

经验交流

毛细管电泳-激光诱导荧光分析血清多胺的研究

张振中^{1)*} 吴逸明¹⁾ 程维明²⁾ 吴如金³⁾⁽¹⁾河南医科大学药理学系, 郑州 450052; ⁽²⁾河南省太康县血栓病医院, 太康 475400; ⁽³⁾中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009

摘要 为进一步探讨多胺的生物学作用, 建立了毛细管电泳-激光诱导荧光 ($\lambda_{ex}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em}=513\text{ nm}$) 分析血清多胺方法。在碱性介质中, 多胺与荧光素异硫氰酸酯进行衍生化反应, 硼酸盐 (pH 8.6) 作为运行缓冲液, 运行电压 20 kV, 腐胺、精胺、精脍和 1,6-己二胺 (内标) 在 8 min 内达到基线分离。考察了方法的线性范围、稳定性、检测限和方法的回收率等, 方法具有样品处理简单, 灵敏度高, 速度快等特点。用于正常对照大鼠和肿瘤大鼠血清多胺的测定。结果提示: 实验组肿瘤大鼠血清精胺和精脍水平显著高于正常对照大鼠和实验组未出现肿瘤大鼠血清精胺和精脍水平 ($P < 0.05$), 正常对照组大鼠和实验组未出现肿瘤大鼠血清精胺和精脍水平间无显著性差异 ($P > 0.05$)。各组间血清腐胺水平均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

关键词 毛细管电泳, 激光诱导荧光, 多胺

学科分类号 R313

多胺 (polyamines) 广泛分布于生物体内, 是一种低级长链脂肪族化合物, 含有多个氨基和 (或) 亚氨基。主要包括腐胺 (Putrescine, Put), 精脍 (Spermidine, Spd), 精胺 (Spermine, Spm) 及其衍生物。多胺与细胞分化, 增殖, 发育有关, 并能影响 DNA, RNA 和蛋白质的代谢。许多研究表明: 多胺水平与肿瘤发生, 发展存在一定相关性^[1], 因此多胺分析具有重要意义。根据文献 [2~4] 报道, 多胺测定主要采用 HPLC 和 GC 两种方法, 存在的主要问题是样品处理复杂, 灵敏度较低。也有采用间接紫外-毛细管电泳^[5]测定多胺的报道, 但其灵敏度低, 难以用于实际样品的测定。采用毛细管电泳-激光诱导荧光分析肿瘤血清多胺的方法具有样品处理简单, 灵敏度高, 速度快等特点。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器: Beckman P/ACE 5510 毛细管电泳仪, 氩离子激光诱导荧光检测器 ($\lambda_{ex}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em}=513\text{ nm}$), Gold System 数据处理系统, 未涂层石英毛细管 (47 cm $\times$ 75 μm) (河北永年光导纤维厂), 漩涡混合器 (上海医科大学仪器厂)。

1.1.2 试剂: 腐胺 (Putrescine, Put) (Sigma 公

司), 精脍盐酸盐 (Spermidine, 3HCl, Spd) (Sigma 公司), 精胺盐酸盐 (Spermine, 4HCl, Spm) (Sigma 公司), 1,6-己二胺 (1,6-diaminohexane, 沈阳试剂三厂), 荧光素异硫氰酸酯 (Isothiocyanatefluorescein, FITC) (第二军医大学), 磷酸氢二钠 (天津市化学试剂六厂), 硼酸 (北京红星化工厂), 高氯酸 (北京红星化工厂), 乙腈 (北京化工厂), 丙酮 (开封化学试剂总厂), 所用水均为去离子水再经二次石英蒸馏器蒸馏水, 除注明外, 所用试剂均为国产分析纯以上。

1.1.3 试液: 腐胺, 精胺, 精脍和 1,6-己二胺贮备液浓度均为 1 mmol/L, 于 4℃保存, 临用前稀释。衍生化缓冲液: 200 mmol/L 磷酸氢二钠 pH 10.7。运行缓冲液为 15 mmol/L 四硼酸钠+ 65 mmol/L 硼酸 (pH 8.6)。荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 溶液: 称取 5 mg FITC 溶于 25 ml 乙腈 (含 200 μl 甲醇) 中。

