

毛细管电泳-多光子激发荧光检测分析生物胺*

张桂森¹, 陈胜^{1,2}, 徐友志¹, 杜伟¹, 刘笔锋^{1, **}

(1 华中科技大学 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

(2 湖北师范学院 电工电子教学示范中心, 湖北 黄石 435001)

摘 要: 构建了毛细管电泳—连续光多光子激发荧光检测系统并应用于生物分析. 对几种常见生物胺, 如腐胺, 尸胺, 组胺, 精胺, 亚精胺和苯乙胺的分析结果表明, 该系统具有分离效率高、质量检测灵敏度高和低消耗等特点, 适于复杂体系如生物样品的测量. 定量分析显示, 生物胺的检测限在 nM 级, 线性范围超过 2 个数量级, 进一步将多光子激发荧光检测与传统单光子激发荧光检测结果对比, 发现前者还具有改善分离选择性的优势.

关键词: 毛细管电泳; 多光子激发荧光; 生物胺

中图分类号: O657.38

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2008)05-1006-4

0 引言

生物胺是一类含氮的脂肪族或杂环类小分子有机化合物, 分为单胺和多胺两大类. 适量摄入生物胺能够有效调节机体内的生理活动, 但过量会使人体产生不良副反应, 如血压升高、头痛或出现皮疹等. 生物胺广泛分布于生物体内, 含有多个氨基或亚氨基. 主要包括腐胺, 尸胺, 组胺, 精胺, 苯乙胺等及其衍生物. 生物胺与细胞分化、增殖和发育有关, 并能影响 DNA, RNA 和蛋白质的代谢. 研究表明: 生物胺水平与肿瘤发生和发展存在一定相关性^[1]. 另外, 食品中也含有生物胺, 如水产品中组胺对人体健康影响很大, 其次是酪胺. 欧美及我国对部分食品中组胺含量做了严格的限量要求. 除了组胺、酪胺本身的作用外, 其他生物胺的存在会增强组胺和酪胺的不良作用.

生物胺分析方法包括比色法、氨基酸分析法和色谱法^[2]等, 如采用高效液相色谱或气相色谱^[3-5]. 存在的主要问题是样品处理复杂, 测量灵敏度较低. 也有采用毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 技术分析生物胺. 由于生物胺类没有紫外吸收, 可采用间接紫外检测方法^[6-7]或激光诱导荧光检测方法^[8-9]. 多光子激发荧光^[10-12] (multiphoton excited fluorescence, MPEF) 作为一门新型检测技术已经广泛应用于生物分离和分析中^[13-16]. 多光子激发荧光的优点是: 1) 超低的探测背景和 a-L 级水平的激发体积^[17]; 2) 质量检出限低, 一般在 z-mole 水平.

本文构建了毛细管电泳—连续光多光子激发荧光检测系统应用于常见的 6 种生物胺的分析, 并将多光子激发荧光检测与传统单光子激发荧光检测结果对比. 结果表明, 该系统具有分离效率高、质量检测灵敏度高和低消耗等特点, 适于复杂体系如生物样品的测量.

1 材料和方法

1.1 仪器

毛细管电泳仪 (Beckman P/ACE 5510, US) 用于毛细管电泳—单光子激发荧光检测分析, 其中, 激发光源为氩离子激光器 ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$), 数据处理系统为 Gold System; 毛细管电泳—多光子荧光检测分析在自组装实验平台上完成, 该平台系统包括: 倒置荧光显微镜 (CK40, Olympus, Japan)、808 nm 的半导体激光器 (HTYG-081, $\lambda_{ex} = 808 \text{ nm}$, 北京半导体研究所)、准直器 (自制)、毛细管电泳用高压电源 (30 KV/0.3 mA, 上海原子物理研究所), 光电倍增管 (R5070, Japan) 和高压电源 (PS350, Stanford Research Systems)、滤镜系统 (E625sp, Chroma Technology; BG18, Newport, USA)、自编程数据处理系统; 石英毛细管 (57 cm \times 75 μm) (河北永年光导纤维厂).

