

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.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.037

# 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

杨 霄<sup>1,2</sup>,索纹纹<sup>2</sup>,洪 波<sup>2</sup>,李小玲<sup>1,2</sup>,曾春芳<sup>1,2</sup>,黄向荣<sup>1,2,3</sup>

[1. 湖南省水产科学研究所,湖南长沙 410153; 2. 农业部渔业产品质量监督检验测试中心(长沙),湖南长沙 410153;

3. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心,湖南常德 415000]

**摘要:**拟建立分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲基睾酮残留量的方法。样品在加入无水硫酸镁后用乙腈均质提取,提取液经 *N*-丙基乙二胺(*N*-propylethane-1,2-diamine,简称 PSA)和  $C_{18}$  分散固相萃取、净化,采用电喷雾离子源正离子多反应监测模式测定,外标法定量。甲基睾酮在 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  $\mu\text{g/kg}$ ,定量限为 1.0  $\mu\text{g/kg}$ 。对罗非鱼、中华鳖、凡纳滨对虾进行 3 个水平的加标回收试验,回收率为 82.4%~96.3%,相对标准偏差均不大于 6.98%。本方法简单、高效、灵敏、重复性好,适用于水产品中甲基睾酮的快速检测分析。

**关键词:**高效液相色谱-串联质谱;分散固相萃取;甲基睾酮;水产品;罗非鱼;中华鳖;凡纳滨对虾

**中图分类号:**S912 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)12-0150-03

甲基睾酮(methyhestosterone,简称 MET),别称甲睾酮、甲基睾丸酮、甲基睾丸素,是一种人工合成的雄性激素,具有雄性和蛋白同化双重作用,应用于水产养殖可以提高产量和控制性别<sup>[1-2]</sup>。甲基睾酮在动物体内代谢缓慢,极小的残留量都会对人体造成巨大的潜在危害,因此,多数国家已经禁止在动物养殖中使用此种激素,并要求动物源食品中不得检出该激素。2001 年我国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,将甲基睾酮列为禁用药物。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》中也规定甲基睾酮为禁用兽药。

目前,甲基睾酮的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3]</sup>、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[4]</sup>以及酶联免疫法(ELISA)<sup>[5]</sup>等。HPLC 前处理步骤较繁琐,分析时间长;ELISA 容易出现样品假阳性,定量不准确,较适用于样品初筛;HPLC-MS/MS 前处理较简单,灵敏度和特异性高,可用于甲基睾酮的准确定量。水产品中甲基睾酮的前处理方法多为传统的固相萃取<sup>[6-7]</sup>、超声提取-乙酸乙酯反萃取<sup>[8]</sup>、超声提取-乙醚反萃取<sup>[9]</sup>、磁力搅拌-液液分配<sup>[10]</sup>等,这些方法操作步骤较多,耗时长,不利于大批量样品的快速测定。分散固相萃取(Dispersive-SPE)净化法(QuEChERS),是由美国的 Lehotay 和德国的 Anastassiadas 于 2003 年提出的

一种快速、简单、便宜、有效、可靠和安全的样品前处理技术,该技术直接将吸附剂粉末加入提取液中进行净化,其操作简便快速,取样量少,廉价安全,适合批量样品的快速分析检测。本试验采用 QuEChERS 方法和 HPLC-MS/MS 技术,拟建立一种高效、快速的水产品中甲基睾酮残留量的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器与试剂

本试验所用中华鳖、罗非鱼、凡纳滨对虾均购自长沙市水渡河农产品大市场。

TSQ Quantum Access 液相色谱-串联质谱联用仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);FA25 均质器(德国 Fluko 公司);精密电子天平(Mettler Toledo 公司);高速冷冻离心机(日本日立公司);漩涡振荡器(美国 Fisher 公司)。

甲基睾酮标准溶液:精确称取甲基睾丸酮标准品(纯度 $\geq 98\%$ ,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)5.0 mg,用甲醇溶解并定容至 50 mL 棕色容量瓶中,配成质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的标准储备溶液,于  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,临用时稀释;甲酸(LC-MS 级,美国 Sigma 公司);乙腈(HPLC 级,德国 Merck 公司);*N*-丙基乙二胺(*N*-propylethane-1,2-diamine,简称 PSA,百灵威科技有限公司); $C_{18}$  吸附剂(70~230 目,上海安谱科学仪器有限公司);无水硫酸镁( $\text{MgSO}_4$ ,分析纯,郑州益康化工产品有限公司);试验用水为超纯水。

### 1.2 仪器分析条件

1.2.1 色谱条件 Atlantis  $C_{18}$  色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.0  $\mu\text{m}$ );柱温为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;进样量为 20  $\mu\text{L}$ ;流速为 300  $\mu\text{L/min}$ ;流动相:甲醇+0.1%甲酸水溶液(体积比=70:30)。

