

柱前衍生-高效液相色谱测定手足口病患者血清中多胺水平

张伟健¹, 谢琪^{1,2}, 曾今诚², 黄明元^{2*} (广东医科大学 1. 东莞市环境医学重点实验室, 2. 东莞市生物活性分子开发与转化研究重点实验室, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 建立一种高效、灵敏、准确的方法测定手足口病患者血清中多胺水平。**方法** 柱前衍生-高效液相色谱(HPLC)测定20例手足口病患者和20例对照者血清中亚精胺和精胺水平。**结果** 精胺与亚精胺线性关系良好, 相关系数大于0.99; 低、中、高质量浓度亚精胺回收率为87.98%~96.70%, 精胺为96.84%~105.15%。手足口病患儿血清中亚精胺和精胺含量明显高于对照组($P<0.01$)。**结论** 柱前衍生-HPLC可用于检测血清中精胺和亚精胺含量。

关键词: 高效液相色谱; 多胺; 手足口病

中图分类号: R 969

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)01-0014-05

Determination of serum polyamine levels by precolumn derivatization high performance liquid chromatography in hand-foot-mouth disease

ZHANG Wei-jian¹, XIE Qi^{1,2}, ZENG Jin-cheng², HUANG Ming-yuan^{2*} (1. Dongguan Key Laboratory of Environmental Medicine; 2. Dongguan Key Laboratory of Bioactive Molecule Development and Transformation Research; Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To establish an efficient, sensitive and accurate method for determination of serum polyamines in hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods** Serum concentrations of spermine and spermidine were measured by precolumn derivatization high performance liquid chromatography (HPLC) in 20 HFMD patients and 20 healthy controls. **Results** There was a linear relationship between spermine and spermidine, with a correlation coefficient > 0.99 . The recovery rates of low, medium and high concentrations were 87.98%-96.70% for spermidine and 96.84%-105.15% for spermine. Serum spermine and spermidine levels were higher in HFMD patients than in healthy controls ($P<0.01$). **Conclusion** The precolumn derivatization HPLC is suitable for detecting serum levels of spermine and spermidine.

Key words: high performance liquid chromatography; polyamine; hand-foot-mouth disease

多胺是一类含氮的低分子量有机化合物, 具有生物活性, 一般包括亚精胺(SPD)和精胺(SPM), 它们具有促进细胞分化、增生、生长, 在调节核酸与蛋白质的合成及生物膜稳定性等方面起着重要的作用^[1]。体内SPD和SPM水平与恶性肿瘤、心血管疾病、脑血管疾病等疾病的发生发展密切相关^[2-4]。目前多胺检测在红斑狼疮^[5]、恶性肿瘤患者中均有报道^[6], 主要采用高相液相色谱法(HPLC)^[7]。手足口病(HFMD)是一类由肠道病毒感染引起的一种发生于5岁以下儿童中的常见疾病^[8]。本实验采用柱前衍生

-HPLC测定手足口患儿和健康体检者血清多胺的浓度, 旨在为临床诊断和疾病预防提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

LC-20A高效液相色谱仪、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、RF-20A xs荧光检测器(Shimadzu), 5417R 冷冻高速离心机(Eppendorf), 氮吹仪 REX-C100, 电动旋涡振荡器Vortex-Genie2, Milli-Q超纯水仪(Millipore), 电热恒温水温箱(精宏公司); 亚精胺标准品、精胺标准品和丹磺酰氯均购于sigma公司; 乙腈为色谱纯, 氨水、高氯酸、NaOH、NaHCO₃等均为分析纯。

1.2 标准溶液配制

准确称取亚精胺和精胺标准品100 mg, 用超纯水定容至10 mL, 放置-20 °C冰箱保存; 用超纯水分

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.81500007), 广东省自然科学基金项目(No. 2019A1515011713), 广东省医学科学技术研究基金项目(No.A2020425)

