

动物源性食品中甲基睾酮残留检测方法研究进展

尚晓睿^{1,2}, 史永富¹, 张璇¹, 王媛¹, 田良良¹, 席寅峰¹, 张俊^{1,2}, 黄冬梅^{1*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 甲基睾酮是一种激素类药物, 在畜牧业和水产养殖业中作为动物促生长剂和性别逆转剂被使用。我国农业农村部 235 号公告规定了在所有动物组织中不得检出甲基睾酮, 但是目前还存在违禁使用的情况, 因此有必要对其残留量进行检测。本文主要概述了甲基睾酮的作用机制、危害和法规标准, 系统综述了现有畜禽、水产品中甲基睾酮残留检测常用的样品前处理方法与分析方法。样品前处理方法的确定包括提取试剂的选择、净化方法的优化等, 检测方法主要包括高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法和免疫分析方法等。本文分析了不同检测方法的优缺点、适用范围以及选择依据, 并对检测方法进行了展望, 旨在为加强动物源性食品中甲基睾酮的残留监测提供参考。

关键词: 动物源性食品; 甲基睾酮; 残留检测

Research progress on the detection methods of methyltestosterone residues in animal-derived foods

SHANG Xiao-Rui^{1,2}, SHI Yong-Fu¹, ZHANG Xuan¹, WANG Yuan¹, TIAN Liang-Liang¹,
XI Yin-Feng¹, ZHANG Jun^{1,2}, HUANG Dong-Mei^{1*}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: Methyltestosterone is a kind of hormone drug, which is used as growth promoters and sex reversal agents in the aquaculture and livestock industry. Announcement No.235 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China stipulates that methyltestosterone should not be detected in all animal tissues, but it is still prohibited to use it at present, so it is necessary to detect its residues. This paper mainly summarized the action mechanism, harm, regulatory standards of methyltestosterone, systematically described the existing sample pretreatment methods and analysis methods of methyltestosterone residue detection in livestock and aquatic species. Determination of sample pretreatment methods include the selection of extraction reagents, optimization of purification methods and *etc.*, the detection methods of methyltestosterone residues in animal-derived foods mainly include high performance liquid chromatography, liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoassay *etc.* Meanwhile, this paper analyzed the application scope, advantages and disadvantages and selection basis of different detection methods, and looked forward to the detection methods, so as to provide reference for strengthening the monitoring of methyltestosterone residues in animal-derived foods.

基金项目: 农业农村部农业标准制修订项目(农质标函[2021]76号)

Fund: Supported by the Agricultural Standard Making and Revising Project of Ministry of Agriculture and Rural Areas (Agricultural Quality Standard Letter [2021] No.76)

*通信作者: 黄冬梅, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全研究。E-mail: hdm2001@126.com

*Corresponding author: HUANG Dong-Mei, Professor, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.300, Jun Gong Road, Yangpu District, Shanghai 200090, China. E-mail: hdm2001@126.com

KEY WORDS: animal-derived food; methyltestosterone; residues detection

0 引言

食物是人们赖以生存的必需品, 随着食品经济的不断发展和生活水平的不断提高, 人们对于能够提供丰富营养物质的动物源性食品的需求量也越来越大。食品安全问题在很大程度上影响着人民群众的身体健康, 也一直是大众关注的焦点。在动物源性食品中一直普遍存在抗生素、激素残留超标等问题, 为了保障人们的身体健康, 解决此类问题刻不容缓^[1]。

甲基睾酮(methyltestosterone, MT)是一种人工合成的类固醇蛋白同化激素, 具有促进性别转变和蛋白同化的双重作用, 在 20 世纪 70 年代就发现其可以作为生长促进剂应用在畜、禽、鱼类养殖中^[2]。然而摄入含有 MT 残留的动物源性食品会对人体健康产生危害, 导致人体激素水平失衡, 肝中毒、胎体中毒等^[3-4]。在我国 2002 年的农业农村部 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》中将 MT 列为禁用药物^[5], 因此为了避免违法和滥用现象, 对动物源性食品中 MT 残留检测方法的研究在食品安全行业中是必不可少的。本文概述了 MT 的作用机制、危害和相关法规标准, 并针对动物源性产品中 MT 的前处理方法和检测技术进行了系统地综述, 分析了未来需要解决的技术挑战, 旨在为政府相关部门对 MT 残留检测和监管提供参考。

1 MT 的作用机制及使用情况

MT 又称甲基睾丸素和甲睾酮, 在畜牧业与水产养殖中被用于控制性别、促进动物生长、提高产量, 同时还能减少饲料的使用量^[6-7]。MT 在动物源性食品中的作用机制是促进线粒体的生物合成和质量控制, 并通过增加红细胞的数量来增加组织氧气输送能力, 使得动物体内蛋白合成、肌肉增长和骨骼钙化的速率加快。MT 通过影响鱼体类固醇激素的合成来实现水产养殖中的性别控制, 如改变雌二醇和睾酮水平等, 引起鱼类性腺发育不良, 进而诱导雌鱼雄性化; 并且还可以影响鱼体内控制性别分化的激素受体基因的表达^[8]。

