

液相色谱质谱法测定萤火虫荧光素

李东芹 (华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要 [目的]建立快速测定D-虫荧光素的液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS)分析方法,并对荧光素的碎裂机理进行解析。[方法]采用Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm)色谱柱,甲醇、水梯度洗脱12 min进行色谱分离;在质谱正离子模式下,用6对反应监测离子对(MRM)进行定性、定量分析。[结果]目标化合物在0.625~125.000 μg/L线性关系良好($r=0.9969$),检出限为0.250 μg/L(S/N 为5)。[结论]该方法灵敏度高、选择性好,不仅可用于萤火虫发光机理、发光强弱差异、发光颜色差异方面的研究,还可以用于其他需要定量测定荧光素的研究。

关键词 液相色谱-串联质谱;快速分析;D-荧光素钾盐;萤火虫;荧光素

中图分类号 S-03 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)15-0191-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.15.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Determination of Firefly Luciferin by High Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry Method

LI Dong-qin (National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract [Objective] A rapid high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed for the determination of D-Luciferin. The D-Luciferin fragmentation mechanism was analyzed. [Method] The HPLC separation was carried on the Shim-pack VP-ODS column (150 L×2.0 mm, 5 μm) with methanol and water eluting gradiently in 12 min. The D-Luciferin was detected by using 6 multiple reaction monitoring (MRM) in ESI positive mode of mass spectrometer. [Result] There was a good linear relationship within the range of 0.625~125.000 μg/L ($r=0.9969$). The quantitative determination limit was 0.250 μg/L ($S/N=5$). [Conclusion] The method is sensitive and selective. It can be used to detect D-Luciferin rapidly in the firefly or other research.

Key words HPLC-MS/MS; Rapid analysis; D-Luciferin; Firefly; Luciferin

萤火虫属鞘翅目萤科,是萤科昆虫的通称,因其尾部能发出萤光,故名萤火虫。萤火虫的发光是其体内荧光素在荧光素酶催化下发生氧化反应所释放的能量形成的。不同品种、不同性别和不同生长时期的萤火虫,其发光部位、发光强弱、发光颜色又有很大的差异^[1-2]。现有对萤火虫发光机理的研究一般集中在荧光素酶的活性、稳定性、立体结构影响发光颜色等方面^[3-7],而对萤火虫荧光素的研究非常少。除了少量萤火虫荧光素人工合成^[8-10]方法报道外,关于萤火虫荧光素的定量测定方法鲜见报道。已报道的荧光素类物质,如荧光素钠、荧光黄、荧光桃红等的测定方法有荧光分光光度计法^[11]、拉曼光谱法^[12]和高效液相色谱法^[13-14]等,这些分析方法理论上也可以用于萤火虫荧光素的测定,但是灵敏度和选择性相对较差。笔者利用液相色谱质谱高灵敏和高选择性的特点,建立萤火虫荧光素的定性、定量分析方法。

1 材料与方

1.1 试材 4000Qtrap 串联三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司); LC-20AD 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); Milli-pore 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 蠕动泵(Hamilton 公司);离心机(贝克曼公司)。甲醇(色谱纯,默克公司);超纯水;乙酸(色谱纯);1 mL 医用注射器;0.22 μm 微孔滤头(上海安普);D-虫荧光素钾盐(上海前生物有限公司);穹宇萤样品(华中农业大学付新华老师提供)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备。精确称取萤火虫尾部组织,液氮研磨后

加 1 mL 95 °C 热水匀浆萃取 15 min,离心取上清 500 μL,加 500 μL 正己烷,混匀后静置分层,取下层水溶液经 0.22 μm 微孔滤头过滤后上机分析。

1.2.2 仪器条件。

1.2.2.1 色谱条件。岛津 Shim-pack VP-ODS(150 L×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱,样品室温度为室温;流动相:A 为 0.1% 的乙酸水溶液,B 为含 2 mmol/L 醋酸铵的甲醇溶液;流速为 0.25 mL/min,柱温箱温度为室温,进样量为 5 μL。梯度洗脱条件为:B:A,0 min 为 15:85(V/V),5 min 为 100:0(V/V),8 min 为 100:0(V/V),8.1 min 为 15:85(V/V),12 min 程序结束。

1.2.2.2 质谱条件。采用电喷雾(ESI)离子源,在正离子电离模式下选用多反应离子监测(MRM)扫描模式进行定量分析。电喷雾电压 5 500 V;离子源温度:500 °C;离子源辅助气 GS1/GS2 气流均为 50 L/h。质量扫描范围 m/z 50~300,二级质谱碰撞能量:31eV。

