

文章编号:1005-4014(2005)02-0115-04

丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生试剂衍生生化条件的研究*

董伟峰¹, 李宪臻¹, 林维宣²

(1. 大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034;

2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001)

关键词: 丹磺酰氯; 生物胺; 衍生化

摘要: 报道了荧光衍生试剂丹磺酰氯同多种生物胺进行衍生生化反应条件的实验研究。在丹磺酰氯浓度为 9 mg/mL、反应温度为 60、反应时间为 15 min、缓冲体系的 pH 值为 11.5 时, 衍生效果最佳。衍生试剂和衍生物的稳定性分别可达一个月和半年以上, 即可以和伯胺反应又可以和仲胺反应。

中图分类号: O657.72; O623.738 **文献标识码:** A

Study on derivatising condition of biogenic amines with dansyl chloride as pre-column derivatising agent

DONG Wei-feng¹, LI Xian-zhen¹, LIN Wei-xuan²

(1. School of Biological & Foodstuff Engineering, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China;

2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

Key words: dansyl chloride; biogenic amines; derivation

Abstract: This paper reports the experimental investigation on the derivatising condition of biogenic amines with dansyl chloride as fluorescent derivation agent. The most suitable derivatising condition are determined as follows: concentration of dansyl chloride, 9 mg/mL; temperature of reaction, 60, time of reaction, 15 min; and pH of buffer, 11.5. The Dns-Cl derivation agent is not decomposed within a month and the dansyl derivative, within six months. The Dns-Cl derivational agent may derivative with primary amine and secondary amine.

丹磺酰氯原本是检测一、二级氨基酸的著名荧光衍生试剂, 生成的氨基酸衍生物可用反相高效液相色谱进行分析^[1]。近些年来生物胺尤其是多胺的研究倍受学术界关注。由于生物胺同氨基酸类似, 自身都没有荧光和紫外的发色基团, 因此都要经过衍生化才能在色谱仪器下检测出来。常用的衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、苯甲酰氯、荧光胺(FA)、芴酰氯(FMOC-Cl)、对酞内酰胺苯磺酰氯(Phisy-Cl)、对酞内酰胺基苯甲酰氯(PIB-Cl)等。丹磺酰氯(Dns-Cl)作为液相色谱柱前衍生试剂具有衍生操作简单、衍生物稳定性好、可定量完成磺酰化反应、有较强的荧光和紫外吸收、灵敏度高、反应范围宽、基体干扰不明显等优点^[2],

所以成为了生物胺高效液相色谱检测中应用最多的衍生试剂。本文以丹磺酰氯作为生物胺的柱前衍生试剂, 荧光检测器为检测手段, 在反相高效液相色谱上对 7 种重要的生物胺进行分析。研究了丹磺酰氯作为衍生试剂使用时的衍生条件: 衍生剂的浓度、缓冲溶液的 pH 值、衍生温度及时间等因素对衍生反应的影响, 并得到最佳的衍生条件; 同时还考察了衍生剂和衍生物的稳定性及衍生剂的灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters1525 高效液相色谱仪, 2475 荧光检测

* 收稿日期: 2004-03-24

作者简介: 董伟峰(1978~), 男, 硕士研究生。

器,717 自动进样器,柱温箱,氮气吹干仪,固相萃取装置,金坛富华 HH-2 型数显恒温水浴超声锅。酪胺、色胺、精胺、精脘、腐胺,ACROS 公司生产;组胺、尸胺,Fluka 公司生产(纯度在 97% 以上);丹磺酰氯,ALDRICH 公司生产(纯度在 99% 以上);乙腈、乙酸乙酯,Fisher 公司生产(色谱纯);碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钠(分析纯);所有用水皆为 mini-Q synthesis 制备的高纯水(18.2 M Ω); ODS-C18 固相萃取净化柱 500 mg/3 mL,Agilent 公司生产。混标储备液:先配 7 个生物胺的 1 mg/mL 浓度的标准溶液,再从 1 mg/mL 7 个单标样的储备液中取色胺 5 mL、酪胺 8 mL、组胺 25 mL,其余各取 1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中定容至刻度。

1.2 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3 柱,5 μ m,4.6 mm \times 250 mm;柱温:25 $^{\circ}$ C;流动相:乙腈-水;流速:1 mL/min 梯度洗脱(乙腈在 20 min 内从 65% 升到 100%;水在 20 min 内从 35% 降到到 0%);进样量:10 μ L;荧光检测器波长:Ex = 340 nm,Em = 515 nm。在上述条件下 20 min 内完成 7 种生物胺的分析。

