLB[25–26]、增强型除脂(enhanced matrix removal-lipid, EMR-lipid)[27–28]等专属性除脂净化方法。食品方法多采用单种净化方式, 无法同时有效去除小分子代谢产物和脂肪成分, 故而无法应用于富脂中药基质。检测仪器方面, 高效液相色谱-串联质谱法是当前测定食品中性激素残留量的主流方法, 也有采用高效液相色谱法[29]、气相色谱-串联质谱法[30–31]的文献报道。

本研究采用 QuEChERS 分散固相萃取联合 EMR-lipid 固相萃取, 同时净化小分子和脂肪成分, 建立了超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定地龙中 19 种性激素类兽药残留, 为该类富脂药食同源复杂基质中兽药残留测定提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

地龙样品共 197 批, 抽自于全国各中药材市场及中药饮片生产企业。

苯丙酸诺龙、诺龙、苯甲酸雌二醇、氯烯雌醚、炔雌醚、己烯雌酚、雌二醇、双烯雌酚、群勃龙、睾酮、丙酸睾酮、炔诺酮、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、己烷雌酚、醋酸美仑孕酮、甲基睾酮、玉米赤霉醇(天津阿尔塔科技有限公司); 炔雌醇(中国食品药品检定研究院), 化合物信息、批号、纯度等见表 1; 甲醇(质谱纯, 北京百灵威科技有限公司); 氨水[色谱纯, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 乙腈、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚、二甲亚砜、氯化钠(NaCl)、硫酸镁($MgSO_4$)、硫酸钠(Na_2SO_4)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); PSA、C_{18}(色谱纯, 迪马科技有限公司); EMR-lipid 固相萃取柱(规格 600 mg/6 mL, 美国 Agilent 公司)。

1.2 仪器与设备

1290/6495 型超高效液相色谱-串联质谱仪、Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm)(美国 Agilent 公司); MSU225P-1CE-DU 电子天平(精度 0.01 mg)、CP224S 电子天平(精度 0.1 mg)(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱和质谱条件

Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm); 柱温为 35 ℃, 流速为 0.3 mL/min, 进样量 10 μL。流动相: A 为 0.02%氨水溶液, B 为甲醇; 梯度条件如下: 0~15 min, 50%~99% B; 15~20 min, 99% B。

电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)正负离子模式; 干燥气(氮气)流速 13 L/min, 温度 210 ℃; 雾化气(氮气)0.24 MPa; 鞘气(氮气)流速 12 L/min, 温度 380 ℃; 毛细管电压正离子为 3.5 kV, 负离子为 4.0 kV。采用多反应监测方式(multiple reaction monitoring, MRM)检测, 监测离子、碰撞能量等参数见表 2。

1.3.2 标准品溶液制备方法

雌二醇、氯烯雌醚、己烯雌酚、双烯雌酚、炔雌醇、己烷雌酚、苯丙酸诺龙用甲醇溶解, 诺龙、苯甲酸雌二醇、炔雌醚、群勃龙、睾酮、丙酸睾酮、炔诺酮、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、醋酸美仑孕酮、甲基睾酮、玉米赤霉醇用乙腈溶解, 并配制为 100 μg/mL 的溶液。

(1)混合中间标准溶液

各化合物标准曲线最低点应对应其定量限, 因此配制 3 组不同浓度的混合中间标准溶液。取各标准储备液按所需比例用乙腈稀释混合, 得到混合中间标准溶液, 其中苯丙酸诺龙、诺龙、苯甲酸雌二醇、氯烯雌醚、炔雌醚、己烯雌酚、雌二醇、双烯雌酚、炔雌醇的质量浓度为 10 μg/mL; 群勃龙的质量浓度为 2 μg/mL; 睾酮、丙酸睾酮、炔诺酮、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、己烷雌酚、醋酸美仑孕酮、甲基睾酮、玉米赤霉醇的质量浓度为 1 μg/mL。

(2)标准曲线工作溶液

精密称取 1.5 g 空白地龙样品粉末(无上述兽药检出), 置于 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中, 按供试品制备方法处理, 得空白基质溶液。精密量取 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μL 的混合中间标准溶液, 用空白基质溶液稀释至 1 mL, 即得标准曲线工作溶液。

