2025 年 4 月 色 谱 Vol.43 No.4
April 2025 Chinese Journal of Chromatography 317～325

研究论文 DOI：10.3724/SP.J.1123.2024.10003

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿液中 4 种氧化应激生物标志物

冯壮壮，林 潇，包得军，胡小键，张海婧，朱 英*，张 续*

（中国疾病预防控制中心环境与人群健康重点实验室，中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所，北京 100021）

摘要：基于超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS），建立了人尿液中 8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）、8-羟基鸟苷（8-OHG）、羟基壬烯巯基尿酸（HNEMA）和双酪氨酸（diY）等 4 种氧化应激生物标志物的测定方法。用水将 0.2 mL 尿样稀释 5 倍后，样品经 Oasis HLB 柱进行富集净化；先用 2%（体积分数）甲醇水溶液洗脱 diY，再用甲醇洗脱 8-OHdG、8-OHG 和 HNEMA，收集洗脱液后分别进样分析；以甲醇和 0.05%（体积分数）乙酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱，Acquity UPLC HSS T3 色谱柱进行色谱分离。分别在正离子电喷雾（ESI^+）和负离子电喷雾（ESI^-）多反应监测（MRM）模式下扫描化合物，同位素内标法定量。4 种氧化应激生物标志物在 0.01～100 μg/L 范围内线性关系良好，相关系数均≥0.999 8；检出限为 7～18 ng/L，定量限为 22～60 ng/L；4 种氧化应激标志物在低、中、高 3 个水平下的加标回收率分别为 103.0%～105.6%（8-OHdG）、100.8%～104.2%（8-OHG）、97.2%～100.2%（diY）和 96.9%～106.0%（HNEMA）。采用本方法测定 40 份尿液样本，结果表明 8-OHdG、8-OHG、diY 和 HNEMA 的检出率均为 100%；检出质量浓度范围分别为 0.52～14.40 μg/L、2.75～38.15 μg/L、8.92～82.28 μg/L 和 1.74～575.29 μg/L，中位值分别为 2.89、12.36、37.66 和 96.92 μg/L。该方法操作简单，灵敏度高，精密度好，适用于开展人尿液中 4 种氧化应激生物标志物的测定。

关键词：固相萃取；超高效液相色谱-串联质谱法；氧化应激生物标志物；尿液；人体生物监测

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Determination of four oxidative stress biomarkers in human urine using solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FENG Zhuangzhuang, LIN Xiao, BAO Dejun, HU Xiaojian, ZHANG Haijing, ZHU Ying*, ZHANG Xu*

(*China CDC Key Laboratory of Environment and Population Health, National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China*)

Abstract: Oxidative stress biomarkers are measurable biological indicators that reflect the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to neutralize them using antioxidants. Elevated oxidative stress is associated with a number of health effects. Herein, we report the development of a comprehensive and sensitive method for quantifying four typical oxidative stress biomarkers in human urine using solid-phase extraction (SPE) in conjunction with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The quantified biomarkers include L,L-dityrosine (diY), 8-hydroxy-2′-

收稿日期：2024-10-09

* **通讯联系人**. Tel：(010)50930164，E-mail：zhangxu@nieh.chinacdc.cn（张续）；Tel：(010)50930161，E-mail：zhuying@nieh.chinacdc.cn（朱英）.

基金项目：国家自然科学基金（22106154）.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 22106154).

deoxyguanosine (8-OHdG), 8-hydroxyguanosine (8-OHG), and 4-hydroxynonenal mercapturic acid (HNEMA), which are markers of oxidative-stress-related damage in proteins, DNA, RNA, and lipids, respectively. To that end, we systematically optimized the MS parameters, SPE cartridge, and elution conditions of the method. Briefly, 0.2 mL of a urine sample was mixed with 0.8 mL of pure water, after which an internal-standard mixture was added. The four target analytes were enriched and purified using an HLB SPE cartridge. The diY and the other three compounds were eluted with 2% (volume fraction) methanol aqueous solution and methanol, respectively. The two groups of eluates containing different target analytes were separately injected onto an Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) and gradient eluted using 0.05% (v/v) acetic acid aqueous solution and methanol. The target analytes were identified using both negative and positive electrospray ionization (ESI^- and ESI^+) and multiple reaction monitoring (MRM) modes, and quantified using stable-isotope-labeled internal standards. The four typical oxidative-stress biomarkers exhibited good linearities within the mass concentration range of 0.01−100 μg/L, with correlation coefficients ≥0.999 8, and limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of 7−18 and 22−60 ng/L, respectively. The spiked recoveries of the target analytes at three levels (5, 10 and 50 μg/L) were 103.0%−105.6% (8-OHdG), 100.8%−104.2% (8-OHG), 97.2%−100.2% (diY) and 96.9%−106.0% (HNEMA), with intra-day precisions of between 1.6% and 5.2%. Moderate-to-strong matrix effects of between 42% and 137% were observed for each target analyte. The target compounds exhibited weak matrix effects of 99%−102% (8-OHdG), 97%−98% (8-OHG), 97%−106% (diY), and 94%−110% (HNEMA) after adjustment using the stable-isotope-labeled internal-standard method. The developed method was used to determine the abovementioned four typical oxidative stress biomarkers in 40 urine samples. All target compounds were detected in human urine at rates of 100%, with mass concentrations of 0.52−14.40 μg/L, 2.75−38.15 μg/L, 8.92−82.28 μg/L, and 1.74−575.29 μg/L recorded for 8-OHdG, 8-OHG, diY, and HNEMA, respectively, along with median values of 2.89, 12.36, 37.66, and 96.92 μg/L, respectively. The developed method is simple to operate, highly sensitive, and is very precise and accurate; consequently, it is suitable for determining the abovementioned four typical oxidative stress biomarkers in human urine.

