

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.06.012

超高液相色谱-串联质谱法测定贝类组织中环境雄激素睾酮的前处理方法优化

付梅¹, 申春琴¹, 汪政希¹, 刘梅²,
姚维志¹, 原居林², 彭希文¹, 吕红健¹

1. 西南大学 水产学院/淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室/农业农村部长江上游水生生物多样性保护研究中心, 重庆 400715;
2. 浙江省淡水水产研究所/农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江 湖州 313001

摘要: 环境雄激素属于典型的内分泌干扰物, 不仅干扰生物内分泌系统导致其生长发育受阻, 还会对人体健康和生态安全造成威胁。为快速测定贝类组织中典型雄激素睾酮的质量浓度, 分别在 4 种提取剂乙腈、乙酸乙酯、叔丁基甲醚、正己烷-二氯甲烷(1:1)及 3 种净化方法超低温冷冻离心、超低温冷冻离心-净化剂、超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱条件下提取河蚬组织中的睾酮, 通过比较其回收率, 优化超高液相色谱-串联质谱法测定睾酮的前处理方法。结果表明: 4 种提取剂中乙酸乙酯对睾酮提取效果最好, 回收率高达 101.6%; 提取液经超低温(-80 °C)冷冻离心法净化后回收率最高, 且操作简便。在此优化条件下, 睾酮在质量浓度为 0.05~1.00 μg/mL 范围内与对应的峰面积呈现良好的线性正相关关系($R^2=0.9989$), 检出限为 6.25 ng/g, 定量限为 20 ng/g。不同添加水平的加标回收率为 66.4%~101.1%, 相对标准偏差为 2.3%~11.6%。经本研究优化后的前处理方法, 操作简便、重现性好、稳定性高, 具有良好的准确度和精密度, 适用于贝类样品中睾酮的提取分析。

关键词: 睾酮; 超高液相色谱-串联质谱法; 前处理方法;

乙酸乙酯; 河蚬

中图分类号: S985.3; X592

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2023)06-0116-09

Optimization of Sample Pretreatment for Determination of Testosterone in Shellfish by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

FU Mei¹, SHEN Chunqin¹, WANG Zhengxi¹, LIU Mei²,
YAO Weizhi¹, YUAN Julin², PENG Xiwen¹, LYU Hongjian¹

收稿日期: 2022-05-07

基金项目: 浙江省淡水水产研究所开放课题(ZJK202115); 国家重点研发计划项目(2022YFC3204200); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202110635013)。

作者简介: 付梅, 博士, 副教授, 主要从事水生生态毒理学、水生生物资源与环境保护研究。

通信作者: 彭希文, 讲师。

1. College of Fisheries, Southwest University/Key laboratory of Fish Reproduction and Development, Ministry of Education/Conservation and Research Center for Aquatic Biodiversity in the Upper Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 400715, China;
2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries/Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Huzhou Zhejiang 313001, China

Abstract: In the present study, the recoveries of testosterone from *Corbicula fluminea* extracted with acetonitrile, ethyl acetate, tert-butyl methyl ether and hexane-methylene chloride (1 : 1) mixture were compared. The effects of three purification methods of ultra-low temperature refrigerated centrifugation, ultra-low temperature refrigerated centrifugation with purifying agent, and ultra-low temperature refrigerated centrifugation with HLB solid phase extraction column on the recovery of testosterone from *Corbicula fluminea* were researched to optimize the pretreatment method for determination of testosterone in shellfish by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results showed that ethyl acetate had the best extracting effect among the four extracting agents, with a recovery of 101.6%. Among three purification methods, ultra-low temperature ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) refrigerated centrifugation had the highest recovery rate. There was a good linear relationship between testosterone concentration and the peak area in the range of $0.05\sim 1.00\text{ }\mu\text{g/mL}$, with the correlation coefficients all above 0.998 9. The limit of detection was 6.25 ng/g , and the limit of quantitation was 20 ng/g . The average recoveries for testosterone at three concentration levels were $66.4\%\sim 101.1\%$, with the relative standard deviation between $2.3\%\sim 11.6\%$. The pretreatment method was easy to operate, also accurate and precision. It was suitable for the extraction of testosterone from shellfish.