1.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测;喷雾电压为 4 000 V;扫描方式为选择反应监测(SRM);毛

收稿日期:2017-01-06

基金项目:国家水产品质量安全监测基金(编号:2011C008);湖南省养殖业科研指导项目(编号:201115)。

作者简介:杨 霄(1986—),男,湖南长沙人,硕士,助理研究员,主要从事水产品质量安全及渔业生态环境方面的研究。E-mail:dustia@163.com。

通信作者:黄向荣,副研究员,主要从事水产品质量安全及渔业生态环境方面的研究。E-mail:hns-11@126.com。

细管温度为 350 ℃; 蒸发温度为 300 ℃; 鞘气压力为 40 (arbitrary unit), 辅助气压力为 10 (arbitrary unit), 碰撞气压力为 199.983 mPa (表 1)。

表 1 甲基睾酮质谱采集参数

母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	碰撞能量 (eV)
303.067	96.977	20
303.067	109.030 *	25

注: “\*” 标记的为定量离子。

### 1.3 样品前处理

水产品取可食肌肉部分, 按照 SC/T 3016—2004《水产品抽样方法》的规定处理后置于 -18 ℃ 密封保存。使用前先解冻。

1.3.1 样品提取 准确称取 ( $5 \pm 0.02$ ) g 处理后的样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 同时加入 3.0 g 无水硫酸镁, 涡旋振荡提取 1 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于鸡心瓶中。向下层残渣中加入 10 mL 乙腈重复提取 1 次, 合并 2 次的上清液于鸡心瓶中。于 40 ℃ 旋转蒸发至近干。

1.3.2 样品净化 在鸡心瓶中加入 2 mL 流动相充分溶解残渣, 取 1 mL 复溶液转入装有 50 mg PSA、150 mg  $C_{18}$  吸附剂的 5 mL 离心管中, 充分漩涡振荡 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液过 0.22  $\mu$ m 聚四氟乙烯膜后上机测定。

### 1.4 校准曲线的绘制

将空白样品按照“1.3”节方法处理后, 取适量空白上清液加入不同量的甲基睾酮标准储备液, 配制 1、5、10、50、100、200 ng/mL 的基质空白标准溶液, 混匀后进样。以待测物提取离子流色谱图的峰面积为纵坐标、相应待测物质量浓度为横坐标进行回归运算, 求得直线回归方程。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理方法的优化

2.1.1 样品提取溶剂的选择 本试验比较了甲醇、乙腈、乙醚、乙酸乙酯 4 种溶剂的提取效果。结果表明, 以上 4 种溶剂对甲基睾酮的提取效率均较高, 达到 75% 以上。甲醇能溶解大多数极性物质, 乙酸乙酯提取的亲脂性化合物较多, 二者共萃取杂质多, 易造成基质干扰, 而乙腈、乙醚样品提取液较清澈, 基质干扰较小, 且目标物周围无明显的杂质干扰峰, 但乙醚易挥发、毒性大, 对试验操作者影响大, 故本试验选择毒性较小、挥发性低的乙腈作为提取溶剂。

2.1.2 无机盐用量的选择 水产品中含有不同量的水分, 且水分与乙腈互溶, 在目标化合物被乙腈提取的过程中部分水分分配到乙腈提取层, 影响试验结果和下一步分离操作。因而需要加入合适的无机盐去除有机相的水分。本试验根据 Schenck 等的报道<sup>[11]</sup>, 选用无水  $MgSO_4$  作为除水剂。试验比较了不同量的无水  $MgSO_4$  对除水效果的影响, 结果发现, 当无水  $MgSO_4$  用量为 3 g 时可以有效除去水分, 回收率较高; 当无水  $MgSO_4$  用量少于 2 g 时, 不能完全除去有机相的水分, 造成样品浓度稀释, 导致回收率降低; 当无水  $MgSO_4$  用量为 5 g 时, 过量的无机盐将目标化合物部分包埋, 使待测物未完全进入乙腈提取相, 从而降低了回收率 (图 1)。因此, 本试验选用 3 g 无水  $MgSO_4$  作为除水剂。

