

高效液相色谱 – 电喷雾离子阱质谱联用 测定尿中的 8-羟基脱氧鸟嘌呤

阮小林, 张爱华, 吴川, 戎伟丰, 黄淑莲

(广东省职业病防治院, 广东 广州 510300)

摘要: 建立了尿样中 8-羟基脱氧鸟嘌呤的 HPLC-MS 测定方法。尿样中的 8-羟基脱氧鸟嘌呤采用 WCX 固相萃取小柱预富集后, 以 0.5% 甲酸-甲醇洗脱, 吹干后用 0.5 mL 流动相溶解剩余物上机测定。采用分子的二级碎片, 方法在 5.0~500.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好线性关系, 相关系数 $r=0.9994$, 检出限 ($S/N=3$) 为 0.50 $\mu\text{g/L}$ 。尿样在 40.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 加标水平的回收率分别为 82% 和 76%, 尿样中内源性杂质对分子二级碎片离子峰无干扰。方法具有较高的选择性和灵敏度, 适合尿样等复杂基体中 8-羟基脱氧鸟嘌呤的定性定量检测。

关键词: 高效液相色谱; 离子阱质谱; 8-羟基脱氧鸟嘌呤; 尿

中图分类号: O657.63 Q526.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)01-0072-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.01.015

Determination of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in Urine by High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Trap Mass Spectrometry

RUAN Xiao-lin, ZHANG Aihua, WU Chuan, RONG Weifeng, HUANG Shu-lian

(Guangdong Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

Abstract A high-performance liquid chromatography – electrospray ionization trap mass spectrometry method was established for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine. The sample was concentrated with WCX cartridge column and eluted out with 0.5% formic acid-methanol. The elute solution was evaporated to dryness in N_2 flow and redissolved with 0.5 mL mobile phase. The analysis of 8-OHdG was carried out using fragmentation of m/z 116 and 167.4 as qualitative ions and m/z 167.4 as quantitative ion. The method showed good linearity over the range of 5.0–500.0 $\mu\text{g/L}$ for 8-OHdG with a correlation coefficient of 0.9994. The detection limit ($S/N=3$) was 0.50 $\mu\text{g/L}$. The spiked recoveries of 8-OHdG at two concentration levels of 40.0 $\mu\text{g/L}$ and 100.0 $\mu\text{g/L}$ were 82% and 76%, respectively. The proposed method was suitable for the determination of 8-OHdG in urine sample with high selectivity and sensitivity.

Keywords high performance liquid chromatography; ionization trap mass spectrometry; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; urine

在 DNA 的所有碱基中, 鸟嘌呤拥有的分子轨道具有较高的能级, 因此在活性氧、电离辐射、某些致癌源、药物、有机溶剂或激素等的作用下, 细胞 DNA 中的鸟嘌呤发生氧化损伤可形成一种修饰碱基 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-Hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)^[1-2]。8-OHdG 因此被认为是一种反映体内 DNA 氧化损伤程度的灵敏指标, 也是 DNA 氧化损伤的生物标志物。当机体修复机制正常时, 8-OHdG 在酶的作用下从 DNA 链上切除并重新掺入正常的鸟嘌呤碱基, 而切下的 8-OHdG 则经尿液排出体外。8-OHdG 在体内稳定, 一旦形成便不再被机体进一步代谢。大量的研究表明, 8-OHdG 与癌变有着密切的关系, 许多致癌源在诱发肿瘤的同时, 有关组织中的 8-OHdG 含量也随之增高。虽然目前不能认为组织中 DNA 的 8-OHdG 是引起肿瘤发生的必要充分条件, 但 Albert 等^[3-6]提出, 这种修饰碱基可作为一种适于暴露某些化学品的内接触剂量指标。

收稿日期: 2010-08-26 修回日期: 2010-11-03

基金项目: 广东省科技厅基金资助项目 (2007B031512003)

通讯作者: 阮小林, Tel: 020-34063465 E-mail: yuetangxl@163.com

8-OHdG 的检测方法主要有酶联免疫法 (ELISA)^[7]、气相色谱 - 质谱联用法 (GC-MS)、³²P 后标记法和高效液相色谱 - 电化学检测法 (HPLC-ECD)^[8-15] 等方法。ELISA 法简单, 特异性强, 灵敏度高, 但测定的是 DNA 和 RNA 氧化产物的总量; GC-MS 法需衍生化, 易产生副产物, 导致假阳性结果; ³²P 标记法特异性不高, 且易造成放射污染; HPLC-ECD 法灵敏度很难满足样品中 8-OHdG 低含量水平检测的要求, 尿样基质干扰大。

