技术与方法

昆虫体内多胺的高效液相色谱(HPLC)测定*

张志春 王满[illegible]** 李 慧 王 楠 李 娟 张国安

(华中农业大学植物科技学院 武汉 430070)

Rapid analysis of polyamines in insects by high performance liquid chromatograpy. ZHANG Zhi-Chun, WANG Man-Qun**, LI Hui, WANG Nan, LI Juan, ZHANG Guo-An (*College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University*, Wuhan 430070, China)

Abstract A method for determinating polyamines in insects using high-poerformance liquid chromatographic(HPLC) was developed. This method was based on pre-column derivatization with dansyl chloride(Dns-Cl). The derivatives were spearated on a C_{18} column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), and eluted with methanol and distilled water using a one-step linear gradient. The temperature of folumn was 40℃ and the flow rate was 1 mL/min. The column eluate was monitored by fluorescence detection(excitatin: 280 nm; emission: 515 nm). The recovery rate of three polyamines, putrescine(put), spermindine(spd), spermine(spm) were 98.7%, 99.2% and 97.8%, respectively. All the relative coefficients were above 0.99. The analysis can be finished in 16 min. Therefore, it is a simple, rapid and sensitive method that can be helpful in determining polyamines in insects and other biological tissues and body.

Key words insect, polyamines, high-performance liquid chromatographic(HPLC), dansyl chloride, fluorescence detection

摘 要 建立丹磺酰氯柱前衍生 HPLC 快速测定昆虫体内多胺含量的方法。以 C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为固定相, 甲醇和水为流动相, 梯度洗脱, 柱温 40℃, 流速 1 mL/min, 荧光检测波长: 激发波长(Ex): 280 nm, 发射波长(Em): 515 nm, 测得腐胺(put)、亚精胺(spd)和精胺(spm)三者回收率分别为 98.7%, 99.2%和 97.8%, 回归方程线性良好(r 值均大于 0.99), 分析时间为 16 min。该法简洁、快速、灵敏度高、重现性好, 可有效分析昆虫及其他生物样品中微量多胺的含量。

关键词 昆虫, 多胺, 高效液相色谱, 丹磺酰氯, 荧光检测

多胺是生物体内普遍存在的具有生物活性的一类低分子量的含氮碱类[1], 是精氨酸(Arg)代谢过程中产生的一类低分子生物胺类[2,3], 主要有腐胺(putrescine, put)、亚精胺(spermidine, spd)与精胺(spermine, spm)等。多胺之所以受到广泛的关注是由于它对生物大分子的合成、细胞的生长、分化及蛋白质的生物合成有重要的调节作用[4,5]。国外的一些研究表明, 这些普遍存在的多胺对昆虫具有多效性的生理功能, 如对昆虫的生长变态[6]、胚胎发育[7]、行为[8]、卵黄发生[9]以及激素代谢[10]等都有影响。通过外源多胺对小菜蛾行为影响的研究发现, 多胺可调节昆虫的行为; 成虫补充多胺后, 影响其产卵量(未发表资料), 这些结果都表明具有生理活性的多胺对昆虫的生长具有重要意义。由于昆虫生理过程及多胺自身代谢的复杂性, 多胺对昆虫生理精确的调节机理和含量变化还不清楚, 因此如何快速检测昆虫体内的多胺越来越受到人们的重视。

多胺属脂肪族直链胺类, 以前主要用氨基

* 国家自然科学基金(30571505); 武汉市晨光计划资助(20055003059-23)。

** 通讯作者, Email: mqwang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2005-12-02, 修回日期: 2006-01-16, 2006-06-12 再修回

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

酸分析仪、纸电泳和荧光比色等方法测定[11]，这几种检测方法样品回收率低，检测灵敏度也不高。自从 Samejima 等 1976 年第一次用 HPLC 检测多胺以来[12]，许多检测多胺的离子交换色谱法和反相液相色谱法被报道。多年实验证明，对于多胺的检测，HPLC 法是最迅速最灵敏的。虽然 HPLC 法已经成为较为成熟的检测生物体内多胺的方法，然而在许多细节方面，如反应时间、样品的保存及分离条件的进一步优化等，尤其是对昆虫体内及组织中微量多胺的检测还有很多工作要做。本文介绍了改进后的快速、灵敏的 HPLC 测定昆虫体内多胺的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