1.2 试剂

组胺、尸胺、腐胺、亚精胺、精胺和苯乙胺 (Sigma, USA), 荧光素异硫氰酸酯 (MO, USA), 水合四硼酸钠 (天津市石英钟厂霸州市化工分厂), 硼酸 (武汉联碱厂), 丙酮 (天津博迪化工有限公司), NaOH (北京化工厂), HCl (武汉市亚泰化工试剂有限公司), SDS (天津化学试剂有限公司). 所用水均为 Direct-Q 系统过滤的超纯水; 除特殊注明外, 所

* 国家自然科学基金 (20405006, 20105004) 和华中科技大学研究生创新基金资助

** Tel: 027-87792203 Email: bfliu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2006-12-18

用试剂均为分析纯或以上,且所有溶液使用前都进行过滤处理($\varphi 400\text{ nm}$).组胺、尸胺、腐胺、亚精胺、精胺和苯乙胺贮备液浓度均为 1 mmol/L ,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,临用前稀释.缓冲液: 25 mmol/L 硼砂 + 100 mmol/L SDS,用 1 mol/L NaOH 溶液调节到 $\text{pH } 10.52$.荧光素异硫氰酸酯(FITC)溶液:称取 4 mg FITC 粉末,溶于 $500\text{ }\mu\text{L}$ 丙酮中加缓冲液至 1 mL .

1.3 方法

1.3.1 衍生化反应

分别取 $10\text{ }\mu\text{L}$ FITC 溶液和 $10\text{ }\mu\text{L}$ 生物胺标准溶液,以 FITC 和生物胺物质的量比为 $10:1$,加衍生化缓冲液到 1 mL ,漩涡混匀,于温度室温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 暗处反应 12 h .

1.3.2 实验方法

毛细管电泳进样前,分别以 0.1 mol/L HCl、 0.1 mol/L 氢氧化钠、水和缓冲溶液冲洗石英毛细管($57\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$) 10 min ;PMT 工作电压为 1000 V ;数据处理采用 Matlab 后处理.电泳实验前,毛细管需进行高压平衡 10 min .分离条件:1)单光子实验条件:毛细管: $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ cm}/57\text{ cm}$;分离电压: 22.5 kV ;压力进样: 5 s ,LIF: $488\text{ nm}/520\text{ nm}$,采用柱上检测;2)多光子实验条件:分离电压: 20 kV ;虹吸进样: $15\text{ cm}/60\text{ s}$;毛细管: $50\text{ }\mu\text{m} \times 57\text{ cm}$,采用柱后检测,将物镜焦点对准在阴极端毛细管出口的中心.

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳-单光子激发荧光检测

毛细管电泳分离生物样品可采用多种分离模式.对于生物大分子如 DNA 和蛋白质等,一般采用含有筛分的方法,如毛细管凝胶电泳或无胶筛分毛细管电泳;对于分离如生物胺小分子化合物,常用的模式是毛细管区带电泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)和胶束电动色谱(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC).由于生物胺类物质没有紫外吸收,需要进行柱前衍生化处理,然后分离和检测.采用荧光检测,常用的衍生试剂为 FITC.由于 FITC 具有较强的疏水性,选用 MEKC 电泳分离模式,能够获得 FITC 标记的生物胺更好的分离效果.因此,在毛细管电泳分离的模式上,本文选择 MEKC 模式.

图 1 给出了在 MEKC 电泳分离模式下,采用传统基于单光子激发的激光诱导荧光检测方法获得的

电泳分离谱图.6 种生物胺获得了比较满意的分离结果,但组胺(峰 1)和亚精胺(峰 2)没有基线分离.

