

人工诱导花鳊成熟过程中卵巢内 6 种 性类固醇激素的含量及变化

林 静¹, 湛 嘉², 帅 滇¹, 王 婷¹, 王 倩¹, 王 磊¹, 俞雪钧², 刘利平^{1*}

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 宁波市检验检疫科学技术研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要: 为分析成年花鳊经多次注射鲤鱼脑垂体 (carp pituitary extract, CPE, 每周 12 mg/kg) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG, 每周 300 IU/kg) 后, 卵巢发育成熟过程中 6 种性类固醇激素的含量及变化, 实验采用超高效液相色谱—串联质谱 (UPLC/MS/MS) 联用方法对花鳊卵巢内这 6 种类固醇激素进行研究。结果发现, 睾酮 (testosterone, T)、孕酮 (progesterone, P)、雌二醇 (estradiol-17 β , E₂)、雌三醇 (estriol, E₃)、17 α , 20 β -二羟基-4-孕烯-3-酮 (17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP)、17 α -羟基孕酮 (17 α -hydroxyprogesterone, 17 α -OHP) 在 xBridge C₁₈ 色谱柱上得到良好分离, 在 0~200 ng/mL 的范围内线性相关系数均大于 0.99, 检测限为 0.1~0.5 ng/g, 回收率为 89.00%~94.83%, 相对标准差均小于 20%; 注射外源激素后, 6 种性类固醇激素在花鳊卵巢中的含量及变化情况如下: 第 2 次注射后, T、P、E₂、E₃、DHP、17 α -OHP 的含量分别为 (0.27 \pm 0.05)、(0.64 \pm 0.05)、0、(1.17 \pm 0.19)、0、0 ng/g; 第 9 次注射后, T、P、E₂、E₃、DHP、17 α -OHP 的含量分别为 (0.73 \pm 0.13)、(1.28 \pm 0.38)、(1.27 \pm 0.27)、(0.83 \pm 0.14)、(1.50 \pm 0.59)、(0.43 \pm 0.25) ng/g; 第 16 次注射后, T、P、E₂、E₃、DHP、17 α -OHP 的含量分别为 (1.17 \pm 0.14)、(2.23 \pm 0.51)、(5.59 \pm 0.96)、(2.46 \pm 0.70)、(2.29 \pm 0.65)、(4.56 \pm 0.74) ng/g。对照组中均未检测到雌二醇和雌三醇。研究表明, 雌二醇和雌三醇是花鳊卵巢发育的关键因素; 随着性腺发育, 花鳊卵巢中 6 种性类固醇激素的含量整体呈逐步增加的趋势。另一方面, UPLC/MS/MS 法能同时定量测定这 6 种性类固醇激素, 具有灵敏、高回收率、稳定的优势。

关键词: 花鳊; 超高效液相色谱—串联质谱; 卵巢; 类固醇激素

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱼类性腺发育过程中, 往往伴随着多种性激素含量的变化, 激素水平与性腺发育关系密切。其中, 性类固醇激素主要包括睾酮 (testosterone, T)、孕酮 (progesterone, P)、雌二醇 (estradiol-17 β , E₂)、雌三醇 (estriol, E₃)、17 α , 20 β -二羟基-4-孕烯-3-酮 (17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP)、17 α -羟基孕酮 (17 α -hydroxyprogesterone, 17 α -OHP)。在鱼类繁殖季节, 多种激素共同作用促进性腺发育^[1-3]。

Okamura 等^[4]发现雌二醇、睾酮等对鳊的性腺发育存在反馈调节作用; 而 DHP 则可以诱导卵巢最后成熟与排卵。这些研究表明, 激素含量的变化是决定鱼类是否正常发育及排卵的关键因素。鳊属鱼类的人工繁殖仍是世界难题, 注射外源激素诱导性腺发育是实现鳊人工繁殖的唯一方式。因此, 建立一种精确、快速检测鱼类体内激素的方法, 了解鳊相关激素在其性腺发育过程的变化规律有助于鳊人工繁殖的成功。

收稿日期: 2015-02-19 修回日期: 2015-06-01

资助项目: 上海市科学技术委员会项目 (13320502200, 08391910200); 上海市农委科技攻关项目 (沪农科攻字 2013 第 2-2 号)

