超高效液相色谱-串联质谱法检测小菜蛾血清中的 β-蜕皮激素*

孙诗晴** 王念猛 薛超彬***

（山东农业大学植物保护学院，农药毒理与应用技术省级重点实验室，泰安 271018）

摘 要 **【目的】** 研究建立可以准确检测小菜蛾血清中痕量 β-蜕皮激素的超效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）分析法。**【方法】** 小菜蛾血清 β-蜕皮激素样品用乙腈提取并进行蛋白沉淀，以 C_{18} 色谱柱分离，经 UPLC-MS/MS 检测，以芸苔素内酯为内标物，内标法定量。**【结果】** 结果表明，在 0.5-50 μg/L 浓度范围内 β-蜕皮激素线性相关系数 R^2=0.999 8；在 0.5、10 和 50 μg/L 3 个添加水平下的平均回收率在 91.9%-104.9%之间，相对标准偏差（RSD_S，n=5）在 3.2%-9.2%之间；方法的定量限为 0.5 μg/L。**【结论】** 该方法具有操作简单、灵敏度高，稳定性好，应用性强等优点，可为昆虫血清中的 β-蜕皮激素检测提供科学准确的方法。

关键词 β-蜕皮激素；小菜蛾；芸苔素内酯；内标法；定量限；高效液相色谱-串联质谱

A method for using UPLC-MS/MS to measure β-ecdysone in *Plutella xylostella*

SUN Shi-Qing** WANG Nian-Meng XUE Chao-Bin***

(College of Plant Protection, Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract **[Objectives]** A method for using UPLC-MS/MS to detect β-ecdysone in the serum of *Plutella xylostella* was developed. **[Methods]** Serum β-ecdysone of *P. xylostella* was extracted with acetonitrile and precipitated with protein. It was then separated in a C_{18} column, analyzed with UPLC-MS/MS and the β-ecdysone content determined using the internal standard brassinolide. **[Results]** The results show that the linear correlation coefficient of β-ecdysone was R^2 = 0.999 8 in the range of 0.5-50 μg/L, the average recovery was 91.9%-104.9% at levels of 0.5 μg/L, 10 μg/L and 50 μg/L, the relative standard deviation (RSDs, n = 5) was 3.2%-9.2% and the quantitative limit of the method was 0.5 μg/L. **[Conclusion]** This method has the advantages of being relatively simple, sensitive, stable and applicable. It should provide an accurate method for the detection and measurement of β-ecdysone in the serum of other insects.

Key words β-ecdysone; *Plutella xylostella*; brassinolide; internal standard method; limit of quantitation; UPLC-MS/MS

蜕皮激素（Molting hormone，MH）是一种存在于无脊椎动物中的类固醇激素，在昆虫体内主要是指 20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone，20E），常称之为 β-蜕皮激素，化学式为 $C_{27}H_{44}O_7$（结构式见图 1），它于 1954 年由 Butenandt 和 Karlson 在家蚕蛹中首次分离提取获得（邱明华，2005）。β-蜕皮激素在调节昆虫蜕皮、繁殖、变态等方面发挥着重要作用（Xia *et al.*，2014），昆虫可通过调节体内蜕皮激素水平来调控自身的生命活动从而适应环境。在昆虫不同发育时期，虫体的激素水平也有所不同，其对昆虫自身生长发育的作用也不同。蜕皮激素水平高时会诱

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31672046）

**第一作者 First author，E-mail：273490312@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：cbxue@sdau.edu.cn

收稿日期 Received：2019-12-16；接受日期 Accepted：2020-01-20

导昆虫早熟、蜕皮。不同的昆虫对外源蜕皮激素的敏感度也有差异，家蚕 *Bombyx mori* 对外源蜕皮激素的敏感度很高，而斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 却能够耐受高浓度的外源蜕皮激素对它的影响（沈关望等，2014；孙帮勇，2018）。

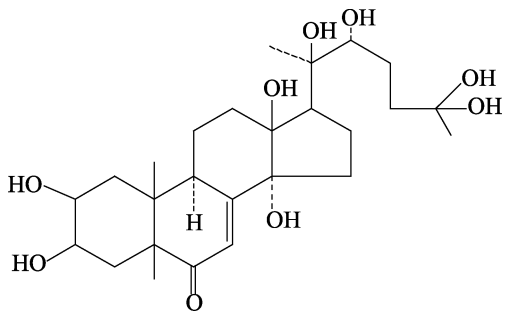

图 1　β-蜕皮激素的结构式
Fig. 1　Structure of 20-hydroxyecdysone (20E)