Key words: solid-phase extraction (SPE); ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); oxidative stress biomarkers; urine; human biomonitoring

氧化应激是指机体产生的活性氧与抗氧化防御系统失衡,从而引发一系列的氧化应激反应,最终导致细胞、蛋白质、DNA、RNA 氧化应激损伤[1-3]。氧化应激在人体生物监测领域发挥重要作用,通过分析尿液中氧化应激生物标志物的含量,能有效评估个体或群体对环境污染物暴露后的生理反应,对于早期发现污染物暴露的健康危害、评估污染物健康风险及影响具有重要意义。

常用于污染物暴露健康评估的氧化应激标志物有 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、8-羟基鸟苷(8-OHG)、羟基壬烯巯基尿酸(HNEMA)和双酪氨酸(diY)等,分别用于反映机体中 DNA、RNA、脂质和蛋白质的氧化损伤[4-7]。目前,氧化应激生物标志物的检测方法主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)[8]、高

引用本文:冯壮壮,林潇,包得军,胡小键,张海婧,朱英,张续. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿液中 4 种氧化应激生物标志物. 色谱,2025,43(4):317−325.

FENG Zhuangzhuang, LIN Xiao, BAO Dejun, HU Xiaojian, ZHANG Haijing, ZHU Ying, ZHANG Xu. Determination of four oxidative stress biomarkers in human urine using solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(4): 317−325.

效液相色谱法(HPLC)[9]、气相色谱-质谱法(GC-MS)[10]和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)[11]。其中,ELISA 只适用于某一类标志物的测定,且存在方法检出限较高和特异性弱等问题,进而影响测定结果的准确性[8]。GC-MS 需要对目标分析物进行衍生化处理,存在操作繁琐且处理效率低等缺点[10]; HPLC 存在 DNA 酶解不完全、干扰物质同时被洗出,导致测量值与真实值存在较大偏差等问题[12]。LC-MS 虽然能够实现准确定量,但已报道的样品前处理方法多采用直接稀释法,如 Hua 等[13]用含 0.1% 乙酸的甲醇水溶液将尿液稀释 3 倍后进行测定,Yan 等[14]用 15 mmol/L 乙酸铵将尿液稀释 10 倍后测定。上述前处理方法虽操作简单,但是不能有效去除尿液中的无机盐组分,不适合大批量的样品测定。此外,已有分析方法所涉及的氧化应激生物标志物类别较少[15,16],缺乏同时检测可反映多系统氧化应激损伤标志物的分析方法,这也导致目前无法对污染物引发的机体氧化损伤进行全面评估。因此,亟需建立一种可同时检测 DNA、RNA、蛋白质和脂质氧化应激生物标志物的方法,为环境污染物暴露所导致的氧化应激损伤提供更加充足的证据。

本研究基于超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)建立了人尿液中 8-OHdG、8-OHG、HNEMA、diY 4 种氧化应激生物标志物的分析方法。该法操作简便,灵敏度高,结果准确,精密度好,适于开展尿液中多种氧化应激生物标志物的分析测定。

1　实验部分

1.1　仪器、试剂与材料

I-Class Plus 型超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(TQ-XS,美国 Waters 公司),Vortex-Genie2 涡旋混匀器(美国 Scientific Industries 公司),AP-25D 电子天平(美国 Ohaus 公司),24 孔固相萃取装置(美国 Supelco 公司),Milli-IQ-7005 纯水机(美国 Milli-pore 公司),MULTIVAP-48 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

8-OHdG(纯度>98%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;8-OHG(纯度>98%)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;diY(纯度>98%)购自美国 Med Chem Express 公司;HNEMA(纯度>98%)购自美国 Good Laboratory Practice Bioscience 公司;$^{13}C_{12}$-diY(纯度>98%)购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;^{13}C-$^{15}N_2$-8-OHG(纯度>98%)购自广州佳途科技有限公司;^{13}C-$^{15}N_2$-8-OHdG 和 D_3-HNEMA 购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司(纯度均>95%);甲醇、乙腈(MS 级,德国 Merck 公司);乙酸(MS 级,美国 TIEDA 公司);实验用水由 Milli-IQ-7005 纯水机产生。Waters Oasis HLB 固相萃取柱(3 mL, 60 mg)。

人群尿液样本采自北京某区,共 40 份,项目已获中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所伦理委员会批准(批准号:202105)。

1.2　实验条件

1.2.1　色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相 A:0.05%(体积分数)乙酸水溶液;流动相 B:甲醇;进样量:10 μL;柱温箱温度 40 ℃;流速:0.25 mL/min;梯度洗脱:0~0.5 min, 99% A; 0.5~3.5 min, 99% A~35% A; 3.5~4.0 min, 35% A~0A; 4.0~8.5 min, 0A; 8.5~8.6 min, 0A~99% A; 8.6~12.0 min, 99% A。

1.2.2　质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI)源;电离方式:8-OHdG、8-OHG 和 diY 采用正离子模式(ESI^+),HNEMA 采用负离子模式(ESI^-);扫描模式:多离子反应监测(MMR)模式;毛细管电压:2.46 kV;离子源温度:150 ℃;脱溶剂温度:500 ℃。4 种目标物及其稳定同位素内标的详细质谱参数见表 1。