Key words: testosterone; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; sample pretreatment; ethyl acetate; *Corbicula fluminea*

环境雄激素作为一类典型的内分泌干扰物, 不仅会干扰生物体的内分泌系统导致其生长发育受阻, 同时还会影响微生物群落的结构与功能^[1-2], 并对人体健康和生态安全造成威胁. 环境中的雄激素主要来源于动物的分泌物和激素药物的使用^[1,3-4]. 研究发现, 环境雄激素主要通过城市污水处理厂、畜禽养殖场、造纸厂及水产养殖场等废水排放进入水环境, 可蓄积在水生生物体内, 并沿食物链进行传递, 进而对水域生态系统和人体健康造成危害^[1,3-4]. 贝类作为水生食物网尤其是底栖食物网的重要组成部分之一, 对水域生态系统的物质循环和能量流动具有重要的作用^[5-6]; 同时, 贝类因口味鲜美、营养价值高, 深受消费者的喜爱. 睾酮 (Testosterone), 又称睾丸素、睾丸酮, 是生物体内含量最高、最重要的雄激素, 也是一种主要的环境雄激素^[1]. 开发一种测定贝类组织中睾酮质量浓度的前处理方法, 有助于贝类组织中类固醇激素的定量分析, 可为研究类固醇激素污染物在底栖食物网中的迁移转化与贝类水产品质量安全监管提供方法基础与技术支持.

生物体内类固醇激素测定的效率与稳定性受检测方法的影响. 目前, 水产品中雄激素定量分析常用的检测方法主要有酶联免疫法^[7]、高效液相色谱法^[8-9]、气相色谱-质谱法^[10-13]、液相色谱-串联质谱法^[14-18]等. 酶联免疫法容易出现交叉反应及假阳性, 重复性较差^[19-20]; 高效液相色谱法抗干扰能力差, 且灵敏度不能满足检测的要求^[14]; 气相色谱-质谱法具有高灵敏度和选择性, 但往往需要对待测物进行衍生化处理, 耗时长、操作繁琐且结果不稳定^[10,17,19]. 相对而言, 液相色谱-串联质谱法具有高通量、高选择性、高灵敏度、定性准确、无需繁琐的衍生化操作等优势, 能更高效地提取目标物、去除杂质、减少干扰, 近年来在性激素类污染物的检测分析中应用广泛^[18,21]. 故本研究拟采用超高液相色谱-串联质谱法测定目标激素, 并对样品前处理方法进行优化.

前处理方法中样品的提取与净化对水产品中类固醇激素测定的回收率、稳定性等具有较大的影响. 陈秋华等^[22]在筛查水产品 16 种激素残留的研究中发现, 提取剂和吸附剂的种类和使用量均会影响目标化合

物的回收率。通常用于提取动物组织中激素物质的溶剂有乙酸乙酯、甲醇、正己烷、叔丁基甲醚、二氯甲烷、乙腈、乙醚等及其混合溶液^[23-26]，但由于目标激素和基质差异，样品前处理提取剂的选择并无统一结论，因此针对贝类中特定激素测定需进行提取剂的优化筛选。样品经过提取和富集后，常采用液相萃取除脂法^[27-29]、固相萃取柱净化法^[24,30-31]、净化剂净化法^[17,22,32]、超低温冷冻离心除脂法^[19,33-34]等去除样品基质中的脂肪、蛋白质等杂质，从而降低干扰，提高方法的检出限，并延长仪器的使用寿命^[23]。黄鸾玉等^[19]认为，除脂是水产品前处理必不可少的步骤，且除脂方法以及固相萃取柱的选择都会影响净化效果。李佩佩等^[35]在测定水产品中甲基睾酮的残留时发现，石油醚作为除脂溶剂，易残留，会对目标物造成严重干扰，因此，除脂净化方法直接影响贝类中雄激素的回收率。冷冻离心除脂法因操作简便、净化效果好、待测激素损失较低^[18,36]，常单独或与其他方法结合使用，被广泛应用于各种基质中激素物质的净化。本研究拟在超低温冷冻离心的基础上，结合净化剂^[37-38]和固相萃取柱^[19]，探寻适用于贝类的高效率净化方法。

水产品中类固醇激素的检测研究对象多为鱼类和甲壳类，贝类中的类固醇激素测定的研究鲜见报道^[17,39]，因此，本研究拟以典型雄激素睾酮作为目标化合物，利用超高液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)，对贝类-河蚬(*Corbicula fluminea*)样品前处理方法中的提取和净化等条件进行优化，以期得到较为理想的贝类雄激素测定前处理方法。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与amp;仪器

睾酮，北京索莱宝科技有限公司；睾酮-d₃，SUPELCO 公司，纯度均大于 98.0%。甲醇、丙酮、乙酸乙酯、乙腈、正己烷、二氯甲烷，Honeywell 公司；甲酸，CNW 公司；叔丁基甲醚，Alfa Aesar 公司，以上有机试剂均为色谱纯试剂。中性氧化铝(FCP100-200 目)，上海泸试实验室器材股份有限公司；无水硫酸镁(99.95%)，无水硫酸钠(99.95%)，上海麦克林生化科技有限公司，均为分析纯。N-丙基乙二胺(PSA)，杭州微米派科技有限公司；高纯氮气，重庆启迪气体有限公司；Poly-sery HLB(Hydrophilic and Lipophilic Balance)固相萃取柱，CNW 公司。

