

# 固相萃取-高效液相色谱法测定 水产品中甲基睾丸酮



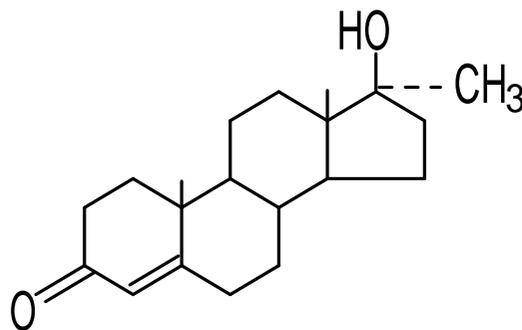
王扬 叶磊海

浙江省水产质量检测中心

杭州 · 2009年11月

# 甲基睾酮 (Methyltestosterone, 英文缩写MET)

又名甲基睾酮和甲基睾丸素，是一种人工合成的雄性激素和蛋白同化激素。



$C_{20}H_{30}O_2$  302.46

甲基睾酮的化学结构式 **ethyltestosterone**

# 在水产养殖中为何使用甲基睾丸酮？

在水产养殖上，它作为一种性激素能促进动物性器官成熟与第二性征的发育，又有促进蛋白质合成的同化作用，使肌肉增长、体重增加，被作为饲养供食用动物的一种促生长剂被添加到饲料中。

另一个重要原因，由于雌雄鱼的经济性状不一样，如生长速度、个体大小、成熟年龄、繁殖方式、体色和体形等均有差异，所以控制鱼类的性别，选择具有最佳生长性能的性别进行单性养殖，将会提高产量，降低成本，获得良好的经济效益。

在水产养殖中曾被报道使用甲基睾丸酮的水产品种类繁多，如鱼类：罗非鱼、鲤鱼、鳊鱼、鳊鱼等；虾类：中国对虾；蛙类：美国青蛙、牛蛙；螺类：大瓶螺、福寿螺以及甲鱼等经济动物。



甲基鞣丸酮具有三致毒性（致畸、致癌、致突变）。通过食物链被人体摄入，它能使妇女引起类似早孕的反应及乳房胀、不规则出血等；它能扰乱人体激素平衡，导致孕妇有女胎男性化和畸胎发生，容易引起新生儿溶血及黄疸。这类外源性激素通过饲料被养殖动物摄入，通过食物链进入人体造成危害。从人类健康的角度考虑，世界各国都采取了各种措施来控制解决。

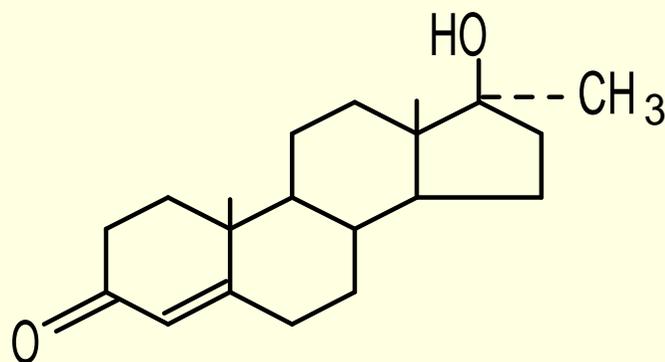


欧盟95/22/EC 中规定禁止使用甲基睾丸酮、己烯雌酚等性激素兽药，在所有食用动物的可食组织中不得检出。

农业部在NY5071-2002《无公害食品 渔用药物使用准则》中已明确规定不允许使用甲基睾丸酮等激素类药物。



# 甲基睾丸酮理化性质及结构



$C_{20}H_{30}O_2$  302.46

化学名：17 $\alpha$ -甲基-17 $\beta$ -羟基雄甾-4-烯-3-酮。

白色或类白色结晶性粉末，无臭，无味，微有吸湿性，遇光易变质。易溶于乙醇、丙酮或氯仿等有机溶剂，溶于乙醚，微溶于植物油，不溶于水。

本试验中应用液-液分配结合固相萃取技术，对样品提取、净化、浓缩，减少样品基质干扰；优化液相色谱条件，采用液相色谱紫外检测法及外标法定量。方法的检出限达到  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，能够满足水产品中对药物残留检测的限量要求。