由于 MT 等类固醇激素的特殊作用, 在畜禽和水产养殖过程中会存在违法滥用 MT 的行为, 以此获得更高的商业利润, 我国在风险监测和监督抽查中已发现多起乳制品、肉制品中的多种激素残留现象, 在养殖业滥用最普遍的有 MT、黄体酮、诺龙、勃地龙等^[9]。据报道, 不同含量的 MT 对畜禽产品的生长、代谢和发育等生理过程具有不同程度的影响^[10]。之前已有研究^[11]发现罗非鱼和虹鳟等多种鱼类的饲料中添加一定量的 MT, 可以发生性逆转现象。

用含有 50 和 100 mg/kg 17 α -MT 的饲料投喂出膜后 15 d 的雌性大口黑鲈 60 d, 能有效诱导其转为雄性个体, 不同 MT 添加量的两组雄性率均为 100%。并且本研究中, 添加 MT 的实验组生理雄鱼血清中雌二醇的含量显著低于对照组雌鱼, 表明抑制雌二醇的分泌是诱导大口黑鲈雌性个体雄性化的必要因素。实验表明低浓度的 MT 可促进养殖动物的生长, 4、8、12、16 mg/kg MT 组均对阿里雌鱼具有促生长作用, 且 16 mg/kg 组的体质量显著低于 12 mg/kg 组, 这与尼罗罗非鱼、舌齿鲈在高剂量激素处理下的抑制生长结果一致, 表明高剂量的 MT 有抑制一些鱼类生长的作用^[12]。

2 MT 残留的危害和相关法规标准

当 MT 被作为促生产剂和性别转化剂被添加到饲料中时, 虽然具有增加产品产量和控制性别等优势, 但是这类激素在动物体内代谢缓慢且不易分解^[13]。研究发现即使食物中 MT 的残留含量很低, 消费者食用此类食物时, 激素残留在体内代谢时间过长, 仍会对人体健康造成影响, 如影响内分泌功能、导致肝中毒或其他重要组织器官发生生理病变, 甚至具有潜在的致畸、致癌、致突变性^[14-15]。其痕量残留的累积会打破人体内自然激素的平衡, 使人体代谢紊乱、生理活动受阻, 这可能会影响肝脏的正常功能, 引发水肿或血钙过高; 针对女性会出现痤疮, 或是乳腺退化和性欲改变等男性化现象; 男性患精巢癌、前列腺癌等的几率上升; 对儿童来说会使其生长发育过程受到影响, 造成儿童青春期提前, 或导致溶血症、黄疸等^[16-17]。

近年来激素残留事件频发, 因此许多国家和地区质检部门的注意力高度集中在动物源性食品的激素残留监测和管控上, 以此来确保消费者的安全和健康。欧盟、美国等都立法限制在动物源性食品中使用 MT 等性激素类兽药^[18]。自 20 世纪 80 年代以来, 能促进动物生长代谢的激素在欧洲畜牧业中被禁止使用。欧盟 95/22/EC 号指令规定禁止使用雄性激素兽药; 美国规定其同类的丙酸睾酮在肌肉中的最高残留限量为 0.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[19]。中国在 2001 年农业部实施的行业标准 NY 5070—2001《无公害食品水产品中渔药残留限量》中就将 MT 明确列为禁用药物; NY 5071—2002《无公害食品渔用药物使用准则》中已明确规定在水产品养殖中限用 MT; 2003 年农业部发布的 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》中也规定此种激素不得在任何动物的可食组织中被检出。2016 年中国国家质量监督检验检疫总局列出的法检项目中提出检验动物源性食品中的 MT 残留的要求^[20]。我国在 2019 年 12 月发布了

农业农村部 250 号公告《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》^[21]也明确规定甲基睾酮等化学合成类激素在食品中不得检出。

3 MT 残留检测的样品前处理方法

MT 残留检测的样品前处理主要步骤包括提取、浓缩和净化等。相较于植物性农产品而言,动物源性食品样品的基质成分更复杂,很多与 MT 在结构和理化性质上相似的物质都会对检测结果构成干扰,这使分离纯化除杂变得更困难,因此选择简便高效的前处理方法至关重要^[22]。

提取的基本原则是根据化合物的化学性质来选择适宜的提取溶剂,将 MT 从样品中提取到利于分析的试剂当中。理想的提取方法和提取溶剂既能确保 MT 的最大提取率,又能减少动物源性食品样品基质中的杂质。净化是清除样品中除了待测物质 MT 外的杂质。好的净化条件能够减少色素和脂肪等基质干扰、确保方法灵敏度、净化效果和回收率。本文详细介绍动物源性食品样品常用的净化和浓缩方法液-液萃取技术(liquid-liquid extraction, LLE)^[23]、固相萃取技术(solid phase extraction, SPE)^[7]等。MT 样品前处理的提取试剂、净化材料以及浓缩方法见表 1。

3.1 液-液萃取技术

液-液萃取技术是指加入一种适宜的溶剂,利用物质在两种互不相溶或微溶的溶剂中的溶解度差异,来进行分离的一种净化方法。激素类药物残留分析中常用的提取溶剂有甲醇、乙腈、丙酮、乙醚和乙酸乙酯等,基于溶剂自身特性和样品基质来说,甲醇、乙腈和丙酮易与样品结合、提取速度快,乙醚和乙酸乙酯适于提取脂溶性化合物,通常采用漏斗振荡或涡旋萃取两种方式^[7]。乙腈等有机溶剂常作为 MT