1.2 标准曲线的配制

用乙腈将 4.00 mg/L 的睾酮标准储备溶液逐级稀释，配制成 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 μg/mL 的标准溶液，混匀后测定，以质量浓度为横坐标，以色谱图峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3 样品前处理

1.3.1 样品的制备

实验所用河蚬购自重庆市开州区某养殖场，剖取软体组织于离心管中，组织捣碎机捣碎并充分匀浆，-20℃保存备用。

1.3.2 睾酮的提取

目标提取物睾酮为弱极性化合物，本研究分别选用乙酸乙酯、乙腈、叔丁基甲醚、正己烷-二氯甲烷(1:1)4 种提取剂提取睾酮，具体步骤如下：

准确称取(1.00±0.02) g 匀浆试样于研钵中(3 重样)，加入 5 g 预烘(110℃, 12 h)后的无水硫酸钠，研磨至生物样品不粘在研钵上，静置 30 min 后，转移至 50 mL 离心管中，并用 5 mL 提取剂润洗研钵和研磨杵，全部转移至离心管中；加入 0.5 mL 质量浓度为 1 μg/mL 的睾酮-d₃，混匀；向离心管中再次加入提取剂 5 mL；涡旋振荡提取 5 min 后，超声 10 min；再次涡旋振荡 5 min 后，静置提取 1 h；于 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 后将上清液转移至新的 50 mL 离心管中；残渣用 5 mL 提取剂重复提取 2 次，合并上清液(共 20 mL)，待净化。

针对不同提取剂进行回收率比较分析时，统一采用超低温冷冻离心法净化样品。

1.3.3 净化

超低温冷冻离心：将上清液于-80℃冷冻 1 h；解冻后，于 4℃ 10 000 r/min 离心 8 min；准确移取 5 mL 上清液于玻璃试管中，氮吹至近干，取乙腈和 0.1% 甲酸水溶液(9:1)复溶后，定容至 1 mL；过 0.22 μm 有机滤膜，UPLC-MS/MS 测定。

超低温冷冻离心-净化剂:将上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 1 h;解冻后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 8 min;准确移取 10 mL 上清液于已加入净化剂(0.5 g 无水硫酸镁,0.5 g 中性氧化铝和 0.2 g PSA)的离心管中,涡旋混匀 5 min,以 10 000 r/min 离心 5 min 后准确移取 5 mL 上清液于玻璃试管中,氮吹至近干,取乙腈和 0.1% 甲酸水溶液(9:1)复溶后,定容至 1 mL;过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜,UPLC-MS/MS 测定。

超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱:预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水先后缓慢通过 HLB 固相萃取柱使其充分活化;将上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 1 h;解冻后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 8 min;准确移取 5 mL 上清液于玻璃试管中,氮气吹干后加入 3 mL 甲醇溶解残渣,并将其转至 15 mL 离心管中;再用 7 mL 纯水润洗玻璃试管,合并至离心管中,混匀;取甲醇溶液层以小于 2 mL/min 的流量通过预先活化的 HLB 固相萃取柱上样,弃去滤液;再用 6 mL 的 20% 甲醇溶液通过 HLB 固相萃取柱进行淋洗,弃去流出液,抽吸 HLB 固相萃取柱至近干;用 4 mL 的 90% 甲醇溶液对 HLB 固相萃取柱进行洗脱,收集洗脱液;将洗脱液在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干后,取乙腈和 0.1% 甲酸水溶液(9:1)充分复溶,定容至 1 mL;过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜,UPLC-MS/MS 测定。

1.4 UPLC-MS/MS 条件

采用 Waters UPLC-Q-TOF-MS ACQUITY UPLC 系统在灵敏模式下用正电喷雾(ESI^+)离子源对睾酮定量.色谱柱为 ACQUITY BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm,1.7 μm),睾酮进样体积为 1 μL ,恒定流速为 0.4 mL/min;流动相由 0.1% 甲酸溶液(A)和乙腈(B)组成;去溶剂化温度和离子源温度分别为 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$,锥形和去溶剂化的流速分别为 50 L/h 和 800 L/h;毛细管电压和锥形电压分别为 3 000 V 和 40 V,MS 碰撞能量范围为 20~40 eV(图 1)。