1.3　溶液配制

混合标准储备液(4 mg/L):准确称取 4 种氧化应激标志物标准品各 1.000 mg 至 10 mL 容量瓶中,甲醇定容后,将单标储备液放置。准确移取 4 种单标储备液 1.0 mL 至 25 mL 容量瓶中,甲醇定容,配制成质量浓度为 4 mg/L 的混合标准储备液。将混合标准储备液分装至 2 mL 安瓿瓶中,封口后于 -80 ℃保存。

混合同位素内标储备液(4 mg/L):采用配制混合标准储备液相同的方法配制 4 种目标分析物的同位素内标储备液。使用时用水将混合同位素内标储备液稀释至 1 mg/L 。

系列标准溶液配制:用纯水将混合标准储备稀释为 10、100、1 000 μg/L 的混合标准使用液,吸取适量混合标准使用液,配制成质量浓度为0.01、

表 1 4 种氧化应激生物标准物及其稳定同位素内标的质谱参数

Table 1 MS parameters of the four target compounds and their stable isotope internal standards

Compound	Retention time/min	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone voltages/V	Collision voltages/V
diY	2.94	361.2	254.1/315.1*	+25/+25	+22/+15
8-OHdG	3.48	284.1	140.0/168.0*	+18/+18	+30/+12
8-OHG	3.29	300.1	140.1/168.1*	+15/+15	+30/+15
HNEMA	5.45	318.4	162.0/171.1*/189.0	−18/−18/−18	−10/−20/−12
$^{13}C_{12}$-diY	2.94	373.3	266.2/327.3	+20/+20	+25/+15
^{13}C-$^{15}N_2$-8-OHdG	3.48	287.1	171.1	+20	+15
^{13}C-$^{15}N_2$-8-OHG	3.29	303.1	171.1	+20	+15
D_3-HNEMA	5.42	321.1	165.1/189.1	−20/−20	−13/−13

diY: L,L-dityrosine; 8-OHdG: 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine; 8-OHG: 8-hydroxyguanosine; HNEMA: 4-hydroxynonenal mercapturic acid. * Quantitative ion.

0.1、0.5、1、5、10、20、50、100 μg/L 的系列标准溶液,内标添加量为 10 μg/L。

1.4 样品前处理

样品准备:尿液样品由−80 ℃平衡至 4 ℃,再平衡至室温。涡旋振荡尿液,取 0.2 mL 尿样于 5 mL 聚丙烯离心管中,依次加入 0.8 mL 水以及 0.1 mL 质量浓度为 100 μg/L 的混合同位素内标溶液(相当于 10 ng 内标),充分混匀后进行固相萃取。

固相萃取:使用 3 mL 甲醇和 3 mL 纯水活化和平衡 Waters Oasis HLB 固相萃取柱;将离心管中样品全部转移至固相萃取柱中,在不施加压力的情况下依靠自然重力过柱。样品过柱后,空气抽干 2 min;用 1 mL 2%(体积分数)甲醇水溶液进行洗脱,收集洗脱液,用于分析 diY。空气抽干 1 min,再用 1.5 mL 甲醇进行洗脱,氮吹至 0.5 mL,加水 0.5 mL,继续氮吹至 0.5 mL,用初始流动相进行复溶至 1 mL,用于分析 8-OHdG、8-OHG 和 HNEMA。

2 结果与讨论

2.1 质谱参数优化

配制质量浓度为 100 μg/L 的目标分析物混合标准溶液,并对目标化合物及内标物质的质谱条件进行优化,包括母离子、子离子、锥孔电压和碰撞能量等参数。利用 Intelli Start 模式自动识别目标化合物的母离子和子离子。通过手动模式进行验证,以确定目标化合物的母离子和锥孔电压;最后对子离子和碰撞能量进行进一步的验证,确保子离子的信号强度最大化。具体参数见表 1。

2.2 液相色谱条件优化

2.2.1 色谱柱选择

比较了 Acquity BEH C_{18}(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Acquity HILIC (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm)和 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 4 种不同色谱柱对目标分析物的色谱分离效果。结果显示,当以甲醇-水作为流动相时,HILIC 柱对 4 种目标分析物的保留及分离效果均较差,4 种目标分析物的保留时间在 1.0 min 内。在实际测定时易受到基质干扰而影响定量结果。对比 BEH C_{18}和 HSS T3 色谱柱的分离效果,结果显示在相同流动相体系下,diY、8-OHdG 和 8-OHG 经 HSS T3 柱分离后的质谱响应信号优于 BEH C_{18}柱。因此,实验选择 HSS T3 柱作为色谱柱。进一步比较两种不同规格的 HSS T3 柱对目标物的分离效果,发现当以 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm 规格的 T3 色谱柱为分析柱时,HNEMA 的色谱峰形更优,且其他 3 种目标分析物兼具更好的分离效果和更高的质谱响应信号。因此,在兼顾灵敏度和分离效果的前提下,实验选择以 Acquity UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)作为色谱柱进行目标分析物分离。

2.2.2 流动相选择

确定色谱柱后,分别以甲醇-水和乙腈-水作为流动相,通过比较目标分析物的色谱峰形和质谱响应来评估两种流动相体系的洗脱效果,结果如图 1 所示。相比于甲醇,乙腈虽然具有更好的洗脱能力,但采用乙腈-水体系时 4 种氧化应激生物标志物的质谱响应信号明显低于甲醇-水体系。此外,考虑到甲醇成本更低,且毒性也更低。因此,实验最终选择甲醇-水流动相体系进行目标分析物梯度洗脱。