收稿日期: 2020-06-09; **修订日期:** 2020-09-30

作者简介: 张伟健(1994-), 男, 在读硕士生

通信作者: 黄明元, E-mail: hmy@gdmu.edu.cn

别稀释以上标准品为1 g/L, 混合以上单标, 再用冷5%高氯酸稀释成终浓度分别为20、10、4、2、1、0.5、0.1、0.02 mg/L的混合标准溶液, 置于4℃冰箱保存。

1.3 样本收集与前处理

根据中国卫生部于2018年发布的《手足口病治疗指南》和粪便手足口病病毒检测阳性诊断结果, 收集手足口病患儿(20例)和同期健康体检者(20例)的血清。

样本前处理: 取250 μL血清, 然后12 000 r/min, 4℃, 离心5 min, 取200 μL血清, 加入冷300 μL 5% HClO₄沉淀蛋白, 涡旋, 12 000 r/min, 4℃, 离心10 min, 转移上清400 μL, 放置4℃待衍生^[9]。

1.4 衍生化处理

400 μL的标准液和样品加入200 μL 2 mol/L NaOH和400 μL饱和NaHCO₃, 然后加上400 μL丹磺酰氯(5 g/L, 乙腈做溶剂), 在60℃水浴加热避光反应45 min, 反应结束后加入100 μL的氨水终止反应并除去多余的丹磺酰氯。

1.5 衍生物的萃取

加800 μL三氯甲烷萃取, 3 000 r/min, 10 min, 吸取下层有机相700 μL, 以氮气吹干, 残渣用500 μL乙腈复溶, 0.22 μm有机滤膜过滤上样检测。

1.6 色谱条件

色谱柱: C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: A项为超纯水, B项为乙腈, 梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表1; 检测器: 荧光检测器, 激发波长为340 nm, 发射波长为510 nm; 流速: 1 mL/min, 进样体积: 10 μL; 柱温: 40℃。

2 结果

2.1 亚精胺和精胺色谱图。

亚精胺和精胺色谱图见图1。亚精胺和精胺保留

时间分别为14.9、18.8 min, 分离效果较好。

表1 梯度洗脱程序

| 时间/min | 超纯水/% | 乙腈/% |
|--------|-------|------|
| 0 | 40 | 60 |
| 5 | 20 | 80 |
| 14 | 5 | 95 |
| 18 | 40 | 60 |
| 20 | 40 | 60 |

2.2 衍生条件优化

按“1.4衍生化处理”项下方法, 考察衍生pH分别为9、10、11时多胺的峰面积, 结果见图2A; 考察衍生剂用量分别为100、200、400、800 μL时多胺的峰面积, 结果见图2B; 考察衍生剂温度分别为30、40、50、60、70℃时多胺的峰面积, 结果见图2C; 考察反应时间分别为10、20、30、40、45、50 min时多胺的峰面积, 结果见图2D。最终确定衍生体系pH约为10, 衍生剂量为200 μL, 反应温度为60℃, 反应时间为45 min。

2.3 标准工作曲线

将冷5%高氯酸稀释成终质量浓度分别为20、10、4、2、1、0.5、0.1、0.02 mg/L的混合标准溶液, 置于4℃冰箱保存, 经衍生化进样测定。以亚精胺和精胺浓度与峰面积采用外标法进行回归得出标准曲线方程, 线性方程亚精胺为 $y=827\ 755x+38\ 250$ 和精胺为 $y=957\ 264x+34\ 436$, 相关系数均>0.997, 亚精胺最低检测限(LOD)为0.02 mg/L, 精胺的最低检测限(LOD)为0.01 mg/L。

2.4 精密度实验

分别取标准溶液质量浓度0.1、1、10 mg/L作为低中高质量浓度, 于上述色谱条件, 1 d内重复检测5次, 计算日内精密度和日间精密度。结果见表2, SPD日内精密度(RSD%)为0.18~2.38, 日间精密度

