



## 高效液相色谱在生物医药研究中的应用

### 第七讲 生物胺的分离和测定(下):多胺及有关化合物的分离和测定

唐琴梅

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

#### § 7-6 多胺及有关化合物的分离

多胺是具有两个以上氨基的脂肪族化合物, 四种重要的多胺及有关化合物的名称和结构见表 1。此类

化合物无紫外吸收, 又无荧光和电化学活性, 检测困难, 必须衍生后才能检测, 因此多胺的分离方法与其衍生有关。

表 7-3 多胺及有关化合物的名称和结构

化合物名称	结构式	缩写
腐胺	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Put
尸胺	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	Cad
精脒	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Spd
精胺	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Spm
乙酰腐胺	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	AcPut
乙酰尸胺	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	AcCad
N <sup>1</sup> -乙酰精脒	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOC}_3\text{H}_7$	N <sup>1</sup> -AcSpd
N <sup>8</sup> -乙酰精脒	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	N <sup>8</sup> -AcSpd
N <sup>1</sup> -乙酰精胺	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOC}_3\text{H}_7$	N <sup>1</sup> -AcSpm

1. 反相色谱 在柱前衍生中多胺与衍生试剂生成疏水的有机大分子, 因此柱前衍生的多胺分离可用反相色谱, 常用的是 C<sub>18</sub>柱<sup>[1-8]</sup>, 也有用 C<sub>8</sub>柱分离的报道<sup>[9-10]</sup>。Genner 和 Skaaden 等分别试验了 Lichrosorb RP-18, RP-8, RP-CN 和苯基、C<sub>6</sub>、C<sub>18</sub>柱, 初步试验表明 C<sub>18</sub>柱分离效果最好<sup>[11-12]</sup>。

2. 阳离子交换色谱 在柱后衍生中多胺的极性基团会在色谱过程中产生峰扩展, 可采用阳离子交换色谱进行分离<sup>[13,14]</sup>, 阳离子交换色谱可将氨基酸、胺及肽与多胺分离, 由于离子交换树脂的高容量, 在分析生物样品时不需对样品作复杂的预处理。

3. 反相离子对色谱 除了阳离子交换色谱, 在柱后衍生中还可利用反相离子对色谱。多胺的结构极易与易离子化的有机酸如 n-己、庚、辛烷磺酸及樟脑磺酸等形成离子对, 在洗脱液中多胺阳离子与离子对试剂的结合有动力学上的平衡, 增加离子对试剂的浓度能使平衡向生成离子对的方向移动, 使多数阳离子生成单一型的离子对, 从而避免了峰扩展。目前反相离子对色谱已成为柱后衍生中最常用的分离方法<sup>[15-19]</sup>。

4. 影响分离的因素 有机改性剂的浓度对多胺的保留时间(t<sub>r</sub>)及分离有较大的影响, 缓冲液的 pH

对多胺的容量因子(k')影响不大, 但缓冲液的离子强度对多胺的 k' 影响较大, 离子强度增加时 k' 减小(图 7-13)<sup>[16,20]</sup>, 在反相离子对色谱中, 离子对试剂的浓度增加时, 多胺的 t<sub>r</sub> 也增加(图 7-14)。

#### § 7-7 多胺及其有关化合物的检测

此类化合物缺少结构检测特征, 故须衍生后才能进行检测。紫外检测器因缺少足够的灵敏度一般不适宜这类生物样品的测定, 目前多选择荧光检测法, 近年来又发展了电化学检测法。

1. 紫外检测法 紫外衍生试剂用于多胺的有对-甲苯磺酰、喹啉-8-磺酰、苯甲酰氯及二甲胺基偶氮苯磺酰氯(DABS-C1)等, 前两种衍生试剂检测灵敏度较低, 定量测定范围分别为 2—50μg 及 20—200ng, 故不能用于多胺的微量测定。苯甲酰氯和 DABS-C1 具有衍生反应迅速、衍生物稳定和检测灵敏度高等优点。苯甲酰氯的多胺衍生物在紫外 229nm 或 230nm 处检测灵敏度可达 1pmol 或 6ng<sup>[5,21]</sup>。DABS-C1 的多胺衍生物检测波长为 436nm, 灵敏度 2pmol<sup>[8]</sup>。

