

化学发光法测定尿液中 8-羟基脱氧鸟苷^①

颜流水^② 熊萌瑶 郭会琴 任艳 黄燕

(南昌航空大学环境与化学工程学院 南昌市丰和南大道 696 号 330063)

摘要 利用 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)在酸性邻菲咯啉(Phen)-Cu 化学发光体系中发光信号强的特点,建立了一种测定尿样中 8-OHdG 含量的方法。本方法的线性范围为 1.67—333.33 $\mu\text{g/L}$,检出限($S/N=3$)为 0.83 $\mu\text{g/L}$ 。对 167.00 $\mu\text{g/L}$ 的 8-OHdG 平行测定 11 次,其相对标准偏差为 1.2%。该法用于尿液中 8-OHdG 的测定,方法简便、灵敏、快速,分析结果令人满意。

关键词 化学发光; 8-羟基脱氧鸟苷; 固相萃取; 尿样

中图分类号: O657.39 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2011)06-2784-04

1 引言

8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxy deoxy guanosine, 8-OHdG)是活性氧簇(ROS)引起 DNA 氧化损伤的修饰产物之一^[1],它被公认为是 DNA 氧化损伤的一种主要标记物^[2]。体液中 8-OHdG 为代谢终产物,在体内稳定存在,因此尿中的 8-OHdG 有望成为评价个体癌变危险或诊断与自由基相关疾病的生物标记物^[3]。目前,已报道的 8-OHdG 的分析方法有高效液相色谱/紫外法^[4],高效液相色谱-电化学法^[5,6],高效毛细管电泳法^[7,8],气相色谱/质谱法^[9]等。这些方法普遍灵敏度不高,且有的操作繁琐。化学发光法具有灵敏、快速、简便等优点,但是目前用化学发光分析尿液中 8-OHdG 的报道还很少。因此本文建立了用化学发光分析实际尿液中 8-OHdG 的方法,对于提高药物质量、优化治疗效果有着重要意义。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

BPCL-K 型微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所); TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); Medi wax 管真空固相萃取装置(天津博纳艾杰尔科技有限公司); Cleanert ODSC18/OH(500mg/6mL)和 Waters Nova-Pak C18(200mg/3mL)固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

8-羟基脱氧鸟苷(美国 Sigma 公司); 邻菲咯啉(上海青析化工科技有限公司); 硫酸铜(上海青析化工科技有限公司); 抗坏血酸(天津市大茂化学试剂厂); 磷酸二氢钾[中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 醋酸钠(上海试四赫维化工有限公司); 实验所用试剂均为分析纯。实验用水为去离子双蒸水。

① 国家自然科学基金资助项目(20765003)

② 联系人,手机:(0)13698090252; E-mail: xiongmengyao1986@163.com

作者简介:熊萌瑶(1986—),女,江西省进贤县人,在读硕士,主要从事分析化学工作。

收稿日期:2011-03-11; 接受日期:2011-04-06

实际样品为乳腺癌患者尿样(江西肿瘤医院提供), 正常人尿样(自愿者提供), 不加任何防腐剂, -20°C 冰箱保存。

2.2 实验方法

2.2.1 尿样的预处理

尿样解冻后取 2mL, 加入 1mL 0.1mol/L 磷酸二氢钾($\text{pH}=7.5$), 混匀, 在低温高速离心机 12000r/min 离心 10min, 取 2.8mL 上清液备用。用 C_{18}/OH 柱进行固相萃取, 具体步骤为(1) 固相萃取(SPE)小柱的活化: 将固相萃取装置调为低真空度, 依次用 10mL 甲醇、5mL 去离子双蒸水和 10mL 0.1mol/L KH_2PO_4 ($\text{pH}=7.5$, 缓冲液 A) 冲洗柱子;(2) 加载尿样: 取 2.8mL 离心后的尿液, 以 2mL/min 的速度慢慢通过活化后的 SPE 小柱。(3) 清洗杂质: 用 3mL 缓冲液 A 冲洗柱子, 并在最大真空度下抽真空干燥柱子。(4) 洗脱样品: 用 3mL 15% 甲醇/缓冲液 A 洗脱, 收集洗脱液, 抽干。

2.2.2 化学发光分析

取 $150\mu\text{L}$ 的 CuSO_4 -Phen 混合液放入发光样品杯中, 加入 $450\mu\text{L}$ 0.1mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液($\text{pH}=5.4$, 缓冲液 B), 再分别加入不同样品过柱后的收集溶液 $250\mu\text{L}$, 将样品杯放入到样品池中放置 8min, 用注射器迅速依次注入 $150\mu\text{L}$ 的 Vc 和 $500\mu\text{L}$ 的双氧水, 迅速测定其发光动力学曲线。使各物质的终浓度分别为 CuSO_4 : $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, Phen: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, Vc: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, H_2O_2 : 5.0 mol/L 。

