

高效液相色谱-三重四级杆质谱分析海洋甲壳动物淋巴和肌肉中的 20-羟基蜕皮酮

赵 鹏 徐继林 亓一舟 陈娟娟 朱冬发 严小军*

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘 要 在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 血淋巴中加入高油菜素内酯作为内标, 用乙腈去除蛋白, 采用高效液相色谱-三重四级杆质谱(HPLC-QqQ MS) 对 20-羟基蜕皮酮进行分析; 对 3 种甲壳动物(三疣梭子蟹、脊尾白虾(*Palaemon carincauda* Holthuis) 和口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)) 的肌肉则采用甲醇提取、正己烷脱脂, 加入高油菜素内酯作为内标进行分析。在电喷雾电离源正离子模式下, 分别取 m/z 445. 2 和 109. 1 作为蜕皮激素和内标的定量目标离子进行检测。结果表明, 蜕皮激素和内标在 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱上得到良好分离, 在 0 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性相关系数为 0. 9978, 方法的检出限为 0. 03 $\mu\text{g/L}$ 。三疣梭子蟹血淋巴中蜕皮激素回收率达 91. 8% ~ 99. 2%, 相对标准偏差小于 7. 1%; 3 种甲壳动物肌肉中蜕皮激素回收率达 85. 7% ~ 91. 2%, 相对标准偏差小于 7. 3%。对采自浙江宁波 3 批三疣梭子蟹血淋巴及三疣梭子蟹、脊尾白虾和口虾蛄的肌肉进行测定, 三疣梭子蟹血淋巴中游离 20-羟基蜕皮酮平均浓度在 2. 43 ~ 2. 86 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 而 3 种甲壳动物肌肉中 20-羟基蜕皮酮平均含量在 4. 8 ~ 9. 6 ng/g 范围内。

关键词 20-羟基蜕皮酮; 甲壳动物; 液相色谱-三重四级杆质谱

1 引 言

蜕皮激素是一种类固醇激素, 它既存在于无脊椎动物(主要是节肢动物) 中, 也存在于植物中。节肢动物的蜕皮激素主要是指 20-羟基蜕皮酮(20E, 图 1A), 有关研究多集中于它对人类和各种动物种类的促进生长作用方面^[1~3]。临床研究表明, 20E 可以很好地促进生物生理代谢, 而且不产生副作用。但甲壳类蜕皮激素浓度达到 200 ~ 400 $\mu\text{g/L}$ 时, 会出现外皮加厚等中毒现象^[4]。因此, 应关注蜕皮激素在甲壳动物中的含量变化, 水产养殖过程中应保证生物体内蜕皮激素含量处于合适的范围内。

目前, 检测生物体内蜕皮激素的方法有薄层扫描法^[5]、放射免疫测定法^[6]、液相色谱法^[7]和液相色谱-串联质谱法^[8~10]等。液相色谱法和薄层扫描法灵敏度较低, 而放射化学法无法进行精确定性分析。液相色谱-质谱分析方法灵敏度高, 抗干扰能力强, 已经应用于哺乳动物及昆虫体内蜕皮激素的痕量检测^[6, 9], 但还未见对海洋甲壳动物淋巴液和肌肉中蜕皮激素的分析报道。本研究利用高效液相色谱-三重四级杆质谱(HPLC-QqQ MS) 分析系统, 建立了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 血淋巴、3 种甲壳动物(三疣梭子蟹、脊尾白虾(*Palaemon carincauda* Holthuis) 和口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)) 的肌肉中的 20E 分析方法, 检出限达到 0. 03 $\mu\text{g/L}$ 。本方法灵敏、准确, 能够满足限量分析要求, 可用于三疣梭子蟹、脊尾白虾和口虾蛄中蜕皮激素的检验, 为海洋甲壳动物蜕皮等生长发育过程的生理学研究提供了高灵敏分析手段。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TSQ Quantum Access 液相色谱-三重四极杆质谱联用分析系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Sep-Pak C₁₈ 固相萃取小柱和 Sep-Pak Silica 固相萃取小柱(3 mL, 60 mg, 美国 Waters 公司)。