2. 荧光检测法 荧光检测法常用的衍生试剂有荧光胺(FA)<sup>[1]</sup>、邻苯二甲醛(OPA)<sup>[15-19]</sup>及丹磺酰氯(DNS-C1)<sup>[3,4,6,9,10]</sup>, FA 和 OPA 只能与伯胺反应, 因此比 DNS-C1 更具选择性, 且衍生反应迅速。DNS-C1

的衍生反应时间较长,但产物稳定,于暗处4℃保存一个月损失不超过10%,检测灵敏度也较高,最小检

测极限可达50—150fmol<sup>[4]</sup>。FA和DNS-C1均用于柱前衍生,OPA柱前、柱后衍生均可使用。

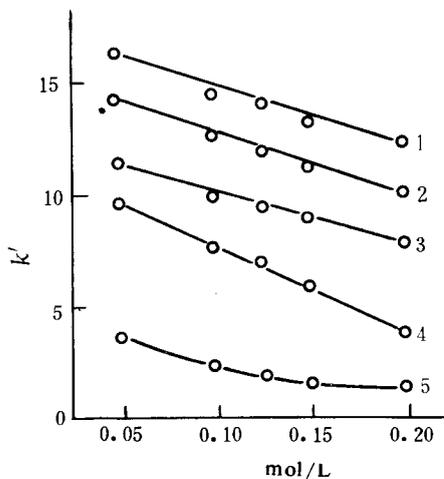


图 7-13 洗脱液中 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的浓度对 k' 的影响

1. Spm, 2. Spd, 3. N<sup>8</sup>-AcSpd, 4. Put, 5. NAcPut

柱前荧光衍生物的制备:

(1) 荧光胺衍生物的制备<sup>[1]</sup> 经预处理后的样本加入 0.4mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.0), 0.2ml 20mmol/L 硫酸镍(II)及 0.5ml 1mmol/L FA 的无水丙酮溶液, 激烈混合后用 1.0ml 0.3mol/L 琥珀酸酸化, 加入 1gNaCl 后用 0.4ml 乙酸乙酯提取, 有机层转移至另一试管中加入 3.0ml 环己烷, 用 0.2ml 0.4mol/L 硼酸缓冲液(pH 10.0)提取, 100μl 硼酸钾缓冲液用于 HPLC 分析。在衍生时加入镍离子是为了抑制生物样本中干扰多胺测定的少量伯胺, 使其不与 FA 反应, 但镍离子不会抑制多胺与 FA 的反应。

(2) OPA 衍生物的制备 a. 直接进样: 经预处理后的生物样本加入 100μl OPA 衍生试剂, 激烈振荡 30sec, 放置 90—120sec 即可用于 HPLC 分析。 b. 乙酸乙酯提取: 按 a 法反应 90sec 后加入 100—200μl 乙酸乙酯, 激烈振荡 1min, 分出乙酸乙酯层用于分析。多胺衍生物在乙酸乙酯中稳定性大大增加, 放置 2.5h 后其得率除 Spm 为 80% 外, 其余化合物均在 93% 以上<sup>[12]</sup>。

(3) DNS-C1 衍生物的制备 经预处理后的生物样本加入 100μl 饱和碳酸钠溶液和 400μl DNS-C1 溶液, 塞住试管后于暗处 54℃ 放置 1h, 过量的 DNS-C1 用加 100μl 的脯氨酸溶液(150mg/ml)来除去, 然后再于暗处放 1h, 丹磺酰衍生物用 500μl 乙酸乙酯提取离心后, 20μl 乙酸乙酯用于 HPLC 测定<sup>[9]</sup>。

