

高效液相色谱法测定卤虫无节幼体中精胺含量

王新星^{1,2} 于朝磊^{1,3} 马静^{1,3} 常青^{1*}

(¹ 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 青岛科技大学化学与分子工程学院, 266042)

(³ 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘要 本研究建立了高效液相色谱法测定卤虫无节幼体中精胺含量的方法。样品经5%三氯乙酸溶液提取, 提取液采用丹磺酰氯柱前衍生, 以甲醇-水为流动相, 经C₁₈反相色谱柱分离后用紫外检测器检测。精胺的线性范围为0.1~1 000 μg/ml, 线性相关系数为0.999 9, 检出限为0.06 μg/ml。3个添加浓度(0.1、1.0和5.0 μg/ml)的平均回收率为86.3%~96.3%, 相对标准偏差皆小于5%。采用此方法对卤虫中精胺进行检测, 其精胺含量为0.077 mg/g。本方法具有分析时间短、线性范围宽、灵敏度和精密度高等优点, 适合于卤虫中精胺的检测。

关键词 精胺 卤虫 高效液相色谱

中图分类号 O657.7 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0112-06

Determination of spermine in brine shrimp by HPLC

WANG Xin-xing^{1,2} YU Chao-lei^{1,3} MA Jing^{1,3} CHANG Qing^{1*}

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, 266042)

(³ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT An analytical method was established for the determination of spermine in brine shrimp by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detector. Spermine in brine shrimp samples was extracted with a mixture of 5% trichloroacetic acid, then derived with dansyl chloride, followed by separation via the C₁₈ RP-HPLC column with methanol-water. Under the optimal conditions, spermine showed good linear relationship in the range of 0.1-1000 μg/ml and the correlation coefficient was 0.999 9. At the spiked levels of 0.1, 1.0 and 5.0 μg/ml, the average recovery was 86.3%-96.3% with the relative standard deviation less than 5%. The minimum detection concentration was 0.06 μg/ml. The overall process was successfully applied to identify and quantify spermine in brine shrimp, and the value was 0.077 mg/g. The method is sensitive, rapid and precise.

KEY WORDS Spermine Brine shrimp HPLC

国家自然科学基金项目(31101913)资助

* 通讯作者。E-mail: changqing@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85822914

收稿日期: 2012-10-24; 接受日期: 2012-11-15

作者简介: 王新星(1985-), 女, 硕士, 主要从事水产动物营养与分析化学方面的研究。E-mail: wangxx19@126.com, Tel: (0532)85822914

精胺是含有两个氨基和两个亚氨基的多胺类物质,在生物体内广泛存在,它是促进细胞生长的重要物质之一,对细胞增殖和分化起着关键性的作用,另外还具有增强肠道免疫力,促进DNA、RNA和蛋白质合成等重要的生理功能,是生物体生长和细胞代谢所必需的痕量生物活性物质(程志斌等 2010)。除体内生物合成的精胺外,食物、肠道菌群和胃肠内补液中的精胺在肠细胞中也有重要作用(Bardocz *et al.* 1995)。研究表明,饮食中包括精胺在内的多胺缺乏会导致肠黏膜发育不全(Loser *et al.* 1999)。外源性精胺可在肠腔内快速被小肠黏膜上皮细胞吸收,并使肠绒毛内的精胺抗体免疫反应增强(Uda *et al.* 2003),但过量摄入容易引发中毒现象(杨贤庆等 2012;Önal 2007)。因此,精确测定饲料或饵料中精胺含量,确保动物获取适量的精胺,对促进动物生长、增强其免疫力具有重要意义。

卤虫作为一种重要的饵料生物,在水产育苗生产中应用广泛。它易培养,繁殖速度快,休眠卵可在室内长时间保存,而且孵化简便,因此其无节幼体常被用作鱼类、甲壳类动物的开口饵料。研究卤虫无节幼体中精胺含量在促进仔稚鱼肠道发育和增强免疫反应等方面,具有重要的理论和实际应用价值。而目前,卤虫无节幼体中精胺含量鲜有文献报道。

