

技术交流 ·

柱前衍生化高效液相色谱法测定人唾液中腐胺和精胺的含量

王 佩, 刘晓昱

(杭州市中医院 药物实验室, 浙江 杭州 310007)

摘要:目的 建立柱前衍生化高效液相色谱法同时测定人唾液中腐胺和精胺含量的方法。方法 唾液经纯化、丹酰氯衍生化后用苯提取,以 Hypersil BDS CN 为正相色谱柱,丙酮-氯仿(2:98)为流动相,流速 1 mL/min 进行测定,检测波长为 425 nm。结果 腐胺和精胺均在 50~1 000 nmol/mL 范围内线性关系良好, r 分别为 0.999 1 和 0.999 2,此法回收率分别为 94.65% 和 90.48%,RSD 分别为 1.6% 和 2.1%。结论 此法灵敏、稳定,重现性好,可检测人唾液中多胺含量。

关键词: 多胺; 腐胺; 精胺; 柱前衍生化; 高效液相色谱法

中图分类号: TQ460.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)04-0268-03

Determination of putrescine and spermine content in human saliva by HPLC with pre-column derivation

WANG Pei, LIU Xiao-Yu

(Department of Pharmaceutical Research, Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China)

Abstract: **Purpose** To develop a high-performance liquid chromatographic method for the determination of polyamine in human saliva. **Methods** The derivation with dansyl chloride was followed by normal-phase chromatography with a mobile phase of acetone / chloroform (2:98) at a flow rate of 1 mL/min and with the detection wavelength set at 425nm. **Results** The standard curve was linear over the concentration range of 50-1 000 nmol/mL for putrescine and spermine with correlation coefficient 0.999 1 and 0.999 2. The recoveries were 94.65% with RSD 1.6% and 90.48% with RSD 2.1% for putrescine and spermine, respectively. **Conclusion** The present study provided a sensitive, accurate and reproducible method for the determination of polyamine levels in human saliva.

Key words: polyamine; putrescine; spermine; pre-column derivation; HPLC

腐胺 (Putrescine, Put)、亚精胺 (Spermidine, Spd) 及精胺 (Spermine, Spm) 属于多胺 (Polyamines), 为内源性脂肪族直链多胺类, 广泛存在于各个器官和组织中。其中 Put, Spm 在体内代谢改变与组织的生长、损伤组织的修复和再生, 以及炎症的病理过程等, 有密切关系^[1]。柱前衍生化高效液相色谱法 (HPLC) 已广泛用于氨基酸及其衍生物的测定^[2]。本文采用柱前衍生化 HPLC 测定人唾液中 Put 和 Spm 的水平, 并初步探讨其临床意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国); 高速冷冻

离心机 (美国贝克曼公司)。

1-二甲氨基萘-5-磺酰氯 (DNSCl)、Put (纯度约 98%)、Spm (纯度约 97%), 均为 Sigma 公司产品; 甘氨酸等其它试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS CN 柱 (250 mm × 4.0 mm, 5 μm); 流动相: 丙酮-氯仿 (2:98); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 425 nm, 柱温: 25℃, 进样体积: 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

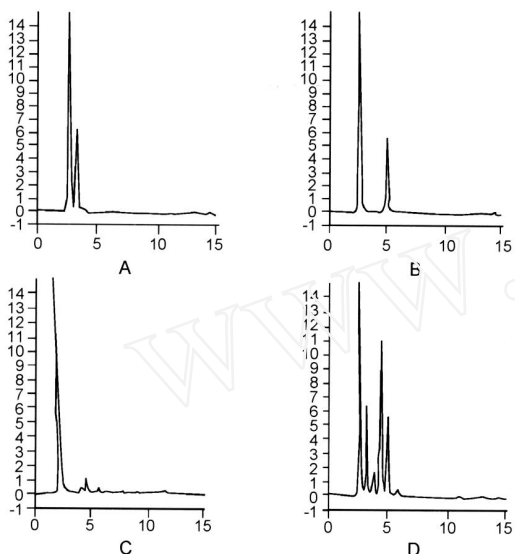
精密称取 Put 及 Spm 溶于 2% 过氯酸溶液, 分别制成每 1 mL 中含 Put 50 nmol, Spm 50 nmol 的对照品溶液。