表 1 19 种性激素标准品信息

Table 1 Informations of 19 kinds of sex hormone standards

化合物	CAS 号	化学式	批号	纯度/%
雌二醇	50-28-2	$C_{18}H_{24}O_2$	S113083	99.9
醋酸氯地孕酮	302-22-7	$C_{23}H_{29}ClO_4$	S163927	98.0
氯烯雌醚	569-57-3	$C_{23}H_{21}ClO_3$	S113475	99.4
左炔诺孕酮	797-63-7	$C_{21}H_{28}O_2$	S149171	98.0
双烯雌酚	84-17-3	$C_{18}H_{18}O_2$	S113083	96.1
己烯雌酚	56-53-1	$C_{18}H_{20}O_2$	S113083	98.7
苯甲酸雌二醇	50-50-0	$C_{25}H_{28}O_3$	S161971	99.3
炔雌醇	57-63-6	$C_{20}H_{24}O_2$	100052-200308	100.0
己烷雌酚	84-16-2	$C_{18}H_{22}O_2$	S113083	99.1
醋酸美仑孕酮	2919-66-6	$C_{25}H_{32}O_4$	S109411	95.8
甲基睾酮	58-18-4	$C_{20}H_{30}O_2$	S109411	98.0
苯丙酸诺龙	62-90-8	$C_{27}H_{34}O_3$	S140595	99.0
炔诺酮	68-22-4	$C_{20}H_{26}O_2$	S146103	98.7
诺龙	434-22-0	$C_{18}H_{26}O_2$	S135375	99.0
炔雌醚	152-43-2	$C_{25}H_{32}O_2$	S222215	98.6
睾酮	58-22-0	$C_{19}H_{28}O_2$	S170601	99.3
丙酸睾酮	57-85-2	$C_{22}H_{32}O_3$	S146101	99.9
群勃龙(α-,β-异构体)	10161-33-8/80657-17-6	$C_{18}H_{22}O_2$	S109411	99.0
玉米赤霉醇(α-,β-异构体)	26538-44-3/42422-68-4	$C_{18}H_{26}O_5$	S109411	99.9

表 2　19 种待测物质谱参数

Table 2　Spectral parameters of 19 kinds of substances to be tested

化合物	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	保留时间/min	碎裂电压/V	碰撞电压/V	电离模式
雌二醇	271.2	183.2/145.1*	10.71	380	45/49	$[M-H]^-$
醋酸氯地孕酮	405.2	309.3*/301.2	12.76	380	21/25	$[M+H]^+$
氯烯雌醚	381.1	345.2*/227.2	15.87	380	17/77	$[M+H]^+$
左炔诺孕酮	313.2	245.2/109.0*	11.70	380	17/29	$[M+H]^+$
双烯雌酚	265.1	249.2*/236.0	10.70	380	33/21	$[M-H]^-$
己烯雌酚	267.1	251.2/237.2*	10.41	380	29/33	$[M-H]^-$
苯甲酸雌二醇	377.2	105.1*/77.1	16.44	380	41/65	$[M+H]^+$
炔雌醇	295.2	159.0/145.1*	10.58	380	37/49	$[M-H]^-$
己烷雌酚	269.2	134.1/119.1*	10.97	380	13/53	$[M-H]^-$
醋酸美仑孕酮	397.2	337.2*/221.0	13.10	380	13/48	$[M+H]^+$
甲基睾酮	303.2	109.1/97.1*	12.00	380	32/32	[M+H]+
苯丙酸诺龙	407.3	257.2/105.1*	16.57	380	18/36	$[M+H]^+$
炔诺酮	299.2	231.2/109.1*	10.48	380	17/27	$[M+H]^+$
诺龙	275.2	257.2/239.1*	10.59	380	17/21	$[M+H]^+$
炔雌醚	365.3	158.9/107.1*	17.27	380	25/49	$[M+H]^+$
睾酮	289.2	109.0/97.0*	11.27	380	32/36	$[M+H]^+$
丙酸睾酮	345.2	271.1/97.1*	15.48	380	16/20	$[M+H]^+$
群勃龙	271.2	253.2*/199.1	10.18	380	20/28	$[M+H]^+$
玉米赤霉醇	321.2	277.2*/259.1	7.30	380	21/25	$[M-H]^-$

注: *为定量离子。

1.3.3　供试品溶液制备方法

精密称取 1.5 g 地龙样品粉末于 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中, 加水 10 mL 浸润, 加入乙酸乙酯-甲基叔丁基醚(1:1, *V*:*V*)混合溶液 15 mL, 涡旋混匀后置振荡器上剧烈振荡(500 次/min) 10 min。随后于冰浴中加入 5 g NaCl:$MgSO_4$ (1:4, *m*:*m*)混合粉末, 置振荡器上剧烈振荡(500 次/min) 5 min, 4000 r/min 离心 5 min 使溶液分层。精密量取上清液 10 mL 于 15 mL 聚苯乙烯具塞离心管中, 加入 50 μL 二甲亚砜, 涡旋混匀, 在 40 ℃水浴下浓缩至近干。用乙腈稀释并定容至 2 mL, 加水 0.5 mL, 混匀, 向溶液中加入 0.5 g QuEChERS 净化包(PSA:C_{18}=1:1, *w*:*w*), 置振荡器上剧烈振荡(500 次/min) 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 得一次净化液。精密取 1 mL 一次净化液上 EMR-lipid 柱(规格 600 mg/6 mL), 待流干后, 精密加 3 mL 80%甲醇洗脱, 将上样液和洗脱液涡旋 1 min 混匀, 4000 r/min 离心 5 min, 即得。