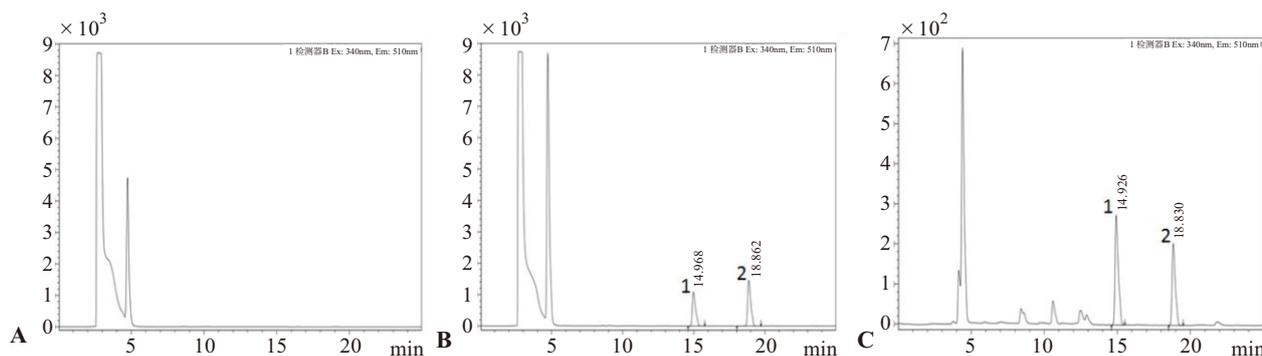


图1 衍生后亚精胺(1)和精胺(2)的HPLC色谱图

(RSD%)为0.11~3.14, SPM日内精密度(RSD%)为0.54~0.85, 日间精密度(RSD%)为0.1~1.28。

2.5 稳定性

分别配制低、中、高(0.1、1、10 mg/L)3种质量浓度标准溶液, 分别置于-20 ℃3个月、室温(25 ℃)

24 h、冻融3次循环以及衍生反应后24 h来考察SPD和SPM的长期、短期稳定性, 结果(表3)表明SPD和SPM在本实验条件下稳定可测; 衍生后SPD和SPM并不太稳定, 提示不能重复检测。