3 结果与讨论

3.1 化学发光动力学曲线

在 Phen- Cu^{2+} -Vc- H_2O_2 系统中, Phen 在金属离子的催化下与 H_2O_2 作用产生化学发光^[10]。在体系中加入 8-OHdG 后, 会产生一个延迟于 Phen 发光的慢的化学发光, 如图 1 所示。

3.2 化学发光反应条件的优化

考察了醋酸盐、硼酸盐、磷酸钠缓冲体系对发光行为的影响, 结果发现, 在硼酸盐和磷酸钠缓冲溶液中, 信号不稳定, 信噪比降低; 而在醋酸盐缓冲溶液中发光性质稳定且峰形良好。当醋酸盐缓冲溶液 pH 为 5.4 时, 相对化学发光信号到达最大。

H_2O_2 是 $\text{HO}\cdot$ 的来源, 因此其浓度对发光强度影响很大。结果表明, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 化学发光信号先增强后减弱, 当 H_2O_2 浓度为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时, 相对化学发光信号强度最大。随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 化学发光信号先增强后减弱, 当 Cu^{2+} 浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 相对发光强度最大。

3.3 固相萃取条件的优化

3.3.1 固相萃取柱的选择

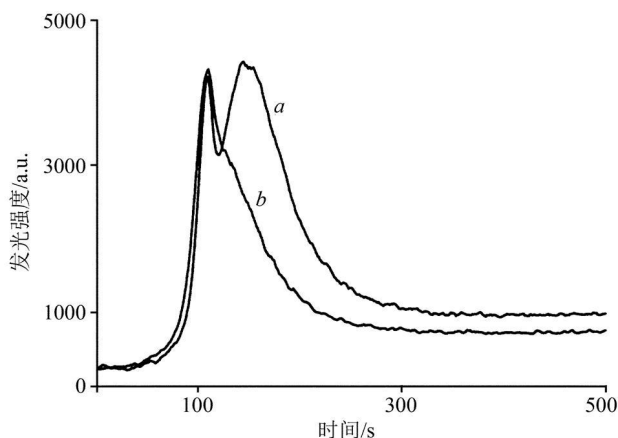


图 1 8-OHdG 的发光动力学曲线
a——含 8-OHdG($167\mu\text{g/L}$); b——不含 8-OHdG;
 CuSO_4 : $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, Phen: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,
Vc: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, H_2O_2 : 5.0 mol/L 。

会抑制发光体系本身的发光,而且不能检测出 8-OHdG 的发光,所以需要实际尿液进行前处理。实验过程中本文选用了两种常用的固相萃取柱, C₁₈柱和 C₁₈/OH 柱进行对比,分别用 C₁₈柱和 C₁₈/OH 柱按上述的固相萃取步骤对尿液进行过柱,结果如表 1 可以看出,尿样通过 C₁₈/OH 柱的回收率明显高于 C₁₈柱,这可能是因为 C₁₈/OH 柱的末端带有羟基,能够很好的与 8-OHdG 结合,更好的吸附尿液中的 8-OHdG。

表 1 C₁₈/OH 柱和 C₁₈柱对尿样中 8-OHdG 的回收率

固相萃取柱	加入标样浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测得量 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
C ₁₈ /OH 柱	167.0	162.0	97.0	98.2
		164.5	98.5	
		165.5	99.1	
		95.5	57.2	
C ₁₈ 柱	167.0	98.2	58.8	58.4
		98.9	59.2	

3.3.2 固相萃取条件的优化

固相萃取过程中淋洗液的 pH 对 8-OHdG 回收率的影响很大,因此考察了 pH 在 6.0—9.0 范围内对回收率的影响,结果表明,随着 pH 值的增加,8-OHdG 的回收率先增强后减弱,当 pH 为 7.5 时回收率达到最大。由于洗脱液对 8-OHdG 的洗脱能力的强弱直接影响回收率的大小,洗脱效果越好,回收率越大,因此在甲醇的含量从 0%—60% 的范围内,考察了甲醇含量对回收率的影响,结果表明当甲醇含量为 15% 时回收率最高,说明了当甲醇含量为 15% 时的洗脱效果最好。

3.4 校准曲线和检出限

在选定的最佳条件下,配制一系列不同浓度的 8-OHdG 标准溶液,测定每一个浓度下的化学发光强度,对所得的数据进行了回归分析,得 8-OHdG 在 1.67—333.33 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系,回归方程是 $y = 23.96x + 860.85$ (y ——相对发光强度, x ——8-OHdG 浓度),相关系数是 0.9995,由 IUPAC 推荐公式计算可得本方法对 8-OHdG 的检出限为 0.83 $\mu\text{g/L}$ 。

3.5 干扰实验

考察了实际样品中可能的共存物对浓度 16.7 $\mu\text{g/L}$ 的 8-OHdG 测定的影响,允许误差 $\leq \pm 5\%$ 。实验结果表明,1000 倍的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、鸟嘌呤(G),100 倍的 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、C、表面活性剂 SDS、CTAB、Tween80、葡萄糖、尿素,10 倍的脱氧鸟苷(dG)、鸟苷、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 都不干扰 8-OHdG 的测定。