1.4 数据处理

质谱数据采集采用 Agilent MassHunter LC/MS Data Acquisition (B.08.02)软件完成，定量分析采用 MassHunter Quantitative Analysis (B.09.00)软件处理。实验数据以 Microsoft Excel 2013 进行整理与制表。图谱绘制采用 GraphPad Prism (8.0.2)。前处理优化实验均重复 2 次。

2　结果与分析

2.1　色谱和质谱条件优化

本研究待测物涵盖了雌激素、雄激素和孕激素 3 类化合物。其中, 大多数雌激素类化合物(雌二醇、双烯雌酚、己烯雌酚、炔雌醇、己烷雌酚、玉米赤霉醇)须采用负离子模式采集方能获得理想的质谱响应。流动相 pH 对该类化合物的电离效果影响很大, 经比较 0.1%甲酸溶液、水、0.02%氨水溶液 3 种流动相水相, 结果水相为 0.02%氨水溶液时大多数化合物响应较好(图 1)。而其他采用正离子模式采集的化合物受流动相 pH 影响不大。因此, 最终选用 0.02%氨水溶液作为水相。优化后的色谱图见图 2。

2.2　前处理方法优化

2.2.1　提取溶剂考察

本研究待测物极性普遍较小, 提取溶剂的极性对提取效率影响较大。研究对比了两种不同极性的典型提取溶剂: 1%甲酸乙腈与甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(1:1, *V*:*V*)下各化合物的峰面积。结果表明(图 3), 甲基叔丁基醚-乙酸乙酯混合体系对目标性激素表现出更好的提取选择性, 同时能有效减少极性基质干扰物的影响, 因此最终选择甲基叔丁基醚-乙酸乙酯混合体系进行后续研究。

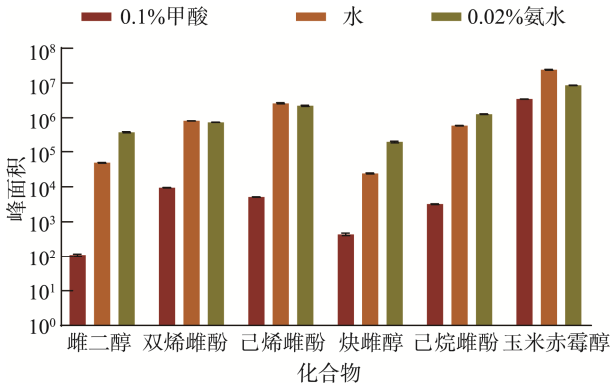


图 1 不同流动相水相下峰面积比较

Fig. 1 Comparison of peak areas under different aqueous mobile phase conditions

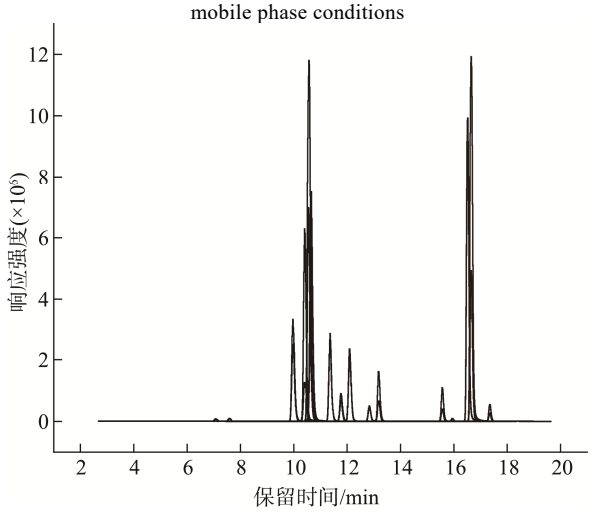


图 2 19 种性激素 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of 19 kinds of sex hormones

