

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定新鲜块菌子实体中 α -雄烷醇

程池露^{1,2}, 李传华², 熊海宽³, 冯娜^{2*}, 张劲松^{2*}

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
国家食用菌加工技术研发分中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403

3 永仁野森达菌业有限公司, 云南 楚雄 651499

摘要: 本研究建立了一种固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱的检测方法, 用于检测新鲜块菌子实体中 α -雄烷醇(5 α -雄甾-16-烯-3 α -醇)的含量。新鲜块菌样品经无水乙醇提取, Oasis HLB 柱萃取富集后, 采用超高效液相色谱-串联质谱进行分析定量。方法学验证结果表明该方法的回收率为 88.49%–92.22%; 检出限为 0.120 9 ng/mL, 定量限为 0.398 9 ng/mL。该方法简便、精确, 适用于新鲜块菌中 α -雄烷醇含量的测定。

关键词: 块菌; α -雄烷醇; 超高效液相色谱-串联质谱

[引用本文] 程池露, 李传华, 熊海宽, 冯娜, 张劲松, 2022. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定新鲜块菌子实体中 α -雄烷醇. 菌物学报, 41(5): 830-836

Cheng CL, Li CH, Xiong HK, Feng N, Zhang JS, 2022. Determination of α -androstanol in fresh *Tuber indicum* fruiting bodies by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Mycosystema, 41(5): 830-836

基金项目: 云南省张劲松专家工作站(20210SAF150009)

Supported by ZHANG Jingsong Expert Station of Yunnan Province (20210SAF150009).

*Corresponding authors. E-mail: fengna006@163.com, syj16@saas.sh.cn

Received: 2021-11-18, accepted: 2021-11-27

Determination of α -androstanol in fresh *Tuber indicum* fruiting bodies by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHENG Chilu^{1,2}, LI Chuanhua², XIONG Haikuan³, FENG Na^{2*}, ZHANG Jingsong^{2*}

¹ College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, China; National Engineering Research Center of Edible Fungi; National R&D Center for Edible Fungal Processing; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China

³ Yongren Ye Senda Fungus Industry Co., Ltd., Chuxiong 651499, Yunnan, China

Abstract: A innovative method using solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS²) was developed to determine α -androstanol (5 α -androst-16-en-3 α -ol) in fresh fruiting bodies of *Tuber indicum*. The α -androstanol in fruiting bodies were extracted with ethanol, purified by solid phase cartridges, and then analyzed and quantified by UPLC-MS². Method logical validation results showed that the recovery rates of α -androstanol by using the method are 88.49%–92.22%; the detection limit is 0.120 9 ng/mL, and the quantification limit is 0.398 9 ng/mL. This method was rapid and accurate, and suitable for the determination of α -androstanol content in fresh fruiting bodies of *Tuber indicum*.

Keywords: *Tuber indicum*; α -androstanol; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

块菌(truffle)又称松露、无娘果和猪拱菌等, 属于囊菌门 Ascomycota、块菌科 Tuberaceae、块菌属 *Tuber* F.H. Wigg, 是一种共生于树下的稀有名贵食用菌, 具有极高的经济价值及食用价值, 被誉为“世界三大珍肴”, 是世界上最昂贵的食用菌(Richard *et al.* 2012; Schmidberger & Schieberle 2017)。块菌对生长环境要求严苛, 主要分布在欧洲、北美以及亚洲的北温带和寒带地区(李淑超等 2017), 主要有法国的黑孢块菌 *Tuber melanosporum*、意大利的白块菌 *Tuber magnatum*、北美的囊状块菌 *Tuber gibbosum* 以及亚洲的印度块菌复合群 *Tuber indicum* complex 等品种(陈娟等 2018; 范黎 2021)。近年来, 国内外对块菌的研究主要集中在块菌的发现、生态环境调查、块菌的人工培育、营养分析与分类等方面(Payen *et al.* 2014; 李晓凤等 2018; 范

黎 2021; Wu *et al.* 2021)。

块菌中含有特殊的活性成分 α -雄烷醇。 α -雄烷醇即 5 α -雄甾-16-烯-3 α -醇(5 α -androst-16-en-3 α -ol), 是一种具有麝香气味的16-雄烯类甾体化合物。 α -雄烷醇被 Prelog & Ruzicka (1944)首次从猪睾丸中分离得到, 后被证明广泛存在于人或动物组织、唾液、尿液、血浆和腋下汗液中(Brooksbank & Haslewood 1961)。 α -雄烷醇类似于人体内的性激素成分, 是一种具有生物活性的类固醇化合物, 能调节女性的情绪和月经时间, 在抗抑郁药物开发方面也具有潜力(David & Vivien 1986; Kazuyuki *et al.* 2000; Huang *et al.* 2014)。由于其特殊的气味, α -雄烷醇还被开发为具有很高市场价值的香料。