向流动相中加入适量甲酸或乙酸,可以改善目标分析物在色谱柱上的分离效果,改善色谱峰峰形[17]。因此,分别向甲醇-水流动相体系中加入同体积的甲酸和乙酸,比较甲酸和乙酸对色谱分离的

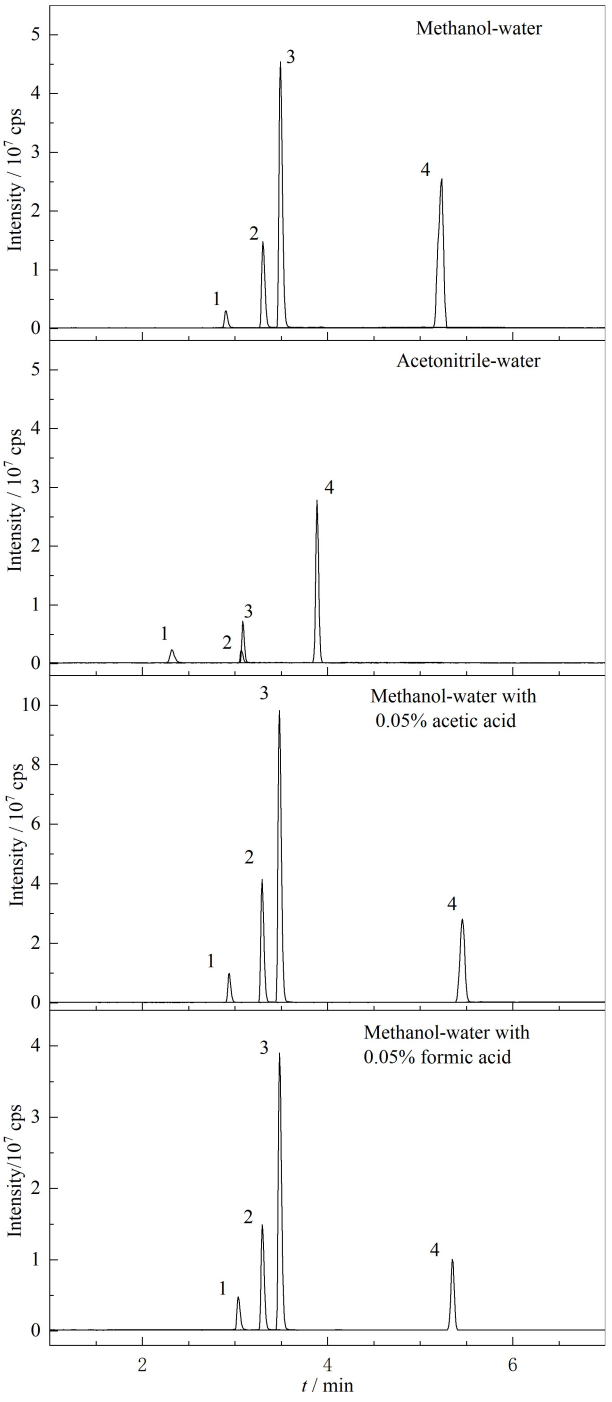


图 1　不同流动相条件下 4 种目标物(10 μg/L)的色谱图

Fig. 1　Chromatograms of the four target compounds (10 μg/L) with different mobile phases

1. diY; 2. 8-OHG; 3. 8-OHdG; 4. HNEMA.

影响。当向流动相中添加 0.05%(体积分数)乙酸后,diY、8-OHG 和 8-OHdG 的质谱响应信号明显优于甲醇-纯水体系。其原因是乙酸的加入改变了目标分析物的离子化状态,使这些目标分析物更易电离。对比添加甲酸的色谱图,乙酸改善目标物在色谱柱上的分离效果明显优于甲酸,其峰形更加尖锐,质谱响应信号更好。进一步,为确定乙酸的最优添加比例,分别向流动相中加入 0.05% 和 0.1%(体积分数)的乙酸,比较不同乙酸添加比例对色谱分离的影响。结果显示,当添加体积分数为 0.1% 乙酸时,HNEMA 的质谱响应信号受到明显抑制。因此,实验最终选择 0.05%(体积分数)乙酸水溶液为 A 相,甲醇为 B 相进行梯度洗脱。

2.3　前处理条件优化

2.3.1　固相萃取柱选择

比较了 Envi-carb(3 mL, 250 mg, Merck 公司)、Oasis MAX(3 mL, 60 mg, Waters 公司)和 Oasis HLB 3 种固相萃取柱对目标分析物的富集效果。分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 纯水活化 3 种固相萃取柱,之后进行加标尿液的上样,并收集上样滤过液;分别使用 3 mL 甲醇淋洗 Envi-carb 和 Oasis MAX 柱, 3 mL 纯水淋洗 HLB 柱,同时收集淋洗液;最后采用 3 mL 二氯甲烷、3 mL 2%(体积分数)甲酸甲醇和 3 mL 甲醇分别洗脱 Envi-carb、Oasis MAX 和 Oasis HLB 柱,同时收集洗脱液。通过对上样滤过液、淋洗液和洗脱液中的目标分析物进行分析,评估 3 种固相萃取柱的富集效果。结果显示,经 MAX 柱和 HLB 柱处理后的洗脱液中,均可检出 8-OHdG、8-OHG 和 HNEMA 的高强度质谱响应信号,这表明上述两种固相萃取柱对 8-OHdG、8-OHG 和 HNEMA 均有较好的富集效果。但上述两种固相萃取柱对 diY 的富集效果却不相同。经 MAX 柱处理后,上样滤过液中可见 diY 的高强度质谱响应信号,而淋洗液和洗脱液中未检出 diY。这表明 diY 在上样过程中已随样品流失,无法在 MAX 柱上实现有效富集。当使用 HLB 柱处理样品时,diY 在样品滤过液和淋洗液中都存在较高的质谱响应信号,而在洗脱液中无明显质谱响应信号,这说明 diY 可被 HLB 柱吸附,但吸附力较弱。而对于 Envi-carb 固相萃取柱而言,虽在其上样滤过液和淋洗液中均未检出目标分析物,但其对目标分析物的吸附能力太强,除二氯甲烷外,采用多种不同极性溶剂均无法实现目标分析物的有效洗脱。因此,综合考虑目标分析物在 3 种不同固相萃取柱上的吸附与洗脱,最终选择 Oasis HLB 柱进行固相萃取。