通信作者: 刘利平, E-mail: lp-liu@shou.edu.cn

目前,对于鱼类体内激素的检测方法主要有放射性免疫测定法^[2]、液相色谱质谱联用法(LC/MS/MS)^[5]、酶联免疫吸附法(ELISA)^[6]等,这些方法均存在一定的缺点,如放射性免疫法和ELISA重复性相对较差、交叉反应复杂,放射性免疫法无法进行准确的定性分析,气质联用法对不易挥发激素的检测效果差。目前新一代的超高效液相色谱—串联质谱联用技术(Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC/MS/MS)具有灵敏度高、抗干扰能力强等优势,近年来已经开始应用于食品安全检测^[7-9]。类固醇激素为典型的脂溶性化合物,而鳊鱼的性腺脂肪含量高,基质成分高度复杂。若不经过良好的净化处理,不仅极易损坏色谱柱,而且基质干扰会降低灵敏度和可靠性。因此,这些脂溶性目标物的提取和净化尤为关键。

本实验采用试管内固相分散萃取(D-SPE)和UPLC-MS/MS技术,检测了花鳊鱼(*Anguilla marmorata*)在多次注射外源激素后、其卵巢中6种性类固醇类激素睾酮、孕酮、雌二醇、雌三醇、17 α ,20 β -二羟基-4-孕烯-3-酮、17 α -羟基孕酮的变化情况,希望为鱼类人工繁殖提供一种能快速定量检测性类固醇激素变化的分析方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

采用超高效液相色谱系统(ACQUITY UPLC, Waters公司)和三重四极杆串联质谱仪(XEVO-TQ, Waters公司);多激素萃取净化管Supertech QR1,包含D-SPE(A)和D-SPE(B),宁波海曙恒隆实验器材有限公司。

睾酮、孕酮、雌二醇、雌三醇、17 α ,20 β -二羟基-4-孕烯-3-酮、17 α -羟基孕酮的标准品(纯度>98%)均购自美国Sigma-Aldrich公司。根据各自的溶解性和纯度,用甲醇配制成200.0 μ g/mL。甲醇、乙腈(色谱纯)购自美国Tedia公司,超纯水均由Millipore simplicity(Millipore,法国)制备。

1.2 样品制备与分析

样品采集与处理 花鳊鱼于2013年5月购自海南文昌市鳊鱼养殖场。雌鱼体长在742~1 010 mm,体质量在1 200~2 965 g,共计120尾。每周注射一次鲤脑垂体(carp pituitary extract,

12 mg/kg)和人绒毛膜促性腺激素(hCG,300 IU/kg)。以不注射激素的花鳊鱼作为对照组。分别在第2,9,16次注射后随机选取5尾花鳊鱼,使用200 mg/L MS-222麻醉,解剖,取全部卵巢于-80 $^{\circ}$ C条件下保存。

称取5.0 g的离体花鳊鱼卵巢组织样品于50 mL D-SPE试管(A)中,加入乙腈20 mL,以10 000 r/min匀浆2~4 min,收集上清液;再向沉淀中加入乙腈20 mL,以10 000 r/min匀浆2~4 min。合并两次的上清液,并用乙腈清洗匀浆器刀头,将液面定容到50 mL后,充分混匀震荡,再次超声匀浆5 min,4 000 r/min离心5 min后,将试管放置于-40 $^{\circ}$ C冰箱冷冻2 h以上,取上清液40 mL,经三角漏斗(底部具有1 cm高的脱脂棉)快速过滤至100 mL鸡心瓶中,在40 $^{\circ}$ C下旋转蒸发至近干。取70%乙腈定容至1.5 mL,并转移至2 mL D-SPE试管(B)中充分混匀后,10 000 r/min离心3 min,取1 mL上清液经微孔滤膜(0.22 μ m,特富龙)过滤至1.5 mL进样瓶中,待分析测定。另称取5.0 g对照组花鳊鱼卵巢组织样品,经和实验组样品相同的前处理,得对照组样品。

混合标准品溶液的制备 图1为睾酮、孕酮、雌二醇、雌三醇、17 α ,20 β -二羟基-4-孕烯-3-酮、17 α -羟基孕酮6种激素的结构式。分别准确称取这6种物质的标准品10 mg,用甲醇溶解并定容至10.0 mL,配制成1 mg/mL的标准储备液,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。制备标准曲线时,将标准储备液加入对照组样品中,配制成浓度为1、5、25、50、100、200 ng/mL的溶液。

色谱与质谱条件 为优化UPLC对6种激素的检测响应值,选用了3种不同型号的色谱柱:xBridge-C18(2.1 mm \times 100 mm, 5 μ m), ACQUITY BEH C₁₈ 1.8 μ m和ACQUITYHSS T₃ 1.8 μ m进行实验;柱温:40 $^{\circ}$ C;流速:0.30 mL/min;进样量:10 μ L;分析时间:12 min;梯度洗脱。梯度洗脱的具体程序见表1。