20-羟基蜕皮酮(20E, 图 1a) 和高油菜素内酯(图 1b) 的标准品(纯度 > 98%) , 乙酸(色谱纯) 均购自

2010-06-07 收稿; 2010-09-02 接受

本文系教育部长江学者与创新团队项目(No. IRT0734) 、国家自然科学基金(No. 40976098) 、国家科技支撑计划(No. 2007BAD43B07) 和宁波大学王宽诚幸福基金资助

* E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司), 纯水由超纯水系统(法国 Millipore 公司) 制备。其它试剂均为国产分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 准确称取 5.0 mg 20E 标准品, 以甲醇溶解并定容至 1.0 mL, 配制成 5 g/L 标准储备液, 置 4 ℃ 冰箱中保存。制作工作曲线时, 用甲醇将此储备液稀释成不同浓度的标准溶液, 每份标准溶液中加入高油菜素内酯, 使其含量达到 100 μg/L。

2.2.2 样品采集和处理 三疣梭子蟹、脊尾白虾和口虾蛄均于 2009 年 11 月采自宁波象山港。由于其它生物淋巴液抽取困难, 故甲壳动物淋巴液中 20E 的分析只针对三疣梭子蟹分析。

从三疣梭子蟹的心脏处抽取 0.3 mL 血淋巴, 加入 1.2 mL 乙腈和 30 μL 1000 μg/L 高油菜素内酯, 涡旋混合 30 s, 以 12000 r/min 高速离心 15 min, 上清液旋转蒸发, 用 0.3 mL 甲醇-0.5% 醋酸(5: 1 V/V) 溶液复溶后进行 HPLC-QqQ MS 分析。根据样品中 20E 的特征离子响应强度与内标物高油菜素内酯的特征离子响应强度比值, 用加入内标的工作曲线法求得淋巴样品中 20E 的含量。

准确称取三疣梭子蟹、脊尾白虾和口虾蛄肌肉各约 1 g, 放入研钵中并加入 2 mL 甲醇, 用剪刀将肌肉尽量剪碎, 研磨 5 min, 倒入超声波细胞破碎仪塑料管, 用 6 mL 甲醇冲洗研钵 3 次, 合并入塑料管, 超声破碎 10 min, 以 12000 r/min 高速离心 15 min, 取上清液并加入等量正己烷, 涡旋混合 30 s, 然后以 12000 r/min 高速离心 15 min 后弃去上层, 重复 3 次, 将溶液旋转蒸发干, 用 0.3 mL 甲醇-0.5% 醋酸(5: 1 V/V) 溶液复溶后进行 HPLC-QqQ MS 分析。用加入内标的工作曲线法求得肌肉样品中 20E 的含量。

2.2.3 色谱-质谱条件 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 进样量 10 μL, 柱温 40℃, 流动相为 0.5% 乙酸(A) 和乙腈(B), 流速 0.2 mL/min。梯度洗脱: 0~8 min, 10%~100% B; 8~10 min, 100% B; 10~12 min, 100%~10% B; 12~16 min, 10% B。

采用电喷雾电离源正离子电离模式, 喷雾电压 3 kV, 鞘气流量 25 L/min, 辅助气流量 5 L/min, 离子传输毛细管温度 350 ℃, 扫描采用选择反应监测(SRM) 模式。碰撞能量见表 1。采集时间均为 0.2 s, 碰撞气采用氩气, 碰撞气压力 0.2 Pa。Q1 和 Q3 分辨率均设定为半峰宽 0.7 Da。

表 1 SRM 模式下获得的特征碎片离子
Table 1 Characteristic fragment ions obtained by selected reaction monitoring (SRM) mode of LC-(ESI⁺)-electrospray ionization-triple quadrupole (QqQ)-MS mode