2.3.2　上样条件优化

为增加 diY 在 HLB 柱上的富集效果,将 6 个不同来源的尿液分别用水稀释 2 倍、5 倍和 10 倍,随

后向稀释后的样品中加入等量 diY 内标，以内标的提取效率评估样品稀释对 diY 吸附的影响。结果显示，随着稀释倍数增加，diY 内标的提取效率分别为 35.3%、58.6% 和 59.5%。可见，对样品进行稀释可显著改善 diY 在 HLB 上的富集。其原因可能是尿液中可能含有与目标分析物产生竞争结合的基质干扰物，在尿液稀释后，其基质成分浓度降低，从而减少了对目标分析物的干扰，提高了 diY 的富集效果。

在获得稀释倍数后，继续使用不同体积分数（0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%）的甲酸水溶液和乙酸水溶液对尿液进行稀释，考察不同酸性条件下 diY 在 HLB 柱上的富集情况。结果显示，采用甲酸水溶液稀释尿液能够增加 diY 在 HLB 柱上的富集；但同时 HNEMA 的加标回收率却随着甲酸体积分数增加而相应变低（如图 2）。当甲酸体积分数为 0.5% 时，HNEMA 的回收率仅为 58%；而其余 3 种目标分析物的加标回收率为 98%～103%。推测原因是甲酸能够促进 D_3-HNEMA 分子中氘原子与质子发生交换反应。随着时间的推移，氘的交换过程逐渐进行，导致 D_3-HNEMA 分子丢氘，形成更易于离子化的形式，从而使其质谱信号不断增加。而用乙酸水溶液进行样品稀释后，既不能增加 diY 在 HLB 柱上的保留，也对 4 种目标分析物的加标回收率没有造成影响（4 种目标分析物的加标回收率为 93%～105%）。因此，实验最终选择用水将样品稀释 5 倍后进行固相萃取。

为进一步提高 diY 在 HLB 柱上的保留，分别用水和甲醇作为基质配制内标使用液，并在两种配制方法下向尿液中加入等体积使用液，比较 diY 在两种加标方式下的富集效果。结果显示，与甲醇相比，用水配制内标使用液并添加内标后，diY 的提取效率从 59% 提高至 70%。其原因是使用甲醇配制的内标使用液在加标过程中引入了更多的甲醇基质，导致上样时样品极性变弱，不利于 diY 在 HLB 柱上保存。因此，实验最终选择以水为基质配制内标使用液并进行内标添加。

2.3.3 洗脱溶剂选择

考察了不同体积分数的甲醇水溶液对 diY 的洗脱效果。向尿液中加入 10 ng 混合内标，样品过 HLB 柱后，用 1 mL 含 1%、2%、5%、10% 甲醇的水溶液进行第一步洗脱。结果显示，diY 内标在洗脱液中的色谱峰面积随甲醇比例的提高而增加。但当甲醇体积分数为 5% 时，洗脱液中 8-OHG 内标的色谱峰峰面积显著增加。原因是随着甲醇体积分数增加，洗脱液的极性逐渐变弱。弱极性试剂在反相吸附柱上的洗脱强度更大，进而使样品中的 8-OHG 被洗出而出现样品损失，进一步影响 8-OHG 的提取效率。因此，实验最终选择 2% 体积分数的甲醇水溶液进行第一步洗脱。

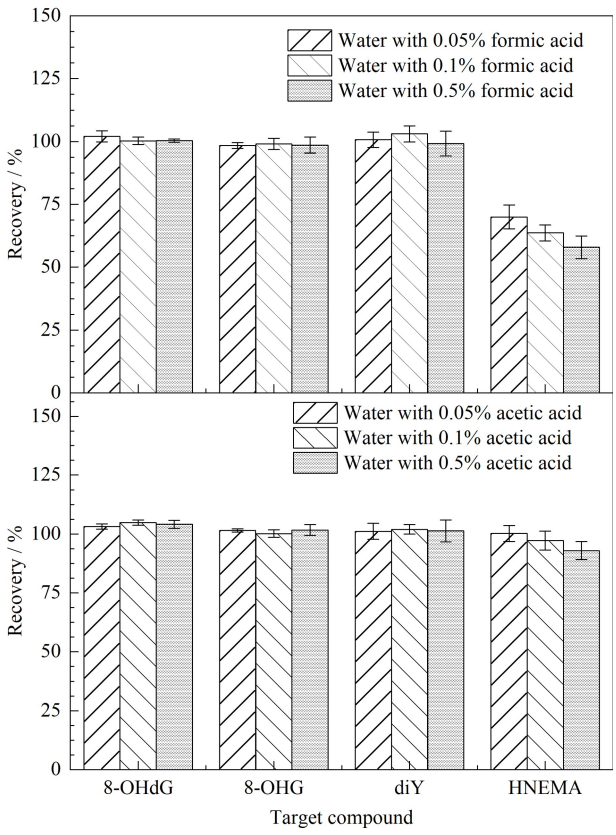


图 2 采用不同稀释溶剂时 4 种目标物的加标回收率（$n=3$）

Fig. 2 Recoveries of the four typical target compounds with different dilution solvents ($n=3$)