2.6 回收率

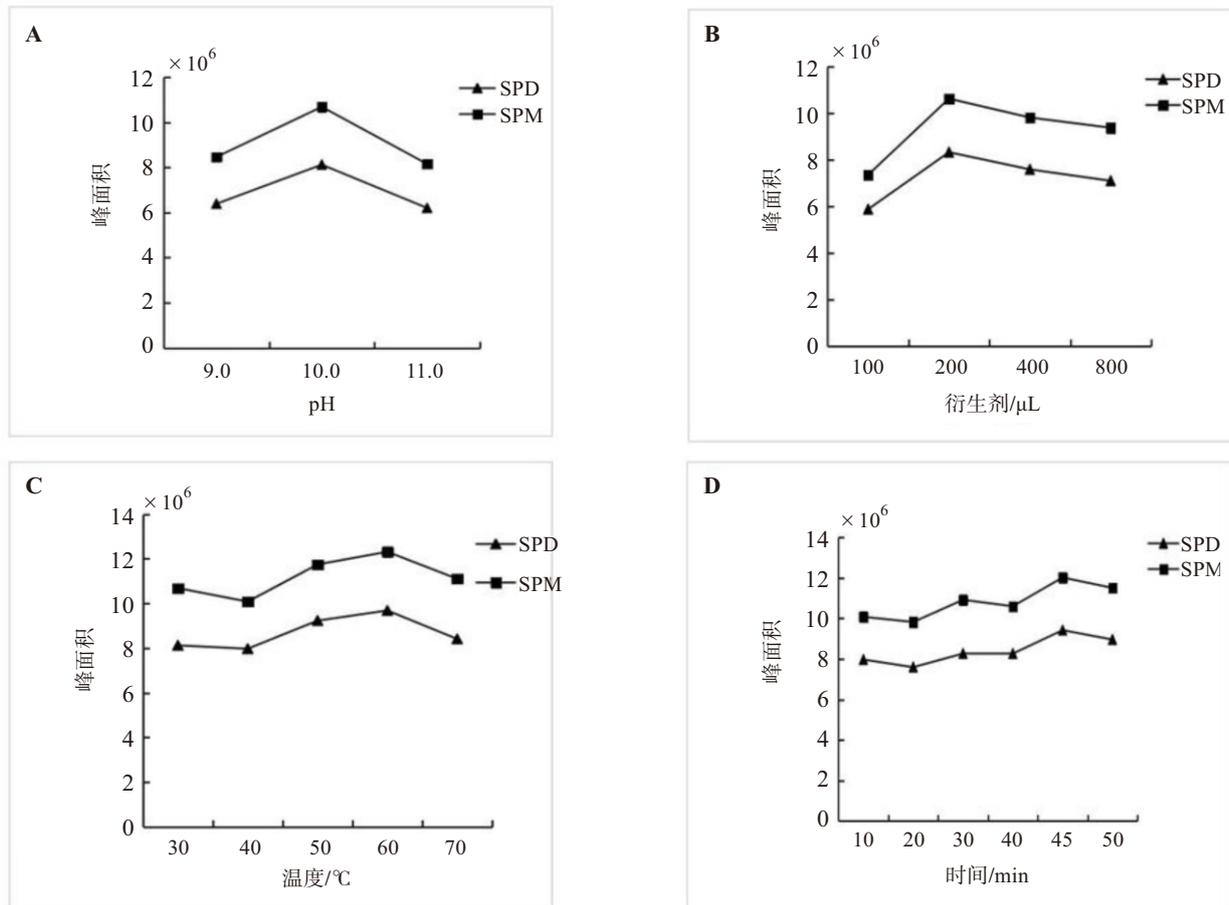


图2 不同衍生条件下亚精胺和精胺的峰面积

表2 亚精胺和精胺的精密度

(n=5)

| 质量浓度等级 | 均值±标准差(mg/L) | | 日内(RSD%) | | 日间(RSD%) | |
|--------|--------------|-------------|----------|------|----------|-------|
| | SPD | SPM | SPD | SPM | SPD | SPM |
| 低 | 0.098±0.0022 | 0.12±0.0011 | 2.38 | 0.56 | 2.03 | 1.28 |
| 中 | 0.94±0.016 | 0.94±0.0030 | 0.18 | 0.54 | 3.14 | 0.020 |
| 高 | 9.65±0.071 | 10.86±0.052 | 1.36 | 0.85 | 0.11 | 0.10 |

表3 亚精胺和精胺的稳定性

(n=3)

| 多胺 | 质量浓度等级 | 3个月, -20℃ (RSD%) | 24 h, 25℃ (RSD%) | 3次冻融循环 (RSD%) | 柱后反应24 h, 25℃ (RSD%) |
|-----|--------|------------------|------------------|---------------|----------------------|
| SPD | 低 | 4.21 | 0.48 | 1.99 | 6.45 |
| | 中 | 0.23 | 2.56 | 1.55 | 2.33 |
| | 高 | 1.52 | 0.47 | 2.50 | 4.62 |
| SPM | 低 | 2.12 | 1.72 | 1.26 | 5.20 |
| | 中 | 0.79 | 2.60 | 1.45 | 0.89 |
| | 高 | 1.61 | 1.70 | 2.01 | 4.88 |

配置已知含量(0.5、4、10 mg/L)的质量标准溶液,使用标准添加法,测定回收率。经衍生化处理进样测定,用标准曲线计算,根据测定质量浓度与实际加入质量浓度计算回收率。结果见表4,SPD回收率在87.98%~99.10%,SPM回收率在96.84%~105.15%。