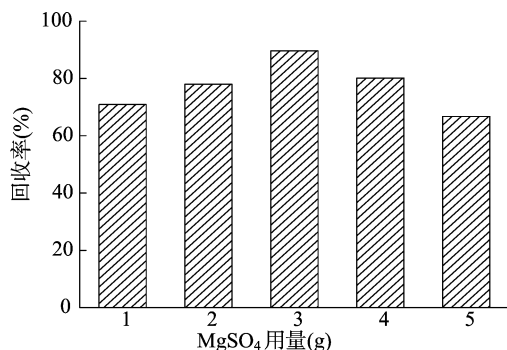


图1 不同用量的  $MgSO_4$  对回收率的影响

2.1.3 分散固相萃取条件的优化 样品经过乙腈沉淀蛋白质后已经去除了大部分的干扰物, 但仍可能存在少量的色素、脂肪等杂质, 为了提高净化效率和减少待测物的损失, 本试验采用分散固相萃取的净化手段。PSA 作为净化吸附剂可以除去样品基质中的少量极性色素、有机酸、酚类和糖类,  $C_{18}$  吸附剂可以除去一些强疏水性干扰物 (如脂肪)。由于鱼虾样品中含有大量的蛋白质、脂肪以及一些色素等干扰物质, 所以本试验采用 PSA 和  $C_{18}$  作为吸附剂进行分散固相萃取净化。本试验在 5 份 1 mL 空白鱼肉提取液中加入标准溶液后, 再分别加入不同比例的 PSA 和  $C_{18}$ , 得到甲基睾酮的加标回收率。从图 2 可以看出, 当 PSA、 $C_{18}$  质量比 = 100 mg/50 mg 时, 甲基睾酮的回收率最低, 表明 PSA 对甲基睾酮有一定程度的吸附作用, 因此可以适当降低 PSA 的比例。当 PSA、 $C_{18}$  质量比 = 50 mg/150 mg 时, 甲基睾酮的空白鱼肉提取液较清澈, 甲基睾酮回收率在 85% 以上, 说明该比例的 PSA 和  $C_{18}$  对目标物的吸附少且可以很好地吸附脂肪、色素等杂质, 样品提取液净化效果好。当  $C_{18}$  的使用比例继续增加时, 无明显效果, 且随着吸附剂的增加, 上清液的量逐渐减少, 不方便移取, 因此, 本试验选取 PSA、 $C_{18}$  质量比 = 50 mg/100 mg 作为分散固相萃取吸附剂的用量。

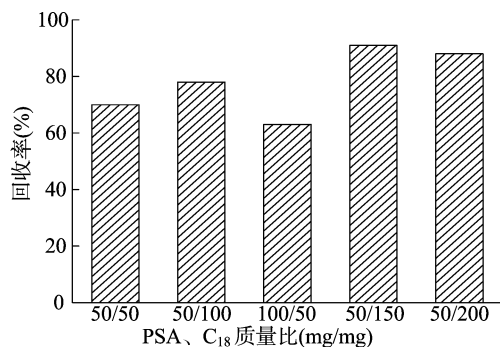


图2 不同比例的 PSA 和  $C_{18}$  对回收率的影响

### 2.2 流动相的选择

流动相的组成影响目标化合物的峰型、保留时间及质谱的离子化效率<sup>[6]</sup>。液质联用的流动相组成为甲醇-水体系和乙腈-水体系。本试验选用甲醇和乙腈作为有机相, 水、0.1% 甲酸水溶液、2 mmol/L 乙酸铵水溶液、2 mmol/L 乙酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸) 作为水相, 进行不同组合。结果表明, 以甲醇和 0.1% 甲酸水溶液 (体积比为 7:3) 作为流动相组成时目标化合物的响应强度最大, 峰型最尖锐, 且目标化合物周围无明显杂质峰干扰。

2.3 质谱条件的优化

采用注射泵进样的方式,以 5 μL/min 的流速,将 500 ng/mL 甲基睾酮标准溶液注入离子源中,在正离子模式下对甲基睾酮进行一级质谱全扫描,得到分子离子,然后以分子离子为母离子对其子离子进行全扫描,以 SRM 模式进行检测。在此基础上对碰撞能等离子源参数进行优化,使选定的母离子和子离子组成的特征离子的丰度比例最佳。最终确定“1.2.2”节所述的质谱条件。

2.4 基质效应的消除

在液相色谱-质谱分析中,基质效应是客观存在的。基质效应影响测定结果的精密度和准确度。为了消除(或补偿)基质效应给分析结果带来的偏差,通常采用同位素内标,稀释样品溶液,配制空白基质标准溶液以及优化色谱-质谱条件等方法。本试验采用优化色谱-质谱条件和配制空白基质标准溶液来消除基质效应对检测结果的影响。

2.5 线性范围与检出限

在选定的色谱分离条件和质谱测定参数下,将 6 个浓度系列的甲基睾酮空白基质标准溶液上机测定,结果表明,在 1~200 ng/mL 的质量浓度范围内,甲基睾酮的色谱峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,线性回归方程为  $y = 473\,540x - 132\,48$ ,相关系数为 0.999 8。50 ng/mL 甲基睾酮空白基质标准溶液 SRM 色谱结果如图 3 所示。采用空白样品添加低浓度的标准品,按“1.3”节方法进行前处理后上机测定,根据特征离子色谱峰的信噪比(S/N 值)等于 3 为检出限,S/N 值等于 10 为定量限,得到甲基睾酮的检出限为 0.5 μg/kg,定量限为 1.0 μg/kg。