3. 电化学检测法 电化学检测法因其高灵敏度

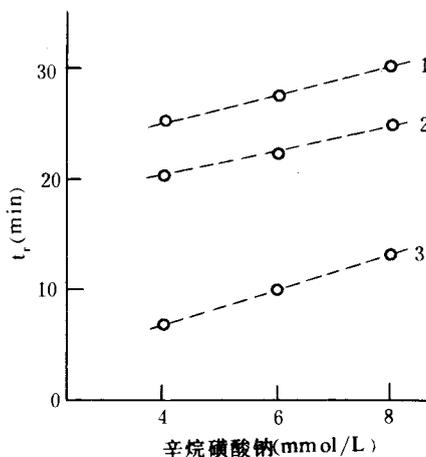


图 7-14 洗脱液中辛烷磺酸钠的浓度对多胺 t<sub>r</sub> 的影响

1. Spm, 2. Spd, 3. Put

及高专一性而广泛用于生物样本中儿茶酚胺的测定, 近年来又开展了电化学检测器对多胺测定的研究, 已取得一定的结果。多胺本身无电化学活性, 但它与 OPA 的衍生物可以用电化学检测。因 OPA 衍生试剂本身具电化学活性, 故而不能用于柱后衍生。庄凌航等<sup>[20]</sup>对多胺用 OPA 柱前衍生电化学检测的条件进行了探讨, 图 7-15 为电化学检测器的工作电位与多胺衍生物电化学检测器响应的曲线图, 检测灵敏度可达 1pmol。

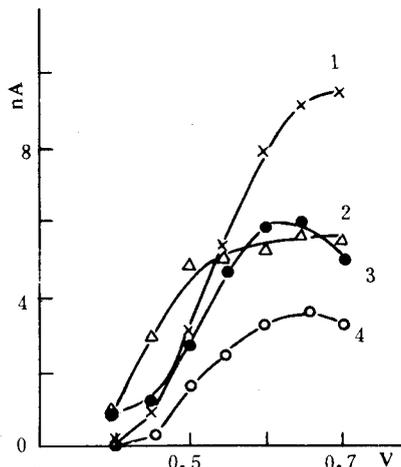


图 7-15 多胺 OPA 衍生物的伏安曲线

1. Spd, 2. Put, 3. Spm, 4. Cad.

4. 衍生反应对检测灵敏度的影响 柱后衍生需用一泵将衍生试剂以一定的流量输入 T 形管与分析

柱流出液在反应圈内混合反应,因此衍生试剂的流量及反应圈的温度对多胺衍生物的峰面积有较大影响。Löser 等<sup>[18]</sup>对此进行了试验,结果表明 OPA 衍生试剂的流量在 0.375ml/min 增至 1.5ml/min 时其峰面积呈线性增加,反应圈的温度在 20—60℃内变化时也能增加峰面积。

在柱前衍生中,衍生试剂的浓度、pH、反应温度及时间以及缓冲液的组成都会影响衍生反应的进行及产物的稳定性<sup>[4,3,12]</sup>,从而影响检测灵敏度,所以必须进行衍生反应条件的优化。

### § 7-8 多胺的水解

游离多胺在尿液中含量较低,而在水解尿液中明显增加,这表明多胺是以 N-乙酰或内酰胺的形式存在于尿液中,所以在测定总的多胺含量时,在样本预处理前要先将生物样本水解,水解条件如下:

1. 生物样本置于聚丙烯管中,加入同体积的 6—12mol/L HCl 混合后塞上塞子,于 110℃水解 14—16 小时,离心,上清液冷冻干燥,残余物经溶解后用于样本预处理<sup>[4,9,17]</sup>。

2. 尿样本加同体积 1—2mol/L HCl,于 100℃水解 3 小时即可,据 Fujita 等<sup>[22]</sup>报道,增加 HCl 浓度 (6mol/L),延长水解时间 (16h) 或提高水解温度 (110—120℃) 均不能增加多胺的含量。

### § 7-9 生物样本的贮存

多胺极易被玻璃吸附,因此生物样本应贮存于聚丙烯容器中,一般尿液收集后常加浓 HCl 以避免细菌污染。最近有试验表明,将动物组织和人尿于两个试验温度 (-20℃ 及 +4℃) 下贮存,每隔十天测定其多胺的浓度,结果在这两个贮存温度下所有多胺浓度在 3 个月以上保持不变<sup>[19]</sup>,由此可见,动物组织和人尿样本能长期贮存。