本文应用高效液相色谱 - 离子阱质谱联用测定尿液中的 8-OHdG, 排除了尿液中复杂基体对 8-OHdG 测定的干扰, 利用二级碎片离子 m/z 116 167.4 为定性离子峰, m/z 167.4 为定量离子, 提高了方法的选择性, 可对样品中的痕量组分进行定性定量测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱, 1100SLSL 型电喷雾离子阱质谱 (Agilent 公司): 包括在线真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱, LC-18 固相萃取小柱 (500 mg 美国 Supelco), MilliQ 纯水机 (美国 Millipore 公司), 高速离心机 (湖南湘仪离心机有限公司), 涡漩振荡器, 万分之一天平。乙腈、甲醇 (色谱纯, 安徽时联特种溶剂有限公司), 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (纯度大于 99.5%, Signa 公司), 甲酸、甲酸铵、氨 (分析纯, 广州化学试剂厂)。

1.2 LC-MS/MS 仪器条件

色谱条件: Atlantis HILIC (2.1 mm × 100 mm, 3 μm); 流动相: 0.1% 甲酸 - 乙腈 (20:80 体积比); 流速: 0.20 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子模式; 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 8 L/min, 雾化气压力 206.8 kPa, 分子离子 m/z 283, 二级子离子 m/z 167.4, 二级碎裂电压 0.80 V。

1.3 标准溶液的配制

称取 8-羟基脱氧鸟嘌呤 0.020 0 g 于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 所得标准储备液的质量浓度为 2.0 g/L。使用前以甲醇稀释成 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 500.0 μg/L 的标准使用液。

1.4 样品前处理

弱阴离子载体固相 (WCX) 萃取小柱用 1 mL 甲醇、2 mL 水活化, 使载体充分浸润, 再以 2.0 mL 50 mmol/L pH 7.5 的甲酸铵缓冲液平衡小柱。将自然解冻的尿样混匀, 10 000 g 离心 5 min, 取上清液 1.0 mL 与 2 mL 缓冲液混匀后上 SPE 小柱, 以自然流速通过载体后, 依次加入 2 mL 去离子水、2 mL 80% 甲醇溶液、0.50 mL 甲醇淋洗载体后, 以 2 mL 0.5% 甲酸 - 甲醇分两次加入小柱洗脱 8-OHdG, 洗脱速度为自然滴速。收集全部洗脱液, 于 50 °C 氮气流下浓缩近干, 准确加入 0.5 mL 流动相, 涡漩振荡 5 min 溶解剩余物, 待测定。

2 结果与讨论

2.1 8-OHdG 的碎裂机理

8-OHdG 是在疾病或外源性化合物的作用下, 细胞 DNA 中一碱基鸟嘌呤因发生氧化损伤而形成的一种被修饰的碱基, 其分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₅, 相对分子质量为 283.24, 结构式如图 1A。因其结构中含有一 NH₂ 基团, 在弱酸性的色谱流动相中可结合一个质子形成带一个单位正电荷的离子, 故采用正离子模式检测 8-OHdG 的准分子离子峰 284 (分子加一个质子, 283+1), 再通过对母离子进行二次碎裂, 去掉一个戊糖 (-C₅H₇O₃) 后得到二级子离子碎片, 结果见图 1B~C。

2.2 色谱分离条件的选择

8-OHdG 结构中含有一 NH₂ 基团, 分子呈弱碱性, 在普通 C₁₈ 柱上保留较差, 实验中比较了普通 C₁₈ 柱、Zorbax SB-Aq 柱、Atlantis HILIC 柱和 Waters XTerra RP18 柱对 8-OHdG 的分离效果。结果表明, 8-OHdG 在 Atlantis HILIC 柱的保留能力好于 XTerra RP18 柱, 在普通 C₁₈ 柱上基本不保留。在 0.1% 甲酸 - 乙腈 (20:80) 为流动相, 流速 0.20 mL/min 的色谱条件下, 其保留时间为 4.3 min, 峰形对称,

半峰宽小, 尿中的内源性杂质在该保留时间内无干扰。空白尿样以及空白尿样加标的质谱图见图 2。

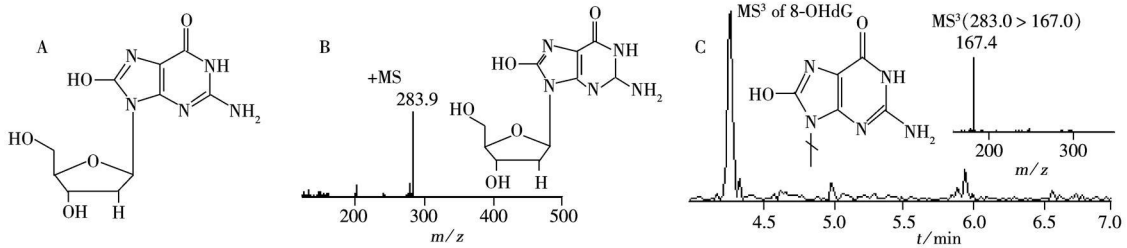


图 1 8-OH dG 的化学结构式 (A)、准分子离子 (B) 及二级子离子碎片 (C)