残留检测前处理中的提取剂,在提取的同时可沉淀蛋白,降低杂质对上机测定的干扰^[30]。在农业部颁的行业标准 SC/T 3029—2006《水产品中甲基睾酮残留量的测定 液相色谱法》中,采用的净化方式是用大量的石油醚和乙腈进行液-液萃取,但是由于液-液萃取操作耗时长、成本高、需要消耗大量的有机溶剂,会对操作人员的健康造成影响,因此后来的很多实验都在研究优化的萃取方式。

3.2 固相萃取技术

固相萃取技术是近年发展起来的一种样品前处理技术,也是 MT 的残留检测中较为常用的净化方法,主要是根据样品的极性来选择采用不同类型的固相萃取柱对样品进行净化,MT 为中性化合物且极性弱,利用选择性吸附和选择性洗脱的分离原理,可达到很好的分离效果。与传统的液-液萃取法相比,操作过程简便、省时省力。

在样品的前处理中,需要比较不同萃取柱的净化效果、实验结果的重现性和回收率来选择合适的萃取柱进行净化实验。黄鸾玉等^[24]优化净化方法,建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定水产品中 MT 残留物。试验比较 ODS-C₁₈ 柱(200 mg/3 mL)和 poly-sery HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL)对样品提取液的净化效果和回收率,HLB 柱回收率(90%)远高于 C₁₈ 柱的回收率(50%),因为前者中的二乙烯苯聚合物基质具有亲水和疏水基团,能使除杂效果更好。该法相比水产行业标准方法的前处理时间缩短。李佩佩等^[25]在样品前处理阶段比较正相的 Alumina-A 柱和 Alumina-N 柱和反相的 LC-C₁₈ 的净化效果和回收率。虽然 Alumina-A 柱的回收率最高(98%),但是基质影响大,净化效果不如最后选择的 LC-C₁₈ 柱。除此之外,一些改进的 SPE 技术如固相微萃取、基质分散固相萃取和磁性固相萃取等,能加强萃取的效果、提高回收率并且缩短前处理时间,正在逐渐应用起来。

表 1 MT 样品前处理提取试剂、净化材料和浓缩方法
Table 1 Pretreatment extraction reagent, purification material and concentration method of MT

药物名称	样品	提取试剂	净化材料	浓缩方法	参考文献
MT	猪肉	乙腈	C ₁₈ 固相萃取柱	40°C 氮吹	[7]
MT	水产品可食部分	乙醚	石油醚洗涤	40°C 水浴减压旋蒸	[20]
MT	罗非鱼、对虾和鳊鲶	乙醚	LC-C ₁₈ 固相萃取柱	50°C 氮吹	[24]
MT	草鱼、中华鳖和对虾	乙醚	LC-C ₁₈ 固相萃取柱	50°C 氮吹	[25]
MT	猪肉和鸡肉	甲醇-乙腈	C ₁₈ 固相萃取柱	37°C 氮吹	[26]
MT	草鱼	乙腈	正己烷去脂	氮吹	[27]
MT	中华鳖、罗非鱼、凡纳滨对虾	乙腈	C ₁₈ 固相萃取柱	40°C 水浴减压旋蒸	[28]
MT	猪肉、鱼、虾	80% 乙腈	HLB 固相萃取柱	45°C 氮吹	[29]

4 MT 的检测方法

为了确保动物源性食品在食用时的安全性, 需要对动物源性产品中 MT 残留的检测方法进行广泛研究。现阶段动物源性食品中 MT 残留检测方法主要有高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[31]、气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[32]、液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[33-35]、酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[36]、毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE)^[37] 和化学发光法^[38]。各种检测方法的检出限、回收率等见表 2。

4.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法可同时检测多种类固醇激素, 在甲基睾酮的检测中, 不受待测化合物沸点低和热稳定性差的限制, 可满足日常检测的需要, 是目前常用的方法^[31]。我国 SC/T 3029—2006 对水产品中可食部分甲基睾酮的检测应用了液相色谱方法。近些年来应用此检测方法发现, 此方法样品处理步骤繁多、检出限较高, 为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率低于 70%, 不适合用于批量检测。一些学者对其进行进一步的改良。彭家杰等^[43]参考 SC/T 3029—2006, 在前处理步骤中采用超声波密封提取来阻止溶剂挥发, 使提取效果更佳; 改良转移过程, 并且控制流动相中甲酸的最佳加入量来使灵敏度提高。用改进后的方法测定草鱼肌肉样品, 使甲基睾酮残留回收率提高至 78.5%~86.5%之间, 相对标准偏差 (relative standard deviations, RSDs) 为 1.8%~3.1%。黄