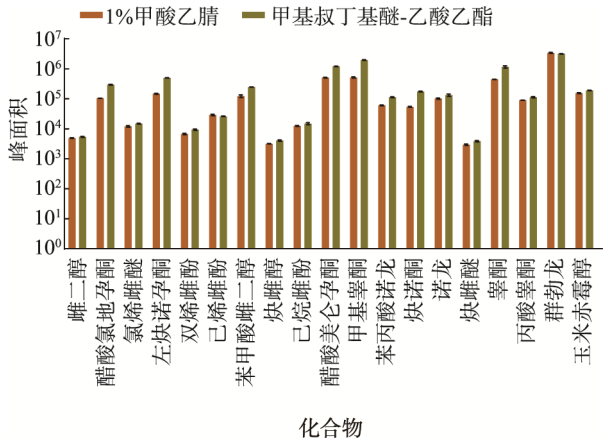


图 3 不同提取溶剂下峰面积比较

Fig.3 Comparison of peak areas under different extraction solvents

2.2.2 萃取盐包考察

本研究考察了 NaCl-Na_2SO_4 (1:4, *m*:*m*)与 NaCl-$MgSO_4$ (1:4, *m*:*m*)两种盐包体系。实验发现，$MgSO_4$ 体系具有更优的除水能力，但其强放热特性可能影响化合物稳定性；而 Na_2SO_4 体系的除水效果相对不足，对溶液体积影响较大，可能造成定量结果的不准确。因此，最终选择 NaCl-$MgSO_4$ 体系并辅以冰浴操作，在保证除水效率的同时有效控制了温度变化对目标物的影响(图 4)。

2.2.3 浓缩及复溶考察

为匹配净化步骤的溶剂需求，本研究采用了提取-浓缩复溶-QuEChERS 净化-EMR 净化的操作流程。浓缩处理虽可提高待测物浓度，但同时也导致基质效应显著增强，反而抑制目标化合物的信号响应。研究考察了将提取液浓缩 5.0 倍、7.5 倍、10.0 倍 3 个水平，发现(图 5)浓缩 5.0 倍时化合物信号响应与基质效应达到最佳平衡；同时考察了复溶溶剂，发现炔诺醚等多个化合物在 75%甲醇和 80%乙腈体系中回收率不理想，而复溶溶剂为乙腈(含 2.5%二甲亚砜)能显著提高目标物的回收率。

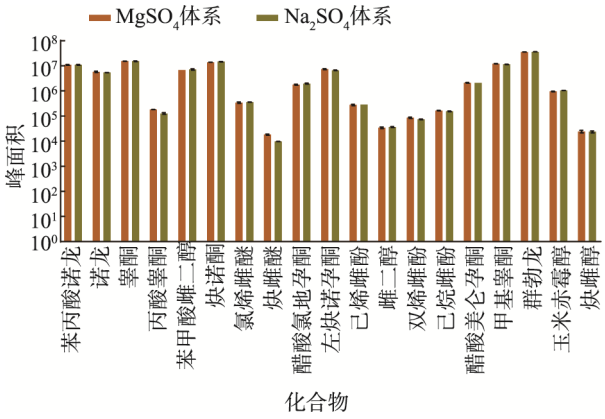


图 4 不同萃取盐包下峰面积比较

Fig.4 Comparison of peak areas under different extraction salt kits

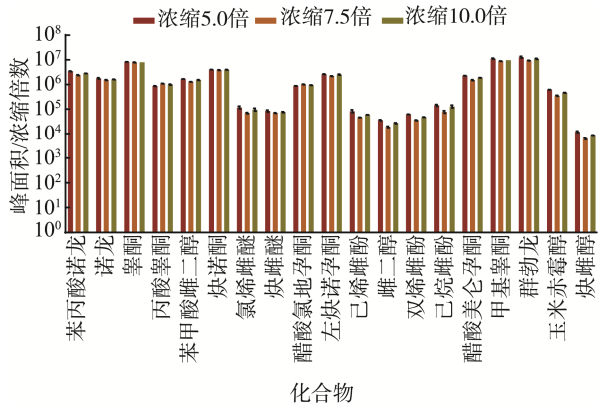


图 5 不同浓缩倍数下峰面积比较

Fig.5 Comparison of peak areas under different concentration multiples

2.2.4 净化方法考察

本研究对象地龙，含有大量核苷类、脂肪类、蛋白质等基质成分，造成较强的基质效应。研究首先比较了提取后不净化、仅 QuEChERS 净化、仅 EMR-lipid 除脂净化，结果样品经前 2 种前处理步骤处理后，供试品溶液上层具明显的油层，无法进样测定；而仅 EMR-lipid 除脂净化虽能

除去油层, 但其他干扰物质未能净化, 导致雌二醇、氯烯雌醚、双烯雌酚、己烯雌酚、苯甲酸雌二醇、炔雌醇、己烷雌酚、玉米赤霉醇等质谱响应相对较差的化合物在现有检出限水平下, 无法出峰, 需要进一步提高检出限定量限水平方可获得满意的方法验证结果。因此开发了 QuEChERS 分散固相萃取联合 EMR-lipid 固相萃取前处理净化方法, 同时除去基质中小分子干扰成分和脂肪, 使用外标法定量即可获得满意的回收率。