目前，蜕皮激素的检测方法主要有分光光度法（SP）（阮美娟和石艳宾，2006）、高效毛细管电泳法（HPCE）（周梅仙等，2005）、液相色谱法（HPLC）（叶滨等，2016）和液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS）（Zhou *et al.*，2011）等。其中，SP 和 HPCE 的灵敏度低，使用较少；HPLC 应用较多，但是灵敏度偏低，主要用于分析植物样品或者蜕皮激素含量较高的动物样品，无法满足昆虫血清中痕量蜕皮激素的检测。UPLC-MS/MS 具有抗干扰性强、灵敏度高等特点，但对昆虫体内痕量蜕皮激素研究仅见于家蚕血液中 β-蜕皮激素的检测（唐博志等，2015）。小菜蛾 *Plutella xylostella*，因其抗药性强、生活周期短，已成为世界范围危害十字花科蔬菜最严重的害虫之一。β-蜕皮激素作为蜕皮激素最重要的表现形式，其在调控昆虫的生长发育、细胞分化及变态生殖过程中的关键作用。有研究发现，蜕皮激素可能通过调节自身生长发育，从而与昆虫抗药性存在一定的关系（姚洪渭等，2002；Retnakaran *et al.*，2003；刘星，2016）。为了进一步研究蜕皮激素在小菜蛾变态、生殖中的作用，建立一种检测小菜蛾血清中痕量蜕皮激素的分析方法尤为重要。因此，本文研究采用 UPLC-MS/MS 方法，对小菜蛾血清中的 β-蜕皮激素的含量进行检测，有助于从生长发育的角度开展抗药性治理，为制定新型害虫防治策略提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂

三重四极杆超高效液相色谱-质谱联用仪（TSQ Quantis）配有电喷雾离子源（ESI）（美国 Thermo-Fisher 公司）；Hypersil Gold C_{18}（50 mm×2.1 mm×1.9 μm）色谱柱（美国 Thermo-Fisher 公司）；R-3 旋转蒸发仪（瑞士 Buchi 公司）。

β-蜕皮激素标准品（纯度 98%）（上海纯优生物科技公司）；芸苔素内酯标准品（纯度 98%）（上海一基实业有限公司产品）；苯基硫脲（分析纯）（天津市科密欧化学试剂有限公司），甲酸、乙腈和甲醇（色谱纯）（德国默克医药生物科技公司）。

1.2　标准溶液的制备

准确称取定量 β-蜕皮激素和芸苔素内酯标准品，用乙腈溶解，分别配制成 2 000 mg/L 储备液，β-蜕皮激素储备液分别用乙腈稀释为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μg/L 系列标准溶液，芸苔素内酯储备液用乙腈稀释为 500 μg/L 标准溶液，分别向 1 mL 系列 β-蜕皮激素标准溶液中加入 500 μg/L 芸苔素内酯标准溶液 0.1 mL，于 4 ℃冰箱中避光保存，待测。

1.3　小菜蛾室内饲养及血清采集

1.3.1　小菜蛾室内饲养　小菜蛾于 2006 年采自山东农业大学南校区实验站园，在室内长期饲养且稳定繁殖，试验期间不接触任何药剂。将甘蓝苗置于干净的搪瓷盘（16 cm×22 cm×3 cm）培养至 3 cm 左右高，并将其放置到养虫笼（35 cm×32 cm×45 cm）内，用于室内饲养小菜蛾至化蛹。收集小菜蛾的蛹并置于（25±1）℃下至羽化，将羽化后的成虫投入已经放置好甘蓝苗的养虫笼内，并在养虫笼上端悬挂浸透 5%-10%蜂蜜水的脱脂棉，以供小菜蛾成虫补充营养。将养虫笼置于温度（25±1）℃，RH=60%-70%，光周期 14L∶10D 的养虫室内饲养。羽化后的雌雄成虫在笼内交配后将卵产于甘蓝苗上。待小菜蛾卵孵化后，取食甘蓝幼苗叶片的 2/3 时，用干净的甘蓝叶片覆盖在甘蓝苗上，将带有小菜蛾幼虫的甘蓝叶片