MS/MS的质谱条件:电喷雾离子源(ESI);睾酮、孕酮、17 α -羟基孕酮、DHP均采用正离子模式扫描,雌二醇、雌三醇均采用负离子模式扫描;多反应监测(MRM)方式检测。正负离子模式的毛细管电压分别为3.5和2.8 kV;雾化温度为500 $^{\circ}$ C;使用氮气雾化和喷雾,流速分别为950和150 L/h。质谱分析的具体参数见表2。

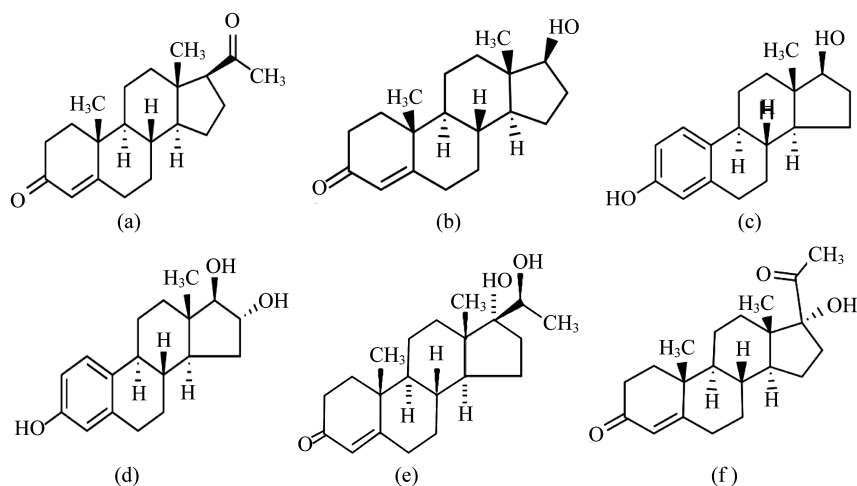


图 1 睾酮(a)、孕酮(b)、雌二醇(c)、雌三醇(d)、 $17\alpha,20\beta$ -二羟基-4-孕烯-3-酮(e)、 17α -羟基孕酮(f)结构式

Fig. 1 Structural formulas of testosterone(a), progesterone(b), estradiol-17 β (c), estriol(d), $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one(e) and 17α -hydroxyprogesterone(f)

表 1 目标物的 UPLC 流动相梯度参数设置

Tab. 1 Gradient UPLC method

时间/min time	A: 水/% (含 2 mmol/L, 0.1% 氨水) 2 mmol/L ammonium acetate in water containing 0.1% ammonia water	B: 甲醇/% methanol	线性 curve
0.00	95.0	5.0	0
6.50	0.0	100.0	6
10.00	0.0	100.0	6
10.1	95.0	5.0	1
12.00	95.0	5.0	1

表 2 6 种性类固醇类激素定量离子对、定性离子对、锥孔电压、碰撞电压和保留时间

Tab. 2 The quantification transition, qualification transition, cone voltage, collision voltage and retention time of the 6 steroid hormones

化合物 compounds	母离子/(m/z) parent ion	子离子/(m/z) daughter ion	锥孔电压/V cone voltage	碰撞电压/V impact voltage	保留时间/min retention time
睾酮 T	289.3	97.1	22	26	15.91
	289.3	109.1	22	26	6.19
孕酮 P	315.4	97	20	24	6.43
	315.4	109.1	20	32	
雌二醇 E ₂	271.3	145.2	45	45	α :5.30
	271.3	183.1	45	40	β :5.84
雌三醇 E ₃	287.2	145.1	56	44	4.53
	287.3	171.1	56	4	
$17\alpha,20\beta$ -二羟基-4-孕烯-3-酮 DHP	333.4	97.1	22	24	6.98
	333.4	109.1	22	28	
17α -羟基孕酮 17α -OHP	331.4	97.1	26	24	6.00
	331.4	109.1	26	30	

回收率和精密度计算 将配置好的混合标准品溶液用甲醇稀释至 500 ng/mL。在 18 个 50 mL 多激素萃取净化管 D-SPE 试管(A)分别放入 5.0 g 对照组花鳗鲡卵巢组织样品,分成 3 组,分别添加不同水平的混合标准品质量至 5、250、1 000 ng,每个水平重复 6 次,静置 20 min 后进行分析。

数据处理 实验所得数据采用 EXCEL 处理,用平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示,统计分析采用 SPSS 软件统计包中的 Duncan 氏检验,以 $P < 0.05$ 作为差异显著。