鸾玉等^[24]建立了一种适用于水产品中甲基睾酮测定的超高效液相色谱分析法。依据甲基睾酮结构式中有极性的羟基、羧基和非极性的碳环的特点来选择提取剂, 用乙腈-甲酸来构建酸性环境, 实现对水产品中甲基睾酮的提取和对蛋白质杂质的沉淀。这种超高效液相色谱分析方法检出限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率为 73.6%~91.4%, 相比 SC/T 3029—2006 的方法来说结果更满足检测需要。LI 等^[39]利用一种操作简便、溶剂消耗低、浓缩系数高的液-液微萃取方法, 结合 HPLC 建立了一种基于脂肪酸的酸碱诱导低共熔溶剂液-液微萃取方法 (deep eutectic solvent-dispersive liquid-liquid microextraction, DES-DLLME), 来测定牛奶样品中的睾酮和甲基睾酮, 此前处理方法不会破坏样品中的睾酮和甲基睾酮。该法的亮点在于使用了对环境友好的由薄荷醇和脂肪酸组成的疏水性低共熔溶剂, 并且回收率在 89.2%~108.2%之间。

高效液相色谱法检测动物源性食品中甲基睾酮残留的优点是准确度和灵敏度较高, 但是越来越多的研究发现该法净化效果差、仪器分析时间长, 存在一定限制, 逐渐被色谱与质谱联用法所取代。

4.2 色谱与质谱联用法

色谱与质谱联用分析法具有灵敏度和特异性高、实验数据可靠等优势, 目前已成为痕量药物检测的首选方法^[44], 常用液相色谱-质谱法来检测动物源性食品中性激素, 并且该方法的灵敏度高于液相色谱法^[45]。如 STOREY 等^[46]建立了一种简单可靠的 HPLC-MS/MS 分析鱼和虾中的甲基睾酮, 采用乙腈、对甲苯磺酸和四甲基-苯二胺二盐酸盐

表 2 甲基睾酮残留的检测方法、回收率、检出限及相对标准偏差

Table 2 Detection methods, recoveries, limits of detection and relative standard deviations of MT residues

药物名称	样品	检测方法	回收率/%	检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	相对标准偏差/%	参考文献
MT	水产品	UPLC	82.0~86.0	-	<7	[24]
MT	草鱼、中华鳖和 对虾	UPLC	68.7~90.7	10	2.09~5.87	[25]
MT	罗非鱼	UPLC-MS/MS	71.06~83.06	0.4	7.4~15.3	[28]
MT	草鱼	HPLC	78.5~86.5	-	1.8~3.1	[29]
MTMT	牛奶	HPLC	89.2~108.2	0.2	-	[33]
MT	猪肉、牛肉、鸡 蛋和牛奶	LC-MS/MS	66.3~114.5	0.15	3.6~15.7	[39]
MT	中华鳖、罗非鱼、 凡纳滨对虾	HPLC-MS/MS	82.4~96.3	0.5	<6.98	[40]
MT	罗非鱼、鲫鱼、 甲鱼和对虾	ELISA	80	0.31	4.46~13.14	[41]
MT	水产品	GICA	-	10	-	[42]

注: -表示未报道; 超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS); 高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS); 胶体金免疫层析 (colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)。

进行双重萃取,该方法前处理简单,而且成本低廉、灵敏度高。毛发也可作为一种易于收集的基质来分析动物体内的合成类固醇,同时避免给动物带来痛苦,REGAL 等^[47]采用 HPLC-MS/MS 测定牛毛发中 MT 的含量,可以帮助更准确和灵敏地控制这种生长促进剂在动物源性食品中的使用,该方法的检出限小于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。畜牧业中有多种兽药和激素在使用,它们的理化性质各异,开发对同一动物源性食品样本的多类兽药激素残留筛查是必要的。刘桂华等^[40]利用 LC-MS/MS 同时测定猪肉、牛肉、鸡蛋和牛奶中 20 种性激素残留,内标法定量,测得样品中 MT 的检出限为 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。郝杰等^[29]利用固相萃取法结合 UPLC-MS/MS 同时检测猪肉、鱼、虾等动物源性食品中多种兽药残留,外标法定量。测得猪肉、淡水鱼、虾样品 MT 的回收率分别为 81.0%~86.4%、76.5%~89.8%、81.4%~89.4%。本方法极大地提高了多残留兽药激素的检测效率,适用于食品安全突发事件应急处理中多残留兽药的快速分析。杨霄等^[48]建立了分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法,MT 在 1~200 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好,方法的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。罗非鱼、中华鳖、凡纳滨对虾 3 个样品的回收率为 82.4%~96.3%,RSDs 均不大于 6.98%。张再永等^[49]建立了通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉和牛肉中 9 种类固醇激素的方法。MT 在猪肉基质中加标回收率为 92%~100.8%,RSDs 为 1.17%~1.59%,在牛肉基质中加标回收率为 89.0%~96.4%,RSDs 为 2.15%~2.17%。该方法的前处理提取率高和灵敏度高,重复性好,也可为其他动物源性食品中类固醇激素含量的测定提供参考。

尽管液相色谱-质谱法具有灵敏度高、能同时检测多种激素残留的优点,但其操作复杂、分析时间长、设备成本高,导致其在基层检测中难以普及,不符合当今追求的检测快速、简洁和现场化的要求。