一同转移至盆内饲养，每天更换新鲜干净的甘蓝叶片。小菜蛾幼虫 4 龄末期开始化蛹，用镊子将蛹轻轻取下，并置于 4 ℃的低温冰箱内进行保存。待 4 龄幼虫全部化蛹后，将蛹重新放在（25±1）℃条件下至羽化，继续饲养。

1.3.2 血清中 *β*-蜕皮激素的采集与测定 将小菜蛾饲养到 4 龄第 2 天，将幼虫剪破腹足用毛细管吸取血清，向血清中加入苯基硫脲抗氧化剂，置于 - 80 ℃冰箱中保存，待处理。

1.4 样品前处理

从 4 龄第 2 天的小菜蛾虫体中获取血清，进行 0.5、10 和 50 μg/L 3 个添加水平添加回收样品，每个水平重复处理 5 次。取 100 μL 小菜蛾血清样品于 2 mL 离心管中，加入 1.9 mL 乙腈（样品稀释 20 倍），涡旋振荡 0.5 min，再以 12 000 r/min 离心 5 min。准确移取 1 mL 上清液于 2 mL 离心管中，加入 0.1 mL 的 500 μg/L 芸苔素内酯标准溶液，以 2 500 r/min 涡旋 1 min，过 0.22 μm 滤膜后，待测。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件 流动相：A 为含 0.05%甲酸水溶液，B 为乙腈。梯度洗脱程序：0-2.5 min，10%-95% B；2.5-3.5 min，95% B；3.5-3.51 min，95%-10% B；3.51-5 min，10% B；流速 300 μL/min；进样量 1 μL；分析时间 5 min。

1.5.2 质谱条件 正离子电离模式（ESI^+），喷雾电压 3 500 V，鞘气流速 50 L/min，辅助气流速 10 L/min，加热气温度 350 ℃，离子传输管温度 300 ℃。碰撞气（Ar）压力 0.21 Pa，监测模式为多反应选择监测（SRM）（表 1）。

2 结果与分析

2.1 色谱和质谱条件优化

用 1 mg/L 的 20E 和芸苔素内酯的标准溶液经流动注射泵注射，分别在 ESI 源正、负离子模式下进行扫描。监测结果显示，当检测范围在（m/z 480.00-m/z 520.00）时，20E 和芸苔素内酯在 ESI^+模式下分子离子峰分别为$[M+H]^{++}$(m/z=481.35)和$[M+H]^+$（m/z=481.4）灵敏度最高且稳定性最好；进行二级质谱扫描，20E 其主要碎片离子为 m/z=445.375 和 m/z=371.292，芸苔素内酯的主要碎片离子为 m/z=445.458 和 m/z=315.292（图 2）。由于 20E 与芸苔素内酯的分子离子峰相似，并且灵敏度最高的碎片离子也相近，为了提高检测方法的选择性，20E 以 m/z=481.35→m/z=445.375 为定量离子对，芸苔素内酯以 m/z=481.4→m/z=315.292。

对蜕皮激素标准品质谱条件进行优化时，我们发现当流动相没有添加甲酸条件下，$[M+H]^+$（m/z=481.35）不稳定，随后分别使用了乙腈加 0.1%甲酸水溶液和乙腈加 0.05%甲酸水溶液作为流动相。结果显示，当以 0.05%甲酸水溶液与乙腈作为流动相时，20E 与芸苔素内酯的响应强度最高，且峰形尖锐对称。不断优化梯度洗脱条件在 5 min 内将 20E 与芸苔素内酯完全分离，20E 的保留时间为 1.57 min，芸苔素内酯保留时间为 2.08 min。

表 1 20E 与芸苔素内酯的多反应选择监测（SRM）参数
Table 1 SRM parameters of 20E and brassinolide

化合物 Compound	初始离子 Precursor ion (m/z)	产物离子 Product ion (m/z)	碰撞能量 CE(V)	射频透镜电压 RF lens (V)
β-蜕皮激素 20E	481.35	371.292	13.59	133
	481.35	445.375*	12.25	133
芸苔素内酯 Brassinolide	481.40	315.292*	17.01	129
	481.40	445.458	9.30	129

*定量离子对。
*Quantitative ion pair.