分析物 Analytes	通道 1 Transition 1 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 Collision energy (eV)	通道 2 Transition 2 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 Collision energy (eV)	通道 3 Transition 3 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 Collision energy (eV)
20-羟基蜕皮酮 20-Hydroxyecdysone	481.2 > 445.2	12	481.2 > 371.1	13	481.2 > 165.1	26
高油菜素内酯 22(S) 23(S)-Homobrassinolide	495.4 > 459.4	9	495.4 > 109.1	32	495.4 > 343.1	16

3 结果与讨论

3.1 质谱离子化条件的选择和色谱分离

以流动注射方式对 1 mg/L 20E 和高油菜素内酯的标准溶液进行 ESI 源质谱分析。分别在正、负离子模式下检测。20E 在正离子模式主要产生 3 种正离子: [M + H]⁺ (*m/z* 481.2)、[M + Na]⁺ (*m/z* 503.2) 和 [M + K]⁺ (*m/z* 519.2) (图 2A); 高油菜素内酯主要产生 [M + H]⁺ (*m/z* 495.4) 和 [M + Na]⁺ (*m/z* 517) 两种正离子(图 2B)。20-E 在负离子模式主要产生 3 种负离子: [M - H]⁻ (*m/z* 479.2), [M + Cl]⁻ (*m/z* 517.3) 和 [M + HCOO]⁻ (*m/z* 525.3) (图 3A); 高油菜素内酯主要产生 [M - H]⁻ (*m/z* 493.3) 和 [M + HCOO]⁻ (*m/z* 539.3) 两种准分子离子(图 3B)。对比两种模式, 各目标物正离子信号

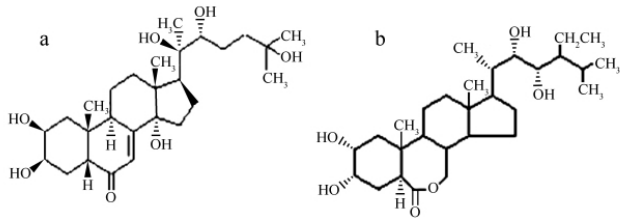


图 1 20-羟基蜕皮酮(a) 和高油菜素内酯(b) 的结构式
Fig. 1 Structures of 20-hydroxyecdysone (a) and 22(S), 23(S)-homobrassinolide (b)

强度比负离子信号强度高两个数量级,因此选择正离子模式作为液质采集模式。在正离子模式下 20E 和高油菜素内酯均以 $[M+H]^+$ 准分子离子峰信号最强,与文献[10]报道一致,故选择各目标化合物的 $[M+H]^+$ 作为选择检测模式下的母离子。对其进行二级质谱扫描,20E 主要产生碎片离子 m/z 445.2, 371.1 和 165.1 (图 4A); 高油菜素内酯主要产生碎片离子 m/z 459.4, 109.1 和 343.1 (图 4B)。其中碎片离子 m/z 445.2 和 459.4 ($[M+H-2H_2O]^+$) 分别是母离子脱去两分子水形成的,信号最强,作为定量离子;选取丰度次强的子离子作为各自的辅助定性离子。最后以选择反应监测(SRM)正离子模式优化锥孔电压(Tube lens offset)、碰撞能量(Collision energy)等质谱参数,优化后的质谱条件见表 1。