4.3 免疫分析方法

免疫分析方法具有较好的选择性和灵敏度,并且其操作简便快速,可用于大批量样品的筛查检测,在 MT 的检测中有广泛的应用^[50]。该法基于抗原和抗体之间的分子识别以形成稳定的复合物,WANG 等^[36]通过细胞融合获得细胞系,该细胞系能够分泌一种与 MT 有高度亲和力的抗体细胞系分泌一种与 MT 有高度亲和力的抗体,基于此抗体建立了一种快速便捷且经济友好的免疫层析法,可以用于牛奶样品中 MT 的检测。KONG 等^[51]利用直接竞争性酶联免疫方法和胶体金免疫层析法测定鱼饲料和猪饲料中的 MT,得到动物饲料中 MT 的回收率为 82.4%~100.6%,与气相色谱-质谱法结果一致。外国研发

出的 MTELISA 试剂盒可用于检测尿液中的 MT 残留,美国 Kernel 试剂盒和德国 RIDASCREEN 试剂盒的灵敏度分别为 0.1 和 0.2 ng/mL 。不过现有关于 MT 的 ELISA 检测对象多为血液、尿液或毛发,针对养殖畜禽及水产品中 MT 残留量测定的比较少。王强等^[41]建立了一种间接竞争酶联免疫吸附法来检测鱼虾样品中的 MT 残留,最低检出限为 0.31 $\mu\text{g}/\text{L}$,同国外商用试剂盒灵敏度相当,水产样品加标回收率为 81.02%~103.19%,RSDs 为 4.46%~13.14%,测定结果与液相色谱-质谱法具有良好的相关性($r=0.9971$)。夏武强等^[42]利用 GICA 技术研究制备出了可以快速检测水产品中 MT 的胶体金试纸条。将待测样品中的 MT 和试纸条检测线上包被的人工抗原,与金标结合垫上包被的胶体金-MT 单抗聚合物进行竞争性结合,根据检测线呈现的红色线条深浅来判定样品的阴阳性,试纸条的最低检出限达到 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并且检测时间整体仅需 10~15 min,可用于大规模样品筛选。免疫分析技术可以更精确地开展定性、定量分析,弥补了理化检测的不足。

4.4 其他检测技术

除了上述介绍的常规检测方法外,还有一些利用其他检测设备对 MT 进行检测的方法。如毛细管电泳法^[35]、电化学分析法^[52]等,这些改良的新型技术具有准确、灵敏、重复性好的特点。毛细管电泳法依据样品在毛细管中迁移速率和分配系数不同来进行 MT 与物质的快速分离,是一种快速,分离力强的高效液相分离技术^[35]。电化学分析法是一种操作简单、灵敏度高的分析方法,GOYAL 等^[52]应用于 MT 及其异构体表睾酮检测的电化学方法是方波溶出伏安法,经过裸碳纳米管修饰后的电极对 MT 及其异构体的电化学响应显著提高,检出限为 2.8 nmol/L ,测定结果与高效液相色谱法分析结果基本一致。但是电化学方法重现性差、易受到样品基质的干扰,因此需要做的是增强方法重现性和抗干扰能力。

检测 MT 的理想方法应该是快速、简单、成本低且易于执行的,随着检测技术的不断进步,越来越多的新技术在 MT 残留检测方向也展现出更加广泛的应用前景。动物源性食品中 MT 残留检测方法及优缺点汇总见表 3。

5 结束语

MT 被用在动物源性食品中可以提高饲料转化率,能够促进蛋白质合成和动物生长速率。但是滥用 MT 会造成其残留在动物源性食品中,即使微小的量也会对人体产生严重的侵害,诸如头痛、胸闷、心悸、肌肉疼痛、脱发、内分泌失调等^[53],因此食品安全检验中的 MT 残留检测就显得尤为重要。

表 3 MT 残留检测方法及优缺点
Table 3 MT residues detection methods and their advantages and disadvantages

方法名称	检测原理	优点	缺点
HPLC	利用待测组分在固定相与流动相之间溶解度的差异来分离	准确度和灵敏度较高	净化效果差; 仪器分析时间长; 回收率低
GC-MS	利用待测组分在两相间溶解差异来分离, 质谱再将各成分电离成碎片来进行定性	灵敏度高	需对分析物进行衍生化, 结果不稳定
LC-MS	利用待测组分在两相间溶解差异来分离, 质谱再将各成分电离成碎片来进行定性	操作简便、快速; 灵敏度高	成本高
ELISA	抗体与抗原的特异性反应, 结合各种标记技术, 进行定量或定性检测	灵敏度高; 操作简单	易出现假阳性

目前国内关于高效准确检测 MT 在动物源性食品中残留的研究尚不完善, 有待于进一步的开发和探索。对于 MT 的前处理方法, 相较于 SC/T 3029—2006 中液-液萃取技术, 现在更常用的是能减少溶剂消耗, 有效降低样品基质效应的固相萃取技术。目前用于动物源性食品中 MT 的检测方法各存在优缺点, 高效液相色谱法仪器成本效益高, 可满足日常检测的需要, 但是前处理步骤复杂、耗时长、不适合批量检测, 灵敏度和准确度都达不到理想条件, 逐渐被质谱仪器所取代; 液相色谱-质谱法前处理方法简单、灵敏度高、稳定性好, 能快速高效地检测动物源性食品中多组分激素的残留, 但是仪器价格昂贵, 不能普遍使用^[54]。气相色谱-质谱法具有灵敏度高、实验数据可靠等优点, 在准确鉴定化合物结构的同时也可进行定量分析, 但需要对分析物进行衍生化, 这可能导致结果不稳定。酶联免疫吸附法是公认的操作简便、快速的检测方法, 适用于检测常见、单一的性激素, 具有特异性强、灵敏、简便、准确和样品通量高等优点, 但缺点是易出现假阳性, 只能用作初步筛查。时代发展对 MT 相应的配套检测技术性能也提出了更高的要求, 快速、准确、高灵敏和高通量已成为发展的趋势, 因此仍需要深入研究动物源性食品中 MT 的残留量检测技术, 来使该检测技术更加完善。