α -雄烷醇独特的生理活性和气味, 使其在块菌中的含量成为评价松露及其相关产品品质的

一个重要指标。由于 α -雄烷醇在块菌中的含量较低, 此前, 对块菌中 α -雄烷醇的含量进行测定时多采用 GC-MS 方法(Huang *et al.* 2014), 相较于此类方法, UPLC-MS/MS 法通过二级质谱进行定性定量。二级质谱可以避免假阳性离子的干扰并可以一定程度上降低噪音, 因此比一级质谱具有更强的定性专属性, 更高的检测灵敏度。故本研究尝试利用无水乙醇超声提取块菌子实体样品, 通过固相萃取技术富集, 再结合 UPLC-MS/MS 技术, 建立一种快捷、精确的测定新鲜块菌子实体中 α -雄烷醇含量的分析方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 块菌子实体

块菌子实体 *Tuber indicum* 由永仁野森达菌业有限公司栽培提供, 上海市农业科学院食用菌研究所李传华博士鉴定。

1.1.2 试剂

α -雄烷醇标准品: (纯度 $\geq 99\%$, 山东君瑞医药科技有限公司); 甲醇(质谱级, Merck 公司); 超纯水(实验室自制); 冰醋酸、甲醇、无水乙醇(分析纯, 国药集团药业股份有限公司)。

1.1.3 仪器

NL TRA 超纯水仪(ELGA Lab Water 公司); 超高效液相色谱仪(Agilent LC1290 infinity II)、三重四级杆质谱仪(Agilent 6495)、色谱柱(Agilent Eclipse Plus C18) (安捷伦公司); 超声波清洗器(KQ2200E, 昆山市超声仪器有限公司); 电子天平(FA2004A, 上海精密科学仪器有限公司), 固相萃取柱(Qasis HLB, 3cc/60 mg, 美国沃特世公司)。

1.2 标准溶液的配制

精确称量 α -雄烷醇标准品, 用质谱级甲醇配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液, 再逐级稀释配制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、500 ng/mL、200 ng/mL、100 ng/mL、

50 ng/mL、20 ng/mL 的标准工作溶液。

1.3 色谱-质谱条件

1.3.1 色谱条件

选用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 50 mm), 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。上样量为 2 μL 。流速: 0.5 mL/min。流动相: 水(A)-甲醇(B)。洗脱程序: 0 min, 20% A, 80% B; 5 min, 20% A, 80% B; 7 min, 0% A, 100% B; 8 min, 0% A, 100% B。

1.3.2 质谱条件

选用大气压化学电离源 APCI 作为离子源, 检测在正离子模式下进行, 选用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。毛细管电压: 4 500 V, 毛细管出口电压: 380 V。干燥气流速: 14 L/min, 干燥气温度: 200 $^{\circ}\text{C}$, 电晕针电流: 8 μA , 气化室温度: 350 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气压力: 30 psi。

1.4 固相萃取洗脱条件的考察及样品前处理

配制 100 ng/mL 的 α -雄烷醇, 通过 Qasis HLB 柱上样, 上样量 1 mL。分别使用 2 mL 不同浓度的乙醇进行洗脱, 对洗脱液中的 α -雄烷醇进行分析定量, 计算不同浓度乙醇洗脱后的回收率, 确定最佳洗脱浓度。

准确称取 10 g 的新鲜块菌子实体样品, 按照料液比 1:2 (重量体积比, g:mL)加入无水乙醇 20 mL, 超声提取 60 min 后, 取上清加入 20 mL 超纯水混匀, 用 Oasis HLB 小柱进行萃取。上样后先用 3 倍柱体积的 50%乙醇洗去杂质, 再用 2 倍柱体积的无水乙醇进行洗脱。收集无水乙醇洗脱液, 氮吹浓缩为 1 mL, 经 0.2 μm 孔径的有机相微孔滤膜过滤, 得到待测样品溶液。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度

