

丹磺酰氯衍生化法检测生物样品中3种游离态多胺（腐胺，精胺和亚精胺）

Determination of Three Free Polyamines in Biological Samples by Using Dansyl Chloride Derivatization

史晓媛，龙志敏，郭立海

Shi Xiaoyuan, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心（上海），中国

SCIEX, China

Key Words: Polyamines, Derivatization, Liquid Chromatography Tandem, Mass Spectrometry

多胺(Polyamines, PA)是带有两个或两个以上氨基的脂肪族化合物，在生物体内广泛存在。最常见的多胺有腐胺(Putrescine)、亚精胺(Spermidine)和精胺(Spermine)等。多胺广泛存在于植物、动物、浮游植物以及海藻中，作为生物体内促进细胞生长的重要物质之一，对细胞生长、细胞增殖起着关键性的作用，能直接参与生物体内的多种生理活动，是生物体生长和细胞代谢所必需的痕量生物活性物质。

本文建立了分析生物样品中3种游离态多胺的定量方法，样品经丹磺酰氯(DNS-Cl)衍生后，多胺衍生物不需要再经过浓缩的步骤，极大地提高了分析速度。本方法具有选择性高，样品用量少，适合痕量分析等优点，能对生物样品中3种游离态多胺(腐胺、亚精胺和精胺)进行很好的定量分析。

样品处理

1. 移取 100 μL 血浆，加入300 μL 乙腈，涡旋混匀1 min，超声10 s后，离心5 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 15000 r/min)。
2. 取上清液，氮气吹干。加入50 μL 丹磺酰氯溶液 (5 mg/mL, 乙腈溶解) 及100 μL 0.1 M Na_2CO_3 缓冲液 (pH 11) 复溶，涡旋30 s后，避光条件下50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min。

3. 反应完成后加入3 μL 甲酸，将pH值调至7左右，离心5 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 15000 r/min)，取上清液进行LC-MS/MS测定。

液相条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm

流动相: A相: 水 (0.1% 甲酸, 5 mM 甲酸铵)

B相: 乙腈: 异丙醇 (v:v, 2:1)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 45 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 10 μL

梯度洗脱，洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	50	50
0.2	50	50
2.6	20	80
3	5	95
3.5	5	95
3.6	50	50
5	50	50

质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 4500

ESI正模式检测

IS电压: 5500V

气帘气CUR: 30 psi

雾化气GS1: 60 psi

辅助加热气: 60 psi

碰撞气CAD: 9

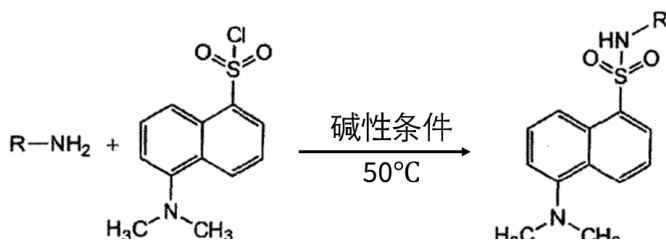
源温度TEM: 600°C

质谱参数如表2:

No.	Compound	Q1	Q3	DP	CE
1	腐胺	555.3	170.1	115	40
	Putrescine	555.3	169.2	115	39
2	亚精胺	845.3	360.3	180	51
	Spermidine	845.3	170.2	180	91
3	精胺	1135.5	360.2	220	66
	Spermine	1135.5	170.0	220	130

实验结果与讨论

1. 衍生化反应原理



反应原理如上图，丹磺酰氯 (Dansyl Chloride, DNS) 在碱性条件下与酚羟基，一级胺和二级胺反应，可以提高这些分析物的反相色谱保留行为、样品稳定性以及质谱响应，从而提高检测灵敏度，得到较好的定量结果。我们发现，pH值对多胺衍生反应有很大影响，pH值在9.8附近时，衍生反应效率最高。

2. 三种多胺标准品衍生物色谱图

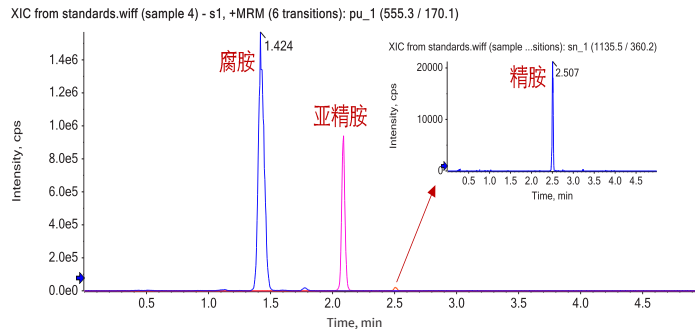


图1. 一针进样，对三种多胺进行高灵敏度分析 (10 ng/mL)

3. 线性结果及重复性考察

配制一系列覆盖大鼠血浆中多胺含量的标准曲线，浓度分别为1 ng/mL, 2ng/mL, 10 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL 3种多胺均呈良好线性关系 ($R^2 > 0.99$)，可满足分析大鼠血浆中多胺的需要。取上述2 ng/mL标准溶液 5份，根据前述样品前处理方法，平行测定，峰面积的相对标准偏差小于10%。实验结果显示，衍生反应的重复性较好。

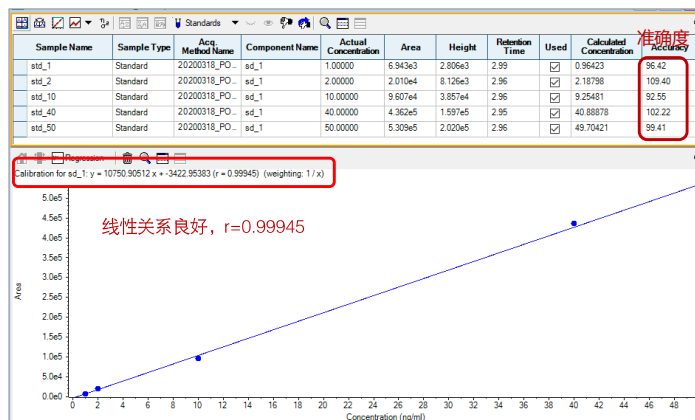


图2. 亚精胺的线性结果

小结

本文针对生物样品中3种内源性游离多胺，利用丹磺酰氯衍生的方法，快速完成3种游离多胺的高灵敏定量分析。多胺物质衍生化后，衍生物更稳定，并增强了反相色谱保留行为，质谱响应提高，更容易被质谱检测到，可实现稳定可靠的定量分析。对应线性范围内，3种多胺均呈良好线性关系 ($R^2 > 0.99$)，5次重复样品的相对偏差均小于10%，方法具有选择性高，样品用量少，灵敏度好等特点，可为生物样品中游离态腐胺、亚精胺和精胺的痕量分析提供参考。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO- MKT-02-13583-ZH- A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China