2.3　方法学验证

2.3.1　线性关系

取标准曲线工作溶液进样测定, 采用外标法定量, 以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X, μg/L)绘制标准工作曲线。结果在各自质量浓度范围内均具有良好的线性, 相关系数大于等于 0.999, 线性范围与相关系数良好, 满足实验要求, 见表 3。

2.3.2　专属性

采用空白基质样品对方法的专属性进行验证。空白基质的色谱图在目标化合物对应保留时间处, 均未检测到干扰峰。

2.3.3　基质效应

为评价基质效应(matrix effects, ME)对 19 种化合物测定的影响程度, 分别制备空白基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线, 按 ME/%=(空白基质匹配标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率)×100%计算。结果 19 种化合物的 MEs 在 5.50%~190.93%范围内, 其中 8 种化合物 MEs 较小, MEs 在 70%~130%范围内; 9 种化合物 MEs 低于 70%, 呈现出基质抑制作用; 2 种化合物 MEs 高于 130%, 呈现出基质增强作用, 因此采用基质匹配标准曲线进行校准, 结果见表 3。

2.3.4　检出限与定量限

检出限是能从背景噪声中识别目标信号的最低加样水平, 定量限是以实际满足定量要求的加入最低加样水平计, 需满足信噪比 S/N=3, 且相对离子丰度比符合设定要求。定量限是检测方法的准确度与精密度均达到可接受标准时, 所对应的最低加样水平。结果 19 种化合物的检出限为 2.5~25.0 μg/kg, 定量限为 5.0~50.0 μg/kg, 满足性激素类兽药残留测定要求, 详见表 3。

2.3.5　准确度

采用加标回收实验评估准确度。取空白样品, 分别添加低(定量限)、中(2 倍定量限)、高(10 倍定量限)3 个水平的对照品溶液, 每个水平做 6 个平行样, 按上述供试品溶液制备方法和色谱质谱条件进行分析, 计算回收率。根据 CAC/GL 71—2009《与食用动物的兽药使用有关的国家食品安全保障监管方案的设计与执行指南》要求, 兽药残留分析方法的回收率可接受范围与待测物浓度相关, 对于 1~10 μg/kg 的残留水平, 回收率应为 60%~120%; 对于 10~1000 μg/kg 的水平, 回收率应为 70%~120%。结果表明(表 4), 所有化合物的回收率范围为 71.39%~118.78%, 方法准确度好。

2.3.6　重复性

在低、中、高 3 个加标水平下, 对全部 19 种化合物进行了一式 6 份的重复性实验。结果表明(表 4), 所有化合物的 RSDs 范围为 0.90%~14.33% (≤15%), 方法重复性好。

表 3　19 种化合物的检出限、定量限、线性方程及范围、基质效应

Table 3　limit of detection, limits of quantitation, linear equations, ranges and matrix effects of 19 kinds of compounds

化合物	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)	线性方程	线性范围/(μg/L)	相关系数	基质效应/%
雌二醇	25.0	50.0	Y=1191.68X-1106.79	5.0~100.0	0.999	13.50
醋酸氯地孕酮	2.5	5.0	Y=47368.44X+6606.08	0.5~10.0	0.999	80.29
氯烯雌醚	25.0	50.0	Y=7068.79X-22945.29	5.0~100.0	1.000	5.50
左炔诺孕酮	2.5	5.0	Y=85580.49X+70136.90	0.5~10.0	0.999	69.31
双烯雌酚	25.0	50.0	Y=3174.40X-7786.67	5.0~100.0	1.000	14.56
己烯雌酚	25.0	50.0	Y=9536.89X-3661.61	5.0~100.0	1.000	13.56
苯甲酸雌二醇	25.0	50.0	Y=482858.92X+103895.96	5.0~100.0	0.999	41.99
炔雌醇	25.0	50.0	Y=8724.59X+1121.33	5.0~100.0	1.000	131.36
己烷雌酚	2.5	5.0	Y=2256.32X+722.97	0.5~10.0	0.999	58.73
醋酸美仑孕酮	2.5	5.0	Y=163993.51X+4843.62	0.5~10.0	0.999	83.84
甲基睾酮	2.5	5.0	Y=250488.93X+22369.73	0.5~10.0	0.999	80.91
苯丙酸诺龙	25.0	50.0	Y=1544498.09X-8931.54	5.0~100.0	1.000	75.48
炔诺酮	2.5	5.0	Y=2248782.43X+23686.55	0.5~10.0	1.000	9.88
诺龙	25.0	50.0	Y=1077135.95X+237019.84	5.0~100.0	0.999	91.23
炔雌醚	25.0	50.0	Y=25507.43X-7893.14	5.0~100.0	0.999	37.18
睾酮	2.5	5.0	Y=262740.12X+118234.52	0.5~10.0	0.999	77.91
丙酸睾酮	2.5	5.0	Y=96184.57X+25422.29	0.5~10.0	0.999	82.22
群勃龙	5.0	10.0	Y=1167320.17X+344950.28	1.0~20.0	0.999	95.37
玉米赤霉醇	2.5	5.0	Y=645.18X+323.68	0.5~10.0	1.000	190.93