精胺定量检测方法主要有气相色谱法(Fernandes *et al.* 2000)、薄层色谱法(Shalaby *et al.* 1994;Lapa-Guimarães *et al.* 2004)、毛细管电泳法(Liu *et al.* 2003)、电化学生物传感器法(Alonso-Lomilloa *et al.* 2010)和高效液相色谱法(Tang *et al.* 2011)等。其中,高效液相色谱(HPLC)以其分析速度快、柱效高、检测灵敏度高、定量分析准确等特点,成为了当前生物胺含量分析测定的主要手段。另外,由于精胺无紫外吸收和荧光发射特性,为提高分析检测灵敏度和分离选择性,通常将精胺衍生化。丹磺酰氯能同多种生物胺进行衍生化反应,且与其他衍生剂相比,其处理得到的衍生物具有较高的稳定性(Pineda *et al.* 2012),是常用的衍生剂之一。

本研究以丹磺酰氯为衍生试剂,采用高效液相色谱法测定了卤虫无节幼体中精胺含量,此方法灵敏度和精密度高、分析速度快、线性范围宽,可以很好地用于卤虫中精胺的定量分析。

1 材料与方法

1.1 试剂

精胺标准品(纯度 $\geq 97\%$)和丹磺酰氯(纯度 $\geq 99\%$)均购自美国Sigma公司;甲醇(德国Merck公司);丙酮为色谱纯;盐酸(HCl)、碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、乙醚、三氯乙酸和氨水均为国产分析纯试剂;水为超纯水。

1.2 主要仪器及设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配有G1322A四元泵、G1329A自动进样器、G1316A柱温箱、G1314B紫外检测器、HP化学工作站(美国Agilent公司);D130型匀浆机(德国Wiggens公司);漩涡振荡器(海门其林贝尔公司);SB-120DTN型超声波清洗器(宁波新芝公司);pH计(瑞士Mettler Toledo公司);N-EVAP型氮吹仪(美国Organomation公司);Unique-R10型超纯水机(厦门锐思捷公司);DHG-9070A型恒温干燥箱(上海精宏公司);Primo R型冷冻离心机(德国Heraeus公司);AL204型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 精胺标准溶液的配制

准确称取精胺标准品10mg于10ml容量瓶内,用0.1mol/L的HCl溶液配制成质量浓度为1.0mg/ml的精胺标准储备液,置于4℃冰箱储存,保存期限为90d。取适量标准储备液,用0.1mol/L的HCl溶液定容,配制质量浓度为0.1、1.0、5.0、10、50、100、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准工作液,用于工作曲线实验,该工作液当日新配。

1.3.2 丹磺酰氯衍生剂溶液的配制

准确称取丹磺酰氯适量,以丙酮为溶剂配制成质量浓度为10mg/ml的衍生剂标准工作液,置于4℃冰箱储存。

1.3.3 实验时间和样品提取

实验时间为2012年5~9月,样品取自山东海阳市黄海水产有限公司。将初孵的卤虫无节幼体,匀浆后,准确称取1g左右,置于10ml离心管中,加入4ml 5%三氯乙酸溶液,振荡混匀后冰浴提取60min,配平,8500r/min离心10min,取上清液置于10ml容量瓶中,连续提取两次,合并上清液,用5%三氯乙酸稀释至刻度。

1.3.4 精胺的衍生

取上述待衍生的试样溶液100 μ l,置于10ml离心管中,加600 μ l 10mg/ml的丹磺酰氯衍生溶液和pH=10的0.1mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲溶液,振荡混合2min,在70℃恒温干燥箱中避光反应30min,加入100 μ l浓氨水,振荡混匀,70℃保温10min,加入3ml乙醚,振荡1min,静置分层后,吸取出上层有机相,重复萃取两次,合并萃取液,氮气吹干,残留物用1ml甲醇溶解,振荡混匀,0.22 μ m滤膜针头滤器过滤进样。

分别移取100 μ l精胺标准系列溶液,分别置于10ml离心管中,以下步骤同试样的衍生步骤。

1.3.5 色谱条件

采用C18色谱柱(4.6 mm \times 150 mm \times 5 μ m),紫外检测波长254 nm,柱温为30℃,进样量20 μ l。流动相A为甲醇,流动相B为超纯水,梯度洗脱,流速为1.0 ml/min,梯度洗脱程序见表1。