取 200 ng/mL 的标准品溶液在同一天内重复进样 6 次, 根据标准曲线计算 6 次实验所得三肽的浓度, 计算日内精密度。取 200 ng/mL 的标准

品溶液连续 3 d, 每天进样 2 次, 根据 6 次实验的结果计算日间精密度。

1.5.2 样品稳定性和重复性

取块菌新鲜子实体, 按照 1.4 中的样品预处理步骤提取后, 配制待测样品溶液 1 份, 分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样, 根据 6 次实验的结果计算样品稳定性。取块菌新鲜子实体, 分别按照 1.4 中的样品预处理步骤提取后, 配制待测样品溶液, 进样测定 6 次, 根据 6 次的实验结果计算样品重复性。

1.5.3 加标回收率

取已知浓度的样品, 加入 α-雄烷醇标准样品, 混匀后重复上样 3 次, 计算样品加标回收率。加标回收率%=(实测值-供试样品中所含被测成分量)/加入对照品量×100%。

2 结果与分析

2.1 固相萃取洗脱条件的考察结果

不同浓度的乙醇对 α-雄烷醇的洗脱回收率结果见表 1, 50%浓度以下的乙醇对 α-雄烷醇没有洗脱能力, 60%以上逐步提高, 在 100%乙醇浓度下回收率约达到 90%。为了更好地洗脱杂质, 富集目标物, 本研究采用 50%乙醇来洗脱杂质, 用无水乙醇来洗脱富集样品中的 α-雄烷醇。

表 1 不同浓度乙醇对 α-雄烷醇的洗脱回收率
Table 1 The elution recovery rate of α-androstanol under different concentrations of ethanol

乙醇浓度	回收率
Ethanol concentration (%)	Recovery rates (%)
50.00	0.00±0.001
60.00	8.36±0.006
70.00	14.89±0.021
80.00	41.73±0.020
90.00	53.66±0.011
100.00	89.86±0.012

2.2 色谱-质谱条件优化

选用大气压化学电离源, 正离子模式, 对

10 μg/mL α-雄烷醇的标准溶液进行母离子扫描, 得到 α-雄烷醇的母离子。然后通过质谱优化软件 Agilent Optimizer, 对 α-雄烷醇进行子离子扫描和碰撞能的优化, 在特征碎片离子的离子丰度达到最大时为最佳。最后得到 α-雄烷醇的相应信息: α-雄烷醇, 相对分子质量: 274.0; 母离子: 257.2; 定量离子: 93.1, 碰撞能: 25; 定性离子: 77.0, 碰撞能 80。

α-雄烷醇经过母离子扫描后得到[M+H]⁺和[M-H₂O+H]⁺两种母离子, 由于[M-H₂O+H]⁺的离子丰度更高, 所以选择[M-H₂O+H]⁺离子作为该化合物的母离子, 进行下一步子离子扫描。在子离子扫描中选择了两种响应最高的碎片离子 93.1 和 77.0 分别作为定量和定性离子。推测其裂解规律如下(宁永成 2018): 母离子的 B 环和 D 环开裂后, C 环再丢掉 1 个甲基, 形成了质荷比为 93.1 的定量离子; A 环在 B 环开裂后, 再丢掉两个甲基, 形成了质荷比为 77.0 的定性离子(图 1, 图 2, 图 3)。

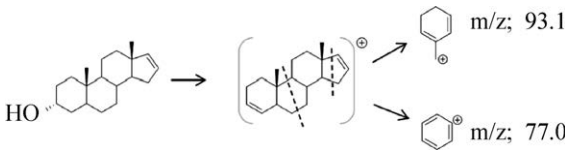


图 1 α-雄烷醇的质谱裂解规律示意图
Fig. 1 Fragmentation law of α-androstanol analysed by mass spectrometry.

2.3 线性范围、检出限和定量下限

运用定量分析软件(Agilent masshunter quantitative analysis)创建 α-雄烷醇的标准曲线, 取配制好的 10 μg/mL、5 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL 和 500 ng/mL、200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、20 ng/mL 的混合标准工作溶液按照 1.3 的液相色谱和质谱条件上样, 以横坐标为化合物的浓度, 纵坐标为化合物的定量离子响应值, 制作定量标准曲线。基于响应值标准偏差和标准曲线的斜率计算检测限(LOD)和定量限(LOQ)。其中: LOD=3σ/S, LOQ=10σ/S, σ: 响