2 结果与分析

2.1 质谱参数优化 用蠕动泵直接进样,对 500 μg/L 的荧光素钾盐标准品溶液进行母离子全扫描,在阳离子模式下得到荧光素钾盐的 $[(M-nK)+(n+1)H]$ 型母离子为 281.1;优化电压、离子源温度和辅助气等参数使分子离子峰最强;在以上质谱条件下,对选定的母离子进行子离子扫描,得到荧光素钾盐的二级质谱碎片离子(图 1);继续对解簇电压(DP)、入口电压(EP)、碰撞能量(CE)和碰撞出口电压(CXP)等质谱参数进行优化,在 DP 为 90 V、EP 为 10 V、CE 为 31 V、CXP 为 10 V 条件下,荧光素的母离子、子离子信号强度比例适中;选取丰度最大的子离子 235.2 与母离子组成 MRM 定量离子对(281.10→235.2,选 177.2、194.2、87.6、

105.3、203.0 子离子与母离子组成 5 个辅助定性离子对。

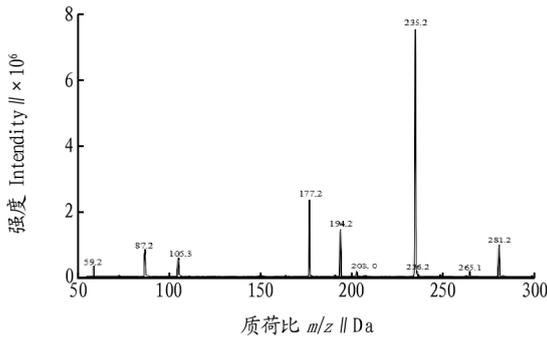


图 1 D-荧光素的二级质谱碎片图

Fig. 1 Mass spectrometry fragmentation of D-Luciferin

2.2 荧光素的质谱裂解方式 根据图 1 荧光素在正离子模式下的离子碎片信息,推测可能存在以下 3 种主要的碎裂方式(图 2)。荧光素钾盐的准分子离子峰[(M-nK)+(n+1)H]为 m/z 281.1,脱去一个羧基后得到 m/z 235.2 的碎片离子;2 位的碳氮键和 4 位的碳硫键同时断裂,重排后可得到 m/z 为 177.1 和 105.3 的碎片离子;1,3 共轭双键之间发生重排反应后,4 位的碳正离子不稳定,碳氮键和 5 位的碳硫键继续断裂,重排后可得到 m/z 为 87.2 和 194.1 的离子碎片,这一步碎裂方式与文献[15]结果一致。

2.3 萤火虫样品中荧光素的定性检测 选取荧光素 6 个主

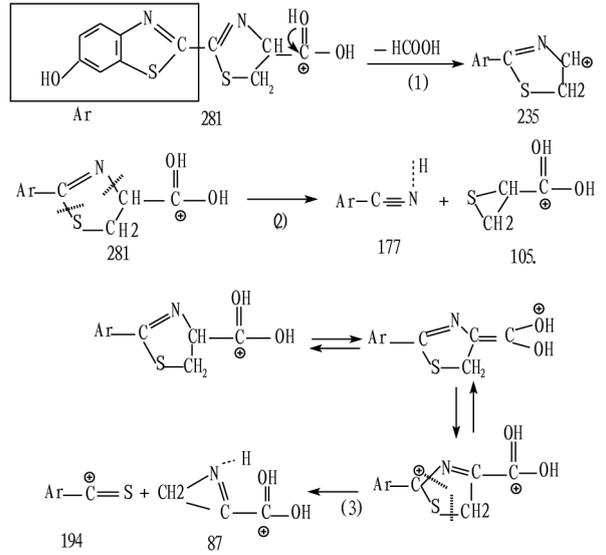


图 2 荧光素质谱裂解机理

Fig. 2 Fragmentation mechanism of D-Luciferin

要子离子碎片,组成 6 对 MRM 特征离子对,同时监测这 6 个反应,即 m/z 281.1→235.2、194.2、177.2、105.3、87.2、203.0。若样品中目标化合物在每级反应监测过程中出峰并且保留时间相同,便可以确认其存在。6 对特征离子对几乎全部涵盖了 D-虫荧光素的所有碎裂途径,定性结果准确可靠。图 3