3.6 实际样品的分析

对乳腺癌患者和正常人尿样先进行固相萃取后,再利用化学发光法对其中的 8-OHdG 含量进行了测定。表 2 为 56 名乳腺癌患者和 30 名正常人尿样中 8-OHdG 含量的比较,从结果可以看出,乳腺癌患者尿中 8-OHdG 含量明显高于正常人。

表 2 乳腺癌患者和正常人尿样中 8-OHdG 水平比较($\bar{x} + s$)

样品	样品数	8-OHdG 含量($\mu\text{g/L}$)
乳腺癌患者	56	67.602 \pm 27.991
正常人	30	5.772 \pm 1.564

3.7 加标回收率和精密度

分别在 3 个 2mL 相同正常人尿液中加入 1mL 浓度为 8.35、83.50、167.00 $\mu\text{g/L}$ 的 8-OHdG 标样,进行固相萃取后测其回收率,每个样重复测 3 次,结果如表 3,回收率为 94.0%—107.0%,精密度(RSD)为 1.16%—2.73%。对 167.00 $\mu\text{g/L}$ 的 8-OHdG 平行测定 11 次,其相对标准偏差为 1.2%。

表 3 不同空白尿样中加标回收率和精密度

原含量 ($\mu\text{g/L}$)	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测得总量 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	RSD (%)
6.32	8.35	14.50	98.0	2.08
		14.34	96.0	
		14.17	94.0	
6.32	83.50	90.91	101.3	2.73
		93.16	104.0	
		95.67	107.0	
6.32	167.00	166.64	96.0	1.16
		168.31	97.0	
		164.97	95.0	

4 结论

本实验应用固相萃取前处理步骤,能够很好的排除实际尿样中杂质的干扰,使实际尿样在发光体系中的发光能够很好的被化学发光仪检测出来。采用化学发光法分析人尿中的 8-OHdG,操作简便快捷,具有很宽的线性范围,而且检出限低,灵敏度非常高。可用于尿样中 8-OHdG 的常规检测,对于提高药物质量、优化治疗效果有着重要意义。

参考文献

- [1] 高瑞霄,姚朱华,邵红霞. 尿 8-OHdG 与糖尿病性动脉粥样硬化相关性的研究进展[J]. 天津医药, 2009, 37(9): 809—811.
- [2] Kasai H. Analysis of a Form of Oxidative DNA Damage, 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, as a Marker of Cellular Oxidative Stress during Carcinogenesis[J]. *Mutat Res.*, 1997, 387(3): 147—163.
- [3] 梅素容, 许国旺, 吴采樱. 人尿中 8-羟基脱氧鸟苷的气相色谱分析方法[J]. 分析化学, 2001, 29(12): 1394—1397.
- [4] 杨进, 杨国宇, 李宏基等. 化学发光法检测苯甲酸钠对 DNA 损伤的保护作用[J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 75—77.
- [5] 汪莉君, 邵华, 许光等. 高效液相色谱紫外法检测尿中 8-羟基脱氧鸟苷[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1030—1032.
- [6] 王旗, 贾光, 闫蕾等. 高效液相色谱-电化学检测法测定尿中 8-羟基脱氧鸟苷含量[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(4): 280—282.
- [7] Bruno S M, Maria L P B. Methodology for Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Analysis by HPLC with Electrochemical Detection[J]. *Pharmacological Res.*, 2002, 46(2): 129—131.
- [8] 梅素容, 蔡凌霜, 姚庆红等. 毛细管电泳-柱末安培检测癌症病人尿中 8-羟基脱氧鸟苷[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(11): 1987—1989.
- [9] Weiss J D, Lunte E C. Detection of a Urinary Biomarker for Oxidative DNA Damage 8-Hydroxydeoxyguanosine by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection[J]. *NIH Public Access*, 2000, 21(10): 2080—2085.
- [10] 梅素容, 王鹏, 吴采樱等. GC/MS 法测定尿中的 8-羟基脱氧鸟苷[J]. 华中科技大学学报, 2006, 34(5): 118—120.

Detection of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Urine Samples by Chemiluminescence Method

YAN Liu-Shui XIONG Meng-Yao GUO Hui-Qin REN Yan HUANG Yan

(College of Environment and Chemical Engineering, Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, P. R. China)

Abstract A chemiluminescence (CL) method was developed for determination of 8-OHdG for its characteristics of strong light signal in acid phenanthroline (Phen)-Cu CL system. The CL intensity was linear with the concentration of 8-OHdG in the range of 1.67—333.33 $\mu\text{g/L}$ under the optimum experimental conditions. The detection limit ($S/N = 3$) was 0.83 $\mu\text{g/L}$, and the relative standard deviation (RSD) was 1.2% for 167.00 $\mu\text{g/L}$ 8-OHdG ($n = 11$). The method for determination of urinary 8-OHdG is simple, sensitive, rapid and satisfactory.

Key words Chemiluminescence; 8-Hydroxydeoxyguanosine; Solid Phase Extraction; Urine Samples