1.3 衍生化

用微量取液枪先后吸取 1 mL 生物胺混合标准溶液、0.5 mL 衍生剂、1 mL pH = 11.5 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液于 50 mL 塑料离心管中,在涡流混合器上混匀 1 min 后置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中衍生 15 min。衍生后取出冷却至室温等待萃取。

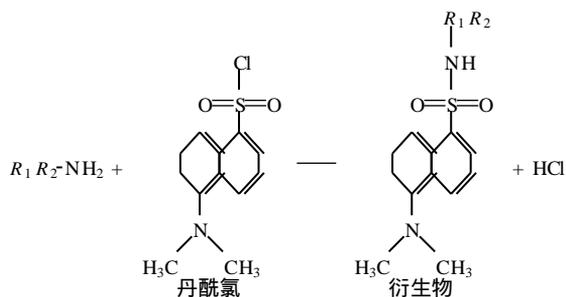
1.4 衍生物的萃取

在衍生完成后的离心管中加入 3 mL 乙酸乙酯,涡流混合器上混匀 1 min 后于 4 000 r/min 离心 5 min,取出,收集上层含有生物胺衍生物的有机相(乙酸乙酯),下层水相再加入 3 mL 乙酸乙酯重复萃取 2 次。合并 3 次萃取的有机相于 40 $^{\circ}$ C 水浴条件下氮气吹干。用微量取液枪吸取 1 mL 乙腈溶解残留物,进样 10 μ L 进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 柱前衍生条件选择

生物胺即没有荧光发色基团也没有紫外发色基团,但是丹磺酰氯可以同伯胺或仲胺基上的活泼氢反应,脱掉一分子的 HCl 生成具有荧光和紫外光的衍生物,反应式如下:



在这一反应过程中起决定性作用的条件有 4 个:衍生剂的浓度、缓冲溶液 pH 值、衍生温度和衍生时间^[3]。

2.1.1 衍生剂的浓度

为了找到 Dns-Cl 的合适浓度以使衍生反应进行完全,测定了当 c(Dns-Cl) 从 1 mg/mL ~ 14 mg/mL 时对生物胺衍生效果的影响,每组做 3 次平行实验取 3 次测量的平均值。图 1 表示了生物胺衍生物的生成量随衍生剂浓度的改变而变化的情况。

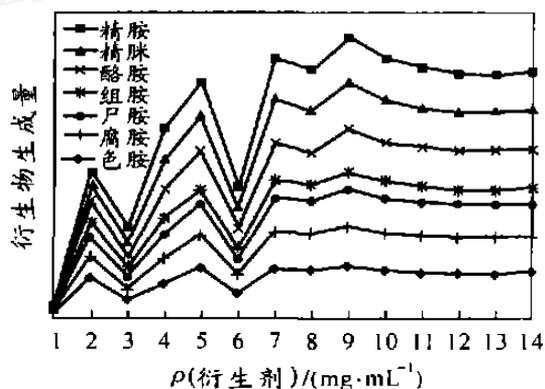


图 1 不同浓度的衍生剂下生物胺衍生物的生成量

从图 1 中可以看出,衍生剂浓度在 9 mg/mL 时,7 种生物胺衍生效果最好,丹磺酰氯衍生物的生成量最多。大于 9 mg/mL 浓度时生物胺衍生物的生成量趋于平衡无明显变化,只会造成试剂的浪费。

2.1.2 buffer 的 pH 值

生物胺和衍生剂要在碱性条件下才能发生衍生化反应,选择一个合适 pH 的 buffer 至关重要。本文选取了碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液体系,配制了不同 pH 的缓冲溶液进行实验研究,实验结果如图 2 所示。由图 2 可以得出色胺、腐胺、尸胺在 buffer 的 pH = 9 时有最大生成量,之后随着 pH 值的增加而略减少而当 pH 值增加到 11.5 时,生物胺的生成量与 pH = 9.5 时基本相当;而其他 4 种生物胺都是在 pH = 11.5 时有最大生成量。因