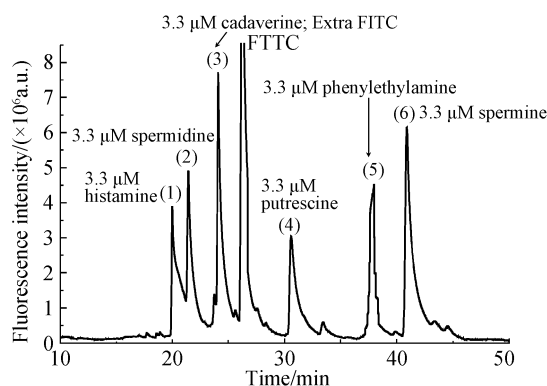


图 1 毛细管电泳-单光子激发荧光检测分析 6 种生物胺
Fig.1 Electropherogram of bio-amines using CE-LIF

2.2 毛细管电泳-多光子激发荧光检测

为实现毛细管电泳的多光子激发荧光检测,自组装了一套系统,并证实适合生物医学分析^[18].本研究将该系统用于生物胺的分离分析.图 2 给出了在 MEKC 电泳分离模式下,采用基于多光子激发的激光诱导荧光检测方法获得的电泳分离谱图.电泳分离条件与单光子激发荧光检测完全一样.与图 1 相比较,6 种生物胺获得了满意的分离结果,组胺(峰 1)和亚精胺(峰 2)获得了基线分离.这是由于基于多光子激发的荧光检测方法的检测体积非常小,一般在 aL 级水平.由于检测造成的电泳谱峰展宽被抑制,因此能够得到比单光子检测更佳的分辩率.当然,不可否认,在单光子检测条件下,能够获得更好得检测灵敏度.

2.3 定量分析

配制一系列多胺标准溶液,以生物胺样品浓度的对数 $\ln C$ (mmol/L) 对电泳峰面积的对数 $\ln I$ 坐图,得到毛细管电泳多光子激发荧光检测分析的线性关系,见图 2.方法的检测限由测量噪音的 3 倍计算.其线性方程、线性范围、检测限和回收率如表 1.

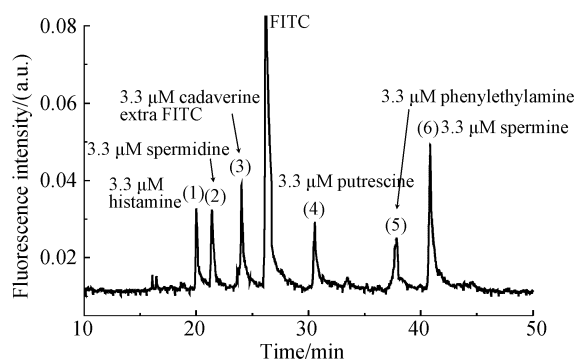


图 2 毛细管电泳-多光子激发荧光检测分析 6 种生物胺
Fig.2 Electropherogram of bio-amines by CE-MPEF

表 1 定量分析结果

样品名称	线性方程 (Y=AX+B) Y: LnI; X: LnC	线性 范围	最小检 测限	回收 率%
组胺	Y=0.76407X+4.63472 $\gamma=0.99167$	121~ 0.571	0.080	96.6
亚精胺	Y=0.84293X+5.96523 $\gamma=0.98952$	182~ 1.712	0.079	105.1
尸胺	Y=0.89757X+7.17404 $\gamma=0.99836$	120~ 1.124	0.058	101.5
腐胺	Y=0.71316X+3.75591 $\gamma=0.99105$	221~ 1.034	0.055	102.3
苯乙胺	Y=0.72756X+4.48539 $\gamma=0.9945$	231~ 1.822	0.077	99.6
精胺	Y=0.72187X+3.49609 $\gamma=0.99056$	205~ 1.152	0.085	98.7

备注:线性范围和最小检测限的单位是 10^{-6} mol/L.

3 结论

毛细管电泳—连续光多光子激发荧光检测系统成功地应用于生物胺分析,如腐胺,尸胺,组胺,精胺,亚精胺和苯乙胺. 研究表明,该系统具有分离效率高、质量检测灵敏度高和低消耗等特点,适于复杂体系的测量. 定量分析显示,生物胺的检测限在 nM 级,线性范围超过 2 个数量级.

