

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）

Detection of 3 free Polyamines (Putrescine, Spermidine, Spermine) in biological samples with dansyl chloride derivatization

肖梦晴；龙志敏

Xiao Mengqing; Long Zhimin

SCIEX应用支持中心（上海）

SCIEX Application and Support Center (Shanghai)

Keywords: Putrescine, Spermidine, Spermine, LC-MS/MS

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。

本文基于SCIEX Triple Quad™ 系统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度的步骤，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。

样品前处理

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

液相：Exion LC™ 30AD 系统

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

流动相：A 水（0.1% 甲酸, 5mM 甲酸铵）；

B 乙腈：异丙醇 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系统

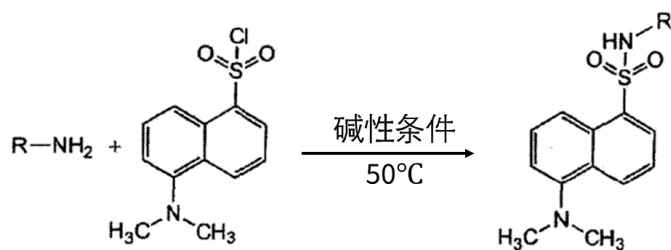
ESI正模式检测 IS电压: 5500V
 气帘气CUR: 30 psi 雾化气GS1: 60 psi
 辅助加热气: 60 psi 碰撞气CAD: 9
 源温度TEM: 600°C
 质谱参数如表2

表2. 质谱参数

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

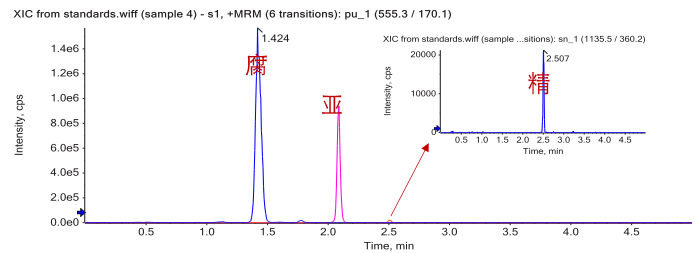


图1. 一针进样，对三种多胺进行高灵敏度分析 (10 ng/mL)

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。

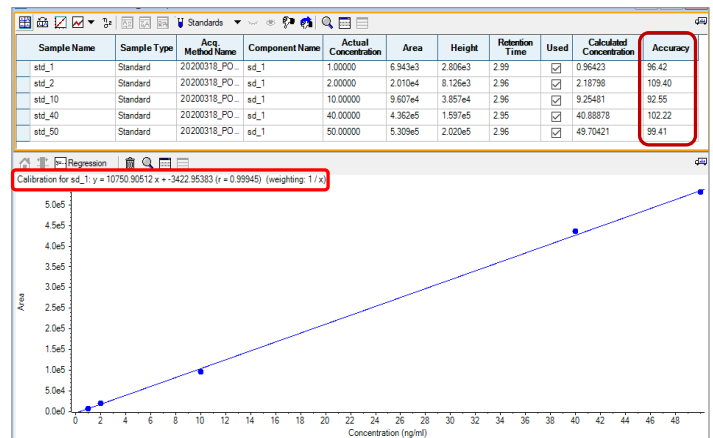


图2. 亚精胺的线性结果

小结

本文针对生物样品中3种内源性游离多胺，基于SCIEX Triple Quad™ 系统结合丹磺酰氯衍生，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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14760-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
广州市海珠区广州国际生物岛星岛环北路
1号B2栋5层501、502单元
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[SCIEX-China](#)