液相色谱仪：美国 VARIAN ProStar 系列，230 泵，363/800 荧光检测器，VARIAN 色谱工作软件。精胺(spm)、亚精胺(spd)、腐胺(put)均为 Sigma 产品，纯度＞99%。甲醇为色谱纯，水为超纯水，过滤超声后使用。

1.2 昆虫样品处理

取桑天牛 *Apriona germari* (Hope)卵，加入 500 μL 预冷的体积分数为 5%的高氯酸(V/V)冰浴研磨，冰浴浸提 1 h 后离心(15 000 g，30 min，4 ℃)。取 200 μL 上清液于 1.5 mL 塑料离心管中，加入 400 μL 丹磺酰氯(5 mg/mL 丙酮溶液)、200 μL 饱和 Na_2CO_3 涡旋混匀后暗反应过夜，期间摇动几次。加入 100 μL 脯氨酸(每 mL 蒸馏水溶解 100 μg)终止反应，用 1 mL 苯分 2 次萃取，合并萃取液，真空干燥。60%的甲醇涡旋溶解后 12 000 r/min 离心 5 min 进样。

1.3 定性分析

将 3 种多胺(spm、spd、put)分别配成 1×10^{-4} g/mL 以及内含 3 种多胺均为 1×10^{-4} g/mL 的混合液，各取 200 μL 按上述方法衍生反应后。各取 50 μL 萃取相备用，其余干燥后用体积分数的 60%的甲醇涡旋溶解后 12 000 r/min 离心 5 min 进样。

硅胶板层析：将上面萃取相各取 20 μL 点硅胶 G 板，展开剂：氯仿：三乙胺(V/V)＝5：1，用凝胶成像系统拍照分析，在紫外灯下用铅笔标记出被分离的多胺部位，测量计算迁移率 *Rf* 值。

1.4 标准曲线制作

将 3 种多胺(spm、spd、put)配成内含 3 种多胺浓度均为 1×10^{-7}，2×10^{-7}，5×10^{-7}，1×10^{-6}，2×10^{-6} g/mL 的混合液，各取 200 μL 按上述方法衍生反应后进样，每个浓度重复 3 次，以面积对进样量作曲线，计算曲线方程和相关性系数。

1.5 回收实验

将 3 种多胺(spm、spd、put)配成内含 3 种多胺浓度均为 4×10^{-7} g/mL 的混合液，取 200 μL 按上述方法衍生反应后进样。按下面的公式计算回收率。

$$回收率(\%)=\frac{测定量}{标曲求得量}\times100。$$

1.6 色谱条件

色谱柱：C18 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)。流动相：甲醇：水(V/V)，采用梯度洗脱 1～20 min 由 60%甲醇上升到 80%甲醇，流速 1 mL/min 柱温 30 ℃。荧光检测波长：激发波长(Ex)为 280 nm，发射波长(Em)为 515 nm。

1.7 分析方法

利用 VARIAN 色谱工作软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 定性分析

2.1.1 硅胶板薄层层析：硅胶板薄层层析结果见图 1。由图 1 可以看出衍生化后精胺的迁移最快，亚精胺次之，腐胺最慢，经计算三者的迁移率分别为 0.950，0.756，0.466；在同样浓度的情况下，精胺最暗，亚精胺次之，腐胺最亮。在天牛卵内可分离到 4 条主要谱带，但斑点较暗。

2.1.2 多胺的 HPLC 分离：多胺的 HPLC 分离结果见图 2(a，b，c，d)。由图 2a 可以看出，在该洗脱浓度下(1～4 min：60%甲醇；4～20 min：80%甲醇)，3 种多胺(put、spd、spm)混合处理后在 14 min 内能很好的分离，保留时间分别为 6.121，9.809，13.002 min，而且 3 种多胺(put、

