养殖三疣梭子蟹中甲基法尼酯的 GC/MS 分析

侯云丹, 沈 洁, 徐继林*, 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, 浙江 宁波 315211）

摘要: 建立了人工养殖三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)淋巴和肌肉中甲基法尼酯的毛细管气相色谱-质谱联用检测法. 向淋巴或冷冻干燥后的肌肉样品中加入十九烷酸甲酯作为定量内标物, 淋巴中加入 0.9% NaCl 和乙腈后用正己烷提取; 肌肉冷冻干燥后用正己烷提取, 浓缩定容后用 EI 源在 SIM 检测模式下进行检测. 结果表明: 甲基法尼酯与内标物十九烷酸甲酯在 SPB-1 柱上得到良好的分离, 方法在 5.00~200.00 ng·mL^{-1} 浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.99995, 方法的最低检测限 3.27 pg. 淋巴和肌肉中甲基法尼酯平均回收率分别达到 95.32%和 88.37%, 标准相对偏差分别为 5.71%和 7.94%. 对采自浙江宁波象山港养殖三疣梭子蟹进行分析测定, 甲基法尼酯在血清中含量在 15.11~145.23 ng·mL^{-1} 范围内, 而肌肉中则在 3.23~10.32 ng·g^{-1} 范围内.

关键词: 三疣梭子蟹; 甲基法尼酯; 气相色谱-质谱联用
中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1001-5132（2011）04-0025-04

甲基法尼酯(Methyl Farnesoate, MF)是甲壳动物大颚器(Mandibular Organ, MO)合成和分泌的一种保幼激素(Juvenile Hormone, JH) JH III 的前体[1], 在一些文献中也被认为是甲壳动物的保幼激素[2]. 许多研究表明, MF 对甲壳动物的 DNA、RNA 合成、生殖细胞的发育以及蜕皮生长有重要的影响[3-4].

对甲壳动物中 MF 的测定, 可采用放射化学测定法[5-6], 由于测定中需要进行放射性标志, 所以影响组织或细胞培养过程的因素如培养时间、培养基等将直接影响测定结果, 而且该方法均应用在 MO 合成 MF 速率的研究中, 故测定结果并非组织或细胞中 MF 的绝对含量. GC/MS 和 LC 是测定甲壳动物中 MF 含量的常用方法[7-9], 通常应用在甲壳动物血淋巴中 MF 含量的测定, 而对肌肉中 MF 含量测定方法的报道比较少见.

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国沿海的重要经济蟹类, 其生长迅速, 营养丰富, 口味鲜美, 养殖利润丰厚, 已经成为中国沿海地区重要的养殖品种, 至今对于三疣梭子蟹 MF 的研究报道还很少见. 笔者建立了三疣梭子蟹中 MF 毛细管气相色谱-质谱联用(GC/MS)检测法, 并对几批三疣梭子蟹血淋巴和肌肉中 MF 进行了分析.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本 SHIMADZU QP2010 气相色谱-质谱分析仪, 带 AOC-20 自动进样器; SUPELCO 30 m×0.25 mm×0.25 μm SPB-1 色谱柱; 国产超声波清洗机、高速离心机、旋转蒸发仪等.

甲基法尼酯标准(纯度>95%)、十九烷酸甲酯标准(纯度>99%)、正己烷(色谱纯)、乙腈(色谱纯), 均为美国 SIGMA-ALDRICH 产品. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 标准溶液配制

将 10 mg 标准甲基法尼酯样品溶解于 1 mL 色谱正己烷中, 充分摇匀. 制作工作曲线时将此储备液分别用正己烷配制成 5 ng·mL^{-1}、20 ng·mL^{-1}、50 ng·mL^{-1}、100 ng·mL^{-1}、200 ng·mL^{-1} 的标准溶液, 分别加入内标物十九烷酸甲酯使每一个标准溶液中的含量为 100 ng·mL^{-1}.

收稿日期: 2011−06−28. 宁波大学学报（理工版）网址: http://3xb.nbu.edu.cn
基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目（IRT0734）; 国家自然科学基金（40976098）.
第一作者: 侯云丹（1986－）, 女, 浙江乐清人, 实验员, 主要研究方向: 生化检测分析. E-mail: houyundan@nbu.edu.cn
*通讯作者: 徐继林（1965－）, 男, 江苏泰州人, 副研究员, 主要研究方向: 海洋生物化学. E-mail: xujilin@nbu.edu.cn

1.3 样品前处理

3 批不同生长期的三疣梭子蟹样品于 2010 年 11 月采自宁波象山港, 从其心脏处抽取 1 mL 血淋巴样品加入 1 mL 0.9% NaCl 和 1 mL 乙腈, 漩涡震荡 1 min, 再加入 1 mL 正己烷, 漩涡震荡 1 min, 3 000 r·min^{-1} 离心 5 min, 取上层有机相. 再重复提取 2 次, 合并提取液, 旋转蒸发提取液至干, 再用正己烷定容到 100 μL 进行 GC/MS 分析.