### § 7-10 生物样本预处理

1. 硅胶预处理小柱<sup>[9,18,23]</sup> 这类小柱主要有 Silica gel Sep-Pak 和 Bond Elut silica cartridge,将小柱预先用 5ml 水洗,吸取 2ml 经碱化至 pH 为 9 的尿液注入小柱,5—10ml 水洗小柱后弃去,然后用 10ml 0.1mol/L HCl 将多胺洗脱,含多胺的洗出液冷冻干燥后进行衍生化反应。

2. 阳离子交换柱预处理法<sup>[1,4,10,19]</sup> 2ml 尿液与 2ml 乙醇混合于 0℃,放置 1 小时,离心除去沉淀,上清液注入阳离子交换柱,先用 25ml 2mol/L HCl 洗,多胺部分用 25ml 6mol/L HCl 洗脱,它含有未结合多胺及单乙酰多胺,将多胺部分减压抽干,进行衍生化。此方法可用于酸水解尿液,酸提取的全血、血浆或血清样本<sup>[19]</sup>。

3. 去蛋白预处理法<sup>[3,6,7,13,17]</sup> 新鲜动物组织加入 0.2mol/L 高氯酸匀浆,经离心后上清液用于衍生反应(柱前),或 HPLC 分析(柱后)。

### § 7-11 应用实例

1. 苯甲酰氯柱前衍生,紫外检测法测定小鼠肾组织中的多胺(图 7-16)<sup>[5]</sup>。

(1) 生物样本预处理

100mg 小鼠肾组织加 1ml 5% 高氯酸匀浆,于 4℃ 22500g 离心 15min,上清液用于衍生反应,上清液若于 -70℃ 可保存 6 个月以上。

(2) 衍生反应 在 500μl 多胺提取液中加入 1ml 2% 苯甲酰氯的甲醇溶液及 1ml 2mol/L NaOH,混合 30sec,于 37℃ 反应 18—20min,加入 2ml 饱和氯化钠水溶液中止反应后以 3.0ml 乙醚提取,3000g 离心 10min,乙醚层蒸干,残余物溶于 100μl 甲醇,用 0.45μm 滤膜过滤,滤液用于 HPLC 测定。

(3) 色谱条件 柱: 250 × 4.6mm i. d., 填料 Supelcosil LC-18-DB (5μm), 洗脱液: 甲醇-水 (60:30), 流量 1.0ml/min, 检测波长 UV254nm. 峰: 1. Put, 2. Cad, 3. Spd, 4. Spm.

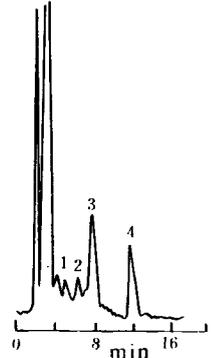


图 7-16 苯甲酰氯柱前衍生测定小鼠肾组织中的多胺

2. 荧光胺柱前衍生反相 HPLC 测定血清中游离多胺(图 7-17)<sup>[1]</sup>

(1) 生物样本预处理 0.5ml 血清加入 0.1ml, 4nmol/ml 1,6-己二胺作为内标准,用水稀释至 1.0ml,加入 0.1ml 3mol/L 过氯酸于 1200g 离心 5min,上层液体在冰水冷却下用 1.5mol/L KOH 调节 pH 为 7.0 ± 0.5,离心除去高氯酸钾,上清液加 1ml 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0),并与 0.5ml 氯仿、0.3ml 甲醇混合于 1200g 离心 5min,水层溶液通过 Cellex P 柱,依次用 2.0ml 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0), 1.0ml 水及 1.5ml 0.05mol/L NaCl 洗,然后用 2ml 3mol/L NaCl 将多胺洗脱,按 § 7-7 中荧光胺衍生物的制备进行衍生化。

(2) 色谱条件 柱 15 × 0.4cm i. d., 填料为 LiChrosorb RP-18 (5μm), 洗脱液: A. 0.5mol/L 氯化铵, 0.175mol/L 苯磺酸钠缓冲液 (pH 4.0)-水-甲醇 (100:175:225)。B. 0.5mol/L 氯化铵, 0.175mol/L 苯磺酸钠缓冲液 (pH 4.0)-甲醇 (100:400), 线性梯度洗脱,从 100%A 到 100%B。柱温 30 ± 0.5℃。荧光