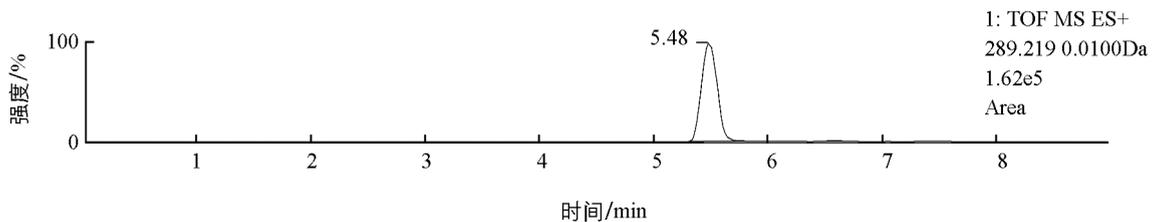


图 1 乙酸乙酯提取睾酮的多反应监测色谱图

1.5 数据处理

对实验所得数据用 Microsoft Excel 2019 进行处理。

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择

本研究考察了乙酸乙酯、叔丁基甲醚、正己烷-二氯甲烷(1:1)、乙腈 4 种提取剂对贝类-河蚬组织中睾酮的提取效果.由表 1 可知,乙酸乙酯作为提取剂回收率最高,达 101.6%,叔丁基甲醚、正己烷-二氯甲烷(1:1)、乙腈对睾酮的提取回收率相当,在 84.8%~89.4%之间.4 种提取剂中,正己烷-二氯甲烷(1:1)提取效率最低,可能是正己烷提取油脂杂质较多,不利于净化^[40].使用乙腈作为提取剂时相对标准偏差为 12.6%,远大于其他 3 种提取剂,表明乙腈作为提取剂稳定性不足,可能是乙腈能致蛋白质变性,易使样品结块,从而导致回收率不稳定^[41].综上所述,4 种提取剂中,乙酸乙酯作为提取剂回收率高且稳定,是河蚬组织中提取睾酮的最优选择。

表 1 提取剂对睾酮回收率的影响

提取剂	回收率/%	相对标准偏差/%	提取剂	回收率/%	相对标准偏差/%
乙腈	89.4	12.6	叔丁基甲醚	86.6	1.5
乙酸乙酯	101.6	4.3	正己烷-二氯甲烷(1:1)	84.8	2.6

2.2 净化方法的选择

超低温冷冻离心、超低温冷冻离心-净化剂、超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱 3 种净化方法的净化效

果见表 2. 结果表明, 提取方法相同的情况下, 超低温冷冻离心法的回收率为 89.4%, 高于超低温冷冻离心-净化剂和超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱法. 超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱法回收率最低, 为 77.4%, 原因可能是采用固相萃取柱进行萃取损失了部分目标化合物. 结果表明, 通过超低温冷冻离心法净化样品, 净化效果好、回收率高、操作简便, 可作为河蚬组织中睾酮提取后的净化方法.

表 2 净化方法对睾酮回收率的影响

净化方法	回收率/ %	相对标准 偏差/%	净化方法	回收率/ %	相对标准 偏差/%
超低温冷冻离心	89.4	12.6	超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱	77.4	8.2
超低温冷冻离心-净化剂	83.2	7.4			

2.3 线性范围、检出限和定量限

在选定的色谱/质谱条件下测定质量浓度分别为 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的睾酮标准溶液系列, 结果表明, 睾酮质量浓度在 0.05~1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内与色谱峰面积呈线性正相关, 其回归方程为 $y=390\ 214x-12\ 033$, $R^2=0.998\ 9$.

根据信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检出限, $S/N \geq 10$ 作为定量限, 计算得出河蚬组织中睾酮的检出限和定量限分别为 6.25 ng/g 和 20 ng/g.

2.4 回收率和精密度

针对空白基质样品, 加标回收实验分别添加睾酮标准物质为低水平(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、中水平(40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、高水平(200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 进行 3 次平行实验. 测定结果表明, 睾酮的平均回收率为 66.4%~101.1%, 测定值的相对标准偏差在 2.3%~11.6% 之间(表 3). 随着加标量的增加回收率不断升高, 在国家标准 GB/T 27404-2008 规定的精密度范围内, 方法的准确度和精密度均符合实际分析检测的要求.