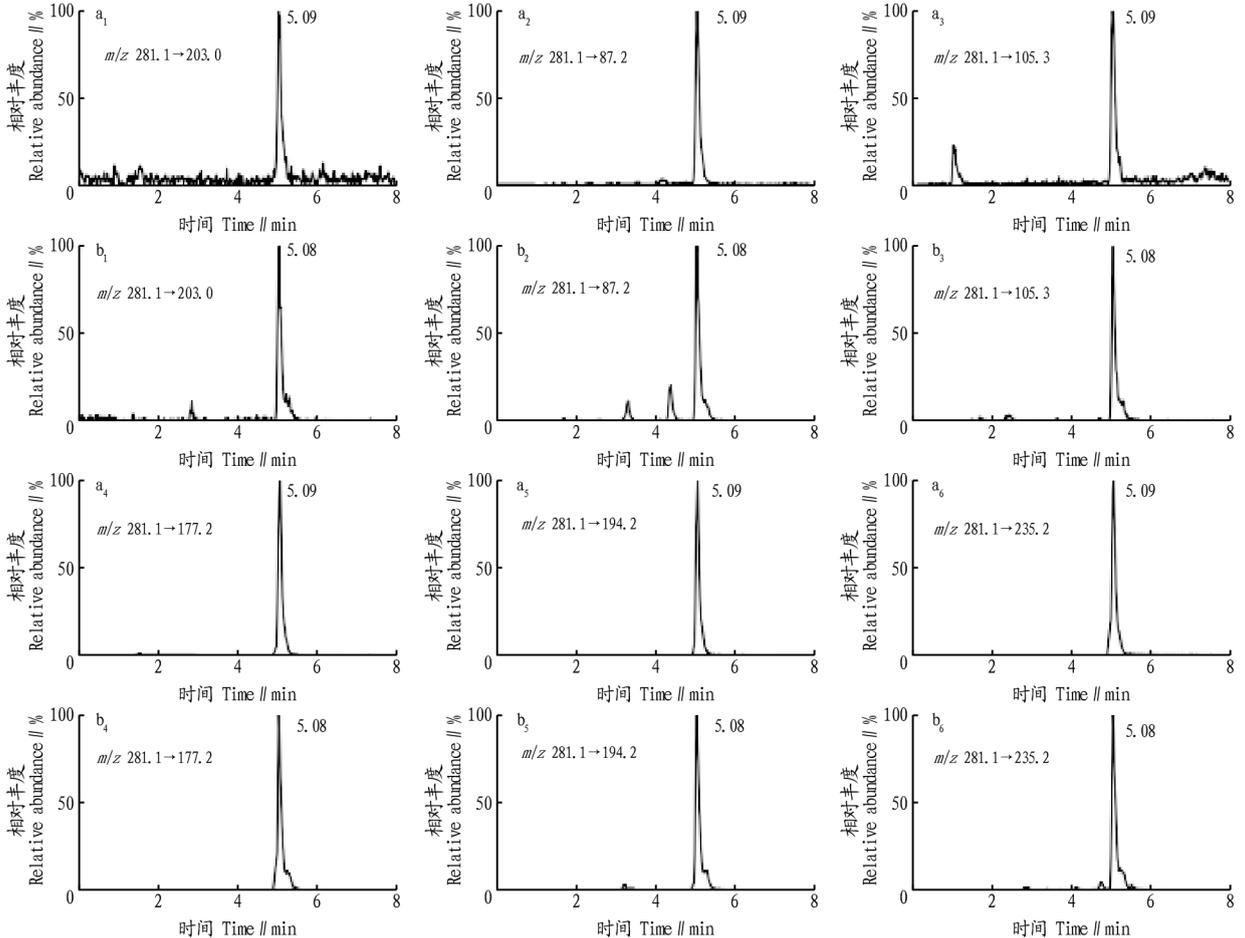


图 3 荧光素标准品(a)和雌萤火虫样品(b)的 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of D-Luciferin in standard sample(a) and the female firefly(b)

为 D-虫荧光素钾盐标准品和雌萤火虫中 6 对特征离子对的检测结果,试验结果证实萤火虫所含的荧光素结构为 D-虫荧光素。

2.4 方法的灵敏度和特异性 将荧光素钾盐稀释成 1 mg/mL 的母液,用超纯水逐步稀释成浓度为 125.0、62.5、31.3、12.5、6.25 $\mu\text{g/L}$ 系列梯度的标准溶液。在“1.2.2”仪器条件下进行上机分析。在 MRM 模式下选择信号最灵敏的 m/z 281.1 \rightarrow 235.2 为定量离子对,以标准溶液的浓度为横坐标 x 、相应的荧光素峰面积为纵坐标 y ,得到标准曲线方程为 $y=3\ 630x+4\ 870$ ($r=0.996\ 9$),表明目标化合物在 0.625~125.000 $\mu\text{g/L}$ 线性关系良好。在当前试验条件下,方法的定量限为 0.625 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=10$),检出限为 0.250 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=5$)。