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

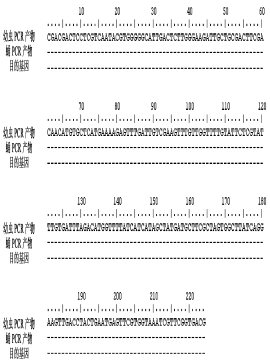


图 1 多胺的薄层层析图

spd、spm)单个处理后保留时间能与之对应，见图 2(b, c, d)保留时间分别为 6.149, 9.851, 12.900 min。

2.2 昆虫体内多胺的色谱图

昆虫体内多胺色谱图见图 3。图 3a 是在 1 ~4 min: 60%甲醇, 4 ~20 min: 80%甲醇梯度下昆虫体内多胺色谱图，在此条件下，腐胺和一些杂质没有完全分离，为此，我们将梯度调为 1 ~ 6 min: 60%甲醇; 6 ~20 min: 80%甲醇，结果见图 3b，不仅 3 种多胺之间能很好的分离，而且 3 种多胺和杂质之间也能很好的分离。图 3c 为多胺标准品在梯度调为 1 ~6 min: 60%甲醇; 6 ~20 min: 80%甲醇下的色谱图，从图 3(b、c)可以看出在此条件下，昆虫体内多胺能很好的分离。在此条件下，重复进样 3 次，测得 3 种多胺 put、spd、spm 的保留时间见表 1。

表 1 三种多胺的保留时间

胺(Amine)	保留时间(min)
腐胺(put)	10.535 4±0.010 7
亚精胺(spd)	12.383 2±0.020 6
精胺(spm)	15.245 6±0.114 3

2.3 标准曲线

标准曲线见图 4。由于昆虫体内的多胺含量很低，在实验中选择了较低浓度的多胺进样，结果表明，put、spd 和 spm 在进样量为 0.1 ~10 ng 范围内线性关系良好见(见图 3)，3 者的线性方程分别为 $y=1.220\,5x-0.065\,7$, $y=1.967\,3x-0.139\,2$, $y=2.808\,9x-0.007\,5$ 三者 r 值分别为 0.999, 0.999, 0.997。最低检测量为 10^{-3} ng。

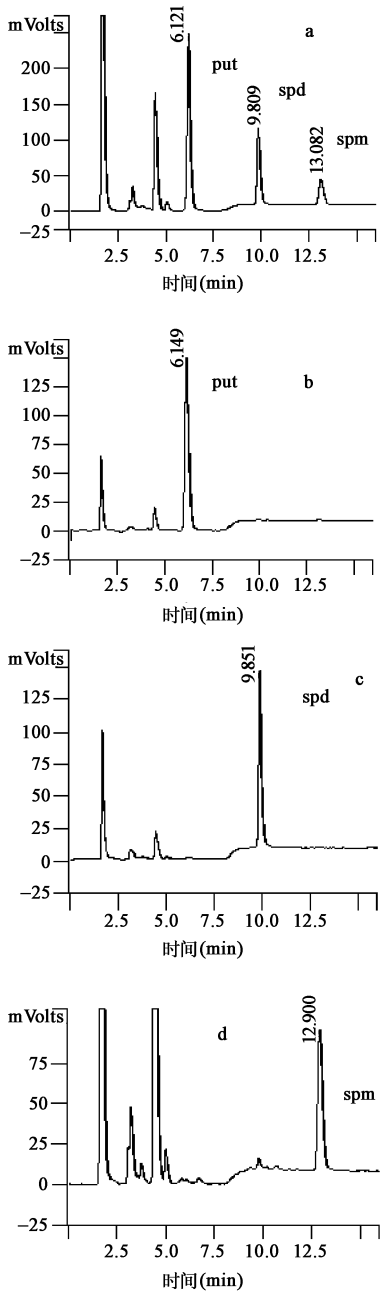
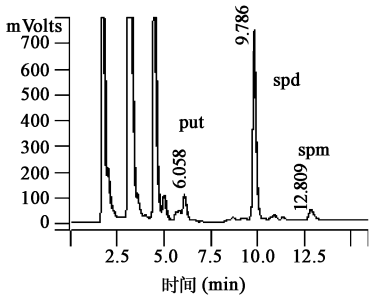