表 3 河蚬中睾酮的加标回收率及精密度($n=3$)

睾酮添加水平/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率/%	相对标准偏差/%	睾酮添加水平/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率/%	相对标准偏差/%
20	66.4	11.6	200	101.1	2.3
40	76.7	10.0			

2.5 水产品中雄激素提取方法比较分析

因提取所用生物样品多为组织匀浆液, 含水率高, 基质水分残留对提取净化效果会产生较大影响^[32]. 杨霄等^[14]、李凯华等^[32]研究表明, 去除生物样品中的水分有利于提高目标化合物的回收率. 提取前加入无水硫酸钠^[42-43]、提取时加入无水硫酸钠^[32]或无水硫酸镁^[14]、净化前过无水硫酸钠柱^[8]等, 均可有效去除水分. 考虑操作简便性及提取液体积的量化问题, 本研究中采用预烘后的无水硫酸钠研磨匀浆后的样品, 静置至水分吸收完全后加入提取剂提取.

水产品中雄激素的提取常用的提取剂包括乙腈、乙酸乙酯、乙醚、叔丁基甲醚、甲醇、正己烷、乙腈-甲酸/乙酸混合液等^[22, 24-25, 33]. 总体而言, 在超高液相色谱-串联质谱法测定水产品内睾酮的前处理中, 乙酸乙酯作为提取剂的提取效果较好(表 4). 杨帆等^[16]、邹红梅等^[17]、李向军等^[24]研究均发现, 鱼类和甲壳类中睾酮的提取使用乙酸乙酯效果最佳, 回收率高、稳定性好, 优于乙腈、正己烷、甲醇等, 与本文关于贝类中睾酮的提取研究结果一致. 此外, 邹红梅等^[17]、李向军等^[24]研究还发现, 同时提取草鱼中甲基睾酮等多种激素时, 乙酸乙酯对大部分目标化合物的提取效率高于甲醇和乙腈. 关于黄鳝、明虾等水产品中甲基睾酮、群勃龙、司坦唑醇等雄激素的提取研究亦表明, 乙酸乙酯作为提取剂的提取效率高, 且具有不易挥发、毒性较小等优势^[16, 27, 34, 44]. 而陈秋华等^[22]研究发现 1% 乙酸-乙腈作为提取剂提取大黄鱼、南美白对虾、梭子蟹中的雄激素时, 提取效果优于乙腈、乙酸乙酯、丙酮. 李凯华等^[32]采用 1% 乙酸-乙腈提取草鱼中的雄激素, 能有效提取目标物. 综上, 乙酸乙酯和 1% 乙酸-乙腈对水生生物体中雄激素提取效果均较好, 但雄激素的回收率还与提取对象、雄激素种类、提取方法和净化方法等相关.

提取过程中, 可采取涡旋、振荡、超声等方法辅助提升提取效果^[25]. 本文在对睾酮进行提取时采用涡

旋振荡-超声-涡旋振荡的方式,一方面超声能增加提取剂的穿透力从而进入细胞内部^[23],提取率高、操作简便且样品处理量多^[8];另一方面,振荡可以加速被提取成分的扩散、释放^[25],使得提取更加充分。提取过程中,重复提取可提高样品的回收率,以重复 1~2 次为宜^[17, 45-46]。

表 4 水产品中睾酮检测的前处理方法比较

检测物	检测基质	提取剂	提取方法	净化方法	回收率/ %	相对标准 偏差/%	参考文献
睾酮	草鱼	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡 提取后超声	石墨炭黑/氨基(GCB/NH ₂)固相萃 取柱净化,丙酮、正己烷除脂	68.2~91.8	1.5~8.5	[16]
			涡旋混匀、 超声提取	净化剂(500 mg 中性氧化铝、200 mg PSA)净化	91.0~95.0	2.0~4.6	[17]
		1%乙酸-乙腈	涡旋混匀	正己烷脱脂、C ₁₈ 净化	85.6~92.5	1.8~2.7	[22]
		乙酸乙酯	均质、超声提取	硅胶固相萃取柱净化	87.2~91.5	6.2~6.7	[24]
		1%乙酸-乙腈	涡旋混合、离心	QuEChERS 净化剂(100 mg PSA, 40 mg C ₁₈)净化	95.8~99.9	0.9~4.1	[32]
	鲢	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡 提取后超声	GCB/NH ₂ 固相萃取柱净化,丙酮、 正己烷除脂	66.3~81.8	5.3~8.5	[16]
	黄鳝	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡 提取后超声	GCB/NH ₂ 固相萃取柱净化,丙酮、 正己烷除脂	67.3~81.8	3.5~8.7	[16]
	大黄鱼	1%乙酸-乙腈	涡旋混匀	正己烷脱脂、C ₁₈ 净化	84.8~87.8	2.7~4.9	[22]
	南美白对虾	1%乙酸-乙腈	涡旋混匀	正己烷脱脂、C ₁₈ 净化	89.7~93.3	1.1~4.0	[22]
	虾	0.1 mol/L 乙二胺 四乙酸二钠-乙腈	涡旋震荡 提取、超声	Captiva EMR 小柱固相萃取	105.6~119.6	4.0~9.3	[30]
	明虾	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡 提取后超声	GCB/NH ₂ 固相萃取柱净化,丙酮、 正己烷除脂	68.2~81.8	1.5~8.1	[16]
	梭子蟹	1%乙酸-乙腈	涡旋混匀	正己烷脱脂、C ₁₈ 净化	83.2~98.1	2.7~5.0	[22]
	鱿鱼	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡 提取后超声	GCB/NH ₂ 固相萃取柱净化,丙酮、 正己烷除脂	73.2~90.8	6.3~8.5	[16]
	河蚬	乙酸乙酯	均质、涡旋震荡、 超声、涡旋振荡提取	超低温冷冻离心	66.4~101.1	2.3~11.6	本研究