参考文献

[1] 吴长青, 冯俊, 沈泡, 等. 动物源性食品中抗生素残留的分类及检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(21): 7126-7132.
WU CQ, FENG J, SHEN P, *et al.* Research progress on classification and detection methods of antibiotic residues in animal-derived foods [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(21): 7126-7132.

[2] WEBER GM, LEEDS TD. Effects of duration and timing of immersion in 17 α -methyltestosterone on sex reversal of female rainbow trout [J]. *Aquac Rep*, 2022, 23: 101014.

[3] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
LI JS, QIU MY, WANG C. Analysis of veterinary drug residues [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2002.

[4] 农业部. 国家禁用渔药说明[EB/OL]. [2009-04-12]. http://www.Shouyaowang.cn/new_view.asp?id=9061 [2022-03-25].

Ministry of Agriculture. Description of national prohibited fishery drugs [EB/OL]. [2009-04-12]. http://www.Shouyaowang.cn/new_view.asp?id=9061 [2022-03-25].

[5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号 [EB/OL]. [2002-12-24]. http://www.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm [2022-03-25].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No.35 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [EB/OL]. [2002-12-24]. http://www.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm [2022-03-25].

[6] KIMERGARD A, MCVEIGH J. Environments, risk and health harms: A qualitative investigation into the illicit use of anabolic steroids among people using harm reduction services in the UK [J]. *BMJ Open*, 2014, 4(6): e005275.

[7] 朱臻怡, 魏云计, 何正和. 饲料中激素类药物及其检测技术研究进展 [J]. 化学分析计量, 2021, 30(1): 96-103.
ZHU ZY, WEI YJ, HE ZH. Research progress of hormone drugs and detection technology in feed [J]. *Chem Anal Meter*, 2021, 30(1): 96-103.

[8] POPRH G, WOOD RI, ROGOL A, *et al.* Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: An endocrine society scientific statement [J]. *Endocr Rev*, 2013, 35(3): 341-375.

[9] 韩超男, 李秀琴, 逯海, 等. 同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中类固醇激素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1669-1675.
HAN CN, LI XQ, LU H, *et al.* Determination of steroid hormones in milk by isotope dilution-ultra performance chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(7): 1669-1675.

[10] LIU S, XU P, LIU X, *et al.* Production of neo-ale mandarin fish *Siniperca chuatsi* by masculinization with orally administered 17 α -methyltestosterone [J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735904.

[11] 周家辉, 杜金星, 姜鹏, 等. 17 α -甲基睾酮对大口黑鲈生长及性腺发育的影响 [J]. 中国水产科学, 2021, 28(9): 1109-1117.
ZHOU JH, DU JX, JIANG P, *et al.* Effects of 17 α -methyltestosterone on growth and sex differentiation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *J Fish Sci China*, 2021, 28(9): 1109-1117.

[12] 姜巨峰, 刘克明, 李春艳, 等. 饲料中甲基睾酮含量对阿里雌鱼生长及体色的影响 [J]. 水产科学, 2022, 41(3): 445-451.
JIANG JF, LIU KM, LI CY, *et al.* Effects of dietary methyltestosterone on growth and body pigmentation of female *Sciaenochromis fryeri* [J]. *Fish Sci*, 2022, 41(3): 445-451.

[13] 沈诚, 徐昆龙, 代佳和, 等. 甲基睾酮在动物源性食品中残留危害及检测方法的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (7): 70-73.