2 结果

2.1 标准曲线、回收率和检测限

比较发现 6 种性类固醇激素在 xBridge C₁₈ 色谱柱上得到良好分离, T、P、E₂、E₃、DHP、17 α -OHP 在 0 ~ 200 ng/mg 的范围内的标准曲线分别为 $y = 8983.37x + 5770.85$ ($r = 0.994$), $y = 8386.93x + 6067.79$ ($r = 0.993$), $y = 130.86x + 16.46$ ($r = 0.994$), $y = 99.68x + 76.20$ ($r = 0.995$), $y = 3694.49x + 25958.58$ ($r = 0.999$), $y = 4732.90x + 6474.66$ ($r = 0.996$)。将 50 和 1 ng/g 混合标准品样品进行分析,测得 T, P, E₂, E₃, DHP, 17 α -OHP 定量离子对 (Transition 1) 为 289.3 > 97.1, 315.4 > 97.1, 271.3 > 145.2, 287.2 > 145.1, 333.4 > 97.1, 331.3 > 97.1, 信噪比 S/N 分别为 18, 19, 16, 17, 17, 14 ($S/N \geq 10$), 检测限分别为 0.2, 0.2, 0.1, 0.1, 0.2, 0.2 ng/g。

6 种性类固醇激素在花鳗鲡性腺中 3 种添加水平的平均回收率为 89.00% ~ 94.83% (表 3), 随着标准品浓度的增加呈下降的趋势, 标准偏差亦逐渐降低, 表明本方法具有较高的可靠性。

2.2 色谱柱优化

在流动相 A (水相, 含 2 mmol/L 乙酸铵) 中加入 0.1% 氨水时, 对待测样品的分离度和响应值均较高。图 2 为在流动相 A (水相: 含 2 mmol/L 乙酸铵, 0.1% 氨水), B (甲醇) 条件下, 色谱柱 ACQUITY BEH C₁₈ 1.8 μ m, ACQUITY HSS T₃ 1.8 μ m 和 xBridge C₁₈ 5 μ m 的平均响应值。从图中可以看出, 色谱柱 xBridge C₁₈ 5 μ m 在分析 6 种性类固醇激素时的响应值总体优于另 2 种型号的响应值, 因此本实验最终选用 xBridge C₁₈ 5 μ m。

2.3 花鳗鲡 GSI 的变化

人工诱导花鳗鲡性腺成熟的过程中对照组的

表 3 6 种性类固醇激素在花鳗鲡性腺中 3 种添加水平平均回收率 ($n = 6$)

Tab.3 Mean spike recoveries for the six steroid hormones of gonad in marbled eel

添加水平 ^a /(ng/g) adding level	平均回收率/% the average recovery	相对标准偏差/% the relative standard deviation
1	94.83	15.30
50	93.27	14.80
200	89.00	5.45

注: 表格中肩标小写字母 a 表示 6 种相同浓度类固醇激素混合标准品理论添加水平; 小写字母 b 表示 6 种相同浓度类固醇激素混合标准品实际检测值。

Notes: Lowercase a means theoretical addition levels with same concentration of 6 steroid hormones mixed standard, Lowercase b means measured values with same concentration of 6 steroid hormones mixed standard

平均 GSI 为 0.902% ($n = 5$), 实验组平均 GSI 在第 2 次注射激素、第 9 次注射激素、第 16 次注射激素分别为 0.978% ($n = 5$), 2.207% ($n = 5$), 22.908% ($n = 5$)。

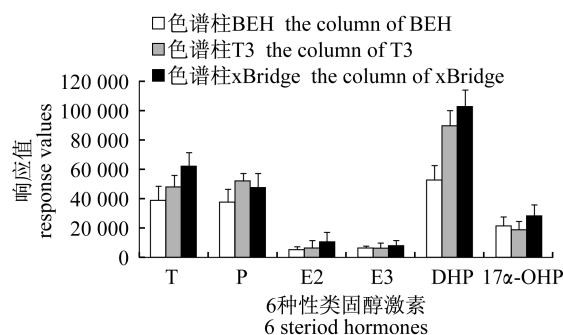


图 2 不同色谱柱 (ACQUITY BEH C₁₈ 1.8 μ m、ACQUITY HSS T₃ 1.8 μ m 和 xBridge C₁₈ 5 μ m) 检测 6 种激素的混合标准品溶液的平均响应值比较
Fig.2 The response value of six hormones with the three columns (ACQUITY BEH C₁₈ 1.8 μ m, ACQUITY HSS T₃ 1.8 μ m and xBridge C₁₈ 5 μ m) runs the same mixed standard solution