2.6 水产品中雄激素样品净化方法比较分析

样品净化方法中,液相萃取除脂法,常采用正己烷、石油醚作为萃取剂。然而黄鸾玉等^[19]发现正己烷去脂的同时可一定程度溶解睾酮等类固醇激素,故不可避免会造成目标化合物的损失,且由于液相萃取过程中易发生乳化,采用此法净化样品的回收率和精密度均不够理想^[18, 28]。

固相萃取柱净化中常采用十八烷基键合硅胶吸附(C₁₈)柱和 HLB 柱对水产品中的类固醇激素进行纯化。已有研究表明,HLB 固相萃取柱基质可耐受不同的溶剂,使用时回收率不受柱床干涸的影响,且吸附剂表面积较 C₁₈ 柱大,除杂效果更好^[19]。靳凤龙^[47]在研究动物源性食品中性激素的测定方法时发现,HLB 固相萃取柱对性激素的回收率达 89.7%~96.6%,是 C₁₈ 柱的 1.2 倍。李向军等^[24]发现,采用 HLB 固相萃取柱净化样品时,可获得较高的回收率,然而,当处理对象为大黄鱼等高油脂样品时,易发生乳化,导致固相萃取柱堵塞。本研究亦发现,河蚬组织经提取后,以超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱作为净化方法时的样品回收率低于其他方法,表明净化过程中目标化合物有损失。

净化剂净化样品时,常用的净化剂包括 PSA、中性氧化铝、无水硫酸镁、NaCl 等。PSA 作为吸附剂能清除许多基质成分,但范小龙等^[37]研究发现仅加入 PSA,目标激素的回收率未明显提高,因此可加入其他净化剂共同净化样品。无水硫酸镁在净化过程中可吸取多余的水分^[37],中性氧化铝具有良好的除脂能

力^[38],二者与 PSA 共同净化样品可提高净化效果.任雪冬等^[38]在测定土壤中激素药物残留时发现以 PSA、中性氧化铝及无水硫酸镁为净化剂组合的样品基质干扰最小,回收率最高.

超低温冷冻离心除脂法操作简便、净化效果好、待测激素损失较低^[18],已被广泛应用于各种基质中类固醇激素的净化.孟霞等^[34]研究发现,黄鳝甲基睾酮的提取与净化中采用低温冷冻离心除脂,样品回收率达 88.1%~105.5%.低温冷冻离心法常结合其他净化法对提取样品进行纯化.黄鸾玉等^[19]将冷冻离心结合 HLB 固相萃取柱净化罗非鱼样品,甲基睾酮的回收率为 73.6%~91.4%.本研究中,超低温冷冻离心净化后,回收率最高,高于超低温冷冻离心-净化剂和超低温冷冻离心-HLB 固相萃取柱,表明超低温冷冻离心净化效果好,超低温冷冻后的净化剂净化和 HLB 固相萃取反而导致样品存在一定程度的损失.田良良等^[33]在测定鱼虾中丙酸睾酮残留量时亦发现,仅采用超低温冷冻离心法净化样品,丙酸睾酮的回收率为 71.2%~104.5%,而超低温冷冻离心与固相萃取柱相结合的方法并没有使杂峰减少,与本研究结果相一致.使用超低温冷冻离心法净化样品,简化了前处理步骤,简便易操作.