应值的标准偏差, S: 标准曲线的斜率, 响应值的标准偏差为测定空白值的标准偏差。

按照上述方法绘制的标准曲线(图 2), 在 20–500 ng/mL 之间呈现良好的线性关系; 线性方程为 $y=476.739\ 895x-5\ 203.830\ 020$, $R^2=0.999\ 2$, 检出限为 0.120 9 ng/mL, 定量限为 0.398 9 ng/mL。

2.4 方法学考察结果

2.4.1 精密度

α -雄烷醇的日内精密度测定结果的 RSD 为 0.64%, 日间精密度测定结果的 RSD 为 1.69% (表 2), 均小于 15.00%, 说明该方法的日内和日间精密度良好。

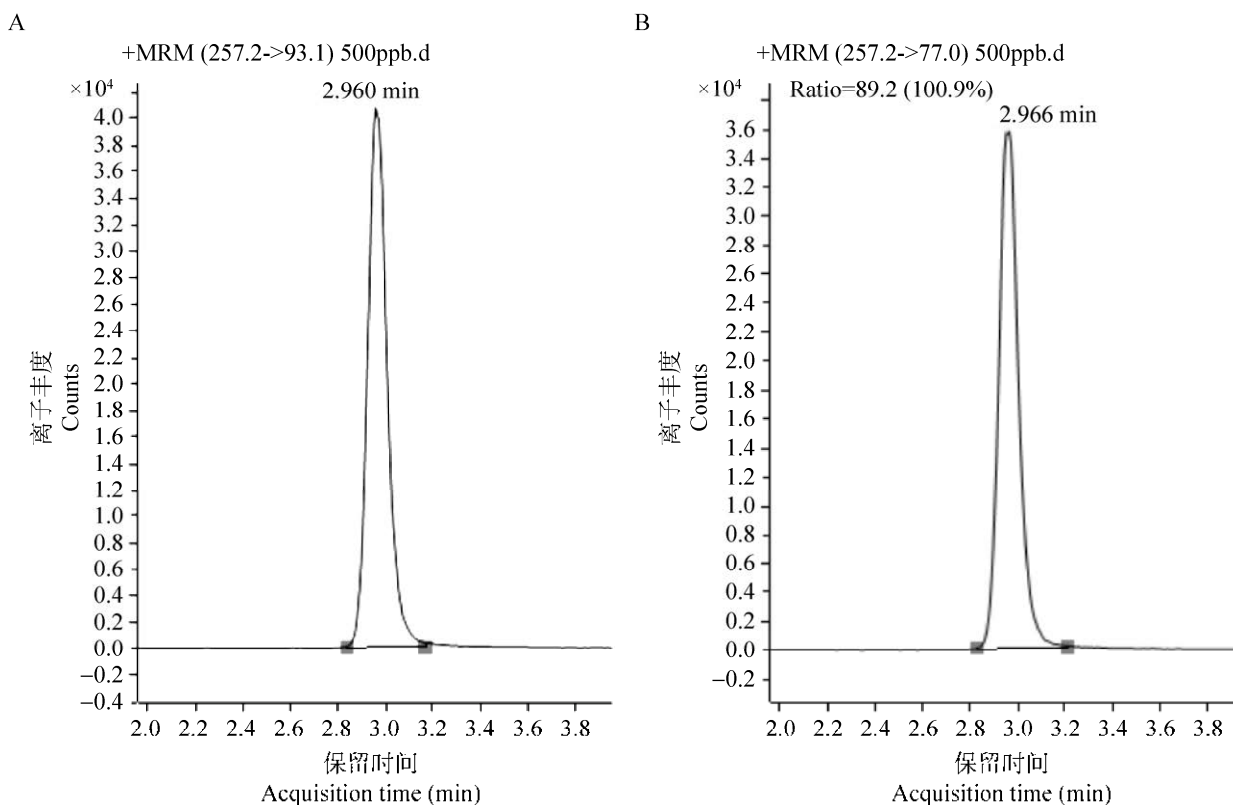


图 2 α -雄烷醇优化条件后的定量离子图(A)和定性离子图(B)

Fig. 2 Quantitative ion diagram (A) and qualitative ion diagram (B) of α -androstanol after optimization.