图 2 多胺标准品的色谱图

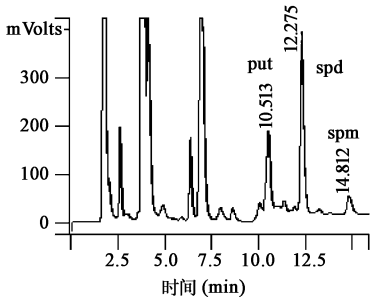
2.4 回收率

经计算，put 的回收率为 98.7%，spd 的回收率为 99.2%，spm 的回收率为 97.8%。

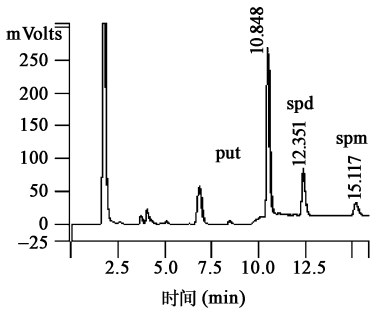
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n



a.桑天牛卵中多胺色谱图1



b.桑天牛卵中多胺色谱图 2



c.多胺标准品的色谱图

图 3　昆虫体内多胺色谱图

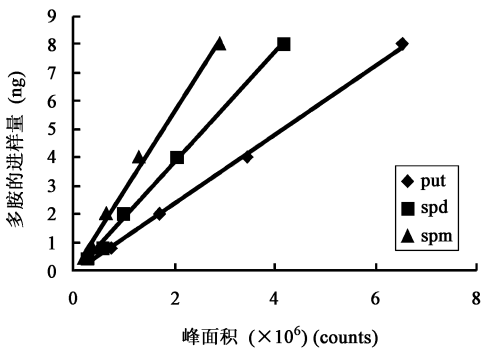


图 4　HPLC 检测丹磺酰化多胺的标准曲线

3　讨论

多胺是一类具有生物活性的低分子量含氮碱类，广泛存在于生物体内，目前昆虫中主要研究的多胺为 put、spd、spm[13]。有研究表明多胺对昆虫具有多种生理功能，为此如何快速检测昆虫体内和昆虫组织中的多胺含量越来越受到人们的重视。到目前为止，已经报道的有关测定多胺的方法主要有薄层层析－荧光分光光度计比色法，气相色谱法(GC)，气质联用(GC-MS)及高效液相色谱法等。其中用 GC 测定多胺，虽然可以检测到 0.02～0.1 pmol，但其最大缺陷是分离效果较差，目前已基本不用[14]；1973 年 Walle 将 GC-MS 引用到多胺的分离检测中，大大提高了多胺的分离效果及检测灵敏度[15]，但此法较为复杂，仪器要求较高，因此在研究中也不常用。而 TLC－荧光分光光度计比色法则是一种较为简洁的方法，在本研究中，当多胺经丹磺酰氯衍生后，利用硅胶 G 板能得到很好的分离效果，但由于昆虫体内的多胺含量较低，在层析板上的斑点较暗，若将此斑点刮下进行荧光比色分析，势必降低其检测的灵敏度，因此 TLC 法常用于多胺的定性分析及生物组织中多胺含量较高时，如植物组织中多胺的分析[16, 17]。自 Samejima 等首次将 HPLC 引入多胺的分离测定以来[12]，利用 HPLC 来分析生物组织中多胺的方法得到了长远的发展。目前用于多胺衍生反应的试剂主要有苯甲酰氯[18]、丹磺酰氯[19]、甲基磺酰氯[20]等，其中以丹磺酰氯灵敏度最高，可以检测到 0.01～1 pmol，苯甲酰氯衍生法较为简单，但其灵敏度较低，为 0.1 nmol[21]。为此，在本研究中，我们选用丹磺酰氯为多胺的衍生试剂。

由于丹磺酰氯具有强荧光，因此对于丹磺酰氯衍生化多胺一般使用荧光检测，检测波长一般为 Ex：340 ～ 380 nm，Em：490 ～ 515 nm[22, 23]，也有人将 Ex 设为 252 nm[24] 和 430 nm[25]。经反复试验比较，当将荧光检测波长设为 Ex：280 nm、Em：515 nm 时，检测的样品峰最高，且无拖尾情况，因此我们确定最佳荧光检测