三疣梭子蟹肌肉取自螯足, 冷冻干燥, 1 g 干样加入 3 mL 正己烷超声提取 3 次, 合并提取液, 旋转蒸发至干, 100 μL 正己烷定容, 进行 GC/MS 分析.

根据样品中甲基法尼酯特征离子响应强度与内标物的特征离子响应强度比值, 用加入内标的工作曲线法求得样品中甲基法尼酯的含量.

1.4 分析条件

GC 条件: 进样口温度 250 ℃, 载气为 99.999% 的高纯氦, 流速 8 mL·min^{-1}, 柱流速 0.81 mL·min^{-1}, 柱前压 73 kPa, 柱起始温度 150 ℃, 保持 3.5 min, 以 20 ℃·min^{-1} 升至 280 ℃, 保持 40 min, 5:1 分流进样 5 μL.

MS 条件: 电子轰击源(Electron Impact, EI), 电子能量为 70 eV, 离子源温度 200 ℃, 接口温度 200 ℃. 用全程离子碎片扫描(SCAN)模式时, 质量扫描范围为 80~500, 溶剂延迟时间 3 min. 用特征离子碎片扫描(SIM)模式时, 甲基法尼酯选择 m/z 114、250 和 69 作为特征离子; 十九烷酸甲酯选择 m/z 74、312 和 143 作为特征离子; 每组特征离子中, 前一个离子作为定量离子, 后 2 个离子作为定性时的参考离子.

2 结果与讨论

2.1 甲基法尼酯与十九烷酸甲酯的气相色谱分离

实验结果表明, 对于含有甲基法尼酯与十九烷酸甲酯的混合标样, 分别采用 SCAN 模式和 SIM 模式, 各组分在 SPB-1 色谱柱可获得良好分离, 色谱出峰尖锐, 没有杂峰干扰(图 1), 2 标样保留时间分别是 7.77 min 和 10.44 min.