表1 精胺衍生样品的分离洗脱梯度

Table 1 Elution program used to separate the derivative of spermine

时间 Time (min)	0	10	13	18	19	30
A(%)	70	90	100	100	70	70
B(%)	30	10	0	0	30	30

2 结果与讨论

2.1 梯度的选择

以丹磺酰氯为衍生剂,采用甲醇和水作为流动相(75:25, v:v)等度洗脱时,卤虫中精胺衍生物出峰受杂峰影响较大,无法进行准确定量。经过反复试验比较,最终选择甲醇-水体系作为流动相进行梯度程序洗脱,梯度洗脱程序见表1。图1为采用该梯度洗脱程序淋洗得到的精胺标准品和卤虫中精胺的衍生生物色谱图。由图1-a可以看出,精胺标准品衍生物出峰情况良好,峰形对称,无杂质干扰,丹磺酰氯与体系中溶液反应生成的副产物,在前5min内全部流出,因此可很好地与目标物分离。卤虫无节幼体中精胺衍生物出峰情况如图1-b所示,精胺峰与相邻杂质峰基线分离良好,峰型对称,无拖尾现象,出峰时间与标准溶液一致,且与已有文献报道的梯度洗脱程序相比,该方法可将精胺衍生物出峰时间由20~40min提前至13.5min

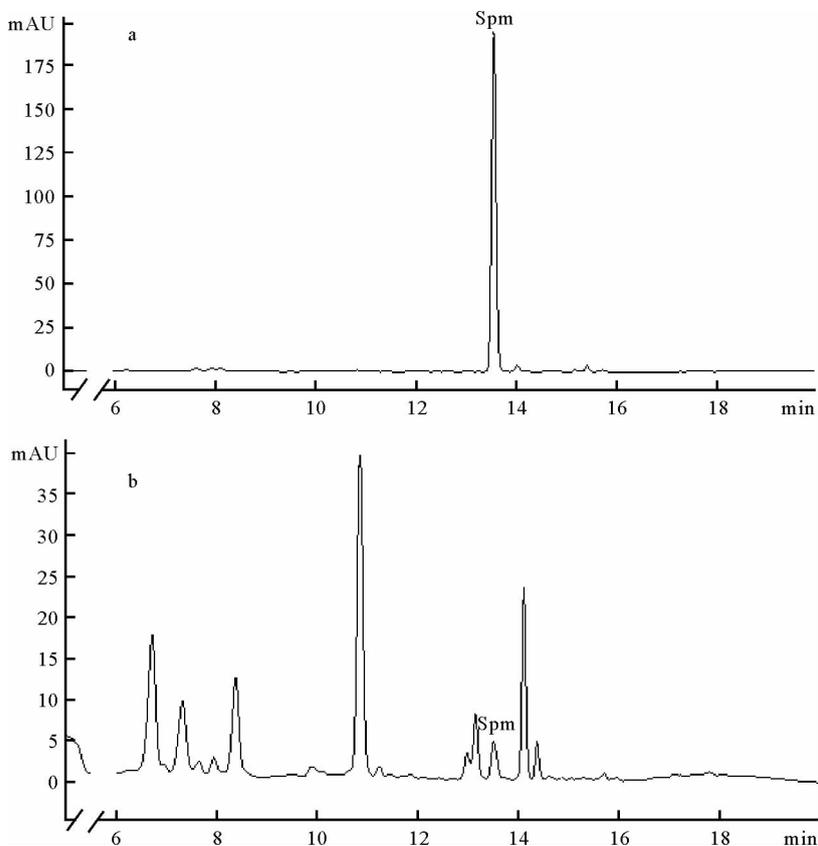


图1 精胺标准品(a)与卤虫中精胺(b)色谱

Fig. 1 Chromatograms of standard solution of spermine (a, 50 μ g/ml) and spermine in brine shrimp sample(b)

(Loukou *et al.* 2003; Romero *et al.* 2000; Saarinen *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2011), 极大地缩短了分析时间, 说明该流动相梯度选择合适。