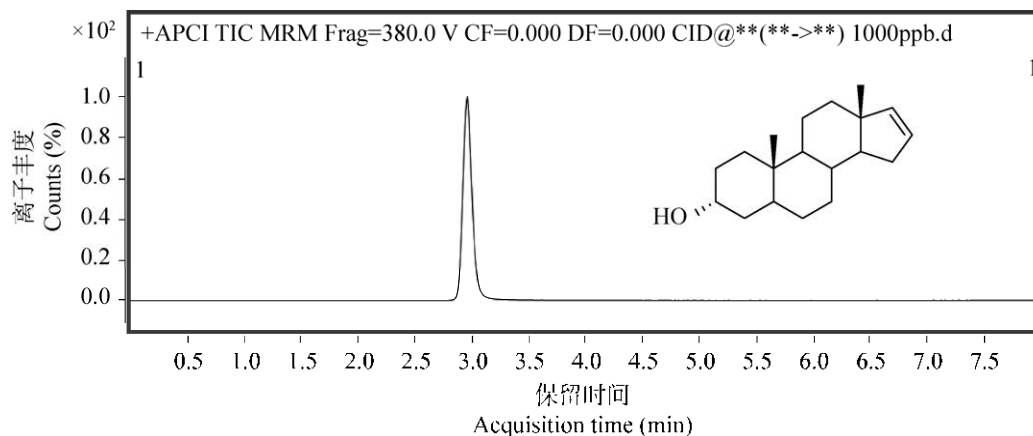


图 3 α -雄烷醇总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of α -androstanol.

表 2 日内和日间精密度的测定结果
Table 2 Measured results of intra-day and inter-day precision

日内精密度	测定值	日间精密度	测定值
Intra-day precision	Measured value (ng/mL)	Inter-day precision	Measured value (ng/mL)
1	179.724 2	1st 1	186.385 5
2	181.077 2	2	187.087 4
3	181.682 9	2nd 1	184.952 4
4	181.003 6	2	179.584 4
5	180.322 5	3rd 1	181.077 2
6	183.088 8	2	181.682 9
RSD (%)	0.64	RSD (%)	1.69

2.4.2 样品稳定性和重复性

稳定性： α -雄烷醇样品稳定性测定结果的 RSD 为 3.91% (表 3)，小于 15.00%，说明样品在 24 h 内性质稳定。重复性： α -雄烷醇的样品重复性测定结果的 RSD 为 2.22% (表 3)，小于 15.00%，说明样品重复性良好。

表 3 样品稳定性、重复性的测量结果
Table 3 Measured results of sample stability and reproducibility

样品稳定性	测定值	样品重复性	测定值
Sample stability	Measured value (ng/mL)	Sample reproducibility	Measured value (ng/mL)
0 h	31.427 4	1	32.991 1
2 h	32.577 0	2	32.404 7
4 h	30.885 8	3	32.753 0
8 h	28.872 1	4	31.664 4
12 h	31.211 1	5	31.510 0
24 h	30.706 2	6	33.290 5
RSD (%)	3.91	RSD (%)	2.22

2.4.3 加标回收率

固相萃取-液质联用方法的加标回收率在 88.49%–92.22%之间，RSD 小于 15% (表 4)。表明该方法的准确度良好，适用于 α -雄烷醇的定量分析。

2.5 样品测定结果

取 3 批次的新鲜块菌子实体。按照 1.4 的方法进行前处理并分别进行检测，新鲜块菌中 α -雄烷醇的含量分别为 4.540 4、2.100 7、

3.140 4 ng/g。结果表明， α -雄烷醇在 3 份新鲜块菌子实体中均有检出。

表 4 回收率的测定结果
Table 4 Measured results of the recovery rates

化合物	回收率	平均值	RSD (%)
Compound	Recovery rates (%)	Average value (%)	
α -雄烷醇	91.69	90.80	1.32
α -androstanol	88.49		
	92.22		

3 讨论

Claus *et al.* (1981)用薄层色谱法证实了黑孢块菌 *T. melanosporum* 的新鲜子实体中含有雄烯醇类成分，但是薄层色谱分离能力和定量能力较差，只适合进行定性分析。Wang *et al.* (2008)和 Huang *et al.* (2014)采用 GC-MS 法分别对印度块菌 *T. indicum* 发酵液和子实体中的 α -雄烷醇进行了定量测定。这 2 种方法均采用一级质谱进行定量，相比一级质谱，本研究采用的二级质谱具有检测限更低、定量更精确的优点。本研究最后测得的块菌子实体中 α -雄烷醇的含量为 Huang *et al.* (2014)测定值的 10 倍以上，这是否和检测方法的灵敏度有关，值得进一步比较研究。