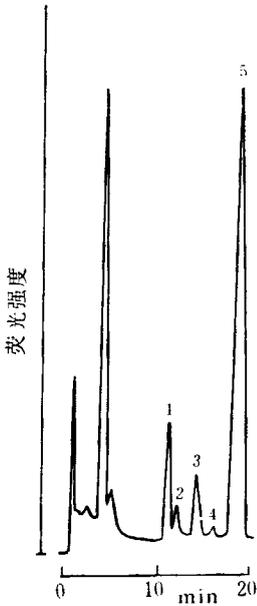


图 7-17 正常血清中游离多胺荧光胺衍生物色谱图

检测波长: 390/490nm. 峰: 1. Spd, 2. Spm, 3. Put, 4. Cad, 5. 内标。

3. DNS-C1 柱前衍生测定水解人脑脊液中多胺 (图 7-18)<sup>[4]</sup>

(1) CSF 的水解 1ml CSF 加入 1 滴 3.0mol/L

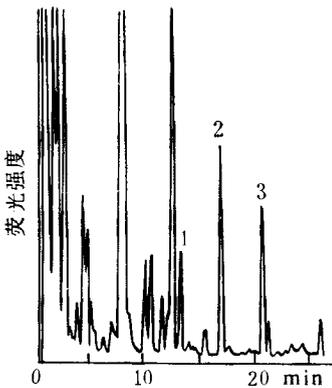


图 7-18 水解人 CSF 样品的色谱图

1. Pat 367pmol/ml, 2. IS, 3. Spd 447pmol/ml

HCl 后冷冻干燥, 残余物加入 0.5ml 6.0mol/L HCl 于 110°C 水解 4—16 小时, 水解物冷冻干燥后残余物溶于 150μl 4% 5-磺基水杨酸, 离心 5min, 50μl 上清液用于预处理。

(2) 样本预处理 50μl 上清液加入 50μl 1,7-庚二胺作为内标准 (200pmol/50μl), 100μl 0.2mol/L KOH 及 500μl 20mmol/L K<sup>+</sup> 缓冲液 (pH 6.2), 调节溶液 pH 为 3—4, 将该溶液注入 Bond-Elut SCX 柱 (阳离子交换), 用 2 倍柱体积的水和 10mmol/L K<sup>+</sup> 缓冲液

洗柱, 多胺用 2×300μl 20% 丙酮的 K<sup>+</sup> 缓冲液 (2.57mol/L, pH 5.6) 洗脱。

(3) 衍生反应及衍生产物的提取 50μl 上述溶液加入 200μl 饱和碳酸钠和 200μl DNS-C1 溶液 (10mg/ml), 振摇 50sec, 于 70°C 加热 10min, 冷至室温, 将内容物通过一 Bond-Elut C<sub>18</sub> 小柱 (该小柱先用甲醇和水洗), 柱流干后用 2 倍体积水洗, 用 500μl 甲醇将多胺衍生物洗脱, 50—100μl 进行 HPLC 分析。

(4) 色谱条件 柱: 250×4.6mm i. d., 填料 Ultrasphere ODS 5μm; 非线性梯度洗脱, A. 乙腈, B. 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 4.4), 流量 2.0ml/min, 柱温 50°C, 检测波长 340/515nm。

4. OPA 柱后衍生, 阳离子交换色谱测定水解大鼠肝提取物中多胺的含量 (图 7-19)<sup>[13]</sup>

(1) 生物样本预处理 大鼠肝组织用 10% 三氯乙酸匀浆沉淀蛋白, 上清液用 8.3mol/L HCl 110°C 水解 3h, 离心, 减压除去盐酸溶液, 残余物溶于重蒸水用于 HPLC 分析。