表 4 3 个加标水平下 19 种化合物的回收率与精密度
Table 4 Recoveries and RSDs for 19 kinds of compounds at 3 spiked levels

化合物	1 倍定量限		2 倍定量限		10 倍定量限	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
雌二醇	108.51	12.09	79.95	11.36	86.10	5.88
醋酸氯地孕酮	89.36	7.30	85.08	4.08	112.73	2.06
氯烯雌醚	118.08	1.48	85.97	4.17	73.53	3.78
左炔诺孕酮	89.67	10.54	84.26	9.42	115.55	3.25
双烯雌酚	118.20	6.64	89.82	9.06	85.38	4.38
己烯雌酚	103.32	6.52	101.73	1.79	83.20	2.31
苯甲酸雌二醇	74.24	3.55	71.39	3.15	90.27	4.29
炔雌醇	96.21	10.36	79.89	8.08	99.16	3.03
己烷雌酚	93.47	12.21	97.94	13.72	115.51	3.18
醋酸美仑孕酮	103.77	4.18	88.34	4.06	102.18	5.32
甲基睾酮	105.36	8.91	91.52	9.68	109.80	2.03
苯丙酸诺龙	97.18	6.11	79.57	1.45	77.82	4.02
炔诺酮	110.85	4.46	95.60	3.00	112.37	5.37
诺龙	87.22	14.33	83.17	3.92	114.48	1.67
炔雌醚	76.97	3.74	78.72	7.66	72.03	1.81
睾酮	86.48	13.45	75.52	4.79	118.78	0.90
丙酸睾酮	87.65	8.68	76.85	8.25	72.84	2.41
群勃龙	100.14	11.82	86.24	5.81	107.90	5.44
玉米赤霉醇	85.11	9.42	78.53	3.94	100.57	6.20

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

2.4 实际样品测定

将本研究建立的方法应用于 197 批地龙样品的检测, 均未检出 19 种性激素残留。地龙以野生为主, 人工养殖为辅, 结果表明本研究所收集的样品未受到环境污染物的迁移影响, 养殖过程中亦未使用性激素类兽药。

3 结论与讨论

本研究采用 QuEChERS 分散固相萃取联合 EMR-lipid 固相萃取, 基于 UPLC-MS/MS 建立了地龙中 19 种性激素残留的检测方法。该方法针对地龙基质富含小分子、蛋白、脂肪等干扰成分的特点, 创新采用联合净化方法, 解决了以往文献使用单种净化方法无法获得满意回收率的问题。

食品基质中性激素检测常用标准方法有 GB 31656.14—2022《食品安全国家标准 水产品中 27 种性激素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB 31658.28—2025《食品安全国家标准 动物性食品及尿液中乙酰孕激素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》和 GB 31658.9—2021《食品安全国家标准 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法》。其中, GB 31656.14—2022 和 GB 31658.28—2025 分别采用 C_{18} 和 EMR-lipid 固相萃取方法除脂, 应用于地龙基质无法去除小分子干扰成分, 导致基质效应仍然较强; 而 GB 31658.9—2021 则采用与本研究类似的思路, 组合 HLB 和氨基固相萃取, 分步净化。相比而言, 本研究采用的 QuEChERS 方法更简便, 采用 EMR-lipid 方法除脂更专属。

以动物全体入药的中药普遍具有相似的基质特点, 如土鳖虫、乌梢蛇等, 本研究采用的方法可为此类富脂的复杂基质中兽药残留检测提供参考, 从而为动物类中药中兽残残留安全监管提供技术支撑。

参考文献

[1] 刘凡敏, 殷佳, 吕明月, 等. 地龙炮制方法、药理作用及质量标志物预测分析的研究进展[J]. 药学研究, 2025, 44(3): 275–281.
Liu Fanmin, Yin Jia, Lv Mingyue, et al. Research progress on processing methods, pharmacological effects and predictive analysis of quality markers of earthworm [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2025, 44(3): 275–281.

[2] 汪海英, 蒋虎刚, 王新强, 等. 地龙的临床应用及药理作用的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2024, 38(12): 92–95.
Wang Haiying, Jiang Hugang, Wang Xinqiang, et al. Research progress on clinical application and pharmacological effects of *Pheretima* [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine, 2024, 38(12): 92–95.