参考文献

- [1] ANTHONY E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes[J]. *Biochem J*, 1986, **234** (2): 249-262.
- [2] HURST W J. A review of HPLC methods for the determination of selected biogenic amines in foods[J]. *Journal of Liquid Chromatography*, 1990, **13** (1): 1-23.
- [3] SCHENKEL E, BERLAIMONT V, DUBOIS J, et al. Improved highperformance liquid chromatographic method for the determination of polyamines as their benzoylated derivatives; application to P388 cancer cells[J]. *J Chromatogr B*, 1995, **668** (2): 189-197.
- [4] SUB J W, LEE S H, CHURNG B C, et al. Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers [J]. *J Chromatogr B*, 1997, **688** (2): 179-186.
- [5] HUH N G, MATTUSCH J, SCHULZ H. Determination of polyamines in biological materials by HPLC with 9-fluorenylmethyl chloroformate precolumn derivatization [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1995, **351** (6): 563-566.
- [6] MA Y, ZHANG R, COOPER C L. Indirect photometric detection of polyamines in biological sample separated by high-performance capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr B*, 1992, **608** (1~2): 93-96.
- [7] SIREN H, MIELONEN M, HERLEVI M. Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine[J]. *J Chromatogr A*, 2004, **1032** (1~2): 289-297.
- [8] BERT L, ROBERT F, DENOROY L, et al. Enhanced temporal resolution for the microdialysis monitoring of catecholamines and excitatory amino acids using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 1996, **755** (1): 99-111.
- [9] PAQUETTE D M, SING R, BANKS P R, et al. Capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for profiling body fluids[J]. *J Chromatogr B*, 1998, **714** (1): 47-57.
- [10] LIU Chang. The effect of self-shortening on the stability region of passive Kerr Mode-locking laser [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33** (5): 525-528.
刘畅. 自缩短效应对 Kerr 被动锁模激光器稳定区的影响[J]. 光子学报, 2004, **33** (5): 525-528.
- [11] TIAN F, HUANG S, BAI J, et al. All solid state multi wavelength femtosecond pulse laser system [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31** (10): 1112-1115.
- [12] WANG Shui-cai, HE Jun-fang, PEN Jun. Studies on detection technique of ultrafast glimmer molecule spectra [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33** (7): 871-875.
王水才, 贺俊芳, 彭菊. 超快微光分子光谱探测技术研究[J]. 光子学报, 2004, **33** (7): 871-875.
- [13] XU C, SHEAR J B, WEBB W W, et al. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (20): 10763-10768.
- [14] SHEAR J B. Multiphoton-Excited Fluorescence in Bioanalytical Chemistry[J]. *Anal Chem*, 1999, **71** (17): 598A-605A.
- [15] WEI J, GOSTKOWSKI M L, GORDON M J, et al. Determination of fluorogen-labeled neurotransmitters at the zeptomole level using two-photon excited fluorescence with capillary electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 1998, **70** (16): 3470-3475.
- [16] WEI J, OKERBERG E, DUNLAP J, et al. Determination of biological toxins using capillary electrokinetic chromatography with multiphoton-excited fluorescence[J]. *Anal Chem*, 2000, **72** (6): 1360-1363.
- [17] ZIPFEL W R, WILLIAMS R M, WEBB W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (11): 1369-1377.
- [18] CHEN Sheng, LIU Bi-Feng, FU Ling, et al. Continuous wave-based multiphoton excitation fluorescence for capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2006, **1109** (2): 160 - 166.

Determination of Biogenic Amines by Capillary Electrophoresis Coupling with Continuous Wave-based Multiphoton Excited Fluorescence Detection

ZHANG Gui-sen¹, CHEN Sheng^{1,2}, XU You-zhi¹, DU Wei¹, Liu Bi-Feng¹

(1 *The Key Lab of Biomedical Photonics of MOE, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*)

(2 *CEET of Hubei Normal University Huangshi 435001, China*)

Received date: 2006-10-20

Abstract: Multiphoton excited fluorescence (MPEF) detection coupling to capillary electrophoresis (CE) has been proposed to analyze biogenic amines, such as putrescine, cadaverine, histamine, spermine, spermidine and phenylethylamine. The detection limit was found to be nM-level, with linear range of over two orders of magnitude for quantitation. It showed that the constructed CE-MPEF method was well suited for complex systems like bio-sample, with advantages of high separation performance, high detection sensitivity and low cost. Further, MPEF exhibited a capability for improving separation resolution after comparing with conventional single photon laser induced fluorescence.

Key words: Capillary electrophoresis; Multiphoton excitation; Fluorescence; Biogenic amines



ZHANG Gui-sen was born in 1965, received his bachelor's degree in physics from Wuhan University in 1997. Now he is a Ph. D candidate at Huazhong University of Science and Technology, his current work focuses on bio-analysis in system biology.