完成 diY 洗脱优化后，继续比较了甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷 4 种洗脱溶剂对 8-OHdG、8-OHG 和 HNEMA 的洗脱效果。3 种物质的加标回收率如图 3a 所示，以二氯甲烷为洗脱溶剂时，3 种目标分析物的加标回收率结果明显低于其他 3 类洗脱溶剂；而经甲醇、乙腈、乙酸乙酯处理后 3 种目标分析物的加标回收率差异不明显。为获得较优的洗脱条件，向处理前的实际尿液中加入 3 种目标分析物标准品，采用本方法进行前处理后进样，得到 3 种目标分析物定量离子峰面积；同时，对相同的实际尿液进行前处理，并向处理后的基质中加入等量标准品，再次进样后得到 3 种目标分析物的定量离子峰面积。通过两次峰面积的比值，获得了 3 种不同洗脱溶剂条件下目标分析物的提取效率。结果如

图 3b,以甲醇为洗脱溶液时各目标分析物的提取效率为 102.9%、100.2%、97.1%,高于乙腈和乙酸乙酯。因此,最终实验选择以甲醇作为第二步洗脱溶剂。

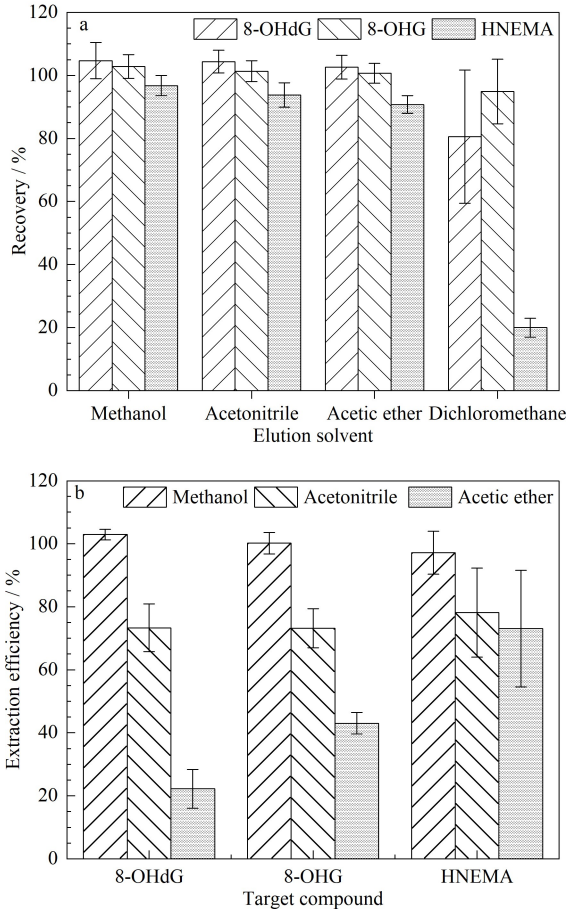


图 3　目标物在不同洗脱溶剂条件下的(a)回收率和(b)提取效率(n=6)

Fig. 3　(a) Recoveries and (b) extraction efficiencies of the targets with different eluting solvents (n=6)

2.4　基质效应

分析方法的精密度和准确性可能受到样本中复杂基质的影响,因此应该对方法的基质效应进行评估,进一步判断整个处理过程是否需要用内标进行校正。按照文献[18,19]的方法,选用 6 个不同来源的尿液,按照本研究的前处理方法进行处理,以 6 个尿液样品检测前的溶液为基质配制尿液基质标准溶液,同时以水为基质配制相同浓度的标准溶液。以两条标准曲线斜率的比值来评估基质效应。ME 为 80%~120%时为弱基质效应,ME 为 50%~80%或 120~150%时表示中基质效应,ME 为<50%或>150%时表示强基质效应。结果如图 4a 所示,在 6 个不同尿液中,8-OHdG 和 diY 的 ME 分别为 58%~86%和 109%~137%,表现为从弱基质到中基质效应;而 8-OHG 和 HNEMA 的 ME 分别为 48%~63%和 42%~60%,表现为从中等基质效应到强基质效应。上述结果表明在定量过程中,需要使用同位素内标进行校正,以降低基质效应对定量结果的影响。图 4b 显示,经同位素内标校正后,8-OHdG、8-OHG、diY 和 HNEMA 的基质效应分别为 99%~102%、97%~98%、97%~106%和 94%~110%,均表现为弱基质效应。

2.5　方法学评价

2.5.1　线性范围、检出限与定量限

配制系列标准溶液,在本研究所述色谱条件和质谱条件下进行测定。以目标分析物及其相应同位素内标的定量离子的峰面积之比为纵坐标,以目标分析物的质量浓度为横坐标绘制标准曲线,标准曲线拟合时采用 $1/x$ 进行曲线加权,4 种目标分析物在标准曲线线性范围内线性关系良好,相关系数(r)均≥0.999 8;以 3 倍信噪比(S/N=3)计算检出限(LOD),10 倍信噪比(S/N=10)计算定量限