2.2 检测波长的选择

试样分别在 220、230、240、254、260 nm 波长下进样检测。实验对比发现, 220 nm 时待测组分有最大响应值, 但峰宽较大, 峰型较差; 230nm 与 254nm 处响应值相似, 但峰型较 254nm 处稍差; 240nm 和 260nm 处响应值最小。综合响应值与峰型两个评价因素, 选择 254nm 作为检测波长, 此波长下检测响应信号较大, 峰型尖锐且受杂峰影响较小, 因此对精胺的检测较为灵敏, 这也是目前文献中报道的生物胺高效液相色谱紫外检测法所常用的波长 (Chen *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011)。

2.3 柱温的选择

实验考察了柱温对精胺检测效果的影响, 分别设柱温为 25、30、35、40、45℃。结果显示, 柱温对出峰情况没有显著影响。

2.4 流速的选择

分别在流动相流速为 0.8、1.0、1.2 ml/min 时, 考察精胺衍生物出峰情况。结果发现, 随着流动相流速的增大, 精胺衍生物出峰时间提前, 峰面积变小。这可能是由于流速较大时, 样品通过检测器检测的信号响应时间较短, 相应的峰会变窄, 峰面积变小。流动相流速为 1.0ml/min 时, 精胺衍生物色谱峰峰型尖锐, 响应值较大, 综合考虑, 选择流速为 1.0ml/min。

2.5 标准曲线的回归方程

按 1.3.1 中方法配制不同浓度的精胺标准溶液进行线性试验, 浓度分别为 0.1、1.0、5.0、10、50、100、500 和 1000 μg/ml, 每个浓度设 3 个平行。按照上述方法进行衍生、进样、定量, 得到精胺的峰面积与其相应浓度呈现良好线性关系, 线性回归方程为 $y = 24.55x + 11.545$, 线性相关系数为 0.999 9, 线性范围为 0.1 ~ 1000 μg/ml。方法的检出限以信噪比 (S/N) 为 3 来确定, 据此得出本方法精胺的检出限为 0.06 μg/ml。与其他一些文献报道的以丹磺酰氯为衍生剂、采用高相液相色谱法测定精胺的方法相比, 该方法具有更宽的线性范围和更低的检测限 (Lu *et al.* 2007; Pineda *et al.* 2012)。

2.6 精密度实验

制备质量浓度分别为 1.0、10、100 μg/ml 的 3 个精胺标准样品, 衍生后连续进样 5 次, 采用上述建立的方法进行处理和测定, 计算相对标准偏差, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, $RSD < 2\%$, 表明检测仪器具有很好的精密度, 检测方法适用。

表 2 精密度实验 ($n=5$)
Table 2 The precision test of the method ($n=5$)

质量浓度 Mass concentration (μg/ml)	峰面积平均值 Average peak area	标准偏差 Standard deviation	相对标准偏差 RSD (%)
1.0	39.5	0.353 6	0.89
10	255.7	3.606 0	1.41
100	2 480.6	5.581 2	0.22

2.7 加标回收率

在 1.00g 卤虫样品中进行基质加标, 分别设立 3 个浓度水平 (0.1、1.0、5.0 μg/ml) 的加标回收试验, 每个

浓度水平设3个平行,采用上述方法进行处理和测定,计算平均回收率,结果如表3所示。3个添加水平,精胺的平均回收率为86.3%~96.3%,批内相对标准偏差(RSD)<5%,实验结果较好,回收率和精密度均能满足检测要求。

表3 加标回收率及相对标准偏差

Table 3 Recovery results and relative standard deviation of standard addition of spermine in brine shrimp samples

加标量 Added ($\mu\text{g/ml}$)	检测值 Found ($\mu\text{g/ml}$)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
	0.085		
0.1	0.091	86.3	4.82
	0.083		
	0.961		
1.0	0.922	93.7	2.22
	0.929		
	4.672		
5.0	4.902	96.3	2.57
	4.866		