此,综合考虑生物胺衍生反应中 buffer 的最适 pH 为 11.5。

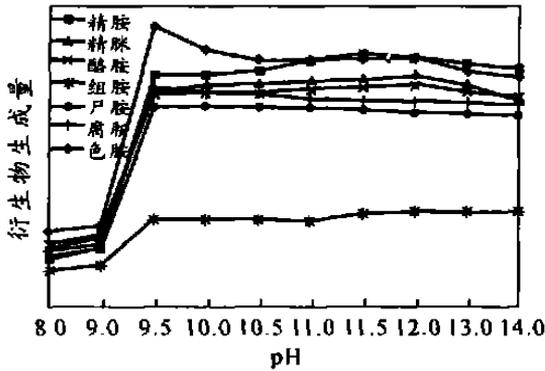


图2 在不同pH值的buffer下各种生物胺的生成量

2.1.3 衍生温度与时间

关于生物胺衍生的衍生温度与时间问题,以往的研究比较多,但结论不统一,作者做了大量实验统计如表1。

表1 衍生温度与对应的时间

/	t/min	/	t/min
室温	隔夜	37	60
40	30	40	60
50	30	60	12
60	15	60	30
65	10	65	30
70	10	70	15
75	10	85	10
90	5	95	5

作者按照以上衍生温度和时间条件对7种生物胺进行衍生都取得了成功,不同条件下7种生物胺的生成量同最稳定的室温隔夜条件下的7种生物胺生成量相比结果相似。但从省时节能方面来考虑,60℃水浴15min是比较合适的衍生条件,可以满足日常的一般检验。

2.2 衍生剂与衍生物的稳定性

选取比较稳定的尸胺标准液(浓度为10μg/mL)与不同日期配制的丹磺酰氯衍生剂(于-20℃冰箱冷冻室避光保存)进行衍生化反应,然后上机检测。

由图3可以看出丹磺酰氯衍生剂可以在-20℃冰箱冷冻室避光保存1个月。

图4是考察生物胺衍生物稳定性的实验图,由图4中可以看出生物胺衍生物在冰箱-20℃下避光保存条件下前6个月内无太大变化,6个月逐渐分解,尤其是色胺和精胺分解迅速。

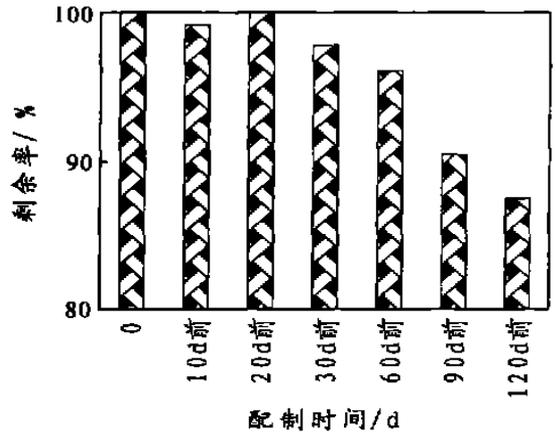


图3 衍生剂的稳定性与时间的关系

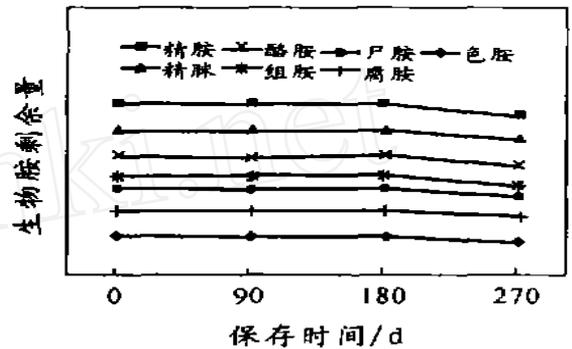


图4 生物胺衍生物的稳定性

2.3 衍生剂的灵敏度

采用逐级稀释法进行实测,尸胺、腐胺、精脞、精胺的浓度稀释到 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$;色胺的浓度稀释到 $5 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$;酪胺的浓度稀释到 $8 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$;组胺的浓度稀释到 $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$,混标衍生后经固相萃取后上机检测,色谱图见图5。7种生物胺的检测低限分别为:色胺 $1.13 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$,腐胺 $3.73 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$,尸胺 $3.32 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$,组胺 $2.57 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$ 。