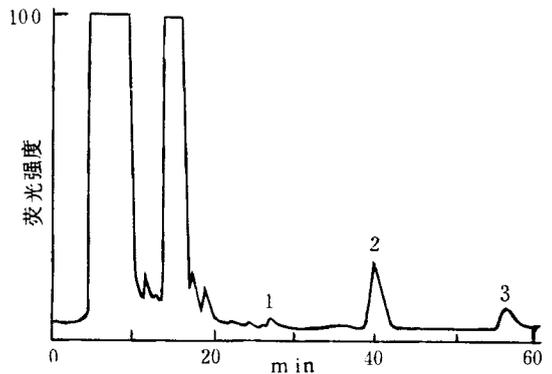


图 7-19 正常大鼠肝的提取物色谱图

(2) 色谱条件 柱 250×3.5mm i. d., 填料 Partisil PXS 10—25 SCS; 线性梯度洗脱: A. 0.01mol/L 醋酸钠, B. 0.05mol/L 醋酸钠于 0.95mol/L 硝酸钠缓冲液 (pH 4.6), 柱温 50°C; 荧光检测波长 330/345nm. 峰: 1. Put, 2. Spd, 3. Spm (相当于 34, 938 及 757nmol/g)。

5. OPA 柱后衍生反相离子对色谱测定尿液中的多胺 (图 7-20)<sup>[18]</sup>

(1) 生物样本预处理 2ml 尿样与 200μl 内标准 (1,7-庚二胺, 30nmol/ml) 混合, 用 25% 氨水调至 pH 9—10, 将该溶液通过 Bond Elut Silica cartridges, 用 10ml 水洗柱, 然后用 10ml 1mol/L HCl 将多胺洗脱, 洗出液在旋转蒸发仪上蒸干, 残余物溶于 500μl 0.1mol/L HCl 中, 20μl 用于 HPLC 分析。

(2) 水解 将加过内标的尿样与 1mol/L HCl 以 1

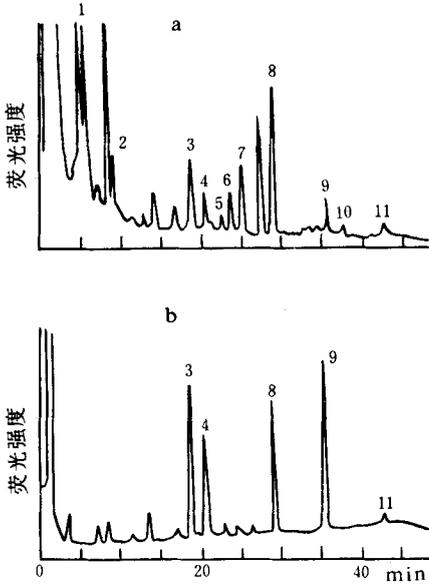


图 7-20 OPA 柱后衍生测定未水解和水解尿液中的多胺及 N-乙酰多胺

: 1(V/V)混合, 100℃水解 14 小时, 水解尿液再按上法进行预纯化。

(3) 色谱条件 预柱:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (10 $\mu$ m), 0.4 × 0.6cm i. d., 分析柱 NovaPak C<sub>18</sub> (4 $\mu$ m), 150 × 3.9mm i. d., 线性梯度洗脱, A. 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液, pH 4.5, 含 0.01mol/L 辛烷磺酸钠; B. 为 0.2mol/L 醋酸钠 (pH 4.5)-乙腈 (10 : 3V/V), 含 0.01mol/L 辛烷磺酸钠, 在 40 分钟内从 90%A, 10%B 到 100%B, 并继续保持至 45min, 图中 a 为未水解尿液, b 为水解尿液。峰: 1. Ac-Put, 2. Ac-Cad, 3. Put, 4. Cad, 5. histamine, 6. N'-Ac-Spd, 7. N<sup>3</sup>-Ac-Spd, 8. 内标, 9. Spd, 10. N'-Ac-Spm, 11. Spm。

6. OPA 柱前衍生, 电化学检测测定肿瘤患者水解尿液中多胺的含量 (图 7-21)<sup>[24]</sup>

(1) 尿液水解 2ml 尿液与等体积 6mol/L HCl 于塑料试管中密封, 100℃水解 12 小时, 冷却后离心除去焦油状物, 上层尿液用于样品预处理。

(2) 样品预处理 1ml 水解尿液用 NaOH 调至 pH 9, 注入 Sep-Pak C<sub>18</sub> 小柱中, 然后用 5ml 水洗涤, 用 1ml 0.1mol 乙酸将多胺洗脱, 取 50 $\mu$ l 按 § 7-7 中 (2) OPA 衍生物的制备 b 法进行衍生反应, 40 $\mu$ l 乙酸乙酯层进行 HPLC 测定。