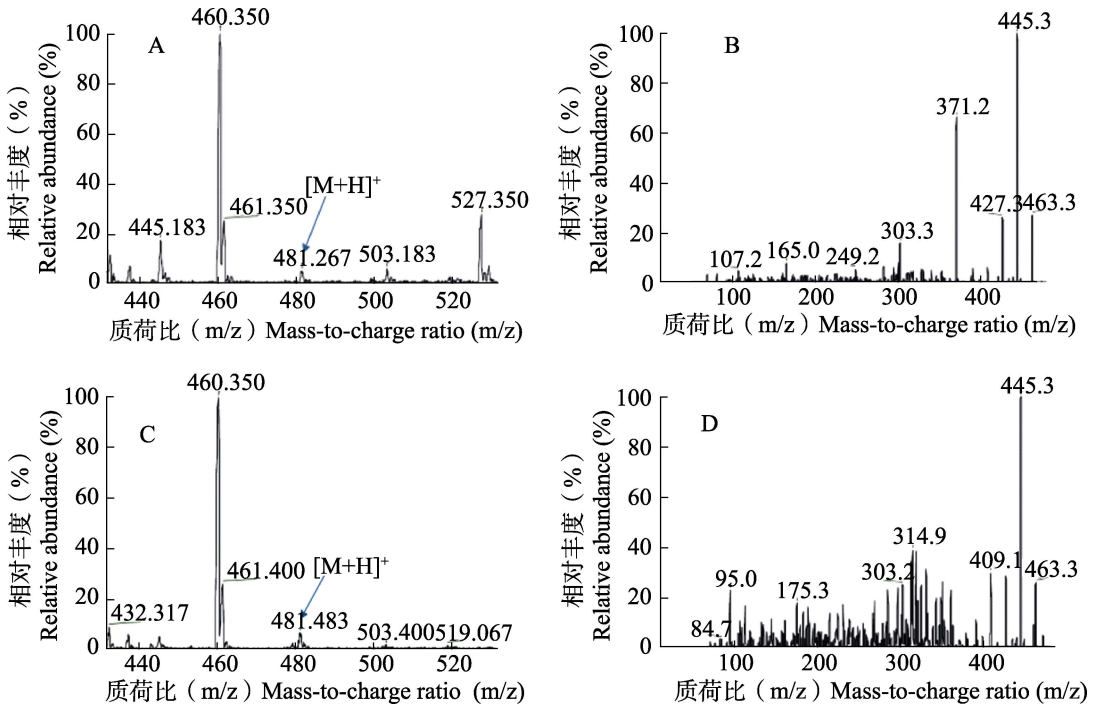

图 2　20E 的分子离子峰（A）及其碎片离子（B）和芸苔素内酯分子离子峰（C）及其碎片离子（D）

Fig. 2　Molecular ionization peak (A) and fragment ion (B) of 20E and molecular ionization peak (C) and fragment ion (D) of brassinolide

2.2　标准曲线

配制浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μg/L 的 20E 系列标准溶液，向 1 mL 不同浓度的标准溶液中加入 0.1 mL 的 500 μg/L 芸苔素内酯标准溶液，以峰面积比值为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线。结果表明，在 0.5-50 μg/L 范围内，20E 的线性方程为 y=0.168 9x − 0.018 5，相关系数（R^2=0.999 8）符合检测要求（图 3）。

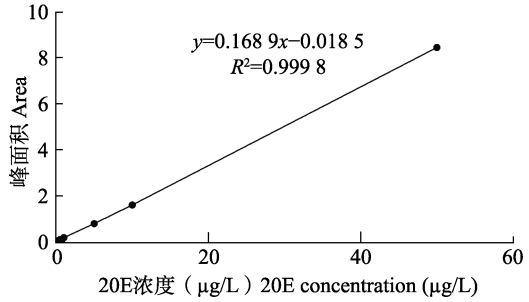

图 3　β-蜕皮激素的标准曲线

Fig. 3　Standard curve of 20E

2.3　样品的前处理、回收率、精密度和定量限

与哺乳动物的血液相比，小菜蛾血清样品中的杂质干扰物较少，用乙腈去蛋白，进行离心分离后可直接进行 UPLC-MS/MS 检测。检测结果表明，20E 在小菜蛾血清中 3 个添加水平下平均回收率在 91.9%-104.9%之间，相对标准偏差在 3.2%-9.2%之间，以最低添加水平 0.5 μg/L 作为定量限（表 2）。