2.8 实际样品分析

按上述检测方法对卤虫样品进行了分析,通过外标定量法计算出卤虫无节幼体中精胺含量为0.077mg/g(0.38 $\mu\text{mol/g}$)。由此可见,卤虫无节幼体中精胺含量很低。这可能与其所处的发育时期有关。卤虫的整个发育过程需要经过卵、无节幼体期、后无节幼体期、拟成体期和成体期五个主要阶段,不同发育期控制精胺合成的鸟氨酸脱羧酶活性不同,因此精胺含量也不同(Watts *et al.* 1996)。卤虫不同发育时期精胺含量的变化有待于进一步研究。

3 结论

本研究建立了测定卤虫中精胺含量的高效液相色谱-紫外检测法,以丹磺酰氯为衍生剂进行柱前衍生,甲醇-水作为流动相梯度洗脱,衍生后不需经过进一步的萃取净化操作即可将卤虫中精胺与相邻杂质峰很好分离,并通过对梯度洗脱程序的优化,使精胺衍生物出峰时间大大缩短,提前至13.5min。此外,该方法线性范围宽,灵敏度和精密度高,为卤虫中精胺含量的测定提供了可靠依据。

参 考 文 献

- 吴永宁, 赵云峰. 2008. GB/T 5009.208-2008. 食品中生物胺含量的测定. 北京: 中华人民共和国卫生部发布
- 杨贤庆, 翟红蕾, 郝淑贤, 岑剑伟, 魏 涯, 石 红, 黄 卉, 周娟娟. 2012. 高效液相色谱法测定生物胺衍生条件的优化研究. 南方水产科学, 8(1): 49-53
- 程志斌, 廖启顺, 苏子峰. 2010. 精胺促进仔猪肠道发育的作用与机理. 饲料博览, (4): 16-18
- Alonso-Lomilloa MA, Domínguez-Renedo O, Matos P and 1 other. 2010. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. Anal Chim Acta 665: 26-31
- Bardocz S, Duguid TJ, Brown DS and 4 others. 1995. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. Br J Nutr 73(6): 819-828
- Chen HC, Huang YR, Hsu HH and 4 others. 2010. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetraodon lineatus*) implicated in a food-borne poisoning. Food Control 21: 13-18
- Fernandes JO, Ferreira MA. 2000. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. J Chromatogr A 886(1): 183-195

- Jiang HL, Ying LY, Zhou CS and 3 others. 2011. Chromatographic determination of biogenic amines in wines after treatment with ionic liquids as novel media. *J Sep Sci* 34: 1055-1062
- Lapa-Guimarães J, Pickova J. 2004. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J Chromatogr A* 1045(1-2): 223-232
- Liu X, Yang LX, Lu YT. 2003. Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 998(1): 213-220
- Loser C, Eisel A, Harms D and 1 other. 1999. Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* 44(1): 12-16
- Loukou Z, Zotou A. 2003. A comparative survey of the simultaneous ultraviolet and fluorescence detection in the RP-HPLC determination of dansylated biogenic amines in alcoholic beverages. *Chromatographia* 58: 579-585
- Lu YM, Lu X, Chen XH and 3 others. 2007. A survey of biogenic amines in Chinese rice wines. *Food Chem* 100: 1424-1428
- Önal, A. 2007. A review: Current analytical methods for the of biogenic amines in foods. *Food Chem* 103: 1475-1486
- Pineda A, Carrasco J, Peña-Farfal C and 2 others. 2012. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. *Food Control* 23: 251-257
- Romero R, Bagur MG, Sánchez-Vinas M and 1 other. 2000. Optimization of experimental variables in the dansyl chloride derivatization of biogenic amines for their determination by RP-HPLC. *Chromatographia* 51(7/8): 404-410
- Shalaby AR. 1994. Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chem* 49(3): 305-310
- Saarinen MT. 2002. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in intestinal digesta and feces by reversed phase HPLC. *J Chromatogr B* 77: 297-300
- Tang T, Qian K, Shi TY and 4 others. 2011. Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization. *Food Control* 22: 1203-1208
- Uda K, Tsujikawa T, Fujiyama Y and 1 other. 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. *J Gastroen Hepatol* 18(5): 554-559
- Watts SA, Yeh EW, Henry RP. 1996. Hypoosmotic stimulation of ornithine decarboxylase activity in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *J Exp Zool* 274(1): 15-22