

Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-羟基-2'-脱氧鸟苷固相微萃取性能研究

彭传云,袁慕坤,李舒琪,刘红燕,张少文,吴春来,赵丹,苗亚磊

(洛阳理工学院 环境工程与化学学院,洛阳 471023)

摘要:8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG)常用于评价个体 DNA 氧化损伤,是一个典型的生物标记物.利用溶胶凝胶法通过自组装技术分别将 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 固载到硅胶中,应用于复杂样品中痕量 8-OHdG 的固相微萃取(SPME).在优化后的萃取条件下,结合高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV),构建了尿样中 8-OHdG 的定量分析方法.结果表明,Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 的富集倍数分别达到 61.64 和 51.20,具有良好的萃取性能;新建立 SPME-HPLC-UV 分析检测方法的线性范围分别为 0.91~100 和 1.22~100 nmol·L⁻¹,R²>0.99,方法的检测限 LOD_s(S/N=3)为 0.31 和 0.42 nmol·L⁻¹.3 个浓度加标实验显示,基于 Cu²⁺ 固载硅胶整体柱建立的分析方法加标回收率在 91.5%和 102.0%之间,日内和日间 RSDs 在 2.7%至 9.7%之间(n=3).说明构建的 SPME-HPLC-UV 分析方法可以灵敏、可靠、准确地检测实际尿样中的 8-OHdG.

关键词:Cu²⁺ 固载硅胶整体柱;Zn²⁺ 固载硅胶整体柱;溶胶-凝胶;固相微萃取;8-OHdG

中图分类号:O657

文献标志码:A

文章编号:1000-2367(2025)04-0099-08

8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG),是生物体内 DNA 分子的鸟嘌呤第 8 个碳原子被过氧化氢、超氧阴离子和羟基自由基等活性氧氧化损伤后形成的产物,常被认为是 DNA 氧化损伤的生物标志物^[1-2].据研究报道^[3-4],生物体内 8-OHdG 的浓度水平与 DNA 鸟嘌呤分子的损伤程度相关,同时,基因突变、致癌、衰老等过程均由损伤的 DNA 分子引起,因此 8-OHdG 通常用作评价环境污染、退行性病变、衰老和癌症等的相关标志物.准确、灵敏、快速检测人体尿液中 8-OHdG 的含量对监测人体健康状况具有重要意义.

目前,常用的检测尿液中 8-OHdG 的方法有酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[5]、高效液相色谱电化学检测(high performance liquid chromatography electro-chemical detectors, HPLC-ECD)^[6-7]、高效液相色谱紫外检测(high performance liquid chromatography ultraviolet detectors, HPLC-UV)^[8]和液相色谱质谱联用(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)^[9-11]等方法,其中 HPLC-UV 检测方法因其具有快速、操作简单、成本低等优势,被广泛应用于 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 的定量检测.为了提高检测结果的准确性和灵敏度,在实际样品前处理过程中,常利用固相萃取(SPE)或固相微萃取(SPME)减小基质影响同时提升分析对象浓度^[12-13].例如:聚苯乙烯/二乙烯苯/阳离子交换 SPE 小柱被用来净化和萃取富集尿样中的 8-OHdG,结合 UPLC-MS-MS,所建立的分析方法检出限低至 0.15 μg/L,具有较高的灵敏度^[14].8-OHdG 分子印迹整体柱作为 SPME 介质,因其具有高效的富集效率和

收稿日期:2024-05-17;**修回日期:**2024-07-01.

基金项目:国家自然科学基金(22104046);河南省科技攻关项目(252102411006);河南省自然科学基金(232300420394).

作者简介(通信作者):彭传云(1981—),女,河南新乡人,洛阳理工学院副教授,研究方向为色谱分析、环境分析, E-mail: chuanyunpeng@126.com.

引用本文:彭传云,袁慕坤,李舒琪,等.Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-羟基-2'-脱氧鸟苷固相微萃取性能研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2025,53(4):99-106.(Peng Chuanyun, Yuan Mukun, Li Shuqi, et al. Solid phase micro-extraction properties of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine for Cu²⁺, Zn²⁺ grafted silica monolith[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2025, 53(4): 99-106. DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.05.17.0002.)

选择性,用于尿样中分析对象的有效提取,结合 HPLC-UV,可以实现对实际样品中痕量 8-OHdG 的有效检测,检出限为 $2.04 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[15].近年来,不断开发具有高效富集效果的 SPE 材料是提高分析检测灵敏度的研究热点之一.

金属离子固载有机配体材料因其能够为有机分子中特定官能团提供配位作用,表现出良好的萃取性能,已被用作 SPE 介质从复杂基质中富集和提取目标分析物^[16-18].同时,将该材料与其他基质复合是增强两种材料潜在优势的有效途径之一.例如,聚丙烯腈复合 K^+ - γ -环糊精金属-有机杂化纳米纤维、聚离子液体@ Zr^{4+} -咪唑鎓整体柱、 Fe^{3+} 固载对苯二甲酸功能化 Fe_3O_4 核壳杂化材料和金属-有机骨架/壳聚糖复合材料,均被用作富集复杂样品基质中痕量目标分析对象^[19-22].迄今为止,金属离子与壳聚糖等天然多糖配位形成的金属离子固载有机聚合物材料在 SPE 相关领域的研究应用鲜有报道.