2.4 激素含量变化

随着注射激素次数的增加, 6 种性类固醇类激素含量呈现逐步增加的趋势, 其中睾酮和雌二醇在花鳗鲡人工繁殖阶段后期增长较快, 孕酮、17 α -OHP 和 DHP 随着卵巢的发育缓慢增加, 但雌三醇的含量在卵巢发育中期呈现先下降再上升的趋势 (图 3)。

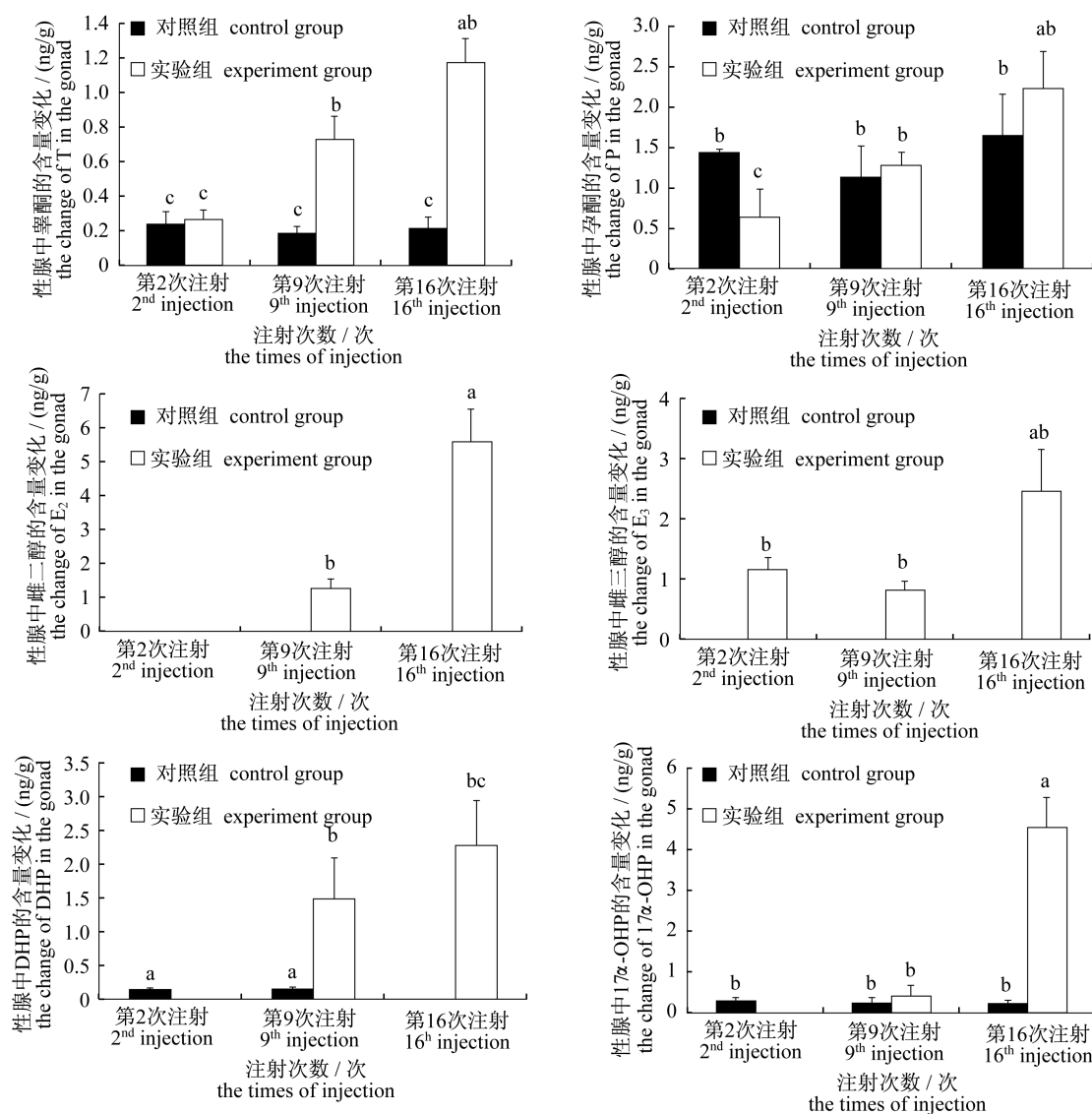


图3 人工繁殖过程中花鳗鲡注射激素组和对照组在不同时期卵巢内性类固醇激素变化

字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Fig. 3 The steroid hormone changes in different periods of marbled eel during artificial induced maturation

The same letter means no significant difference ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 超高效液相色谱—串联质谱联用技术分析鱼类卵巢中激素方法的建立