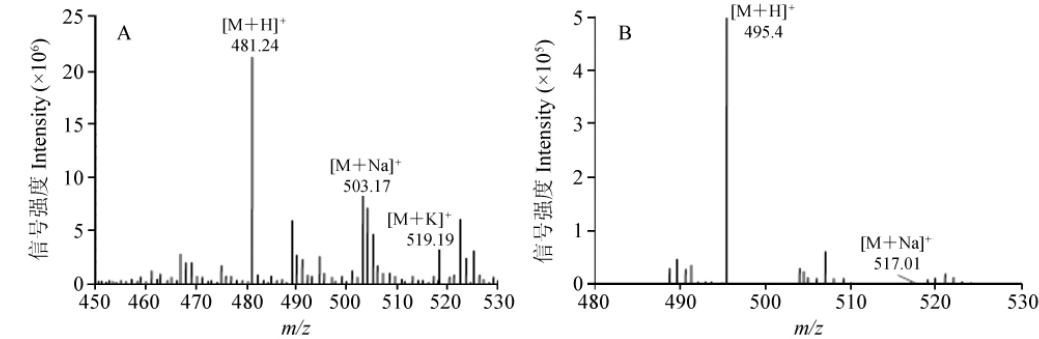


图 2 正离子模式下 20E(A) 和高油菜素内酯(B) 的质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of 20-hydroxyecdysone(A) and 22(S) , 23(S) -homobrassinolide(B) under positive mode

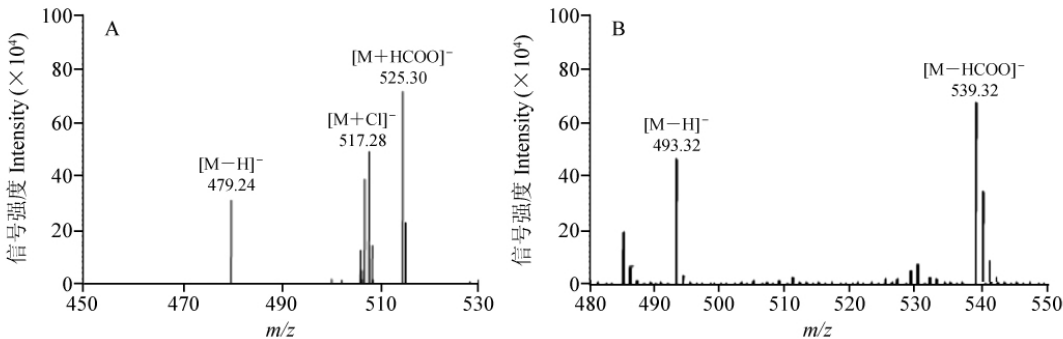


图 3 负离子模式下 20E(A) 和高油菜素内酯(B) 的质谱图
Fig. 3 Mass spectrum of 20-hydroxyecdysone(A) and 22(S) , 23(S) -homobrassinolide(B) under negative mode

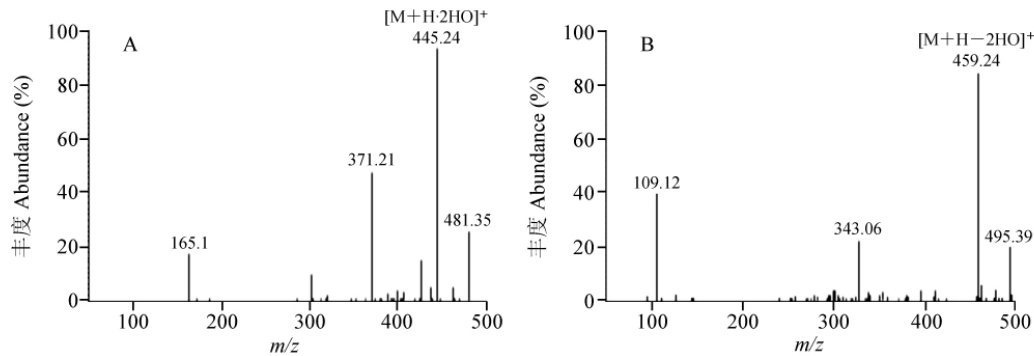


图 4 正离子模式 20E(A) 和高油菜素内酯(B) 的 MS/MS 子离子全扫描
Fig. 4 Mass spectrum of 20-hydroxyecdysone(A) and 22(S) , 23(S) -homobrassinolide(B) by LC-MS²