样品中甲基法尼酯的定性分析基于两点, 一

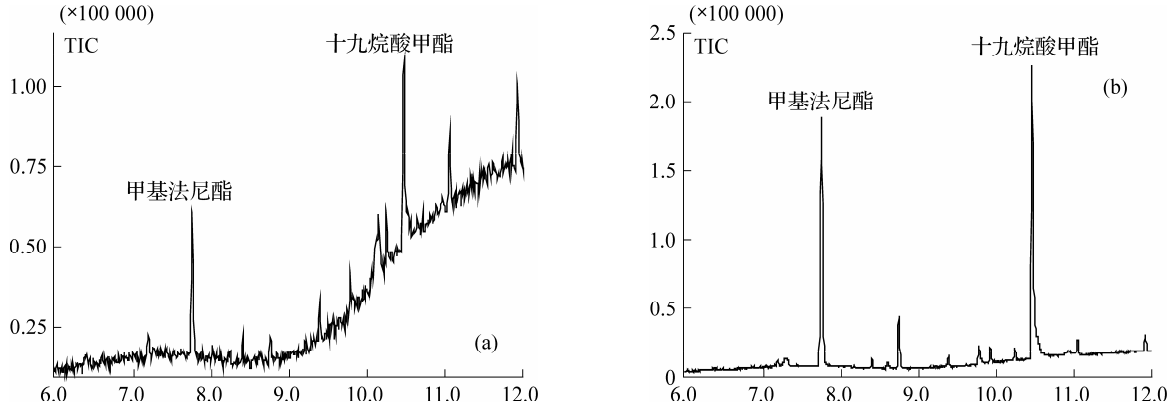

图 1 100 ng·mL^{-1} 甲基法尼酯与十九烷酸甲酯在 SCAN 模式(a)和 SIM 模式(b)下的气相色谱离

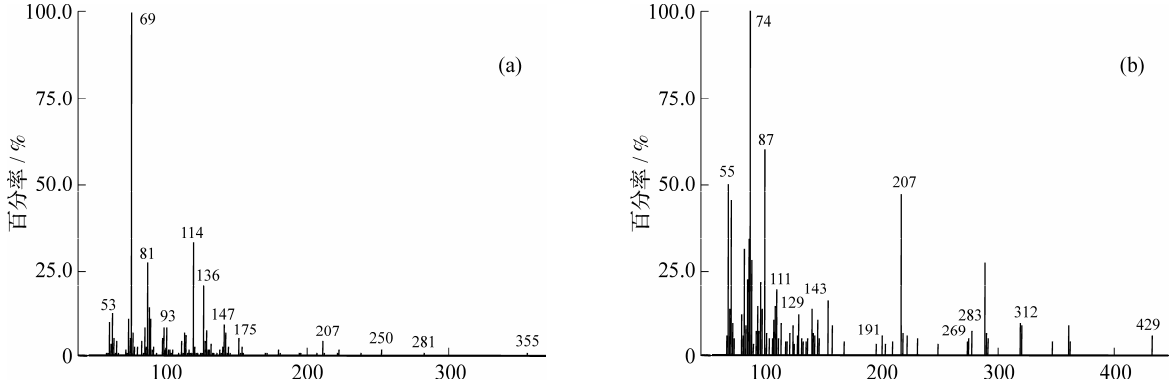

图 2 甲基法尼酯(a)与十九烷酸甲酯(b)的质量图谱

表 1　三疣梭子蟹肌肉和淋巴中甲基法尼酯含量

生长阶段	1		2		3	
样品	淋巴/ ($ng\cdot mL^{-1}$)	肌肉/ ($ng\cdot g^{-1}$)	淋巴/ ($ng\cdot mL^{-1}$)	肌肉/ ($ng\cdot g^{-1}$)	淋巴/ ($ng\cdot mL^{-1}$)	肌肉/ ($ng\cdot g^{-1}$)
浓度	15.11±3.58	3.23±1.21	52.11±50.58	6.23±1.83	145.23±8.21	10.32±4.45

是在相同的色谱条件下与标准色谱图(图 1)进行对照, 根据保留时间确定; 二是通过质谱图(图 2)进行定性.

由图 1 也可以看出, 在相同的测定条件下, 同一样品的色谱图在 SIM 模式下的背景噪音(图 1(b))明显比 SCAN 模式(图 1(a))小, 说明采用 SIM 模式可以明显提高方法的灵敏度. 因此我们采用 SIM 模式进行定量分析. 图 2 为甲基法尼酯与十九烷酸甲酯在 SCAN 模式下对应出峰位置的质量谱图, 一般都选取样品的基峰作为目标物的定量离子, 所以甲基法尼酯常选取 m/z 69[1]. 但是经过考察 5 $ng\cdot mL^{-1}$ 浓度下甲基法尼酯主要离子的信噪比(S/N)发现, m/z 69 的信噪比为 7.67, 而 m/z 114 的信噪比高达 22.92, 故最终选取 m/z 114 作为甲基法尼酯的定量离子; 同理选择 m/z 74 作为十九烷酸甲酯的目标离子, 同时选取 m/z 250、69 和 312、143 分别作为甲基法尼酯与十九烷酸甲酯定性时的参考离子.

2.2　定量标准曲线

将配制好的标准溶液采用 SIM 模式进行 GC/MS 分析, 以所选的甲基法尼酯与十九烷酸甲酯的定量离子峰面积的比对甲基法尼酯浓度作工作曲线, 在 5.00~200.00 $ng\cdot mL^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系, 线性方程为 Y=0.258X, 相关系数 R=0.99995.

2.3　回收率和精密度

对于比较复杂的定量分析, 为了校正在前处理过程中由于目标化合物的损失而造成的误差, 常采用内标法[9], 即在做工作曲线和样品时加入内标校正, 但所用的内标与目标化合物的性质必须相似, 保留时间也要尽量接近. 对于本实验而言, 选取十九烷酸甲酯作为内标, 在做样品前已确认三疣梭子蟹肌肉和淋巴中无十九烷酸甲酯.

取淋巴, 按 1.3 节所述方法进行处理, 作为甲基法尼酯样品. 后取同一份淋巴加入一定量甲基法尼酯标准溶液和内标, 进行前处理, 作为血清甲基法尼酯的加标样品. 取与淋巴同体积的生理盐水, 加入与加标样品中等量的对照品溶液和内标, 作为测定的对照品溶液. 以甲基法尼酯加标样品测定值减去甲基法尼酯样品的测定值的差值与对应同浓度的甲基法尼酯对照品溶液的测定值的比值计算提取回收率. 测得淋巴中甲基法尼酯的提取回收率(n=3)为 95.32%, 相应的相对标准偏差为 5.71%.

将淋巴样品换成肌肉样品, 重复上述步骤, 测得肌肉中甲基法尼酯的提取回收率(n=3)为 88.37%, 相应的相对标准偏差为 7.94%. 说明该方法有良好的回收率和稳定性.