收稿日期: 2007-11-22

作者简介: 王佩 (1973-), 女, 副主任药师, 硕士。

2.3 衍生物的制备

精密量取对照品溶液 1 mL,加固体碳酸钠 30 mg 和 DNSCI 试液 (DNSCI 80 mg 溶于丙酮 50 mL) 1 mL,40 反应 30 min,加 1%甘氨酸水溶液 0.5 mL,放置 30 min,最后用等体积苯提取,苯层进行高效液相色谱分离并定量。Put 的保留时间约 4.9 min,Spm 约 3.1 min,唾液中杂质对 Put、Spm 测定基本无干扰,见图 1。



A. 精胺对照; B. 腐胺对照品; C. 人唾液; D. 人唾液加入腐胺和精胺对照品

A. Spermine reference substance; B. Putrescine reference substance; C. Human saliva; D. Putrescine and spermine reference substance spiked the human saliva

图 1 人唾液衍生生物 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of derivatives of human saliva

2.4 标准曲线的制备

分别精密量取 Put、Spm 对照品溶液 1,5,10,15,20 μ L,分别按 2.3 项下的方法进行衍生化、提取,苯层进样 20 μ L。分别以 Put、Spm 浓度与峰面积进行回归得标准曲线方程,Put: $Y = 1\ 917.4 X + 7\ 898.2$, $r = 0.999\ 1$;Spm: $Y = 1\ 570 X + 6\ 589$, $r = 0.999\ 2$ 。结果表明,Put 和 Spm 在 5 ~ 1 000 nmol/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

分别精密量取 Put、Spm 对照品溶液 5,10,20 μ L,在 24 h 内按 2.3 项下的方法,重复制备测定 5 次,然后每 1 d 制备测定 1 次,连续 5 d。结果见表 1。

2.6 回收率试验

精密称取 Put、Spm 对照品适量,加 2%高氯酸处理后的正常人唾液,制成 50,40,30,20,10,5 nmol/mL 浓度。按 2.3 项下方法进行制备测定,用标准曲

线计算,并求回收率,结果见表 2。

表 1 Put 和 Spm 精密度试验 ($n = 5$)

Tab 1 Precision test of putrescine and spermine ($n = 5$)

浓度	日内 RSD/ %		日间 RSD/ %	
	Put	Spm	Put	Spm
低浓度	4.2	3.8	1.2	4.1
中浓度	1.3	3.5	2.5	4.1
高浓度	0.8	1.1	1.1	1.2

表 2 Put 和 Spm 的回收率试验

Tab 2 Recovery test of putrescine and spermine

加入量 / nmol	Put		Spm		
	测得量 / nmol	回收率 / %	加入量 / nmol	测得量 / nmol	回收率 / %
50	46.65	93.3	50	44.18	88.4
40	37.64	94.1	40	37.36	93.4
30	28.62	95.4	30	27.09	90.3
20	19.34	96.7	20	17.74	88.7
10	9.56	95.6	10	9.05	90.5
5	4.64	92.8	5	4.58	91.6
平均		94.7			90.5
RSD/ %		1.50			1.86

2.7 唾液中 Put 和 Spm 的含量测定

取不同健康人唾液经 3 000 r/min 离心后的上清液 6 mL,加 2%高氯酸溶液 6 mL,混匀,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液 1 mL,加丙酮 1 mL,混匀,3 000 r/min 离心 10 min 取上清液 1 mL,按 2.3 项下方法操作,根据色谱峰面积用标准曲线求算唾液中 Put 及 Spm 的浓度,见表 3。

表 3 正常人唾液中腐胺及精胺的含量

Tab 3 Putrescine and spermine concentration in normal human saliva

	含量/ (nmol/L)						$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	
腐胺	0.60	0.19	0.75	0.35	0.69	0.24	0.47 \pm 0.24
精胺	1.57	1.11	1.07	1.62	0.95	1.23	1.26 \pm 0.28