只用单一离子对扫描检测目标成分时,有时会同时出现几个色谱峰,如图 3 中 m/z 281.1 \rightarrow 87.2 和 m/z 281.1 \rightarrow 105.3 这 2 个离子对,在标样和样品中均出现几个峰,此时就很难确定目标成分峰。当检测指标增加至 6 个离子对时,目标成分就非常好辨认。在每个 MRM 离子对谱图(图 3)中,同一保留时间均出现的色谱峰只有一个,即是目标成分。

2.5 实际样品检测 分别精确称取穹宇萤的雌、雄、幼尾部组织,按照“1.2.1”方法处理后,在“1.2.2”仪器条件下上机测试,由外标标准曲线定量得到每 100 g 雌虫、雄虫和幼虫的荧光素含量分别为 362.69、725.00、13.76 μg 。

3 结论

该研究建立的萤火虫荧光素液相色谱-串联质谱测定方法,有效避免了液相色谱法、分光光度法中基质的干扰,具有快速、灵敏、选择性高等特点。该方法不仅可以用于萤火虫发光机理、发光强弱、发光颜色差异等方面的研究,也可用于虫荧光素人工合成及其他研究中荧光素的定量分析。

参考文献

- [1] LOWER S E, STANGER-HALL K F, HAL D W. Molecular variation across populations of a widespread North American firefly, *Photinus pyralis*, reveals that coding changes do not underlie flash color variation or associated visual sensitivity[J]. BMC Evolutionary Biology, 2018, 18: 1-14.
- [2] YIU V, JENG M L. *Oculogryphus chenghoiyanae* sp. n. (Coleoptera, Lampyridae): A new otoretine firefly from Hong Kong with descriptions of its bioluminescent behavior and ultraviolet-induced fluorescence in females[J]. Zookeys, 2018, 739: 65-78.
- [3] EBRAHIMI M, HOSSEINKHANI S, HEYDARI A, et al. Improvement of thermostability and activity of firefly luciferase through [TMG][Ac] ionic liquid mediator[J]. Applied biochemistry biotechnology, 2012, 168(3): 604-615.
- [4] LESKINEN P, VIRTA M, KARP M. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast[J]. Yeast, 2003, 20(13): 1109-1113.
- [5] MAGHAMI P, RANJBAR B, HOSSEINKHANI S, et al. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase[J]. Photochemical & photobiological sciences, 2010, 9(3): 376-383.
- [6] HIRANO T. Molecular origin of color variation in firefly (beetle) bioluminescence: A chemical basis for biological imaging[J]. Current topics in medicinal chemistry, 2016, 16(24): 2638-2647.
- [7] KIYAMA M, SAITO R, IWANO S, et al. Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin[J]. Current topics in medicine chemistry, 2016, 16(24): 2648-2655.
- [8] NIWA K, NAKAMURA M, MAKI S, et al. Biosynthesis of firefly D-luciferin[J]. Luminescence, 2006, 21(5): 286.
- [9] OBA Y, YOSHIDA N, KANIE S, et al. Biosynthesis of firefly luciferin in adult lantern: Decarboxylation of L-cysteine is a key step for benzothiazole ring formation in firefly luciferin synthesis[J]. PLoS One, 2013, 8(12): 1-15.
- [10] NIWA K, NAKAMURA M, OHMIYA Y. Stereoisomeric bio-inversion key to biosynthesis of firefly D-luciferin[J]. FEBS Letters, 2006, 580(22): 5283-5287.
- [11] 何雄, 周静峰, 孙金才. 银纳米粒子基底制备及表面增强拉曼光谱法检测荧光素钠[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1084-1088.
- [12] 李伯平, 郭冬发. 分光光度法测定钻井液中示踪剂荧光素钠[J]. 中国无机分析化学, 2013, 3(1): 38-40.
- [13] 蒋俊, 王祖翔, 任连兵, 等. HPLC 法同时测定果汁饮料中曙红、荧光桃红、荧光素钠[J]. 分析实验室, 2011, 30(12): 34-37.
- [14] 奚星林, 邵仕萍, 徐娟, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中的 12 种合成色素[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(3): 217-222.
- [15] KANIE S, NAKAI R, OJIKI M, et al. 2-S-cysteinylhydroquinone is an intermediate for the firefly luciferin biosynthesis that occurs in the pupal stage of the Japanese firefly, *Luciola lateralis*[J]. Bioorganic chemistry, 2018, 80: 223-229.