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

波长为 Ex:280 nm、Em:515 nm。

根据丹磺酰氯衍生化多胺的极性,一般是用乙腈:水[24]和甲醇:水作为流动相,本研究利用较为常用的甲醇:水作为流动相。流动相的浓度对样品的分离效果影响很大,从目前的报道看,有的研究采取 1~20 min:50%~80%甲醇;20~22 min:80%甲醇;22~30 min:80%~50%甲醇[23],有的研究采取 0~23 min:60%~95%甲醇[26],但从这些报道的图谱可以看出,在这些条件下,样品中的多胺并未完全分离。经过反复实验比较发现,无论采取何种浓度的流动相,如不采用梯度洗脱,则分离时间长,且峰较宽,如采用梯度洗脱(1~4 min:60%甲醇;5~20 min:80%甲醇)后,分离时间大大减少,仅为 14 min,且具有很好的分离效果,峰形变窄,但在此条件下,桑天牛卵中腐胺和杂质不能很好的分离,将梯度改为 1~6 min:60%甲醇;6~20 min:80%甲醇后,不仅 3 种多胺能很好的分离,且与杂质也能很好的分离,峰形也很窄,没有拖尾情况,故将此梯度定为最佳分离浓度,分析时间为 16 min。

对于昆虫体内多胺样品的制备,此法简便稳定,仅需高氯酸除蛋白即可,衍生化后,样品稳定便于保存。经过反复实验证明,衍生时间为 10 h 为宜,暗反应。样品制备后能长时间保存。此法简便易行,能很好地分离检测昆虫体内和组织中的微量多胺,为更好的研究多胺对昆虫的影响提供了基础。

参 考 文 献

1 Morgan D. M. L., Wallace H. M. *Biochem. Soc. Trans.*, 1994, **22**(4): 845~846

2 Seiler N. In: Carter C. (eds), The Neuro Pharmacology of Polyamines. London Academic Press, 1994. 1~36

3 Tirard A., Renucci M., Provost E., Khlat J., Clement J. L. *Chemi. Senses*, 2002, **27**(5): 417~423.

4 Williams A. H. G., Canellakis Z. N. *Perspect Biol. Med.*, 1979, **22**(3): 421~53

5 Russel D. H. *Pharmacology*, 1980, **20**(2): 117~129.

6 Birnbaum M. J., Whelan T. M., Gilbert L. I. *Insect Biochem.*, 1988, **18**(8): 853~859.

7 Callerts P., Geuns J., DeLoof A. *J. Insect Physiol.*, 1992, **38**(10): 751~758.

8 Cayre M., Strambi C., Charpin P., Augier R., Renucci M., Strambi A. *Behav Neurosci.*, 1996, **110**(5): 1 117~1 125.

9 Cayre M., Tirara A., Charpin P., Augier R., Strambi C., Strambi A. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1993, **24**(4): 219~228.

10 Birnbaum M. J., Gilbert L. I. *J. Comp. Physiol.* [B], 1990, **160**(2): 145~151.

11 Nikolaus S. In: Tabor H., Talbor C. W. (eds.), Polyamines. New York: Academic Press, 1983. 3~9.

12 Samejima K., Kawase M., Sakamoto S., Okada M., Endo Y. *Anal. Biochem.*, 1976, **76**(2): 392~406.

13 Hamana K., Niitsu M., Samejima K., Matsuzaki S. *J Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, **100B**(2): 399~402.

14 Brooks J. B, Moore W. E. *J. Microbiol.*, 1969, **15**(12): 1 433

15 Walle T. Polyamines in Normal and Neoplastic Growth. New York Raven Press, 1973. 355

16 Fleisher J. H., Russell D. H. *J. Microbiol.*, 1975, **110**(2): 335~340.

17 Wettlaufer S. H., Weinstein L. H. *J. Chromatogr.*, 1988, **441**(2): 361~366

18 Morgan D. M. *Methods Mol Biol.*, 1998, **79**: 111~118.

19 Koski P., Helander I. M., Sarvas M., Vaara M. *Anal. Biochem.*, 1987, **164**: 261.

20 Sugiura T., Hayashi T., Kawai S., Ono T. *J. Chromatogr.*, 1975, **110**(2): 385~388

21 崔同. 河北农业大学学报, 1994, **17**(Sup.): 219~223.

22 Hugo J. P. W., Jan M. C. G. *Plant Physiol.*, 1987, **83**: 232~234.

23 Isabel E. M., Estrella L. M. *Plant Physiol.*, 1988, **87**: 519~522.

24 Molins-Legua C., Campins-Falco P., Sevillano C. A., Pedron-Pons M. *Analyst*, 1999, **124**(4): 477~482.

25 王淳本, 柴锡禄, 雷景迈, 何善述. 同济医科大学学报. 1995, **24**(2): 94~97.

26 Young C. C., Chen L. F. *Plant and Soil*, 1997, **195**(3): 143~149.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n