# 试样制备

---

按规定取水产品可食部分，切成不大于  
 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 的小块后，用组织捣  
碎机绞碎，充分匀浆，取**5.00g**（精确到  
**0.01g**）于**50mL**离心管中。

# 提取

向每份试样中加入**1g**无水硫酸钠，玻棒拌匀，再向离心管中加入**15mL**乙醚，振荡**15min**，**5000 r/min**离心**10分钟**，所得上清液倒入旋发瓶中；残渣用**15mL**乙醚按上述方法再提取一次，所得上清液合并至旋发瓶中，在**40℃**左右水浴条件下减压旋转蒸发至干（或放置在通风柜中过夜，常温自然挥干），残渣中加入**4mL**甲醇，充分振荡溶解，溶液转移至**10mL**具塞玻璃离心管中。

# 净化

加3mL的石油醚至上述离心管中（预先加0.3mL水），加塞剧烈旋涡振荡1min，弃去上层石油醚层，下层加入3mL石油醚按上述方法再洗涤一次。下层甲醇液经中性氧化铝柱（预先1mL甲醇活化平衡好），流入10mL玻璃离心管中，再用2mL甲醇冲洗柱子，冲洗液并入离心管中，40℃下氮气吹干，用1.0mL流动相定容，经0.45 μ m四氟乙烯膜过滤，上机分析。

# 色谱条件

---

色谱柱: ZORBAX ODS-C18柱, 250 mm × 4.6 mm (id), 粒度5 μm;

流动相: 甲醇+水 (含1/600体积的磷酸) = 72:28 (v:v);

流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;

检测波长: 254 nm;

柱温: 30°C;

进样量: 20 μL。

# 定性定量

---

分别注入20uL浓度为0.05~5.00  $\mu$  g/mL标准工作液和样品提取液于高效液相色谱仪中，按设定的色谱条件进行检测分析，记录峰面积，相应值均应在仪器检测的线性范围之内。根据标准品在上述色谱条件的保留时间定性，外标法定量。

# 计算公式

试样中甲基睾丸素残留量（ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）的计算式为：

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W}$$

式中：X，试样中甲基睾丸素的残留量（ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）；

A，试样中甲基睾丸素的峰面积；

$A_s$ ，标准工作液甲基睾丸素的峰面积；

$C_s$ ，测定用标准工作液中MET的浓度（ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）；

W，准确称取的试样重量（g）；

V，定容体积（mL）。

# 结果与分析——样品前处理

---

- n 提取溶液的选择
- n 脱脂溶剂的选择
- n 净化方法的选择

# 提取溶液的选择

- n 中性激素残留提取：二氯甲烷、乙醇、甲醇、乙醚、乙酸乙酯等。甲基睾酮两端的羰基和羟基均为极性基团，中间的多个碳环为非极性部分，故其能溶解于极性和非极性溶剂，但不能溶于极性很强的水中。对水产品组织提取时，选择甲醇、乙醚和乙醇和二氯甲烷四种提取剂进行实验比较。
- n 结果表明：四种提取剂对加标样的绝对提取量都比较高，但乙醇提取水产品组织浸出杂质过多，严重影响到后面的净化效果，无法定量；甲醇提取液经减压蒸发浓缩时间过长，且易起泡喷出影响回收率，不利于大批量样品检测；二氯甲烷的回收率最低；乙醚提取杂质少，易除去基质干扰，效果较理想；故可选用乙醚溶液作为提取剂。
- n 另外，提取前加入少量无水硫酸钠既可以吸收组织中的水分，也可以起盐析作用能提高回收率。

# 净化方法

液—液萃取

固相萃取法

本实验尝试用液—液萃取和固相萃取法（SPE）结合对试样进行净化浓缩。它克服了单纯液—液萃取及一般柱层析的缺点，可使萃取富集、净化一步完成。

# 脱脂溶剂的选择

提取时往往会提出一些类脂物质，因此提取后要采用甲醇—石油醚萃取液液分配脱去类脂物质。之所以选用石油醚作除脂溶剂，因它极性很小，能除去类脂和其它低极性杂质，但与甲醇有一定的互溶性，会产生轻度乳化，可考虑加入少量水分增加甲醇液密度（石油醚不溶于水）和低温高速离心的方法，而消减乳化现象。