对于 20E 的分析,一般采用甲醇^[9]、乙腈^[10]和水作为流动相,在 C_{18} 反相柱上进行色谱分离。本实验分别以甲醇、乙腈及甲醇-乙腈(1:1, V/V) 为流动相。实验表明,以乙腈为流动相时,信号响应最强。结合质谱离子化条件的选择,在流动相的水相中加入乙酸,可以优化峰形,提高 $[M+H]^+$ 的离子化效率。乙酸浓度对 20E 和高油菜素内酯色谱峰的峰形会产生较大的影响。当乙酸浓度低于 0.3% 时,色谱峰拖尾现象严重。实验表明,采用 0.5% 乙酸可获得理想的峰形(图 5)。

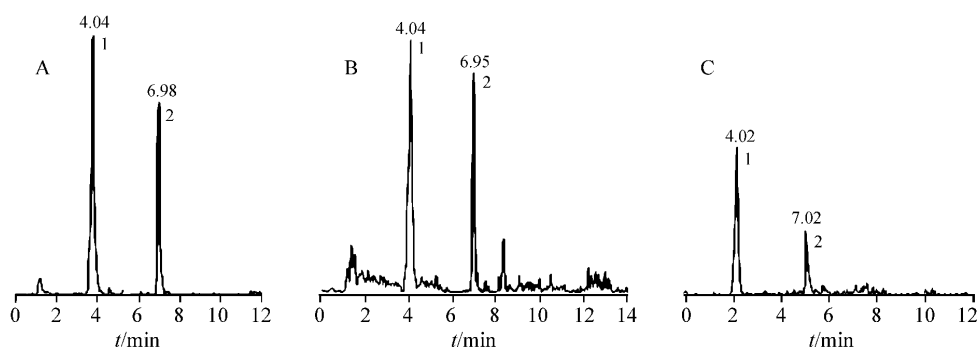


图 5 标准物和样品的选择反应监测离子模式总离子流图

Fig. 5 Selected reaction monitoring chromatograms of authentic matter and samples

A. 10 $\mu\text{g/L}$ 20-羟基蜕皮酮和 100 $\mu\text{g/L}$ 高油菜素内酯混合标样选择反应监测色谱图 (SRM chromatograms of standards); B. 三疣梭子蟹血淋巴样品的选择反应监测色谱图 (SRM chromatograms of haemolymph sample); C. 三疣梭子蟹肌肉样品的肌肉的选择反应监测色谱图 (SRM chromatograms of muscle sample)。1. 20-羟基蜕皮酮 (20-Hydroxyecdysone); 2. 高油菜素内酯 (22(S)-23(S)-homobrassinolide)。

在上述离子化条件下,采用 2.2.3 节的条件分析,含有标准品和内标的混合样品在 Hypersil Gold C_{18} 色谱柱上可以获得良好的分离。

3.2 标准曲线和检出限

分别配制含 1, 5, 10, 20 和 50 $\mu\text{g/L}$ 20E 及 100 $\mu\text{g/L}$ 高油菜素内酯的混合标准溶液,采用 2.2.3 节的条件进行 LC-MS 分析。在 0 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性方程式为 $Y = 0.8013X - 0.1768$, 相关系数 $R^2 = 0.9978$ 。由于甲壳动物蜕皮激素含量通常很低,均在相应的线性范围内,故采用此标准曲线对三疣梭子蟹血淋巴和 3 种甲壳动物肌肉中的蜕皮激素进行定量分析。

对 10 μL 0.2 $\mu\text{g/L}$ 20E 标准样品进行分析,测得 20E (m/z 481.2) 定量特征碎片离子 (m/z 445.2) 的信噪比 $S/N = 18$ 。将对应 $S/N = 3$ 的标准样品量作为检出限,可算出本方法 20E 的检出限为 0.03 $\mu\text{g/L}$ 。相比薄层扫描法检出限 3.14 mg/L ^[5]、放射免疫法检出限 23 $\mu\text{g/L}$ ^[6]、其它高效液相色谱串联质谱法检出限在 0.1 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 之间^[8~11]。由此可见,本方法检测蜕皮激素的灵敏度很高。