2.7 贝类中有机物的提取与净化

水产品中类固醇激素的检测研究对象多为鱼类和甲壳类,贝类中雄激素测定的研究鲜见报道^[17,39].不同于鱼、虾中激素的检测主要针对肌肉中的激素,贝类中激素检测多针对所有软体组织,基质较复杂.已有研究表明,贝类组织中目标化合物提取的回收率变化范围大.贝类中关于多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)、多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)等检测相关文献显示,贝类空白基质加标回收率差异均较大^[43,48-52].曹方方等^[42]研究亦表明,花蛤中的有机氯农药 p, p'-二氯二苯二氯甲烷(p, p'-dichlorodiphenyl dichloroethane, p, p'-DDD)的回收率为 62.3%~106.0%,相对标准偏差为 5.6%~21.0%,o, p'-二氯二苯三氯甲烷(o, p'-dichlorodiphenyl trichloroethane, o, p'-DDT)的回收率为 73.8%~118.0%,相对标准偏差为 4.6%~16.0%.

本文采用乙酸乙酯作为提取剂,超低温冷冻离心作为净化方法提取河蚬中的睾酮,回收率为 101.6%,而空白基质加标回收率为 66.4%~101.1%,相对标准偏差为 2.3%~11.6%,变化范围略大,我们推测可能贝类软体组织样品基质较复杂,自身造成的影响难以避免.

3 结论

本研究优化了河蚬组织中睾酮质量浓度测定的前处理方法:选取乙酸乙酯作为提取剂,涡旋振荡超声提取,并经超低温冷冻离心净化后利用超高液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)进行定量分析.该方法简便、快速,且具有较高的准确度和精密度,在 20~200 μg/kg 加标水平范围内,回收率为 66.4%~101.1%,相对标准偏差为 2.3%~11.6%,适用于河蚬组织中睾酮的提取测定,也可为其他动物组织中的环境雄激素残留分析提供参考.

参考文献:

- [1] 韩伟,李艳霞,杨明,等.环境雄激素的危害、来源与环境行为[J].生态学报,2010,30(6):1594-1603.
- [2] RADL V, PRITSCH K, MUNCH J C, et al. Structural and Functional Diversity of Microbial Communities from a Lake Sediment Contaminated with Trenbolone, an Endocrine-Disrupting Chemical [J]. Environmental Pollution, 2005, 137(2): 345-353.
- [3] KOLODZIEJ E P, SEDLAK D L. Rangeland Grazing as a Source of Steroid Hormones to Surface Waters [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(10): 3514-3520.
- [4] KOLODZIEJ E P, HARTER T, SEDLAK D L. Dairy Wastewater, Aquaculture, and Spawning Fish as Sources of Steroid Hormones in the Aquatic Environment [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(23): 6377-6384.
- [5] 王艳杰,李法云,范志平,等.大型底栖动物在水生态系统健康评价中的应用[J].气象与环境学报,2012,28(5): 90-96.
- [6] SMAAL A, VAN STRALEN M, SCHUILING E. The Interaction between Shellfish Culture and Ecosystem Processes [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2001, 58(5): 991-1002.
- [7] 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.

- [8] 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.
- [9] JIANG J, LIN H, FU X T, et al. Preliminary Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Detection of Methyl-Testosterone Residue in Carp Muscle [J]. Journal of Ocean University of China, 2005, 4(3): 248-251.
- [10] DAESELEIRE E, DE GUESQUIÈRE A, VAN PETEGHEM C. Derivatization and Gas Chromatographic—Mass Spectrometric Detection of Anabolic Steroid Residues Isolated from Edible Muscle Tissues [J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1991, 562(1/2): 673-679.
- [11] 湛嘉,俞雪钧,李佐卿,等. 黄鳍肌肉中11种性激素的气质联用检测方法 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(5): 642-646.
- [12] MARCHAND P, LE BIZEC B, GADE C, et al. Ultra Trace Detection of a Wide Range of Anabolic Steroids in Meat by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 867(1/2): 219-233.
- [13] 邹龙. 气相色谱质谱联用技术对水产品中激素多残留检测的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [14] 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(12): 150-152.
- [15] XU C L, CHU X G, PENG C F, et al. Development of a Faster Determination of 10 Anabolic Steroids Residues in Animal Muscle Tissues by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(2): 616-621.
- [16] 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.
- [17] 邹红梅,左舜宇,黄东仁,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中雄激素和糖皮质激素残留 [J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(2): 45-50.
- [18] 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.
- [19] 黄鸾玉,蒙源,庞燕飞. 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): 345-349.
- [20] 李华,郭启高,梁国鲁,等. 利用高效液相色谱法同时测定枇杷果实中10种植物激素 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(3): 18-25.
- [21] 杨金泉,贺小敏,施敏芳,等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定地表水中9种性激素 [J]. 中国环境监测, 2019, 35(3): 19-27.
- [22] 陈秋华,张天闻,傅红,等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速筛查水产品中16种激素残留 [J]. 食品科学, 2018, 39(20): 337-343.
- [23] 孙闰霞,柯常亮,林钦,等. 超声提取/气相色谱-质谱法测定海洋生物中的多环芳烃 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 57-63.
- [24] 李向军,于慧娟,冯兵,等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定水产品中24种性激素 [J]. 分析试验室, 2012, 31(5): 62-67.
- [25] 田良良. 水产品中丙酸睾酮残留检测方法的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [26] 谢世涛,谢世红,欧阳敏,等. 固相萃取-高效液相法测定水产品肌肉组织中炔诺酮的药物残留量 [J]. 现代测量与实验室管理, 2009, 17(2): 9-11.
- [27] 张璇,蔡友琼,惠芸华,等. 超高压液相色谱法测定水产品中甲基睾酮的残留量 [J]. 分析试验室, 2014, 33(4): 459-461.
- [28] 江洁,林洪,付晓婷,等. 水产品中多种激素残留测定的高效液相色谱法 [J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 67-71.
- [29] 黄冬梅,史永富,王媛,等. HPLC-MS/MS测定水产品中苯丙酸诺龙、诺龙残留量 [J]. 食品科学, 2010, 31(22): 394-397.
- [30] 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.
- [31] 徐英江,田秀慧,张秀珍,等. 超高效液相色谱串联质谱法对水产品中8种雌激素的测定 [J]. 分析测试学报, 2010, 29(2): 152-156.
- [32] 李凯华,肖曼,张玲,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中多种雄性激素和孕激素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5068-5073.