1.2 标本

河南省实验动物中心提供的初断乳 Wistar 大鼠随机分为正常对照组和实验组, 饲养四周后体重

* 通讯联系人。

Tel: 0371-6973994, E-mail: zzzhyd@371.net

收稿日期: 2000-05-24, 接受日期: 2000-07-07

为 120~200 g, 实验组 (30 只) 给予支气管灌注煤焦沥青生理盐水悬液, 对照组 (20 只) 给予支气管灌注炭粉生理盐水悬液, 每隔 10 天灌注一次, 连续灌注 6 次. 两组均于灌注 13 月后宰杀. 采用动脉放血法取血, 立即抗凝, 离心取上清液, 于 -20℃ 保存备用.

1.3 方法

1.3.1 衍生化反应: 分别取 10 μ l FITC 溶液和 10 μ l 衍生化缓冲液, 然后加入一定量的多胺标准液或样品液, 加水到 0.1 ml, 漩涡混匀, 于暗处反应 120 min.

1.3.2 实验方法: 每次进样前分别以 0.1 mol/L 氢氧化钠, 水和运行缓冲液 (15 mmol/L 四硼酸钠 + 65 mmol/L 硼酸 (pH 8.6)) 高压冲洗未涂层石英毛细管 (47 cm $\times$ 75 μ m) 2 min, 然后压力进样 (10 s), 于阴极处检测 ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 513$ nm), 运行电压 20 kV, Gold System 软件进行数据处理.

2 结果与讨论

2.1 pH 值对多胺分离的影响

缓冲液的 pH 值对多胺分离度有显著影响. pH 8.6 为最佳 (图 1), pH 7.0 时精脒和精胺未分开. pH 9.0 时, 精胺、精脒、腐胺和 1, 6-己二胺均未分开. 出峰顺序与质荷比大小相反.

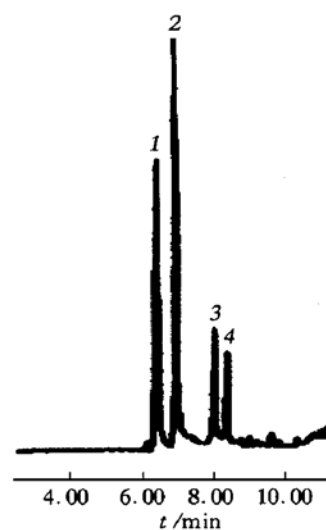


Fig. 1 Electropherogram of standard polyamines

1: Spermine; 2: Spermidine; 3: 1, 6-diaminohexane;
4: Putrescine.

2.2 分析方法的评价

2.2.1 线性回归方程: 配制一系列多胺标准溶液, 以多胺浓度 y (nmol/L) 与多胺和内标 (1, 6-己二胺) 峰高之比 x 进行线性回归得到线性回归方程如下:

$$\text{腐胺: } y = 2.66 + 2.76x, r = 0.9987 \quad (1)$$

$$\text{精胺: } y = 4.72 + 2.78x, r = 0.9983 \quad (2)$$

$$\text{精脒: } y = 4.45 + 3.86x, r = 0.9984 \quad (3)$$

2.2.2 稳定性: 将高、中、低三个浓度的溶液在同一天内及隔日测定多次, 结果见表 1.

Table 1 Stability of the method (RSD%)

Added/ nmol $\cdot$ L ⁻¹	Within-day			Between-day		
	Spermine	Spermidine	Putrescine	Spermine	Spermidine	Putrescine
10.0	10.0	11.0	7.0	9.0	8.7	6.9
100	6.0	5.1	4.7	6.3	7.5	5.0
150	5.1	4.2	3.7	5.3	5.2	4.3

$n = 6$.

2.2.3 检测限: 精胺、精脒和腐胺的最低检测限 ($S/N > 3$) 分别为 1.4 nmol/L, 2.0 nmol/L 和 2.5 nmol/L.

2.2.4 方法的回收率: 向血清中加入一定量多胺, 按照样品处理方法处理, 衍生化后直接进行分析, 根据线性回归方程计算测定值, 计算回收率, 精胺、精脒和腐胺回收率分别为 101.1%, 99.9% 和 106.8%.