实验建立了用超高效液相色谱—串联质谱联用法测定花鳗鲡卵巢中 6 种性类固醇类激素的方法,并对实验条件进行了优化,结果发现色谱柱 xBridge C₁₈ 5 μm 配合流动相 A,对用乙腈提取鱼类卵巢中的性类固醇类激素进行分离后,在 UPLC/MS/MS 反应模式下同时进行 6 种激素的定性及定量分析,具有较高的回收率,重复性好,

信号响应强,可靠性高。在乙酸铵流动相中,雌二醇和雌三醇等响应低,通过加入 0.1% 氨水进而促进负离子电离效率,提高了响应值。

在对动物组织中的微量物质进行检测时,往往存在检测限的问题。在本方法中,为了提高检测限,在样品加标后,需放置 30 ~ 60 min,使标样充分渗透,得到的结果才能达到国内外痕量残留分析对测定方法的要求^[10],而且样品中类固醇激素的含量均需在各自己的线性范围内,才能采用通过本方法建立的标准曲线进行定量分析;本方法

与湛嘉^[11]等使用气质联用仪测定黄鳝肌肉中性激素相比,检测限降低了 47%;回收率高于蔡勤仁等^[12]使用液质联用仪检测猪组织中的类固醇激素的回收率。

不同动物组织中,存在多种干扰检测分析的物质,需要采取不同的提取方法。类固醇类激素为脂溶性激素,而硬骨鱼类性腺内含有大量脂类物质,由于类固醇类激素的极性与油脂的极性相似,用固相萃取法^[13]等方法很难将其从油脂中分离开,因此样品前处理的过程与方法就显得尤为重要。李向军等^[14]使用 HLB 柱在处理大黄鱼和鳊鱼肝脏样品时易发生乳化现象,影响样品的净化。凝胶渗透色谱法(GPC 法)虽然可通过分子量大小来分离净化,但对于分子量接近油脂的化合物则无法使用。国标中(GB/T 21981-2008)动物源食品中激素残留的检测方法不仅操作繁琐,回收率低(尤其是极性较弱的激素),而且净化效果欠佳,尤其针对低含量水平的物质时,色谱柱容易被污染,结果重复性差。本文选用固相分散萃取(D-SPE),与固相萃取方法相比,简单快捷,灵敏度高,分离效果好^[15]。所谓 D-SPE 就是采用 Supertech QR15 萃取净化管,此净化管将萃取和净化二合一,结合低温冷冻去脂,当温度降低到一定程度时甘油三酯类脂肪等杂质会从极性溶剂中凝固析出,再通过离心和快速过滤,一般可以除去水产品乙腈提取液 90% 以上的脂肪^[16-18],从而使回收率和样品净化达到较好的效果。

3.2 类固醇类性激素变化在鱼类性腺发育中的作用

鱼类性类固醇类激素通常在一些特殊的细胞内(如滤泡细胞和睾丸间质细胞)形成。这些激素中,睾酮对鱼类体内游离脂肪酸的代谢和诱导排卵后的产卵行为都有一定的作用,在雌鱼发育过程中通常 T 通过 P450 芳羟化酶的作用转化成雌二醇^[2-3],而 E₂ 在合成卵黄时发挥重要作用。Mariann 等^[19]研究发现,在卵黄生成末期,雌鱼血液中睾酮的含量比雄鱼高。Matsubara^[20]研究表明,11-KT 的含量随卵巢的发育而升高,周雯伊等研究发现雌花鳊血清中的睾酮含量随着性腺发育而不断增加^[21],这与本研究中性腺内睾酮变化相类似;本研究中睾酮在第 16 次注射时出现最高值,可能因为花鳊卵巢内正在积累大量卵黄物质,需要睾酮促进脂类物质转化以及形成雌