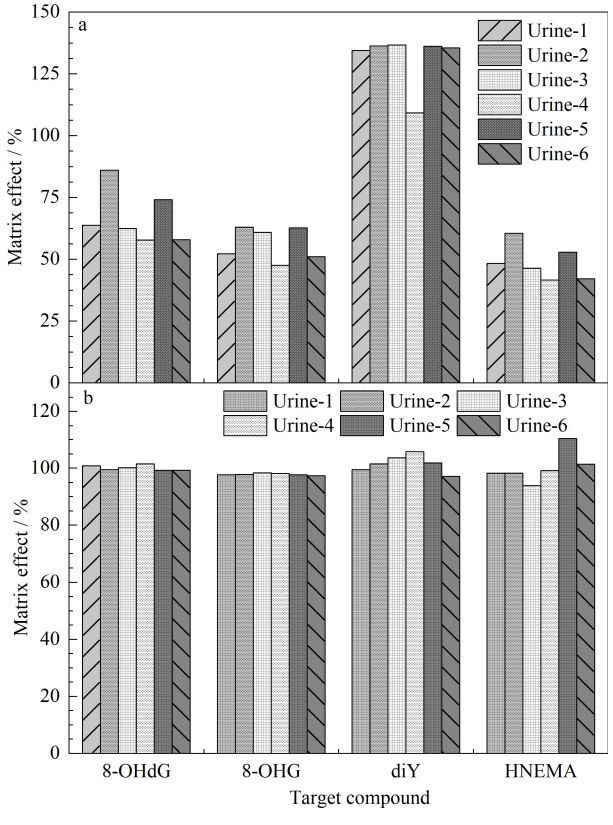


图 4　不同尿液中 4 种目标分析物的基质效应

Fig. 4　Matrix effects of the four target analytes in different urine samples

a. not adjusted with isotopic internal standard; b. adjusted with isotopic internal standard.

(LOQ)。4 种目标分析物的线性范围、相关系数、LOD 和 LOQ 见表 2。

表 2 4 种目标分析物的线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients (r), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of the four target compounds

Compound	Linear range/(μg/L)	r	LOD/(μg/L)	LOQ/(μg/L)
diY	0.01-100	0.9999	0.018	0.060
8-OHDG	0.01-100	0.9999	0.011	0.037
8-OHG	0.01-100	0.9998	0.010	0.034
HNEMA	0.01-100	0.9999	0.007	0.022

2.5.2 回收率与精密度

选择 6 个实际尿液样品进行低(5 ng/mL)、中(10 ng/mL)、高(50 ng/mL)3 个水平的加标回收试验。在同一自然日中,对同一实际尿样进行 6 次平行测定,评估方法日内精密度。详细结果如表 3 所示,8-OHdG、8-OHG、diY 和 HNEMA 的加标回收率分别为 103.0 ~ 105.6%、100.8% ~ 104.2%、97.2% ~ 100.2%、96.9% ~ 106.0%,日内精密度为 1.6% ~ 5.2%。

2.6 方法比较

如表 4 所示,目前已有的氧化应激标志物分析方法主要涉及 2~3 类氧化应激标志物的检测,缺少可以同时测定 DNA、RNA、脂质和蛋白质 4 类氧化应激标志物的分析方法;其次,本方法的 LOD 明显低于其他方法;最后,本方法的样本用量也处于较低水平,虽然文献[13]和文献[21]样本用量更少,但上述方法中目标分析物的加标回收率分别为 77% ~ 101% 和 88.7% ~ 95.4%,低于本研究所获得的加标回收率。因此,与其他研究相比,本方法在增加检测类别的同时也保证了方法的灵敏度和准确度,可为人群尿液样本中不同类型氧化应激标志物的同时检测提供可靠的技术支持。

2.7 实际样品测定

采用本方法测定了 40 份尿液样本中 4 种氧化应激生物标志物。结果显示,8-OHdG、8-OHG、diY 和 HNEMA 均可检出,检出率为 100%;检出质量浓度范围分别为 0.52 ~ 14.40 μg/L、2.75 ~ 38.15 μg/L、8.92 ~ 82.28 μg/L 和 1.74 ~ 575.29 μg/L,中位值分别为 2.89、12.36、37.66 和 96.92 μg/L。Yan 等[14]测定了广东省清远地区垃圾拆解地附近居民尿液中 8-OHdG、8-OHG、diY 的含量水平,发现 3 种氧化应激标志物的检出率分别为 91.3%、99.0%、100%,检出质量浓度的中位值分别为 8-OHdG 2.35 μg/L、8-OHG 14.50 μg/L和 diY 55.30 μg/L。与本研究相比,其较低的检出率可能是由于该研究采用直接稀释法处理尿液,导致方法检出限高于本研究所致;而较高的检出浓度可能是由于电子拆解地居民受到了多溴联苯醚、短链氯化石蜡等污染物暴露,进而导致氧化应激水平升高。Wu 等[21]测定得到的口腔黏膜炎病例队列人群尿液中

表 3 4 种目标分析物在低、中、高 3 个水平下的加标回收率和日内精密度(n=6)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of intra-day at low, medium and high levels of the four target compounds (n=6)