# 固相萃取柱的选用

方法一：C18柱净化，从提取液（预先用水稀释成浓度50%以下）中将甲基睾酮吸附出来，用少量低浓度甲醇水溶液和水淋洗，再用甲醇来充分洗脱来达到净化目的；

方法二：中性氧化铝层析净化：先用1mL甲醇润洗平衡层析柱；将提取上清液加到中性氧化铝层析柱中，流出液用离心管收集；用2mL甲醇冲洗柱子，冲洗液合并至离心管中。

## 结果显示:

**C18柱:** 不能充分将甲基睾酮吸附下来, 回收率达不到检测要求。

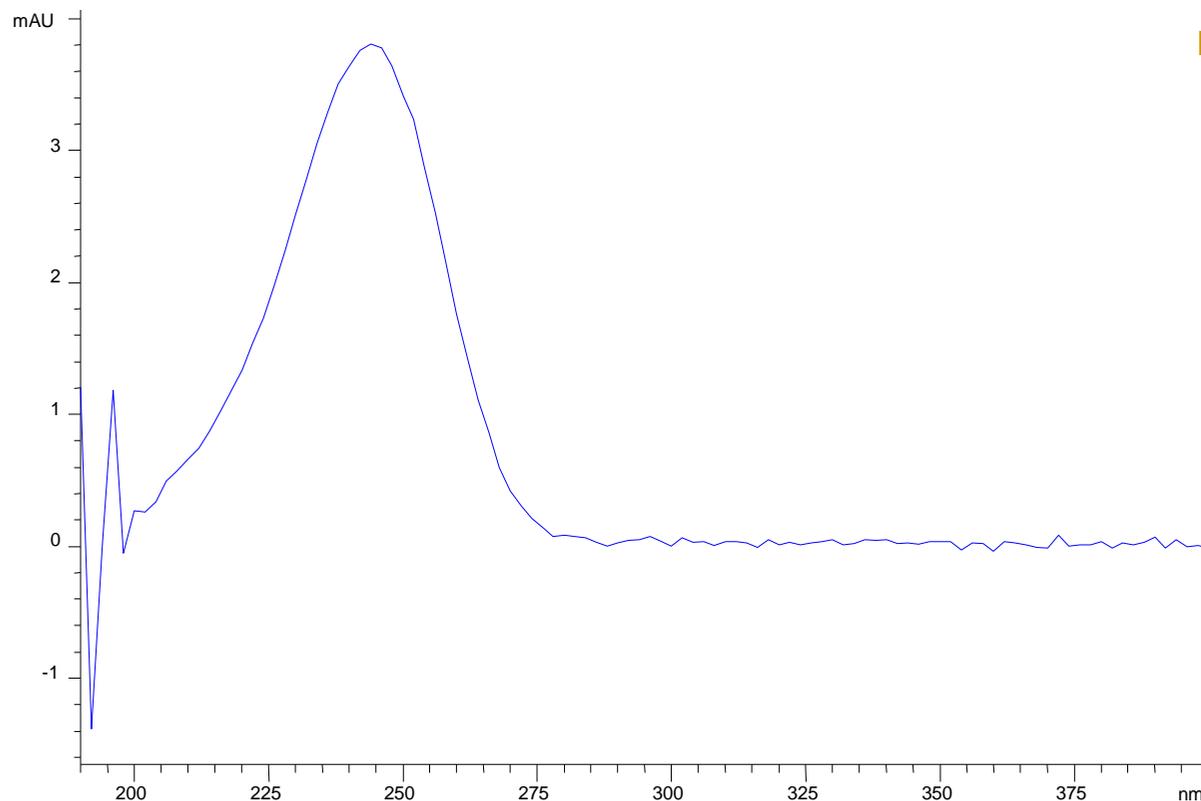
**中性氧化铝柱:** 基质中的色素和蛋白类杂质能被充分吸附去除, 色谱图中特征峰旁的干扰峰较少, 故选用后者为净化柱。需要特别注意: 甲醇提取液的水分含量不得高于**10%**, 水分过多会直接影响层析柱中的氧化铝活性而影响回收率。