Fig 1 Chemical structure (A), molecule fragment (B) and daughter fragment ion (C) of 8-OH dG

2.3 固相萃取条件的优化

8-OH dG 分子在中性 pH 值下以弱阳离子形式存在于水溶液中, 选择弱阳离子载体 (WCX) 的固相萃取小柱与一般 C_{18} 载体固相萃取小柱进行比较, 以 $100.0 \mu\text{g/L}$ 的标准溶液考察不同载体的吸附作用。结果表明, 8-OH dG 与 C_{18} 载体作用力很弱, 在 10% 甲醇-水的淋洗条件下基本不保留, 而在 WCX 载体上, 保留作用较强, 在 80% 甲醇-水的淋洗液强度下, 仍有较好的保留作用, 有利于尿样等复杂基体样品的处理。在总洗脱体积为 2 mL 的条件下, 考察了不同体积分数的甲酸-甲醇溶液对样品的洗脱效率, 结果见图 3。

实验发现, 不加甲酸时, 8-OH dG 的洗脱效率仅为 15%, 随着甲酸的增加, 洗脱效率迅速增加, 当甲酸的体积分数为 0.3%~0.6% 时, 洗脱效率达到最高值, 其洗脱机制为: WCX 载体的脂肪酸基是一种弱阴离子, 在 pH 近中性条件下, 呈电负性, 可与 8-OH dG 分子上的 $-\text{NH}_2$ 作用而被保留, 加入甲酸后, 当体系 pH 降低至羧基 pK_a 以下时, 羧基可被甲酸中和呈电中性, 与 $-\text{NH}_2$ 作用减弱直至无静电作用, 从而被洗脱。本文选择 0.5% 甲酸-甲醇为洗脱液。

WCX 载体的羧酸基 pK_a 为 4.8, 为保证在上样过程中羧酸基呈电负性, 同时 8-OH dG 分子上的 $-\text{NH}_2$ 带正电荷, 使两者能发生良好的吸附作用, 应在中性至弱碱性环境下上样。实验以 50 mmol/L 甲酸铵为缓冲溶液介质, 比较了 pH 为 4.0~8.0 的条件下, 载体对 8-OH dG 的吸附作用, 吸附效率按式 (1) 计算, 标准溶液的总上样体积为 2 mL, 结果见图 4。

$$\text{吸附效率} = 100\% \times (M_0 - M_1) / M_0 \quad (1)$$

式中: M_0 为加到载体上的 8-OH dG 总量 (μg); M_1 为上样后流出溶液中的 8-OH dG 总量 (μg)。实验结果表明, 上样体系 pH 控制在 7.0~8.0 之间时, 8-OH dG 的吸附效率最高。故实验选择 pH 为 7.5, 浓度为 50 mmol/L 的 1 mL 甲酸铵缓冲液与 1 mL 尿样混合后上样, 以保证上样 pH 控制在最佳吸附区间。

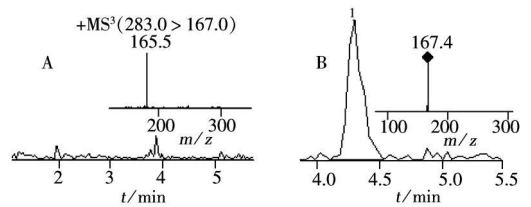


图 2 空白尿样 (A) 与空白尿样加标 (B) 的质谱图

Fig. 2 MS spectra of blank urine (A) and blank urine spiked with 8-OH dG standard (B)