本研究采用无水乙醇作为提取溶剂，首次通过固相萃取-液质联用的方法测定新鲜块菌子实体中 α -雄烷醇的含量，采用二级质谱极大地提

高了检测的灵敏度和专属性。为块菌及其产品的质量提供了新的检测方法。经方法学验证证明该方法简单、灵敏、精确,且重现性好,适用于块菌子实体及其相关产品中 α -雄烷醇的含量测定。

[REFERENCES]

- Brooksbank B, Haslewood G, 1961. The estimation of androst-16-en-3 α -ol in human urine. Partial synthesis of androstenol and of its beta-glucosiduronic acid. *Biochemical Journal*, 80(3): 488
- Chen J, Li SC, Li JM, Yan B, Liu PG, 2018. Distribution, biological diversity, and conservation of Chinese black truffle. *Scientia Sinica Vitae*, 48(3): 319-331 (in Chinese)
- Claus R, Hoppen HO, Karg H, 1981. The secret of truffles: a steroidal pheromone? *Experientia*, 37(11): 1178-1179
- David B, Vivien W, 1986. Effects of androstenol on human sexual arousal. *Biological Psychology*, 22(2): 141-147
- Fan L, 2021. Current taxonomic and geographic situation on Asian black truffles. *Journal of Fungal Research*, 19(1): 6-11 (in Chinese)
- Huang ZG, Wei CH, Luo HB, Liu YM, Deng J, 2014. Study on extraction and detection of α -androstenol in truffle. *Advanced Materials Research*, 881-883: 781-784
- Kazuyuki S, Masayo M, Toshiya F, Dai M, Fukuko K, 2000. Effects of 5 α -androst-16-en-3 α -ol on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in human females. *Chemical Senses*, 21(4): 465-467
- Li SC, Qiao P, Liu SS, Chen J, Guo SX, 2017. Research progress in the molecular systematics and symbiotic mechanism of *Tuber* (Tuberaceae, Ascomycota). *Mycosystema*, 36(2): 131-144 (in Chinese)
- Li XF, Yang B, Zhang HQ, 2018. Evaluation of nutritional value of natural black truffle grown in Yunnan. *Food Research and Development*, 39(11): 157-161 (in Chinese)
- Ning YC, 2018. Structural identification of organic compounds and organic spectroscopy. 4th ed. Science Press, Beijing. 266-316 (in Chinese)
- Payen T, Murat-Furminieux C, Bonito G, 2014. Truffle phylogenomics: new insights into truffle evolution and truffle life cycle. *Advances in Botanical Research*, 70: 211-234
- Prelog V, Ruzicka L, 1944. Untersuchungen über Organextrakte. (5. Mitteilung). Über zwei moschusartig riechende Steroide aus Schweinetestes-Extrakten. *Helvetica Chimica Acta*, 27(1): 61-66
- Richard S, Nayuf V, Nina K, Marta CO, Jean-Pierre S, Ivo F, Petr K, 2012. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189(3): 688-699
- Schmidberger PC, Schieberle P, 2017. Characterization of the key aroma compounds in white alba truffle (*Tuber magnatum* Pico) and burgundy truffle (*Tuber uncinatum*) by means of the sensomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42): 9287-9296
- Wang G, Li YY, Li DS, Tang YJ, 2008. Determination of 5 α -androst-16-en-3 α -ol in truffle fermentation broth by solid-phase extraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector/electron impact mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 870(2): 209-215
- Wu Z, Meenu M, Xu B, 2021. Nutritional value and antioxidant activity of Chinese black truffle (*Tuber indicum*) grown in different geographical regions in China. *LWT-Food Science and Technology*, 135: 110226

[附中文参考文献]

- 陈娟, 李淑超, 李佳梅, 阎波, 刘培贵, 2018. 中国“黑块菌”(黑松露)新分布区确认及物种多样性保护. *中国科学: 生命科学*, 48(3): 319-331
- 范黎, 2021. 亚洲黑松露(块菌)系统分类和地理分布研究进展. *菌物研究*, 19(1): 6-11
- 李淑超, 乔鹏, 刘思思, 陈娟, 郭顺星, 2017. 块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进展. *菌物学报*, 36(2): 131-144
- 李晓凤, 杨兵, 张华琦, 2018. 云南野生黑松露营养价值评定. *食品研究与开发*, 39(11): 157-161
- 宁永成, 2018. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学. 第四版. 北京: 科学出版社. 266-316