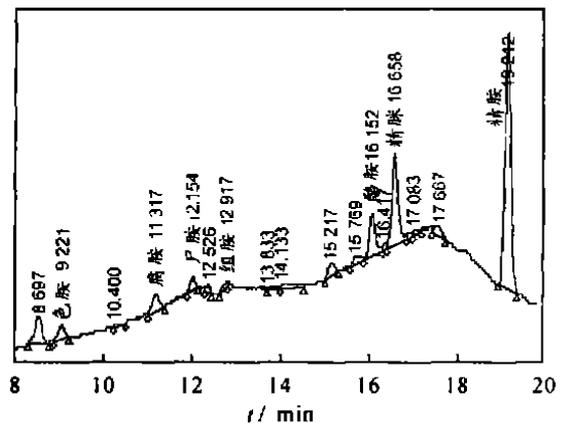


图5 混标储备液稀释至 1×10^{-4} 倍的色谱图

10^{-3} mg/L, 酪胺 4.45×10^{-4} mg/L, 精脞 2.65×10^{-4} mg/L, 精胺 1.29×10^{-4} mg/L。

3 结 论

本文对优良的生物胺衍生试剂-丹磺酰氯在其与生物胺的衍生反应中几个重要因素进行了研究。从而优化出最佳衍生反应条件:丹磺酰氯浓度为 9 mg/mL、反应温度为 60、反应时间为 15 min、缓冲体系的 pH 为 11.5。衍生试剂和衍生物于 -20 冰箱冷冻室避光保存的条件下,稳定性分别可达一个月和半年以上。

参考文献:

[1] NEGRO A, GARBISA S, GOTTEL, *et al.* The use of

reverse-phase high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with dansyl chloride for quantitation of specific amino acids in collagen and elastin[J]. *Anal Chem*, 1987, 160: 39 - 42.

[2] LEGUA C M, FALCO P C, CABEZA A S, *et al.* Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC[J]. *Analyst*, 1999, 124: 477 - 501.

[3] PALEOLOGOS E K, KONTOMINAS M G. On-line SPE with surfactant accelerated on-column derivatization and MLC separation as a tool for the determination of biogenic amines in various food substrates[J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 1 289 - 1 294.

科技论文的规范表达

摘要的写作

1 摘要的定义

以提供文献内容为目的,不加评论和补充解释,简明、确切地记述文献重要内容的短文。

2 摘要的要素

目的——研究、研制、调查等的前提、目的和任务,所涉及的主题范围。

方法——所用的原理、理论、条件、对象、材料、工艺、结构、手段、装备、程序等。

结果——试验的、研究的结果,数据,被确定的关系,观察结果,得到的效果,性能等。

结论——结果的分析、研究、比较、评价、应用,提出的课题、假设、启发、建议、预测等。

3 摘要的详简度

篇幅以 200 ~ 300 字为宜。

4 编写摘要的注意事项

对论文的内容不加注释和评论。

要着重反映新内容和作者特别强调的观点。

要排除在本学科领域已成常识的内容。

不得简单地重复题名中已有的信息。

摘要应具有独立性和自含性,应是一篇完整的短文。一般不分段,不用图表、化学公式和非公认符号或术语,也不宜引用图、表、公式和参考文献的序号。

要用第三人称的写法。应采用“对……进行了研究”、“报告了……现状”、“进行了……调查”等记述方法标明一次文献的性质和文献主题,不必使用“本文”、“作者”等为主语。

要采用规范化的名词和术语(包括地名、机构名和人名)。

5 范例

例 1 白薯线虫的防治

[目的]由于根节线虫(nematodes)危害,使密西西比的某些种植者难以生产适应市场级别需要的白薯。[方法]蔬菜收获分公司实验站于 1967 年用杀线虫剂(包括熏剂)进行了站外试验,在大批出现线虫的三或四排重复和任意的地块上使用了已知的和试验的杀线虫剂。[结果]在处理的垄行中,商品熏剂 vorlex、DOW W-85 和 DD 大大增加了收获量和质量。应在播种前 14 ~ 30 d 施 vorlex 或 DOW W-85 0.01704 L/m²(或施 DD 0.0163 ~ 0.068 L/m²)于行间深 20.32 ~ 25.40 cm 处,撒播熏杀(fumigation)也是有效的,但要求较高的熏剂水平。[结论]认为在试验的固体杀线虫剂中,Bayer68 138 和 Dasanit 是有希望的,但只进行单季大田试验是不够的,还需要更多的信息。