3 讨论

应用 HPLC 分析血液、尿液或器官组织中的多胺已有报道,经文献检索测定唾液中的多胺尚未见报道。本实验选用 Hypersil BDS CN 正相色谱分析,对唾液中多胺衍生化物进行分离和定量,Put 和 Spm 的日内和日间误差均 $< 5.0\ %^{[3-4]}$ 。由表 3 结果可见,正常人唾液中 Put 和 Spm 水平很低,并有较大的个体差异。体液中多胺含量的增加,预示着某部位组织生长迅速,或者因恶性肿瘤而促进了多胺的增加。因此测定血液或尿液中多胺的含量作为临床诊断恶性肿瘤的一个指标^[5]。人唾液中多胺水平的升

高,是否也预示着口腔或其他组织病变的标志,其临床意义尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Nishiquchi S, Kuroki T, Takeda T, et al. Effects of putrescine on *D*-galactosamine-induced acute liver failure in rats[J]. *Hepatology*, 1990, 12(2):348-353.
- [2] 张云楚,王丹丹. 柱前衍生化 HPLC 法测定 *N*(2)-*L*-丙氨酸-*L*-谷氨酰胺注射液的含量[J]. *中国生化药物杂志*, 2006, 27(6):364-366.
- [3] Lin J K, Lai C C. Chromophoric determination of putrescine, spermidine

- and spermine with dabsyl chloride by high-performance liquid chromatography and thin layer chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1982, 227(2):369-377.
- [4] Cooper J D, Muirhead D C, Taylor J E. Determination of eletriptan in plasma and saliva using automated sequential trace enrichment of dialysate and high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 21(4):787-796.
- [5] Jänne J, Alhonen-Hongisto L, Sjöpanen P, et al. Use of polyamine antimetabolites in experimental tumors and in human leukemia[J]. *Med Biol*, 1981, 59(5-6):448-457.

HPLC 法测定氨酪酸注射液中的有关物质

徐玉文¹, 李玉梅², 巩丽萍¹

(1. 山东省药品检验所, 山东 济南 250101; 2. 山东博士伦福瑞达制药有限公司, 山东 济南 250014)

摘要:目的 建立测定氨酪酸注射液中有关物质检查的 HPLC 方法。方法 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱, 流动相: 0.5% 的三乙胺溶液(用磷酸调 pH 5.5); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 205 nm。结果 各降解产物均可与氨酪酸主峰良好分离, 方法的精密度和重复性良好 ($RSD < 0.3\%$)。结论 该方法准确、简便、快速, 适用于氨酪酸注射液的质量控制。

关键词: 氨酪酸; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2008)04-0270-03

Determination of related substances in aminobutyric acid injection by HPLC

XU Yu-wen¹, LI Yu-mei², GONGLI-ping¹

(Shandong Provincial Institute for Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Shandong B & L Freda Pharm. Co., Ltd., Jinan 250014, China)

Abstract: **Purpose** To establish a HPLC method for the determination of aminobutyric acid and its related substances. **Methods** A CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with UV detection at 205 nm, and 0.5% triethylamine solution as the mobile phase (adjusted to pH 5.5 with phosphoric acid) were used. The flow rate was 0.5 mL/min, and the temperature of the column was 35 °C. **Results** An excellent separation was achieved for aminobutyric acid and its related substances; The reproducibility and precision of the method were good ($RSD < 0.3\%$). **Conclusion** This method was accurate, simple, quick and effective for testing related substances in aminobutyric acid. It was also suitable for the quality control for aminobutyric acid

Key words: aminobutyric acid; related substances; HPLC

氨酪酸 (aminobutyric acid) 又称 γ -氨酪酸、 γ -氨基丁酸。

氨基丁酸。氨酪酸能增强葡萄糖磷酸酯酶的活性, 促进脑细胞的代谢。用于脑血管障碍引起的偏瘫、记忆障碍、语言障碍、儿童智力发育迟缓等, 亦能降低血氨, 用于治疗各种类型的肝昏迷。此外也可用于

收稿日期: 2007-11-27

作者简介: 徐玉文 (1975-), 男, 山东滕州人, 硕士, Tel: 0531-81216520, Email: xuyuwen@mail.sdu.edu.cn。