- SHEN C, XU KL, DAI JH, *et al.* Research progress on the hazard from methyltestosterone residues in animal-derived food and its detection method [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017, (7): 70–73.
- [14] GAGLIANO-JUCÁ T, BASARIA S. Abuse of anabolic steroids: A dangerous indulgence [J]. *Curr Opin Endocr Metab Res*, 2019, 9: 96–101.
- [15] GAO J, LIU S, ZHANG Y, *et al.* Effects of 17 α -methyltestosterone on transcriptome, gonadal histology and sex steroid hormones in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. *Comp Biochem Physiol D*, 2015, 15: 20–27.
- [16] BISWAS A, BEHERA S, DAS P, *et al.* Effect of methyl testosterone (17 α -MT) on the phenotype, bioindices and gonads of adult male dwarf Gourami (*Colisalaria*) [J]. *Emir J Food Agric*, 2014. DOI: 10. 9755/ejfa. v26i5. 16365
- [17] 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 XD, HUANG X, HAO BC, *et al.* Harm and detection method of sex hormone residues in animal-derived food [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2015, (21): 274–277.
- [18] MATRASZEK-ZUCHOWSKA I, WOZNIAK B, SIELSKA K, *et al.* Determination of selected testosterone esters in blood serum of slaughter animals by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Steroids*, 2020, 163: 108723.
- [19] MASIA A, SUAREZ-VARELA MM, LLOPIS-GONZALEZ A, *et al.* Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 936: 40–61.
- [20] 周迎春, 王林裴, 刘少博, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中甲基睾酮残留量[J]. *肉类研究*, 2017, 31(9): 63–68.
- ZHOU YC, WANG LP, LIU SB, *et al.* Determination of methyl testosterone residues in foods of animal origin using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Meat Res*, 2017, 31(9): 63–68.
- [21] 中华人民共和国农业部农村部公告第 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]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202001/t20200106_6334375.htm [2022-01-20].
- Announcement No.250 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. List of drugs and other compounds prohibited for use in food animal [EB/OL]. [2020-01-06]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202001/t20200106_6334375.htm [2022-01-20].
- [22] 王玉梅, 孙健, 于泓, 等. 动物源性食品中兽药残留检测技术的研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(6): 414–417.
- WANG YM, SUN J, YU H, *et al.* Research progress on detection of veterinary drug residues in animal-derived foods [J]. *Food Ind*, 2021, 42(6): 414–417.
- [23] 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 LD, XU XL, YUAN F, *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 Sci*, 2017, 38(22): 291–297.
- [24] 黄鸾玉, 蒙源, 庞燕飞, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮残留物[J]. *理化检验-化学分册*, 2018, 54(3): 345–348.
- HUANG LY, MENG Y, PANG YF, *et al.* Determination of methyltestosterone residues in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2018, 54(3): 345–348.
- [25] 李佩佩, 梅光明, 张小军, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中的甲基睾酮残留量[J]. *食品科学*, 2012, 33(22): 282–285.
- LI PP, MEI GM, ZHANG XJ, *et al.* SPE-HPLC determination of 17 α -methyltestosterone residues in aquatic products [J]. *Food Sci*, 2012, 33(22): 282–285.
- [26] 万译文, 伍远安, 洪波, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮药物残留[J]. *湖南饲料*, 2013, 20(5): 13–16.
- WAN YW, WU YAN, HONG B, *et al.* Determination of methyltestosterone residues in aquatic products by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Hunan Feed*, 2013, 20(5): 13–16.
- [27] 张家华, 方炳虎, 王敏儒. 猪肉和鸡肉中 11 种同化激素残留超高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(4): 48–53.
- ZHANG JH, FANG BH, WANG MR. Determination of eleven anabolic steroids in pork and chicken by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Progress Vet Med*, 2021, 42(4): 48–53.
- [28] 陈培基, 李刘冬, 邹琴, 等. 高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮残留量的优化研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 223–226.
- CHEN PJ, LI LD, ZOU Q, *et al.* HPLC determination of 17 α -methyltestosterone residue in aquatic products [J]. *Food Sci*, 2010, 31(6): 223–226.
- [29] 郝杰, 姜洁, 余建龙, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中多种兽药残留[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 266–272.
- HAO J, JIANG J, YU JL, *et al.* Simultaneous determination of multi-veterinary drug residues in animal-origin food by solid phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2017, 38(12): 266–272.
- [30] 姚汶励, 姜鹏, 白俊杰. 17 α -甲基睾酮对草鱼性腺发育及性类固醇激素水平的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 801–809.
- YAO WL, JIANG P, BAI JJ. Effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal development and hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *J Fish China*, 2019, 43(4): 801–809.
- [31] 张惠峰, 蔡天华. 高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮残留量的不确定度评定[J]. *食品科学*, 2015, 36(18): 199–203.
- ZHANG HF, QI TH. Uncertainty evaluation for determination of methyltestosterone residue in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2015, 36(18): 199–203.
- [32] ZHANG Y, WU X, WANG W, *et al.* Simultaneous detection of 93 anabolic androgenic steroids in dietary supplements using gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2022, 211: 114619.
- [33] LOPEZ-GARCIA M, ROMERO-GONZALEZ R, FRENICH AG, *et al.* Determination of steroid hormones and their metabolite in several types of meat samples by ultra high performance liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1540: 21–30.
- [34] 牛晋阳, 孙焕, 李莹莹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 10 种类固醇类激素残留[J]. *食品科学*, 2010, 31(4): 230–232.
- NIU JY, SUN H, LI YY, *et al.* High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric determination of steroid hormone multi-residues in pork [J]. *Food Sci*, 2010, 31(4): 230–232.
- [35] 祝璟琳, 杨弘, 肖炜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定罗非鱼肌肉中甲基睾酮残留[J]. *食品科学*, 2011, 32(22): 243–247.
- ZHU JL, YANG H, XIAO W, *et al.* Determination of methyltestosterone residue in tilapia muscle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. *Food Sci*, 2011, 32(22): 243–247.
- [36] WANG Z, ZOU S, XING C, *et al.* Preparation of a monoclonal antibody against testosterone and its use in development of an immunochromatographic assay