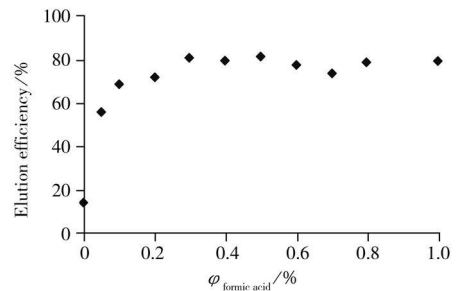


图 3 不同体积分数的甲酸-甲醇溶液下的洗脱效率

Fig. 3 Elution efficiency of different percent formic acid in methanol

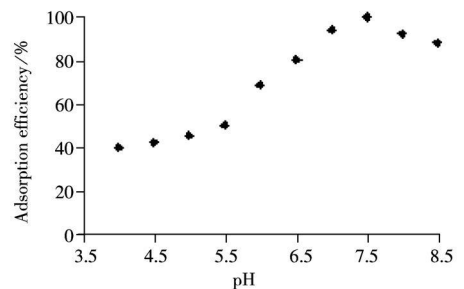


图 4 不同 pH 上样条件下 WCX 对 8-OH dG 的吸附效率

Fig 4 Adsorption efficiency at different pH

2.4 方法的线性范围、精密度与检出限

以 5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、500.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液进样, 二级碎片离子 m/z 116、167.4 为定性离子峰, 以二级子离子 m/z 167.4 进行定量分析。结果表明, 8-OH dG 在 5.0~500.0 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内呈良好线性关系, 线性回归方程为 $Y = 1.625X + 1.397.3$ (X 表示 8-OH dG 的质量浓度, $\mu\text{g/L}$; Y 表示质谱响应峰面积), 相关系数 $r = 0.9994$ 。以 40.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液进样, 平行测定 6 次, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 5.0%、9.8% ($n = 6$)。以质谱 3 倍基线噪音计算检出限 ($S/N = 3$) 为 0.50 $\mu\text{g/L}$, 低于王旗等^[11]报道的 1 $\mu\text{g/L}$, 且基线平稳, 无干扰峰。

2.5 尿样的加标回收率

取某化工厂职业人群的尿样经 10 000 g 离心 5 min 后, 取上清液加入 8-OH dG 标准溶液, 使其加标最终质量浓度为 40.0、100.0 $\mu\text{g/L}$, 按照“1.4”步骤进行处理, 以外标法定量, 得到平均加标回收率分别为 82% 和 76%。

3 结论

本文建立了弱阴离子交换固相萃取进行尿样前处理, 高效液相色谱 - 离子阱质谱联用测定尿中痕量 8-OH dG 的方法。方法以二级子离子为定性定量离子, 特异性好, 检出限低, 精密度好, 线性范围宽, 符合尿样中 8-OH dG 低含量水平的测定要求, 已成功用于甲醛接触人群尿中 8-OH dG 的测定。

参考文献:

- [1] LU C Y, MA Y C, LIN J M, CHUANG C Y, SUNG F C. Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and indoor air pollution among non-smoking office employees [J]. *Environ Res* 2007, 103(3): 331-337.
- [2] XU G W, YAO Q H, WENG Q F, SU B L, ZHANG X, XIONG J H. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2004, 36(1): 101-104.
- [3] ALBERT A, VAN Z, ANTON J L, JANER H, FRANCESCO D. 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA from leukocytes of healthy adults: relationship with cigarette smoking, environmental tobacco smoke, alcohol and coffee consumption [J]. *Mutat Res* 1999, 439(2): 249-257.
- [4] JOSEPH L, KARL H, SUSAN B, HELEN R G, PAUL E. 8-Hydroxydeoxyguanosine: A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus [J]. *FEBS Lett* 1994, 348(2): 131-138.
- [5] MARCZYNSKI B, KRAUS T, ROZYNEK P, RAITHEL H J, BAUR X. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA of workers highly exposed to asbestos and their clinical data: occupational and non-occupational confounding factors and cancer [J]. *Mutat Res* 2000, 468(2): 203-212.
- [6] VLADIMIRA K, EVA S, ALICE J, JUAN J. Determination of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in untreated urine by capillary electrophoresis with UV detection [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 985(1/2): 513-517.
- [7] ISHIYAMA Y, OGARA A, OKAMURA T, UMEMURA T. Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 43(5): 1737-1743.
- [8] CHIOU C C, CHANG P Y, CHAN E C, WU T L, TSAO K C, WU J. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers [J]. *Clin Chim Acta* 2003, 336(1): 87-94.
- [9] PARUL R, PUTH J, NALINIM, JOSEPH L. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine [J]. *Free Rad Biol Med* 2007, 42(4): 552-558.
- [10] 张静, 温放, 杨娜, 朱楠, 孙贵范, 刘娜. 卵巢上皮性肿瘤患者尿中 8-羟基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷的检测及意义 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2004, 20(6): 352-354.
- [11] 王旗, 贾光, 闫蕾, 王昕虹. 高效液相色谱 - 电化学检测法测定尿中 8-羟基脱氧鸟嘌呤含量 [J]. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(4): 280-282.
- [12] 王天成, 贾光, 王翔, 闫蕾, 沈慧麒. 人尿中 8-羟基脱氧鸟嘌呤的 HPLC 电化学测定方法 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(4): 405-406.
- [13] 许茜, 王权, 赵传鹏, 藤蔓. 小鼠血清中 8-羟基鸟嘌呤的 HPLC 测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(12): 605-607.
- [14] 徐永俊, 徐顺清, 周宜开. 细胞 DNA 中 8-OH-dG 的毛细管区带电泳检测方法的研究 [J]. *卫生研究*, 2005, 34(5): 539-542.
- [15] PILGER A, NANCISITS S, GERMADNIL D, RÜDIGER H W. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B* 2002, 778(1/2): 393-401.