# 结果与分析——色谱条件的选择

---

- n 检测波长选择
- n 流动相选择

# 色谱条件——检测波长选择



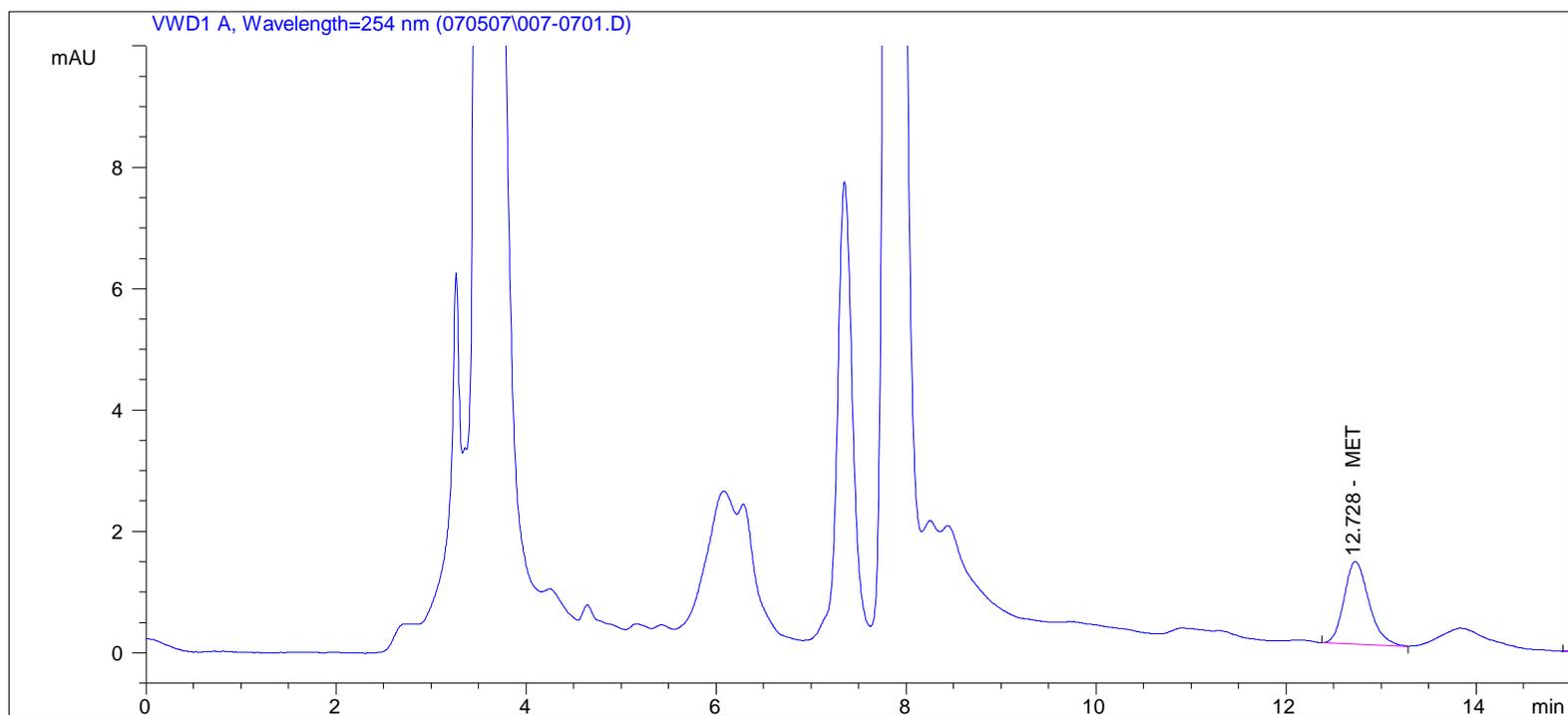
n 在240~242nm波长处有最强的紫外吸收，而在245~255nm的范围中也均可有强吸收峰，然而在240~245nm范围内水产品组织中可能对应的干扰物质峰较多，本实验选择254nm为检测波长。

图 甲基羧丸酮紫外全波长扫描图

# 色谱条件——流动相选择

1. 在流动相中加入一定量的酸发现能使峰性形变尖锐，检测灵敏度提高。但酸性过强会影响分离柱的使用寿命，所以要严格控制PH值（ $\geq 2.5$ ）。在水中加入一定比例的磷酸（600: 1），可使各组分达到基线分离并且排除杂质峰的干扰。
2. 当甲醇/水的体积比在70/30~80/20的范围内时，随着比例数增大，出峰时间逐渐缩短，但灵敏度不受影响。选用甲醇：水（含1/600的磷酸）体积比=72: 28的溶液体系为流动相。