二醇。性腺内睾酮和雌二醇的含量随着发育时间的进行而不断升高,使得花鳊在外源激素诱导下能够发育并成熟。Nagahama 等^[22-23]研究表明,在鱼类卵巢生长发育阶段,GtH 刺激卵母细胞外的滤泡细胞合成雌二醇,而雌二醇可促进肝脏合成卵黄蛋白原,进而使卵黄在卵母细胞内大量积累。此外,雌二醇还参与碳水化合物和脂类代谢的调节,促使脂类从身体组织中调动出来。本研究在对照组中并未检测到 E₂ 的含量,而实验组其含量逐渐升高,表明 E₂ 是性腺发育必需的类固醇类激素,缺少 E₂ 的亲鱼其性腺不能发育。齐鑫等^[24]研究认为,花鳊成熟过程中对照组血清中 E₂ 的含量最高,而实验组中 E₂ 的含量随着发育阶段的进行而不断降低,这与性腺内 E₂ 的含量变化截然不同;温海深^[25]和林浩然等^[26]认为雌二醇对卵母细胞的发育有重要的调节作用,但是不能使卵黄蛋白原进入卵细胞内,而 T 可以将卵黄蛋白原运输到卵细胞内;由此,本研究中,睾酮和 E₂ 的含量随着发育阶段的进行而逐渐增加,与此理论相符。本研究中花鳊卵巢内雌三醇的含量在激素注射第 2 针到第 9 针时略微下降,可能与 17 α -OHP 在此时期大量被转化成 DHP 有关,因为部分雌三醇是由 17 α -OHP 经过芳香化作用转化而来。对日本鳊的研究证明,雌鱼体内 DHP 含量在卵母细胞最后成熟时大大增加,进而与卵细胞膜的特异性受体相结合,产生成熟促进因子,诱导卵母细胞核融解和排卵^[2],这与本研究中性腺内 DHP 的含量变化规律相一致。

花鳊人工繁殖过程中 6 种类固醇激素随着发育逐步升高,在第 16 次注射时出现最高值,而此时花鳊的 GSI 也达到峰值,表明花鳊的性腺发育过程与类固醇激素含量升高密切相关;另外,对照组均未检测到雌二醇和雌三醇,说明这两种激素为花鳊卵巢发育所必需,至于是否可用这两种激素的含量水平作为衡量花鳊性腺发育的标志,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Huertas M, Alexander P, Peter C, et al. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: Possible involvement of chemical communication [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 147(3): 304-313.

- [2] Kazeto Y, Tosaka R, Matsubara H, *et al.* Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel [J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2011, 127: 149 – 154.
- [3] Kawakami Y, Nomura K, Ohta H, *et al.* Characterization of thyroid hormone receptors during early development of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2013, 194(12): 300 – 310.
- [4] Okamura A, Horie N, Mikawa N, *et al.* Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations [J]. *Ecology of Freshwater Fish*, 2014, 23(1): 95 – 110.
- [5] Wang H Y, Chung-Davidson Y W, Li W M. Identification and quantification of sea lamprey gonadotropin-releasing hormones by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1345(6): 98 – 106.
- [6] Rosenfeld H, Mylonas C C, Bridges C R, *et al.* GnRH α -mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(1): 55 – 64.
- [7] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, *et al.* Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2 – μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1194: 66 – 79.
- [8] Mendiola J A. Use of compressed fluids for sample preparation; food applications [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1152(1 – 2): 234 – 246.
- [9] Heccegová A, Dömötöróvá M, Matisová E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1153(4): 54 – 73.
- [10] Sulyok M, Berthiller F, Krska R, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry Rcm*, 2006, 20(18): 2649 – 2659.
- [11] Zhan J, Yu X J, Li Z Q, *et al.* Simultaneous determination of residue of sex hormones in eel muscle by Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2008, 29(6): 298 – 303. [湛嘉, 俞雪钧, 李佐卿, 等. 黄鳝肌肉中的 20 种性激素同时测定的气质联用检测方法. *食品科学*, 2008, 29(6): 298 – 303.]
- [12] Cai Q R, Feng J W, Zhang Y, *et al.* Determination of 12 steroid hormone residues in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combining with library search [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(8): 712 – 717. [蔡勤仁, 冯家望, 张毅, 等. 液相色谱 – 串联质谱结合谱库检索法同时测定猪组织中 12 种性类固醇激素. *色谱*, 2011, 29(8): 712 – 717.]
- [13] Simersky R, Ond-ej N, David A M, *et al.* Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28(2): 125 – 136.
- [14] Li X J, Yu H J, Feng B, *et al.* Simultaneous determination of 24 hormones in aquatic products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2012, 31(5): 62 – 67. [李向军, 于慧娟, 冯兵, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 24 种性激素. *分析实验室*, 2012, 31(5): 62 – 67.]
- [15] Wielogórska E, Elliott C T, Danaher M, *et al.* Validation of an ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection and quantitation of 19 endocrine disruptors in milk [J]. *Food Control*, 2015, 48(2): 48 – 55.
- [16] Chen S, Yu X, He X, *et al.* Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low – temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1297 – 1300.
- [17] Lopes R P, Augusti D V, Oliveira A G, *et al.* Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. [J]. *Food Addit Contam-Part A: Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011, 28(12): 1667 – 1676.
- [18] Gentili A, Caretti F, Bellante S, *et al.* Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(5): 1375 – 1388.