2.4　小菜蛾幼虫 β-蜕皮激素的含量

通过上述研究建立的检测方法，对小菜蛾 4 龄第 2 天的幼虫的 20E 含量进行了检测，其 20E 含量为 5.60 μg/L。

3　结论与讨论

小菜蛾虫体小，血清含量少，已有研究报道在进行小菜蛾蜕皮激素含量测定时，往往采用虫体均浆液进行测定，而不是采用小菜蛾的血清（刘文静，2009；李富根等，2014）。这种测定方法往往侧重含量，而不能很好的反映小菜蛾血清中蜕皮激素的浓度，也就不能更准确的去阐明蜕皮激素在小菜蛾生长调节及变态发育中的作用。同时使用 UPLC-MS/MS 检测小菜蛾血清中

表 2 20E 在小菜蛾血清中的加标平均回收率、精密度（*n*=5）和定量限
Table 2 Recoveries of 20E

化合物 Compound	样品中 20E 量（ng） 20E in sample	添加水平（μg/L） Adding level	回收率（%） Recovery	相对标准偏差（%） Relative standard deviation	定量限（μg/L） Limit of quantitation
20E	11.2	0.5	104.9	9.2	0.5
		10	97.1	4.7	
		50	91.9	3.2	

表 3 小菜蛾 4 龄幼虫 *β*-蜕皮激素的含量
Table 3 The content of 20E in the 4th larvae of *Plutella xylostella* larvae

标准品/样品 Standard/Sample	峰面积 Area		比率 Ratio	比率平均值 Average of ratio	20E 含量 20E content	20E 平均含量 20E average content (μg/L)
	β-蜕皮激素 20E	芸苔素内酯 Brassinolide				
1 μg/L 标准品 1 μg/L Standard	589	795 9	0.074 0	0.067 0	–	–
	492	820 5	0.060 0		–	–
血清样品 Serum sample	127	717 3	0.017 7	–	5.29	5.60
	154	779 4	0.019 8	–	5.90	

蜕皮激素含量，操作简便，省去了常用的有机溶剂萃取、浓缩、定溶。对 20E 和芸苔素内酯的标准溶液进行 ESI 源质谱分析，在正离子模式下，均以$[M+H]^+$分子离子峰信号最强，与之前报道一致（赵鹏等，2011）。血清样品处理时，我们采用了直接使用乙腈去除血清中蛋白，相较于使用 C_{18} 固体萃取平均回收率 71.4%-87.7%，回收效率更高（Destrez *et al.*，2009）。试验中采用芸苔素内酯作为内标，与高芸苔素内酯比较，具有更高的相似色谱保留时间，对蜕皮激素的回收率测定干扰，平均回收率在 91.9%-104.9%之间，相对标准偏差在 3.2%-9.2%之间，测定结果的准确度更高（唐博志等，2015）。与海洋甲壳动物淋巴和肌肉中的 20-羟基蜕皮酮（赵鹏等，2011）、防治药剂对小菜蛾内分泌干扰效应研究（刘文静，2009）的分析方法相比较，极大的缩短了检测时间，提高了分析效率，是检测 *β*-蜕皮激素的最优方法。

本文研究建立了 UPLC-MS/MS 检测小菜蛾血清中蜕皮激素含量的分析方法，该方法较其他检测方法具有操作简单、灵敏度高，稳定性好，应用性强等优点。将方法应用于小菜蛾血清中 20E 含量检测，为进一步研究蜕皮激素在小菜蛾变态、生殖中的作用提供了科学准确的研究方法。

参考文献 (References)

Destrez B, Pinel G, Monteau F, Lafont R, Bizec BL, 2009. Detection and identification of 20-hydroxyecdysone metabolites in calf urine by liquid chromatography-high resolution or tandem mass spectrometry measurements and establishment of their kinetics of elimination after 20-hydroxyecdysone administration. *Analytica Chimica Acta*, 637(1/2): 178–184.

Li FG, Ai GM, Zou DY, Ji Y, Gu BG, Gao XW, 2014. Characterization of activation metabolism activity of indoxacarb in insects by liquid chromatoraphy-triple quadrupole mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 42(4): 463–468. [李富根, 艾国民, 邹东云, 季颖, 顾宝根, 高希武, 2014. 液相色谱-三重四极杆串联质谱法测定昆虫对茚虫威活化代谢活性的差异. 分析化学, 42(4): 463–468.]