[3] 邸玉青, 李静. 红曲地龙蛋白压片糖果降脂保肝作用探析[J]. 现代食

品, 2023, 29(11): 98–101.
Di Yuqing, Li Jing. Analysis of the lipid-lowering and liver protective effects of monascus and earthworm protein tablet candy [J]. Modern Food, 2023, 29(11): 98–101.

[4] 杨静, 叶慧, 马鸿雁, 等. 地龙腥臭气特征、来源及矫臭方法研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(2): 670–677.
Yang Jing, Ye Hui, Ma Hongyan, et al. Research progress on characteristics, sources and odor correction methods of *Pheretina* stenchy odor [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(2): 670–677.

[5] 王康, 方运雄, 刘承焯, 等. 广西广地龙人工养殖产业发展情况调研报告[J]. 现代畜牧科技, 2023, 99(8): 60–63.
Wang Kang, Fang Yunxiong, Liu Chengzhuo, et al. Research report on the development of Guangxi *Pheretina* artificial breeding industry [J]. Modern Animal Husbandry Science and Technology, 2023, 99(8): 60–63.

[6] 高旭东, 黄鑫, 郝宝成, 等. 动物源性食品中性激素残留的危害及检测方法[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(21): 274–277.
Gao Xudong, Huang Xin, Hao Baocheng, et al. The hazards and detection methods of sex hormone residues in animal-derived foods [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015(21): 274–277.

[7] 劳柏豪, 张静娴, 于泓, 等. 动物源性食品中禁用兽药监管及检测策略研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(22): 236–247.
Lao Bohao, Zhang Jingxian, Yu Hong, et al. Research progress on regulatory and detection strategies for prohibited veterinary drugs in animal-derived foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(22): 236–247.

[8] Almazrouei B, Islayem D, Alskafi F, et al. Steroid hormones in wastewater: sources, treatments, environmental risks, and regulations [J]. Emerging Contaminants, 2023, 9(2): 100210.

[9] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和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[EB/OL]. (2020-01-06) [2025-12-12]. https://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202001/t20200106_6334375.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement No.250 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the people's Republic of China. List of prohibited drugs and other compounds in food-producing animals [EB/OL]. (2020-01-06) [2025-12-12]. https://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202001/t20200106_6334375.htm.

[10] Moussa F, Mokh S, Doumiati S, et al. LC-MS/MS method for the determination of hormones: validation, application and health risk assessment in various bovine matrices [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 138: 111204.

[11] Suo Decheng, Fan Xia, Xiao Zhiming, et al. Trace analysis of progesterone and 21 progestins in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled with high-field quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130115.

[12] Wozniak B, Matraszek-Zuchowska I, Klopot A, et al. Fast analysis of 19 anabolic steroids in bovine tissues by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(21): 3319–3329.

[13] 孙建华, 孙振中, 戚隽渊, 等. 大气压化学电离源的高效液相色谱串联质谱法同时测定黄鳝肌肉中九种性激素的残留研究[J]. 水产科学, 2014, 33(12): 781–784.
Sun Jianhua, Sun Zhenzhong, Qi Juanyuan, et al. Simultaneous detection of 9 sex hormones in muscle of field eel *Monopterus albus* by HPLC-MS-MS [J]. Fisheries Science, 2014, 33(12): 781-784.

[14] 张劢, 李艳, 刘炳锐, 等. 液质联用技术同时测定血清中 12 种类固醇激素[J]. 中国医药科学, 2025, 15(9): 150–153.
Zhang Mai, Li Yan, Liu Bingrui, et al. Simultaneous determination of 12 steroid hormones in serum by liquid-mass spectrometry technique [J]. China Medicine and Pharmacy, 2025, 15(9): 150–153.

[15] 于慧娟, 张珊珊, 张晓玲, 等. 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中雌激素、孕激素和雄激素[J]. 质谱学报, 2014, 35(2): 170–178.
Yu Huijuan, Zhang Shanshan, Zhang Xiaoling, et al. Simultaneous determination of the estrogen, progestogen and androgen in aquatic products by isotope dilution-LC-MS/MS [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2014, 35(2): 170–178.

[16] 孙利东, 许秀丽, 袁飞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和鸡肉中 4 种激素本底值[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 291–297.
Sun Lidong, Xu Xiuli, Yuan Fei, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of background values of 4 hormones in milk and chicken [J]. Food Science, 2017, 38(22): 291–297.

[17] Hoga C A, Reche K V G, Almeida F L, et al. Development and validation of an analytical method for the determination of 17*β*-estradiol residues in muscle of tambaqui (*Colossoma macropomum Cuvier*, 1818) by LC-MS/MS and its application in samples from a fish sexual reversion study [J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1128: 121774.