- [19] Mariann R W, Toyohiko N, Muramoto K, *et al.* Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. [J]. *Biochemistry*, 1991, 6(6): 1509 – 1515.
- [20] Matsubara H, Lokman P M, Kazeto Y. Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1): 393 – 402.
- [21] Zhou W Y. The research of gonad development and related hormones secretion male in marbled eel (*Anguilla marmorata*) by hormone-induced, and relative hormone secretion [D]. Haikou: Hainan University, 2009. [周雯伊. 激素诱导雄性花鳗鲡性腺发育及相关激素分泌的研究. 海口: 海南大学, 2009.]
- [22] Nagahama Y. 17 alpha, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. [J]. *Steroids*, 1997, 62(1): 190 – 196.
- [23] Nagahama Y, Young G, Ueda H, *et al.* Endocrine control of final gamete maturation in salmonids [M]// Iwamoto R N, Sower S. *Salmonid Reproduction*. Washington Sea Grant Program. Seattle: University of Washington, 1985: 8 – 19.
- [24] Qi X. The research of gonad development by artificial reproduction in marbled eel (*Anguilla marmorata*) [D]. Haikou: Hainan University, 2010. [齐鑫. 人工诱导雌性花鳗鲡性腺发育成熟的研究. 海口: 海南大学, 2010.]
- [25] Wen H S, Dong S L. Recent progress and prospects of the study of Cyclophilins [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2008, 38(3): 367 – 370. [温海深, 董双林. 硬骨鱼类雌激素受体及其在生殖调节中的作用研究. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(3): 367 – 370.]
- [26] Lin H R, Qi X, Zhou W Y, *et al.* Artificial induction maturation of marbled eel (*Anguilla marmorata*) and functions of related hormones and tissues [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 24(7): 990 – 997. [林浩然, 齐鑫, 周雯伊, 等. 人工诱导花鳗鲡卵巢发育成熟及相关激素和组织的作用. *水产学报*, 2010, 24(7): 990 – 997.]

Quantification of 6 sexual steroid hormones in the ovary of marbled eel *Anguilla marmorata* during artificial induced maturation

LIN Jing¹, ZHAN Jia², SHUAI Dian¹, WANG Ting¹, WANG Qian¹,
WANG Lei¹, YU Xuejun², LIU Liping^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,
Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, China

Abstract: To determine the content and changes of 6 steroid hormones in the ovaries of female farmed marbled eels *Anguilla marmorata* during artificially induced maturation through carp pituitary extract (12 mg/kg · week) and hCG (300 IU/kg · week) injection, in this paper, ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-triple quadruple mass spectrometry (UPLC/MS/MS) method was applied to detect the 6 steroid hormones. The results showed that the chromatographic separation of 6 gonad steroid hormones, namely, testosterone (T), progesterone (P), estradiol-17 β (E₂), estriol (E₃), 17 α , 20 β -dihydroxy - 4-pregnen-3 - one (DHP), and 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP) was well performed using an xBridge C₁₈ column. The linear regression coefficients (R) of T, P, E₂, E₃, DHP, 17 α -OHP were above 0.99 in the range of 0 - 200 ng/ml and the limits of detection were above 0.1 - 0.5 ng/g. Average recoveries of T, P, E₂, E₃, DHP, 17 α -OHP also reached more than 89.00% - 94.83%, and relative standard deviations were less than 20%. The average contents of T, P, E₃ in the second week (after second injection) were (0.27 ± 0.05), (0.64 ± 0.05), (1.17 ± 0.19) ng/g respectively. DHP, E₂, 17 α -OHP were not detected in the second week. From the ninth week, the contents of T, P, E₂, E₃, DHP, 17 α -OHP increased to (0.73 ± 0.13), (1.28 ± 0.27), (1.27 ± 0.27), (0.83 ± 0.14), (1.50 ± 0.59), (1.43 ± 0.25) ng/g. The average contents of T, P, E₂, E₃, DHP, 17 α -OHP in sixteenth week (after sixteenth injection) were (1.17 ± 0.14), (2.23 ± 0.51), (5.59 ± 0.96), (2.46 ± 0.70), (2.29 ± 0.65), (4.56 ± 0.74) ng/g, while there were no E₂ and E₃ detected in the control group. The results indicated that E₂ and E₃ are essential to ovary development, and the 6 steroid hormones increased with the development of gonad maturation. The UPLC/MS/MS method is a sensitive and reliable approach with high recovery rate in simultaneously quantifying 6 gonad steroid hormones in the fish.

Key words: *Anguilla marmorata*; UPLC/MS/MS; ovary; steroid hormones

Corresponding author: LIU Liping. E-mail: lp-liu@shou.edu.cn