Liu WJ, 2009. Endocrine disruption effect of insecticides for control on diamondback moth, *Plutella xylostella*. Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [刘文静, 2009. 防治药剂对小菜蛾内分泌干扰效应研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]

Liu X, 2016. Study on the fecundity difference between fenpropathrin-resistant and susceptible *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and the underlying mechanism. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [刘星, 2016. 朱砂叶螨甲氰菊酯抗性和敏感品系生殖力差异及其相关机制. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]

Qiu MH, 2005. Ecdysones, what role do they play in life world? *Chinese Journal of Nature*, 27(3): 161–165. [邱明华, 2005. 昆虫蜕皮物质, 在生命活动中扮演什么角色? 自然杂志 27(3): 161–165.]

Retnakaran A, Krell P, Feng QL, Arif B, 2003. Ecdysone agonists: Mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4): 187–199.

Ruan MJ, Shi YB, 2006. Application of response surface methodology in the extraction of *β*-ecdysone from tussore. *Journal of Tianjing University of Science & Technology*, 21(2): 73–76, 85. [阮美娟, 石艳宾, 2006. 响应面分析在提取柞蚕中 *β*–蜕皮激素的应用. 天津科技大学学报, 21(2): 73–76, 85.]

Shen GW, Lin Y, Lv YH, Wang JY, Xing RM, Xia QY, 2014. Regulation of ecdysone on vitellogenin gene expression in silkworm *Bombyx mori*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11): 1106–1112. [沈关望, 林英, 吕毅华, 王继岩, 邢润苗, 夏庆友, 2014. 蜕皮激素对家蚕卵黄原蛋白基因表达的调控. 中国生物化学与分子生物学报, 30(11): 1106–1112.

Sun BY, 2018. Study on the mechanism of tolerance to high concentration of ecdysteroid in *Spodoptera litura*. Master dissertation. Chongqing: Chongqing University. [孙帮勇, 2013. 斜纹夜蛾对高浓度蜕皮激素耐受机制研究. 硕士学位论文. 重庆: 重庆大学.]

Tang BZ, Li L, Wu GH, 2015. Determination of 20-hydroxyecdysone in hemolymph of *Bombyx mori* by HPLC-MS/MS. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 36(1): 52–58. [唐博志, 李龙, 武国华, 2015. 高效液相色谱-串联质谱法测定家蚕血液中 *β*-蜕皮激素. 质谱学报, 36(1): 52–58.]

Xia Q, Li S, Feng Q, 2014. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annual Review of Entomology*, 59: 513–536.

Yao HW, Ye JY, Cheng JA, 2002. Advances in fitness of resistant insect to insecticides and its mechanism of endocrinic regulation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 39(3): 181–187. [姚洪渭, 叶恭银, 程家安, 2002. 害虫抗药性适合度与内分泌调控研究进展. 应用昆虫学报, 39(3): 181–187.]

Ye B, Li K, Li S, Li K, 2016. Detection of ecdysteroids in insect hemolymph by a combination of reverse-phase high-performance lipid chromatography and an enzyme linked immunosorbent assay. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(2): 186–191. [叶滨, 李康, 李胜, 李恺, 2016. 结合反相高效液相色谱和酶联免疫吸附法测定昆虫血淋巴中的蜕皮甾醇激素. 应用昆虫学报, 53(2): 186–191.]

Zhao P, Xu JL, Qi YZ, Chen JJ, Zhu DF, Yan XJ, 2011. Determination of 20-hydroxyecdysone in several marine crustaceans by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39(1): 57–61. [赵鹏, 徐继林, 亓一舟, 陈娟娟, 朱冬发, 严小军, 2011. 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. 分析化学, 39(1): 57–61.]

Zhou JH, Qi YT, Hou YL, Zhao J, Li Y, Xue XF, Wu LM, Zhang JZ, Chen F, 2011. Quantitative determination of juvenile hormone III and 20-hydroxyecdysone in queen larvae and drone pupae of *Apis mellifera* by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879(25): 2533–2541.

Zhou MX, Chen SF, Zhu WX, 2005. The study on the determination of phytoecdysone in *Folium mori* by capillary electrophoresis. *Journal of Huaiyin Teachers College* (*Natural Science Edition*), 4(4): 311–313. [周梅仙, 陈舒泛, 朱文娴, 2005. 高效毛细管电泳法测定桑叶中 *β*–蜕皮激素. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 4(4): 311–313.