2.4　最低检测限

用 QP2010 气相色谱-质谱分析仪随机所带 SNRATIO 软件, 测得进样 5 μL 含量为 5 $ng\cdot mL^{-1}$ 时甲基法尼酯 S/N 为 22.92, 分别采用信噪比为 3 和 10 的标准物浓度作为仪器检测限和定量限, 计算出方法检测限为 3.27 pg, 定量限为 10.9 pg.

2.5　样品测定

根据上述条件, 对 3 批不同期的三疣梭子蟹肌肉和淋巴样品进行了分析, 每一期取 3 只三疣梭子蟹样品平行测定, 结果取均值(表 1).

从表 1 可以发现, 不同发育阶段甲基法尼酯含量差异较大, 血清中从 15.11 $ng\cdot mL^{-1}$ 到 145.23 $ng\cdot mL^{-1}$ 不等, 而肌肉中则在 3.23 $ng\cdot mL^{-1}$ 至 10.32 $ng\cdot mL^{-1}$ 不等, 说明三疣梭子蟹中甲基法尼酯含量随发育不同阶段变化而变化.

3　结语

在所选实验条件下, 甲基法尼酯与内标物十九烷酸甲酯在 SPB-1 柱上得到良好的分离. 利用 EI 源在 SIM 检测模式下, 对标准品和样品进行检测, 色谱出峰尖锐, 没有杂峰干扰. 方法在 5.00~200.00 $ng\cdot mL^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好, 线性方

程为 Y=0.258X, 相关系数为 0.99995. 方法的最低检测限 3.27 pg, 淋巴和肌肉中甲基法尼酯平均回收率分别达到 95.32%和 88.37%, 标准相对偏差分别为 5.71%和 7.94%. 对采自浙江象山港的 3 批不同发育阶段的养殖三疣梭子蟹进行分析测定, 甲基法尼酯在血清中含量在 15.11~145.23 ng·mL^{-1} 范围内, 而肌肉中含量则在 3.23~10.32 ng·mL^{-1} 范围内.

参考文献:

[1] Laufer H, Borst D W, Baker F C, et al. Identification of a juvenile hormone like compound in a crustacean[J]. Science, 1987, 235:202-205.

[2] Laufer H, Borst D W, Bake F C, et al. Juvenile hormone in crustacean[J]. Biological Bulletin, 1985, 169(2):533-543.

[3] 李胜, 赵维信. 甲壳动物的大颚器和甲基法尼酯[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(3):240-246.

[4] 陆剑锋, 常国亮, 吴旭干, 等. 两组不同饲料对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育及卵黄发生的激素调控[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4):505-512.

[5] 赵维信, 白桦. 克氏原螯虾大颚器合成甲基法尼酯的研究[J]. 水产学报, 2001, 25(3):193-196.

[6] Laufer H, Biggers W J, Ahl J S B. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate[J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 111(2):113-118.

[7] Bomt D W, Tsukimura B. Quantification of methyl faruesoate levels in hemolymph by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatography, 1991, 545: 71-78.

[8] Gao J, Pan X, James D, et al. Quantification of methyl farnesoate levels in crustacea by gas chromatography-mass spectrometry analysis[J]. Journal of Kunming University of Science and Technoloy, 2007, 32(4):73-79.

[9] 汪正范. 色谱定性与定量[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000:170-173.

Determination of Methyl Farnesoate in Cultured *Portunus Trituberculatus* by GC/MS

HOU Yun-dan, SHEN Jie, XU Ji-lin*, ZHU Dong-fa, YAN Xiao-jun

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

Abstract: An analytical method on sensitivity of methyl farnesoate in lymph and muscle of cultured *Portunus trituberculatus* is introduced using capillary gas chromatography-mass spectrometry. After nonadecanoic acid methylester is added to lymph and frozen drying muscle as inner standard, and 0.9% NaCl and acetonitrile are added to lymph, methyl farnesoate can be extracted with *n*-hexane effectively, and determined using EI-SIM-MS after concentration. The results indicate that methyl farnesoate and the inner standard can be separated from each other on SBP-1 column with sharp peak. The linearity is agreeable from 5.00 to 200.00 ng·mL^{-1} and relative coefficient is found to be 0.999 95, with low detection limit of 3.27 pg. The average recovery rate in lymph and muscle is 95.32% and 88.37%, respectively, and the standard deviation reads 5.71% and 7.94%, respectively. This method is applied to determine the methyl farnesoate at different stages of *P. trituberculatus*, coming up with the results of 15.11~145.23 ng·mL^{-1} in lymph and 3.23~10.32 ng·g^{-1} in muscle.

Key words: *Portunus trituberculatus*; methyl farnesoate; GC/MS

（责任编辑　史小丽）