(3) 色谱条件 柱 20 × 0.5cm i. d., 填料 LiChrosorb RP-C<sub>18</sub> (10 $\mu$ m); 洗脱液: 甲醇-0.05mol/L 三乙胺磷酸缓冲液 (pH 3.80, 含 0.1mmol/L EDTA-2Na); 流量梯度, 起始流量 1.0ml/min, 15min 时瞬时升为 2.0ml/min; 电化学检测工作电压 0.65V, Ag/AgCl 参比电极, 灵敏度 10nA。

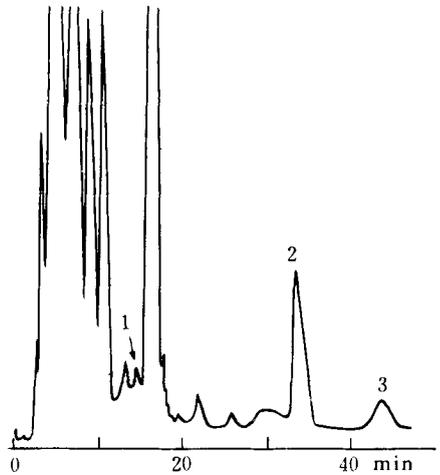


图 7-21 OPA 柱前衍生电化学检测测定肿瘤患者水解尿液中的多胺 1. Spd, 2. Put, 3. Cad

参考文献

[1] M. Kai et al., *J. Chromatogr.*, 163, 151 (1979).  
 [2] H. Furuta et al., *J. Chromatogr.*, 337, 103 (1985).  
 [3] C. Stefanelli et al., *J. Chromatogr.*, 375, 49 (1986).  
 [4] P. M. Kabra et al., *J. Chromatogr.*, 380, 19 (1986).  
 [5] S. Asotra et al., *J. Chromatogr.*, 408, 227 (1987).  
 [6] M. A. Desiderio, *J. Chromatogr.*, 419, 285 (1987).  
 [7] C. F. Verkoelen et al., *J. Chromatogr.*, 426, 41 (1988).  
 [8] N. Koski et al., *Anal. Biochem.*, 164, 261 (1987).  
 [9] B. Brossat et al., *J. Chromatogr.*, 277, 87 (1983).  
 [10] 张和顺等, 色谱, 6, 186 (1988).  
 [11] M. C. Gennaro et al., *Chromatographia*, 25, 117 (1988).  
 [12] T. Skaaden et al., *J. Chromatogr.*, 247, 111 (1982).  
 [13] P. K. Bonay et al., *J. Chromatogr.*, 224, 371 (1981).  
 [14] D. H. Russell et al., *J. Chromatogr.*, 273, 263 (1983).  
 [15] N. Seiler et al., *J. Chromatogr.*, 221, 227 (1980).  
 [16] T. Wagner et al., *J. Chromatogr.*, 227, 349 (1982).  
 [17] N. Seiler et al., *J. Chromatogr.*, 339, 45 (1985).  
 [18] C. Loser et al., *J. Chromatogr.*, 430, 249 (1988).  
 [19] P. M. Kabra, L. J. Marton, "Clinical Liquid Chromatography Volume I Analysis of Endogeneous Compounds" CRC Press, Inc., Boca Raton, Floride, P. 179, 1984.  
 [20] 庄凌航等, 色谱, 9, 108 (1991).  
 [21] 李富贵等, 第七次全国色谱学术报告会文集, P. 449, 北京, 1989.  
 [22] K. Fujita et al., *Cancer Research*, 36, 1320 (1976).  
 [23] M. M. Abdel-Monem et al., *J. Chromatogr.*, 222, 363 (1981).  
 [24] 庄凌航等, 第七次全国色谱学术报告会文集, P. 387, 北京, 1989. (收稿日期: 1989年6月15日)