[18] 黄永辉. 快速分散固相萃取-平行液相色谱-串联质谱法同时测定炸鸡食品中 26 种性激素[J]. 食品科技, 2024, 49(5): 314–320.
Huang Yonghui. Simultaneous determination of 26 sex hormones in fried chicken food by QuEChERS combined with parallel liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(5): 314–320.

[19] 方秋华, 黄显会, 郭春娜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测羊奶中乙酰孕激素多残留研究[J]. 分析测试学报, 2012, 31(10): 1314–1318.
Fang Qiuhua, Huang Xianhui, Guo Chunna, et al. Determination of acetylgestagens in ovine milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(10): 1314–1318.

[20] 王佳慧, 杨帆, 高明, 等. 液相色谱串联质谱检测鹿茸及其制品中孕酮等 5 种性激素[J]. 化学试剂, 2020, 42(9): 1078–1082.
Wang Jiahui, Yang Fan, Gao Ming, et al. Determination of five estrogens in *Pilose antler* and its products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chemical Reagents, 2020, 42(9): 1078–1082.

[21] 尤亮亮, 魏巍, 刘海燕, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱测定牛奶中 9 种性激素残留[J]. 中国测试, 2016, 42(5): 46–49, 55.
You Liangliang, Wei Wei, Liu Haiyan, et al. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of 9 hormones residues in milk [J]. China Measurement and Test, 2016, 42(5): 46–49, 55.

[22] 张学亮, 罗云敬, 路勇, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法同时测定牛肉与牛奶中 20 种性激素残留[J]. 分析测试学报, 2015, 34(4): 388–394.
Zhang Xueliang, Luo Yunjing, Lu Yong, et al. Simultaneous determination

of 20 kinds of hormones residues in beef and milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(4): 388–394.

[23] 杨帆, 莫文电, 段玉林, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品及其制品中 3 种抗生素和 14 种性激素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(8): 2247–2257.
Yang Fan, Mo Wendian, Duan Yulin, et al. Determination of residues of 3 antibiotics and 14 sex hormones in aquatic products and their products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(8): 2247–2257.

[24] 严忠雍, 李佩佩, 龙举, 等. 凝胶渗透色谱-液相色谱-串联质谱法测定水产品中性激素[J]. 广州化工, 2014, 42(23): 121–123.
Yan Zhongyong, Li Peipei, Long Ju, et al. Determination of hormones in aquatic products by HPLC-MS with gel permeation chromatography [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2014, 42(23): 121–123.

[25] 徐梦, 陈婷婷, 卢如剑, 等. UPLC-MS/MS 法测定鸡蛋中 13 种性激素残留量[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(7): 113-118, 171.
Xu Meng, Chen Tingting, Lu Rujian, et al. Determination of 13 sex hormone residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(7): 113-118, 171.

[26] 尹伶灵, 杨修镇, 陈玲, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鸡蛋和鸡肉中的 7 种性激素药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 3078–3084.
Yin Lingling, Yang Xiuzhen, Chen Ling, et al. Rapid determination of 7 kinds of hormones residues in eggs and chicken by solid phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(10): 3078–3084.

[27] Wang Kewen, Wang Xue, Xu Zhenzhen, et al. Simultaneous determination of multi-class antibiotics and steroid hormones drugs in livestock and poultry faeces using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Food Additives and Contaminants Part A, 2020, 37(9): 1467–1480.

[28] 辛丽娜, 莫东淑, 蒋定之, 等. EMR 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定虾肉中性激素残留的方法建立[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 263–270.
Xin Lina, Mo Dongshu, Jiang Dingzhi, et al. Determination of sex hormone residues in shrimp by EMR solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 263–270.

[29] 车颜波, 陈吉汉, 魏亚峰, 等. 奶粉中雌二醇、孕酮、睾酮同时测定的 HPLC 方法研究[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(9): 53–55.
Che Yanbo, Chen Jihan, Wei Yafeng, et al. Study on determination of estradiol, testosterone, progesterone in milk powder by HPLC [J]. China Dairy Industry, 2013, 41(9): 53–55.

[30] 卢杰, 冯晓梅, 隋晓, 等. 亚临界 1,1,1,2-四氟乙烷萃取-气相色谱-质谱法测定鱼肉中 6 种性激素残留[J]. 分析化学, 2013, 41(10): 1487–1492.
Lu Jie, Feng Xiaomei, Sui Xiao, et al. Determination of 6 kinds of sex hormones in fish using subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(10): 1487–1492.

[31] 赵超敏, 古淑青, 曲栗, 等. 气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱法溯源分析黄油中 5 种类固醇激素[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 270–278.
Zhao Chaomin, Gu Shuqing, Qu Li, et al. Traceability of five steroid hormones in butter investigated by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 270–278.

(责任编辑: 曹岱琳 韩晓红)