表4 亚精胺和精胺的回收率 (n=4)

| 多胺 | 添加/(mg/L) | 测试/(mg/L) | 回收率/% | RSD/% |
|-----|-----------|-----------|--------|-------|
| SPD | 0.5 | 0.44 | 87.98 | 1.96 |
| | 4 | 3.96 | 99.10 | 0.90 |
| | 10 | 9.67 | 96.70 | 4.35 |
| SPM | 0.5 | 0.48 | 96.84 | 1.58 |
| | 4 | 4.21 | 105.15 | 1.06 |
| | 10 | 10.14 | 101.41 | 4.55 |

2.7 HFMD患儿和健康对照者血清中SPD和SPM含量的检测

在优化后的实验条件下,经上述处理,测定20例手足口病患儿及20例健康对照者血清中多胺的水平,SPD和SPM含量见表5。

表5 HFMD患儿和健康对照者血清亚精胺和精胺含量 ($\bar{x} \pm s$, n=20, mg/L)

| 对象 | SPD | SPM |
|--------|--------------------------|--------------------------|
| HFMD患儿 | 1.05 ± 0.04 ^a | 1.39 ± 0.06 ^a |
| 健康对照者 | 0.60 ± 0.03 | 0.95 ± 0.04 |

与健康对照者相比: ^aP<0.01

3 讨论

衍生剂质量浓度在5 g/L时得到最优结果,对衍生剂用量进行优化发现衍生剂量在200 μL时衍生化产物与其他更大剂量相差不大,考虑到成本,确定衍生剂用量为200 μL^[10]。有报道发现衍生剂的用量、衍生反应的温度和时间以及衍生体系的pH值对丹磺酰氯衍生反应影响很大^[11],pH值过低会影响衍生反应不完全,过高则会干扰,对pH进行优化结果表示在10.0左右衍生反应最合适;衍生化温度及衍生时间对实验结果也会有较大的影响,衍生温度过高衍生物易分解,衍生温度过低时衍生反应不完全^[5],经反复试验发现,60℃衍生反应45 min吸收信号最强。

应用HPLC检测肿瘤患者生物样本中的多胺已有多篇研究报道。一项研究报道了局灶性脑缺血患者血液中的亚精胺水平升高^[12];此外,亚精胺与第

48小时的临床结果和第4~6天的梗死体积有关。有趣的是,外源性多胺或多胺抑制剂可以影响一系列的生理活动。例如,亚精胺或精胺预处理显著抑制缺血/再灌注(I/R)细胞的凋亡,抑制caspase-3和caspase-9的表达,抑制细胞色素c的释放,上调Bcl-2的表达,降低[Ca²⁺]^[13]。在一个高血压诱发的充血性心力衰竭模型中,亚精胺的摄入降低了血压,提高了肌氨酸磷酸化水平,防止了心脏肥厚,表明延迟了心力衰竭的进展^[14]。在本研究中,我们研究了亚精胺和精胺在EV71感染的手足口病中的作用,表5结果显示手足口患者与健康对照中的亚精胺和精胺水平差异均有统计学意义,提示亚精胺和精胺在手足口病,特别是EV71感染的手足口病中高表达,表明生物多胺与手足口病的进展有关。本研究在已有的研究基础上,优化衍生实验条件,最终建立了衍生体系pH约为10,衍生剂量为200 μL,反应温度为60℃,反应时间为45 min的高效液相色谱法以检测手足口患者血清中亚精胺和精胺含量。本方法准确可靠,重复性好,可用于临床监测手足口病患者体内亚精胺和精胺水平,有待提高的地方为应该增加临床样本量和疾病临床分期,更深层次挖掘多胺与手足口病之间的联系,为临床诊断和疾病预防提供参考。

参考文献:

- [1] 张映,王静,胡玲琴,等.多胺及其代谢产物对脑缺血的影响与治疗[J].现代生物医学进展,2014,14(32):6762-6765.
- [2] MADEO F, EISENBERG T, PIETROCOLA F, et al. Spermidine in health and disease[J]. Science, 2018, 359(6374): eaan2788.
- [3] KIM H A, LEE H S, SHIN T H, et al. Polyamine patterns in plasma of patients with systemic lupus erythematosus and fever[J]. Lupus, 2018, 27(6): 930-938.
- [4] 任婷,成细华,陈聪,等.多胺代谢与缺血性心血管疾病研究进展[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):690-692.
- [5] 高梅梅,李文龙,耿春梅,等.柱前衍生化-HPLC法测定人血浆中多胺浓度及其临床应用[J].中国临床药理学杂志,2016,25(6):344-348.
- [6] CASERO RA J R, MURRAY STEWART T, PEGG A E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(11): 681-695.
- [7] IBARRA A A G, WROBEL K, ESCOBOSA A R C, et al. Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion

(下转第25页)

- [15] JOGEIR T, SISSEL A, BRITT H, et al. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species[J]. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol*, 2007, 146(3): 395-401.
- [16] RENATA G, ANNA K, HOSANA G R, et al. Comparative effects of DHA and EPA on cell function[J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 112(1): 56-64.
- [17] 郭玉华, 李钰金. 水产品中EPA和DHA的研究进展[J]. *肉类研究*, 2011, 143(1): 82-86.
- [18] VANESSA B, GWENDOLINE C, PIERRE F, et al. Microbial lipids as potential source to food supplements [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2016, 7(1): 25-42.
- [19] 李湛. EPA、DHA对体内脂质代谢影响的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2015, 9(1): 117-118.
- [20] GAETAN D, DANIEL C, ETIENNE G, et al. Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 63(1): 186-196.
- [21] SAMANEH G F, KAISA M L, GIOVANNI M T, et al. Comparison of the bioavailability of docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) in the rat [J]. *Prostag Leukotr Ess*, 2014, 90(1): 23-26.
- [22] 张文凤, 黄伟雄. 广东经济鱼类不饱和脂肪酸的含量分析与组成特征评价[J]. *环境化学*, 2020, 39(5): 1181-1191.
- [23] 乔芳, 李欢, 李东亮, 等. 冬夏两季五种经济鱼类组织脂肪酸含量及组成分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 80-90.
- [24] SILVIA T, DANIEL M, DAVID D, et al. Skin mucus fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus Aurata*): A descriptive study in fish fed low and high fish meal diets [J]. *Fishes*, 2019, 4(1): 15-25.
- [25] SAHARI M, FARAHANI F, SOLEIMANIAN Y, et al. n-3 Fatty acid distribution of commercial fish species components [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2013, 90(8): 1167-1178.
- [26] HARUN D, HAMD D. Chemometric characterization and classification of selected freshwater and marine fishes from turkey based on their fatty acid profiles [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2009, 86(3): 235-246.

~~~~~

(上接第17页)

- trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS/MS)[J]. *J Chromato B*, 2015(1002): 176-184.
- [8] ZHENG W, SHI H, CHEN Y, et al. Alteration of serum high-mobility group protein 1 (HMGB1) levels in children with enterovirus 71-induced hand, foot, and mouth disease[J]. *Medicine*, 2017, 96(17): e6764.
- [9] DUCROS V, RUFFIEUX D, BELVA-BESNET H, et al. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2009, 390(1): 46-51.
- [10] LEAREY J J, CRAWFORD-CLARK S, BOWEN B J, et al. Detection of biogenic amines in pet food ingredients by RP-HPLC with automated dansyl chloride derivatization[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(24): 4430-4436.
- [11] CHO H E, KANG M H. pH gradient-liquid chromatography tandem mass spectrometric assay for determination of underivatized polyamines in cancer cells[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018(1085): 21-29.
- [12] ELS T, BRUCKMANN J, RÖHN G, et al. Spermidine: A predictor for neurological outcome and infarct size in focal cerebral ischemia? [J]. *Stroke*, 2001, 32(1): 43-46.
- [13] HAN L, XU C, JIANG C, et al. Effects of polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(11): 1345-1352.
- [14] EISENBERG T, ABDELLATIF M, SCHROEDER S, et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine[J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1428-