3.3 样品前处理过程及方法的回收率和精密度

分析血清样品中 20E 时,有研究者采用乙腈去蛋白后直接上机分析^[9];也有研究者采用 Sep-Pak C_{18} 固相萃取法和 Sep-Pak Silica 固相萃取法^[10]。本研究向 940 μL 生理盐水中分别加入 1 mg/L 标准品和内标各 30 μL ,采用不同前处理方法进行回收率实验。结果表明,乙腈去蛋白后直接进样的回收率为 91.8% ~ 99.2%,相对标准偏差小于 7.1%;Sep-Pak C_{18} 柱的回收率为 71.4% ~ 87.7%,相对标准偏差为 13.1%;过硅胶柱后的样品不出峰,未检测到。本研究采用乙腈去除蛋白法提取 20E 进行液质分析。

对于 3 种甲壳动物肌肉中 20E 的提取,考虑到肌肉中脂类对 20E 测定的干扰,甲醇提取后还需经过正己烷预先脱脂。但实验发现,由于内标高油菜素内酯的极性相对于 20E 较低 (图 1),大部分也会被正己烷脱除,所以用高油菜素内酯作为肌肉中 20E 的参比内标并不合适,需要寻找极性与 20E 更为接近的物质或者 20E 的同位素内标作为方法的参比内标。在本研究中,为了与血淋巴中 20E 测定方法尽量一致,同时避免内标也被正己烷去除,所以在测定肌肉中 20E 时,参比内标高油菜素内酯在正己烷脱脂后加入。向已被甲醇提取过的甲壳动物肌肉残留物中加入 1 mg/L 20E 后,重复 2.2.2 过程进行回收率实验,测得方法的平均绝对回收率在 85.7% ~ 91.2% 范围内,相对标准偏差小于 7.3%。

3.4 样品测定

对 3 组不同批次的三疣梭子蟹、脊尾白虾及口虾蛄进行分析,每批样品平行测定 3 次。三疣梭子蟹血淋巴中 20E 含量为 $(2.80 \pm 0.44) \mu\text{g/L}$ 、 $(2.60 \pm 0.53) \mu\text{g/L}$ 和 $(2.43 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$ 。3 种甲壳动物肌肉样品平均值见表 2。与节肢动物门中的昆虫^[6,9]及其它甲壳类^[12]类似,海洋甲壳动物体内的蜕皮激素随着生长期不同而不断变化^[4]。由于本实验样本均采自冬季,从结果可见,3 种甲壳动物体内的蜕皮激素不同批次间并无明显的统计性差异。

表 2 3 种甲壳动物肌肉中 20E 的含量(ng/g)
Table 2 Content of 20-hydroxyecdysone in muscle of three kinds of crustacean(ng/g) ($\bar{X} \pm SD$, ng/g)

样品批次 Sample batch	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	脊尾白虾 <i>Palaemon carincauda</i> Holthuis	口虾蛄 <i>Oratosquilla oratoria</i>
1	5.6 ± 0.2	4.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3
2	7.4 ± 0.4	5.4 ± 0.4	9.6 ± 0.4
3	8.3 ± 0.5	6.7 ± 0.4	7.2 ± 0.2

