

超高效液相色谱-串联质谱法检测尿液中

4-羟基壬烯醛-巯基尿酸

葛莉莉^{1,2}, 白原松^{1,2}, 胡玉鑫^{1,2}, 田福林^{1,2}, 徐苑苑^{1,2}

(1.环境应激与慢病防控教育部重点实验室(中国医科大学), 辽宁沈阳 110122; 2.中国医科大学公共卫生学院, 辽宁沈阳 110122)

摘要: 建立超高效液相色谱-串联质谱法检测尿液中4-羟基壬烯醛-巯基尿酸(HNE-MA)含量的分析方法。样品经Oasis HLB固相萃取小柱净化, C18色谱柱分离, 流动相使用1 mmol/L乙酸铵-水及甲醇, 多反应监测模式进行测定。该方法测得HNE-MA在0-100 ng/ml范围内, 标准曲线的线性关系良好($R^2 > 0.999$), 低、中、高剂量平均加标回收率在88.83%-100.61%之间。检出限为0.3628 ng/ml。该方法灵敏精准, 能有效地测定尿液中HNE-MA的含量。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 4-羟基壬烯醛-巯基尿酸; 尿液; 多反应监测模式

中图分类号: R-331

文献标识码: A

A method for the determination of 4-hydroxynonenal-mercaptouric acid in urine was established by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry

Ge Lili^{1,2}, Bai Yuansong^{1,2}, Hu Yuxin^{1,2}, Tian Fulin^{1,2}, Xu Yuanyuan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Environmental Stress and Chronic Disease Control & Prevention (China Medical University), Ministry of Education, Shenyang, Liaoning 110122, China; 2. School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China)

Abstract: To establish a method for the determination of 4-hydroxynonenal-mercaptouric acid (HNE-MA) in urine by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. The samples were purified by Oasis HLB solid phase extraction column. The mobile phase was eluted with 1 mmol/L ammonium acetate water and methanol. Multiple reaction monitoring mode was used for measurement. The detected HNE-MA levels were 17.2150-17.7666 ng/ml, the linear relationship of standard curves is good ($R^2 > 0.999$), and the average recoveries of low, medium, and high doses are between 88.83% and 100.61%. The detection limit was 0.3628

ng/ml. The method is sensitive and accurate, and can effectively determine the content of HNE-MA in urine.

Keywords: Ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; HNE-MA; Urine; Multiple reaction monitoring mode

环境暴露与人类健康密切相关。活性氧（ROS）是机体基础水平上产生的物质，通常能够被抗氧化剂中和。环境化学物质暴露可直接导致 ROS 含量增加，过量的 ROS 会攻击机体 DNA、脂质和蛋白质等大分子物质并造成氧化损伤，并可进一步导致疾病的发生^[1-3]。对氧化应激相关生物标志物的分析有助于阐明环境暴露对人体的影响。4-羟基壬烯醛-巯基尿酸（HNE-MA）是研究最多的脂质过氧化产物之一，主要通过尿液排出体外。因此，可通过分析尿液中 HNE-MA 的水平来研究环境暴露、脂质过氧化与疾病之间的关系^[4-5]。

由于 HNE-MA 是氧化应激的代表性生物标志物，因此准确测量 HNE-MA 含量有助于环境暴露与疾病的研究。本文建立了超高效液相色谱-串联质谱法检测尿液中的 HNE-MA，对前处理过程、色谱和质谱条件进行了优化，提供了一种更准确的方法进行尿液中 HNE-MA 的测定与分析。

1 实验

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、Agilent 6420 三重四极杆质谱仪、ET 3301A 氮吹仪、Milli-Q 超纯水器、Thermo Scientific Sorvall LegendMicro 17 & 21 微量离心机、涡旋振荡器。

样品：HNE-MA、HNE-MA-d3（Cayman）

试剂：色谱纯级别甲醇、乙酸铵、娃哈哈纯净水。

耗材：Oasis HLB 固相萃取小柱（60mg/3cc，Waters）、2 mL 注射器、棕色进样瓶、内衬管、有机相尼龙针式滤器。

1.2 溶液配制

1) **储备液**：将 HNE-MA 内标、外标原液分别用甲醇稀释为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的储备液，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2) **工作液**：将 HNE-MA 内标、外标储备液分别用甲醇稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ 进行实验。

1.3 仪器工作条件

1) **色谱条件**：柱温 20 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 1 μl ，流速 0.2 ml/min。流动相：A 为 1 mmol/L 乙酸铵-水，B 为甲醇溶液，流动相梯度如表 1 所示。