Compound	Low		Medium		High		Intra-day
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	RSD/%
diY	100.2	1.4	97.8	0.8	97.2	0.9	1.7
8-OHdG	105.6	1.4	104.9	1.4	103.0	0.8	1.6
8-OHG	104.2	0.7	100.9	0.9	100.8	1.1	1.8
HNEMA	106.0	4.1	102.0	4.5	96.9	2.2	5.2

表 4 本方法与文献报道的人尿液中氧化应激标志物检测方法的比较

Table 4 Comparison of the developed method with other reported methods for the determination of oxidative stress biomarkers in human urine

No.	Oxidative stress biomarker				n	Extraction method	Instrumental analysis method	LOD/(μg/L)	Sample volume/μL	Ref.
	DNA	RNA	Lipid	Protein						
1	√	√	/	√	3	/	HPLC-MS/MS	0.058-0.093	/	[11]
2	√	/	√	√	7	derivatization-SPE	HPLC-MS/MS	0.01-0.03	500	[20]
3	√	/	/	√	4	dilution	UPLC-MS/MS	0.007-0.083	50	[13]
4	√	/	√	/	4	SPE	HPLC-MS/MS	0.008-0.03	100	[21]
5	√	√	/	/	2	SPE	UPLC-MS/MS	/	200	[22]
6	√	/	√	/	2	SPE	UPLC-MS/MS	0.01-0.02	500	[23]
7	√	√	√	√	4	SPE	UPLC-MS/MS	0.007-0.018	200	this study

n: the total number of the target compounds in the method; √: mentioned; /: not mentioned.

8-OHdG(22.08 μg/L)和 HNEMA(100.15 μg/L)的中位浓度也高于本研究,其原因可能是本研究所检测人群为一般人群,其氧化应激水平一般低于病例人群。Martinez 等[20]测定了美国纽约人群尿液样本中的 diY,其中位质量浓度(0.99 μg/L)低于本研究,而 8-OHdG 中位质量浓度(9.18 μg/L)高于本研究,这可能是因为不同的环境因素、地理与人种因素引起的差异。

3　结论

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法建立了人尿液中 4 种氧化应激生物标志物的测定方法。对仪器和前处理条件进行了优化,从方法学指标和基质效应等方面对方法进行了评估,并进行了实际样品的测定。本方法具有操作简单、检测结果准确、检出限低和重复性好的优点,适用于人尿液中 4 种氧化应激标志物的分析测定。

参考文献:

[1] Qiu H Q, Shen X T, Liu J, et al. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2021, 47(5): 543
裘红权, 沈小铁, 刘璟, 等. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(5): 543

[2] Qiao M Y, Duan A R, Yu T, et al. Journal of Toxicology, 2024, 38(4): 277
乔梦芸, 段爱茹, 鱼涛, 等. 毒理学杂志, 2024, 38(4): 277

[3] Guo Z Y, Xu Y Y, Dai H M, et al. Environmental Chemistry, 2024, 43(1): 33
郭子毓, 徐玉艳, 代恒美, 等. 环境化学, 2024, 43(1): 33

[4] Zhu K, Wan Y, Zhu B, et al. Environ Pollut, 2024, 344: 123362

[5] Li M, Wan Y, Qian X, et al. Environ Int, 2023, 173: 107816

[6] Qian X, Wan Y, Wang A, et al. Environ Pollut, 2021, 289: 117913

[7] Cui R Z, Shi Z G, Huo M, et al. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2022, 39(11): 40
崔润芝, 史正刚, 霍曼, 等. 中医药信息, 2022, 39(11): 40

[8] Mello L D. Anal Biochem, 2021, 628: 114215

[9] Sun H, Hou J, Zhou Y, et al. Chemosphere, 2017, 174: 506

[10] Liu W, Morrow J D, Yin H. Free Radical Bio Med, 2009, 47(8): 1101

[11] Sun Y. [PhD Dissertation]. Nanjing: Southeast University, 2022
孙颖. [博士学位论文]. 南京: 东南大学, 2022

[12] Shi H X, Wu Z Y, Chen S Q, et al. Journal of Shenyang Medical College, 2019, 21(1): 79
史华旭, 吴子一, 陈世奇, 等. 沈阳医学院学报, 2019, 21(1): 79

[13] Hua L T, Gao Y F, Guo S, et al. Environ Sci Technol, 2024, 58(18): 7758

[14] Yan M Q, Cheng Z P, Zou Q, et al. Environment & Health, 2023, 1(6): 405

[15] Lee J D, Cai Q, Shu X O, et al. J Womens Health, 2017, 26(5): 467

[16] Erve T J, Kadiiska M B, London S J, et al. Redox Biol, 2017, 12: 582

[17] Zhang X, Han L X, Qiu T, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(3): 224
张续, 韩林学, 邱天, 等. 色谱, 2023, 41(3): 224

[18] Han L X, Zhang X, Hu X J, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(4): 312
韩林学, 张续, 胡小键, 等. 色谱, 2023, 41(4): 312

[19] Li J, Qiao Q D, Zhuang J X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(2): 170
黎娟, 乔庆东, 庄景新, 等. 色谱, 2016, 34(2): 170

[20] Martinez M P, Kannan K. Environ Sci Technol, 2018, 52(11): 6647

[21] Wu C, Chen S T, Peng K H, et al. Anal Bioanal Chem, 2016, 512: 26

[22] Chen Q, Hu Y, Fang Z, et al. Front Chem, 2020, 8: 606495

[23] Sambiagio N, Sauvain J J, Berthet A, et al. Antioxidants, 2020, 10(1): 38