References

1 Burdette W J , Richards R C. *Nature* , **1961** , 189: 666 ~ 668
2 Syrov V N , Kurmukov A G. *Farmakol Toksikol.* , **1976** , 39(6) : 690 ~ 693
3 Slama K , Koudela K , Tenora Mat' hová A. *Cellular and Molecular Life Sciences* , **1996** , 52(7) : 702 ~ 706
4 FANG Kai(房 凯) . *J. Biol.* (生物学杂志) , **1993** , 1: 8 ~ 10
5 BI Hao-Rong(毕昊容) . *Chinese Journal of Veterinary Drug*(中国兽药杂志) , **1999** , 33(1) : 27 ~ 29
6 Oeh U , Lorenz M W , Hoffmann K H. *Journal of Insect Physiology* , **1998** , 44(10) : 941 ~ 946
7 BIAN Cen-Yun , LU Bao-Xiu , WANG Jian , LE Hong-Quan(卞岑云 , 卢保秀 , 王 俭 , 乐红权) . *Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives*(兽药与饲料添加剂) , **2005** , 10(6) : 27 ~ 29
8 Destrez B , Pinel G , Bichon E , Monteau F , Lafont R , Le Bizec B. *Rapid Com. Mass Spectrom* , **2008** , 22(24) : 4073 ~ 4080
9 Li Y , Warren J T , Boysen G , Gold A , Ball L M , Swenberg J A. *Rapid Commun. Mass Spectrom* , **2006** , 20(2) : 185 ~ 192
10 Destrez B , Pinel G , Monteau F , Lafont R , Le Bizec B. *Anal. Chim. Acta* , **2009** , 637(1-2) : 178 ~ 184
11 Le Bizec B , Antignac J P , Monteau F , Andre F. *Anal. Chim. Acta* , **2002** , 473(1-2) : 89 ~ 97
12 Martin-Creuzburg D , Westerlund S A , Hoffmann K H. *General and Comparative Endocrinology* , **2007** , 151(1) : 66 ~ 71

Determination of 20-Hydroxyecdysone in Several Marine Crustaceans by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

ZHAO Peng , XU Ji-Lin , QI Yi-Zhou , CHEN Juan-Juan , ZHU Dong-Fa , YAN Xiao-Jun*

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology , Ningbo University , Ministry of Education , Ningbo 315211)

Abstract A method based on high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization/triple quadrupole mass spectrometry(HPLC/QqQ-MS) has been established for the determination of 20-hydroxyecdysone in the haemolymph of *Portunus trituberculatus* and in the muscle of crustacean(*Portunus trituberculatus* , *Palaemon carincauda* Holthuis and *Oratosquilla oratoria*) . Homobrassinolide was utilized as internal standard. The mass spectrometry was performed in positive mode , using precursor ions at m/z 445. 2 and 459. 4 as quantitative ions for 20-hydroxyecdysone and 22(S) , 23(S) -homobrassinolide , respectively. The results showed that 20-hydroxyecdysone and 22(S) , 23(S) -homobrassinolide were separated with high efficiency in the selective reaction monitoring(SRM) mode on Hypersil Gold C₁₈ column. Linearity of the method was good with correlation coefficients(R^2) of 0. 9978 in the range of 0 - 50 $\mu\text{g/L}$. The detection limit was 0. 03 $\mu\text{g/L}$. The recoveries varied from 91. 8% to 99. 2% for the haemolymph and 85. 7% to 91. 2% for the muscle with the relative standard deviations(RSDs) from 7. 3% and 7. 1% , respectively. Using this method , 20-hydroxyecdysone in the haemolymph of *Portunus trituberculatus* collected in Ningbo China , has been determined with content ranged from 2. 43 to 2. 86 $\mu\text{g/L}$; the concentration of 20-Hydroxyecdysone in the muscle of crustaceans(*Portunus trituberculatus* , *Palaemon carincauda* Holthuis and *Oratosquilla oratoria*) were determined from 4. 8 to 9. 6 ng/g. The method is a powerful tool for comprehensive analysis of biological sample with exclusive selectivity and excellent sensitivity.

Keywords 20-Hydroxyecdysone; Crustacean; High performance liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry

(Received 7 June 2010; accepted 2 September 2010)