2.3 血清多胺的测定

2.3.1 测定: 取 100 μ l 血清, 然后加入 40 μ l 冰

冷的 3 mol/L HClO₄, 漩涡振荡 (1 min) 混匀后, 于 4℃ 放置 30 min, 离心 (11 000 r/min $\times$ 10 min), 移取上清液. 按照“衍生化反应”及“实验方法”项下进行实验, 典型血清多胺毛细管电泳图见图 2, 并采用标准加入法对各峰进行了确证.

2.3.2 结果: 对各组间数据采用 SPSS 软件进行统计学处理, 结果提示: 实验组出现肿瘤的大鼠 (16 只) 血清精胺水平 (5.49 ± 1.45) μ mol/L 显著高于正常对照组大鼠 (20 只) (4.50 ± 1.02) μ mol/L 和实验组未出现肿瘤大鼠 (14 只) 血清精胺水平

(4.71 ± 1.58) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), 但正常对照组大鼠与实验组中未出现肿瘤大鼠血清精胺水平间无显著性差异 ($P > 0.05$). 实验组出现肿瘤大鼠血清精胺水平 (8.36 ± 2.73) $\mu\text{mol/L}$ 显著高于正常对照组大鼠 (5.23 ± 2.42) $\mu\text{mol/L}$ 和实验组未出现肿瘤大鼠血清精胺水平 (5.71 ± 2.60) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$),



Fig. 2 Electropherogram of serum polyamines

1: Spermine; 2: Spermidine; 3: 1, 6-diaminohexane;
4: Putrescine.

但正常对照组与实验组未出现肿瘤大鼠血清精胺水平间无显著性差异 ($P > 0.05$). 各组间血清腐胺水平无显著性差异 ($P > 0.05$). 多胺水平在细胞的生长中起着不可忽视的作用, 多胺水平可能影响癌基因或抑癌基因的激活或抑制. 当有外界因素 (物理的或化学的) 作用于生物体后, 导致多胺水平升高, 而使癌基因激活, 抑癌基因受到抑制, 最后可能引起细胞癌变. 多胺的许多生物学作用有待于进一步探索.

参 考 文 献

- 1 Anthony E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J*, 1986, **234** (2): 249~262
- 2 Schenkel E, Berlaimont V, Dubois J, *et al.* Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polyamines as their benzoylated derivatives: application to P388 cancer cells. *J Chromatogr B*, 1995, **668** (2): 189~197
- 3 Suh J W, Lee S H, Chung B C, *et al.* Urinary polyamines evaluation for effective diagnosis of various cancers. *J Chromatogr B*, 1997, **688** (2): 179~186
- 4 Huhn G, Mattusch J, Schulz H. Determination of polyamines in biological materials by HPLC with 9-fluorenylmethyl chloroformate precolumn derivatization. *Fresenius J Anal Chem*, 1995, **351** (6): 563~566
- 5 Ma Y, Zhang R, Cooper C L. Indirect photometric detection of polyamines in biological sample separated by high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*, 1992, **608** (1~2): 93~96

The Determination of Polyamines in Serum by Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescent Detector

ZHANG Zhen-Zhong^{1)*}, WU Yi-Ming¹⁾, CHENG Wei-Ming²⁾, WU Ru-Jin³⁾

(¹⁾ Department of Pharmacology, Henan Medical University, Zhengzhou 450052, China; (²⁾ Taikang Thrombus Hospital, Taikang 475400, China; (³⁾ Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract To explore the biological functions of polyamines, the analytical method of polyamines by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector (LIF) was developed. After derivatization of polyamines with isothiocyanatefluorescein, using borate (pH 8.6) as running buffer, putrescine, spermine, spermidine and 1, 6-diaminohexane were separated successfully within 8 min at the voltage of 20 kV. The linear range, stability, detection limit and recovery were examined, the method was simple, sensitive and rapid. The results of polyamines in serum showed: The levels of spermine and spermidine were significantly higher in rat serum of tumor than in rat serum of control group and non-tumor group. There was no markedly difference between the levels of spermine and spermidine in rat serum of control group and in rat serum of non-tumor group. The levels of putrescine in serum were no obviously difference between any groups.

Key words capillary electrophoresis, laser-induced fluorescence, polyamines

* Corresponding author. Tel: 86-371-6973994, E-mail: zzzhyd@371.net

Received: May 24, 2000 Accepted: July 7, 2000