- [33] 田良良, 林洪, 曹立民, 等. 同位素稀释高压液相色谱-串联质谱法测定鱼虾中丙酸睾酮残留量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 23-28.
- [34] 孟霞, 谢世红, 谢世涛, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定黄鳝肌肉组织中 6 种激素残留 [J]. 分析科学学报, 2015, 31(2): 208-212.
- [35] 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.
- [36] 赵超敏, 岳振峰, 吴晖, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 4 种雌激素残留 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 244-249.
- [37] 范小龙, 吴婉琴, 黄坤, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定化妆品中糖皮质激素类药物 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(1): 86-93.
- [38] 任雪冬, 王璐, 熊爽. QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中 61 种激素类药物残留 [J]. 分析测试学报, 2019, 38(9): 1036-1043.
- [39] 周昕, 王江涛, 谭丽菊, 等. 胶州湾某水域蛤蚧(*Ruditapes philippinarum*)、牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)中的雌激素含量 [J]. 生态毒理学报, 2010, 5(1): 123-129.
- [40] 候美玲, 董宪兵, 李红丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时检测畜禽肉中抗生素及镇静剂类兽药残留 [J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(3): 113-117, 126.
- [41] 张秋云, 杨洪生, 沈美芳, 等. 超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱法快速筛查草鱼中 39 种糖皮质激素残留 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5007-5012.
- [42] 曹方方, 费金岩, 许人骥, 等. 气相色谱-质谱法测定贝类样品中的有机氯农药 [J]. 中国测试, 2017, 43(3): 53-57.
- [43] 李天云, 孙凡, 黄圣彪, 等. 闽江某河段河蚬组织中多环芳烃和有机氯农药的蓄积特征 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2007, 32(6): 72-77.
- [44] 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.
- [45] 张爱芝, 王全林, 沈坚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼制品中残留的 7 种性激素 [J]. 色谱, 2010, 28(2): 190-196.
- [46] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化委员会. 牛肝和牛肉中睾酮、表睾酮、孕酮残留量的测定 液相色谱-串联质谱法: GB/T 20758—2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [47] 靳凤龙. 动物源食品中性激素的色谱测定方法研究 [D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2013.
- [48] 杜静, 黄会, 张华威, 等. 气相色谱法同时测定贝类中 15 种持久性有机污染物残留量 [J]. 中国渔业质量与标准, 2019, 9(3): 53-62.
- [49] SHIN C, JANG H, JO H, et al. Development and Validation of an Accurate and Sensitive LC-ESI-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish and Tunicate [J]. Food Control, 2017, 77: 171-178.
- [50] YANG X L, ZHOU L, TAN Y L, et al. Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Coupled with Dispersive Solid-Phase Extraction for Simultaneous Quantification of Eight Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish [J]. Toxins, 2017, 9(7): 206.
- [51] 孙秀梅, 胡红美, 钟志, 等. 气相色谱法测定贻贝中的多氯联苯和有机氯农药 [J]. 广州化工, 2014, 42(14): 134-136, 173.
- [52] 陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定贝类中的脂溶性贝类毒素 [J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(6): 624-629.