- [J]. Food Agric Immunol, 2016. DOI: 10. 1080/09540105. 2015. 1137276
- [37] LOBATO A, PEREIRA EA, GONCALVES LM. Combining capillary electro migration with molecular imprinting techniques towards an optimal separation and determination [J]. Talanta, 2021, 221: 121546.
- [38] 王兴胜, 郑海涛, 文立. 睾酮电化学检测的研究进展[J]. 分析测试学报, 2012, 31(2): 234-240.
- WANG XS, ZHENG HT, WEN L. Research progress in electrochemical determination of testosterone [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(2): 234-240.
- [39] LI X, YUAN T, ZHAO T, *et al.* An effective acid-base-induced liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents for determination of testosterone and methyltestosterone in milk [J]. J Chromatogr Sci, 2020, (9): 9.
- [40] 刘桂华, 秦伟, 刘红河, 等. LC-MS/MS同时测定动物源性食品中20种游离态性激素残留[J]. 卫生研究, 2013, 42(1): 61-66.
- LIU GH, QIN W, LIU HH, *et al.* Simultaneous analysis the residues of 20 hormones in foods of animal origin by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Hyg Res, 2013, 42(1): 61-66.
- [41] 王强, 王旭峰, 黄珂, 等. 酶联免疫吸附法测定水产品中甲基睾酮残留[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 303-308.
- WANG Q, WANG XF, HUANG K, *et al.* Determination of methyltestosterone residue in aquatic products by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Mod Food Sci Technol, 2015, 31(5): 303-308.
- [42] 夏武强, 胡叶军, 孙琛, 等. 甲基睾酮免疫胶体金试纸条的研制及在水产品中的应用[J]. 淡水渔业, 2016, 46(1): 93-98.
- XIA WQ, HU YJ, SUN C, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for methyltestosterone residue in aquatic products [J]. Fresh Water Fish, 2016, 46(1): 93-98.
- [43] 彭家杰, 李绪鹏, 胡浩光, 等. 高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮残留量前处理方法的改进[J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(2): 56-60.
- PENG JJ, LI XP, HU HG, *et al.* Improvements on pre-treatment method of the determination of methyltestosterone residues in aquatic products by HPLC [J]. Chin Fish Qual Stand, 2014, 4(2): 56-60.
- [44] 尹伶俐, 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 LL, YANG XZ, CHEN L, *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]. J Food Saf Qual, 2019, 10(10): 3078-3084.
- [45] 周秋玲, 娄婷婷, 王素英, 等. 动物源性食品中性激素检测方法的比较分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 183-189.
- ZHOU QL, LOU TT, WANG SY, *et al.* Comparative analysis of detection methods of gonadal hormone in animal derived food [J]. Food Res Dev, 2018, 39(9): 183-189.
- [46] STOREY JM, CLARK SB, JOHNSON AS, *et al.* Analysis of sulfonamides, trimethoprim, fluoroquinolones, quinolones, triphenylmethane dyes and methyltestosterone in fish and shrimp using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2014, 972: 38-47.
- [47] REGAL P, NEBOT C, VAZQUEZ BI, *et al.* Determination of the hormonal growth promoter 17 α -methyltestosterone in food-producing animals: Bovine hair analysis by HPLC-MS/MS [J]. Meat Sci, 2010, 84(1): 196-201.
- [48] 杨霄, 索纹纹, 洪波, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲基睾酮的残留量[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 150-152.
- YANG X, SUO WW, HONG B, *et al.* Determination of methyltestosterone residue in aquatic products by dispersive solid-phase extraction and performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Jiangsu Agric Sci, 2018, 46(5): 150-152.
- [49] 张再永, 马俊美, 李强, 等. 通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉和牛肉中9种类固醇激素[J]. 肉类研究, 2020, 34(7): 58-63.
- ZHANG ZY, MA JM, LI Q, *et al.* Determination of 9 steroid hormones in pork and beef samples by filtration solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Meat Res, 2020, 34(7): 58-63.
- [50] 赵冬艳, 王彩萍, 丁超梦. 甲基睾酮检测方法的研究进展[J]. 广州化工, 2016, 44(21): 20-22.
- ZHAO DY, WANG CP, DING CM. Research progress on detection method for methyl testosterone [J]. Guangzhou Chem Ind, 2016, 44(21): 20-22.
- [51] KONG N, SONG S, PENG J, *et al.* Sensitive, fast, and specific immunoassays for methyltestosterone detection [J]. Sensors, 2015, 15(5): 10059-10073.
- [52] GOYAL RN, GUPTA VK, CHATTERJEE S. Electrochemical investigations of corticosteroid isomers-testosterone and epitestosterone and their simultaneous determination in human urine [J]. Anal Chim Acta, 2010, 657(2): 147-153.
- [53] 钱琛, 李静, 陈桂良. 动物源性食品兽药残留分析中样品前处理方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1666-1674.
- QIAN C, LI J, CHEN GL. Research progress of sample preparation methods in veterinary drug residue analysis for animal-derived foods [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1666-1674.
- [54] 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 F, MO WD, DUAN YL, *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]. J Food Saf Qual, 2019, 10(8): 2247-2257.

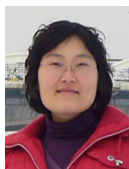
(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



尚晓睿, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量安全研究。

E-mail: 596770492@qq.com



黄冬梅, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全研究。

E-mail: hdm2001@126.com