# 甲基睾丸素在鲫鱼样品检测色谱图



在上述色谱条件下对水产品中甲基睾丸素的检测结果，谱图基线平稳，虽有杂峰，且相互有差异。甲基睾丸素保留时间在12.6~12.7 min，能与附近杂峰很好分离。

# 方法确认

---

- n 准确度和精密度
- n 线性关系和线性范围
- n 最低检测限和定量限的确定

# 准确度 and 精密度

取鲫鱼、黄鳝、罗非鱼、甲鱼四种水产品各5.00g，加入适量甲基睾丸素标准溶液，制成含甲基睾丸素 $10 \mu\text{g/kg}$ ， $40 \mu\text{g/kg}$ ， $400 \mu\text{g/kg}$ 三个水平浓度，每个浓度水平重复5次实验，测定回收率并计算其相对标准偏差，结果见下表。

表 不同水产品中添加甲基睾丸酮的回收率结果(n=5)

水产品	加标浓度Concentration μ g/kg	回收率%(n=5) Recovery ratio (%)					平均回收率%	相对标准偏差RSD (%)
鲫鱼	10	81.2	75.3	80.8	76.8	82.9	79.4	4.93
	40	88.5	80.4	77.5	80.5	80.8	81.5	7.30
	400	78.8	78.2	81.9	80.1	83.8	80.6	9.94
罗非鱼	10	75.1	72.3	70.9	70.8	70.8	72.0	3.63
	40	85.4	79.5	86.2	81.8	79.9	82.6	5.07
	400	82.3	86.4	79.5	85.0	83.1	83.3	3.64
黄鳝	10	79.3	81.4	85.9	80.8	86.8	82.8	4.47
	40	89.2	84.3	82.1	89.8	85.8	86.2	3.19
	400	87.1	87.4	79.6	84.7	86.2	85.0	5.42
甲鱼	10	81.5	70.9	81.9	80.5	81.8	79.3	8.53
	40	88.0	87.2	81.1	79.8	82.2	83.7	5.97
	400	86.1	88.4	79.9	84.8	82.2	84.3	5.41

# 线性关系和线性范围

将绘制标准曲线用 $0.05\sim 5.00\ \mu\text{g/mL}$ 工作液依次从低浓度到高浓度按色谱条件分析，按其所得峰面积的平均值与对应的标准溶液浓度作标准曲线，并计算回归方程及相关系数。

当溶液浓度为 $0.05\ \mu\text{g/mL}$ 时，信噪比为 $12.0\geq 10$ ，能被准确定量；当溶液浓度大于 $5\ \mu\text{g/mL}$ 时，其吸收峰有严重的拖尾现象，影响其定量，因此线性范围为 $0.05\ \mu\text{g/mL}\sim 5.00\ \mu\text{g/mL}$ 。在此范围线性明显，回归方程为 $y=66.71x-1.15$ ，相关系数： $r=0.9998$ 。

# 最低检测限和定量限

检测限是指定量分析方法实际可测定到某组分含量的极限。本方法线性范围最低点为 $0.05 \mu\text{g/mL}$ ，对应到水产品组织中检测限为 $10 \mu\text{g/kg}$ ，即当水产品甲基睾酮浓度大于 $10\mu\text{g/kg}$ 时，本方法能较准确定量水产品甲睾酮的含量。

对水产品中以 $10\sim 400 \mu\text{g/kg}$ 加标进行回收率试验，试验结果表明回收率都在 $70\%\sim 110\%$ 之间，色谱峰明显。因此把此浓度作为最小检出浓度。

# 结 论

---

本实验建立固相萃取-高效液相色谱测定水产品中的甲基睾丸素的方法，相比行业标准简化操作步骤，提高净化效果。一旦在水产养殖中违法使用甲基睾丸素作为雄性化激素来提高成鱼产量和质量，它在水生动物体内运转代谢必然会造成药物残留。通过实验表明，该法测定成水产品中甲基睾丸素检测限达到ppb级，可以满足水生动物药代动力学研究的需要。

该方法的准确度和检测限等技术指标能满足性激素残留分析的要求，适用于目前我国的实验室实际装备情况。



恳请各位专家和同行指正！

通讯地址：浙江省水产质量检测中心  
杭州益乐路20号，邮编 310012  
手机：13757113434，办公室：0571-85029759；  
E-MAIL: [wangyangruanfeng@163.com](mailto:wangyangruanfeng@163.com)