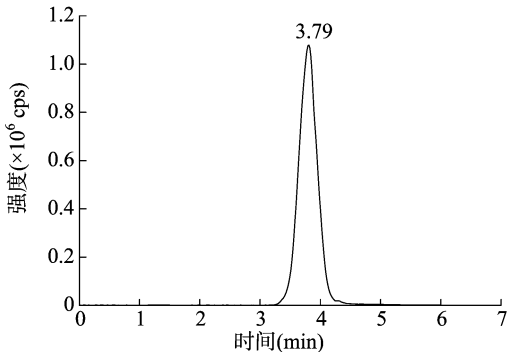


图3 50 ng/mL 甲基睾酮标准溶液 MRM 色谱结果

2.6 准确度与精密度

根据水产品各物种间肌肉成分的差异,如虾肉中的色素含量较高,中华鳖肌肉中脂肪含量较高等,选取罗非鱼、中华鳖以及凡纳滨对虾 3 类水产品的肌肉组织进行加标回收率试验。各个品种空白样品的添加标准物质的浓度为 1、10、50 μg/kg,每个浓度水平作平行样品 5 个,计算回收率和相对标准偏差,结果见表 2。4 种样品的加标回收率为 82.4%~96.3%,相对标准偏差为 3.21%~6.98%,表明该方法的准确度高,重复性好,符合药物残留检测方法的要求。

2.7 实际样品测定

将建立的方法用于 30 份市售水产品(10 份草鱼,10 份罗非鱼,5 份凡纳滨对虾,5 份中华鳖)的检测,结果发现这 30 份市售水产品中均未检出甲基睾酮,说明上述市售水产品中未违规添加甲基睾酮。

表 2 加标回收率及精密度试验结果

样品	添加水平 (μg/kg)	平均测定值 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD 值 (%)
罗非鱼	1	0.875	87.5	4.56
	5	4.560	91.2	6.98
	50	48.15	96.3	4.21
中华鳖	1	0.856	85.6	5.37
	5	4.685	93.7	5.15
	50	45.10	90.2	4.93
凡纳滨对虾	1	0.824	82.4	6.24
	5	4.695	93.9	3.21
	50	46.40	92.8	4.16

3 结论

本研究建立了分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲基睾酮残留量的方法。采用分散固相萃取技术,有机试剂用量少,样品前处理简单,易于操作;采用高效液相色谱-串联质谱检测,显著缩短了色谱分析时间,提高了灵敏度。该方法具有简单、快速、高效、环保的特点,适合当前水产品中甲基睾酮残留量快速检测的要求。

参考文献:

[1] Mubarik M S, Ahmed I, Mateen A, et al. 17 alpha - methyltestosterone induced masculinization and its effect on growth and meat quality of *Cyprinus carpio* [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2011, 13 (6) : 971 - 975.

[2] Rivero - Wendt C L, Miranda - Vilela A L, Ferreira M F, et al. Lack of genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* and *Oreochromis niloticus* of 17α - methyltestosterone used in fish hatcheries to produce male monosex populations [J]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12 (4) : 5013 - 5022.

[3] 马丽莎, 朱新平, 尹 怡, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮的残留量 [J]. 分析科学学报, 2014, 30 (3) : 369 - 372.

[4] 李佩佩, 郭远明, 陈雪昌, 等. 凝胶渗透色谱-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲基睾酮含量 [J]. 理化检验: 化学分册, 2013 (5) : 570 - 572.

[5] 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 (5) : 303 - 308.

[6] 祝瑞琳, 杨 弘, 肖 炜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用测定罗非鱼肌肉中甲基睾酮残留 [J]. 食品科学, 2011 (22) : 243 - 247.

[7] 秦振发, 黎小正. 硅胶柱 SPE - HPLC 测定水产品中甲基睾酮的研究 [J]. 食品科技, 2009 (10) : 291 - 294.

[8] 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 (4) : 459 - 461.

[9] 秦安丽. 罗非鱼中甲基睾酮超高压液相色谱测定方法 [J]. 热带农业工程, 2011, 35 (5) : 13 - 16.

[10] Determination of methyltestosterone residues in fishery products liquid chromatography method: SC/T 3029—2006 [S].

[11] Schenck F J, Lehotay S J, Vega V. Comparison of solid - phase extraction sorbent or clean up in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables [J]. Journal of Separation Science, 2002, 25 (14) : 883 - 890.