本研究利用简便的溶胶-凝胶法,通过自组装过程,以降解壳聚糖为配体,制备了 Cu^{2+} 固载硅胶整体柱和 Zn^{2+} 固载硅胶整体柱,进一步研究该材料对 8-OHdG 的萃取性能,探索有效提取复杂样品中 8-OHdG 的 SPE 方法,利用该材料高效的富集效果,结合 HPLC-UV,建立一种灵敏、高效、实用的定量分析方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC2000 液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司);HSC-12B 氮吹仪(天津恒高电气科技有限公司);LSP04-1A 注射泵(保定兰格恒流泵有限公司);石英毛细管(0.32 mm i.d.,河北永年光纤维厂);傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR,美国 Thermo Fisher 公司);SU 8000 型扫描电子显微镜(SEM,日立高新技术公司)和 X 射线能谱元素分析仪(EDS,日立高新技术公司).

8-OHdG、莱克多巴胺、双酚 A、苾标准品(Sigma 公司, St. Louis. Model, USA);壳聚糖、冰乙酸、氨水、过氧化氢(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);硫酸铜、尿素、乙酸锌、亚氨基二乙酸(分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司);聚乙二醇(分析纯,阿拉丁试剂有限公司);四甲基氧硅烷(98%,武汉大学有机硅新材料有限公司);实验用水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司).

标准储备液的配制:准确称取 1.000 0 mg 8-OHdG 标准样品,用甲醇溶解,配制成 0.035 3 mmol/L 的标准储备液,储存于冰箱中 4 °C 保存,使用时用乙腈稀释,配制成系列 8-OHdG 标准工作液.

1.2 实验过程

1.2.1 金属离子固载硅胶整体柱的制备

截取一定长度的石英毛细管,先用纯净水洗净,注入 1 mol/L NaOH 溶液,于 40 °C 下保持 12 h,然后用 1 mol/L HCl 溶液将毛细管冲洗 40 min 后,用纯净水以 0.1 mL/min 的流速清洗至中性,于 120 °C 下氮吹烘干 5 h 后,硅胶垫封口,保存备用.

准确称取亚氨基二乙酸 2.0 g、壳聚糖 2.0 g 至 250 mL 圆底烧瓶中,加入 80 mL 纯净水,于 50 °C 下搅拌 2 h 后,加入 2.4 mL 3%(质量分数)过氧化氢溶液,继续搅拌 3 h,制得降解壳聚糖溶液,冷却至室温后备用.

分别称取 0.020 g CuSO_4 、0.023 g $\text{Zn}(\text{AC})_2$ 于两个 10 mL 离心管中,加入 4 mL 降解壳聚糖溶液,常温下搅拌约 10 min 后;分别加入 0.22 g 尿素、0.20 g 聚乙二醇,冰水浴条件下搅拌约 10 min 后加入 1.4 mL 四甲氧基硅烷,磁力搅拌 3 h,然后用氨水调节混合溶液的 pH 至 7.0,超声脱气,制得均一溶胶,将其注入已处理的毛细管中,用硅胶垫将毛细管两端封口,于 40 °C 下反应 20 h,然后在 90 °C 下反应 7 h.制备的整体柱依次用甲醇和丙酮洗涤,然后将整体柱放置于室温下干燥后备用.

1.2.2 固相微萃取(SPME)过程

将制备的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 固载整体柱连接在注射器前端,首先用 1 mL 甲醇溶液平衡整体柱 2 min;将 2.5 mL 8-OHdG 标准溶液以 $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速通过整体柱;经过空气吹干后,用 1 mL 甲醇/氨水(9/1,V/V)以 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗脱整体柱,收集前 37.5 μL 洗脱液,氮气吹干后,残留物用 50 μL 纯净水溶解后,进行 HPLC 分析,以此考察整体柱的富集效果.每个实验在相同条件下重复 3 次.

1.2.3 实际样品处理

收集的 10 mL 晨尿样品存于离心管中,冷冻储藏.在室温下解冻后于 4 000 r · min⁻¹下离心 30 min,取上清液至圆底烧瓶中,在 55 ℃下减压蒸干,再加入 10 mL 甲醇超声溶解,离心 10 min 后取上清液旋蒸至干,然后再加入 10 mL 乙腈,超声溶解,并离心 10 min,取上清液备用.

1.2.4 色谱条件

ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);紫外检测波长为 254 nm;流动相组成为甲醇/0.1%(质量分数)乙酸(V/V=1/9);流速为 1.0 mL/min;进样量 20 μL;柱温为 40 ℃.

2 结果与讨论

本研究采用富集倍数(enrichment factor,EF,简记为 E_F)作为评价依据,衡量整体柱对 8-OHdG 的富集效率.E_F 的定义如下:

$$E_F = \frac{C_1}{C_0}, \tag{1}$$

式中,C₀ 是指萃取前溶液中 8-OHdG 的浓度(nmol · L⁻¹);C₁ 是指经过整体柱富集后溶液中 8-OHdG 的浓度(nmol · L⁻¹).

2.1 整体柱的制备条件优化及表征

2.1.1 整体柱制备条件的选择及优化

为制备具有较高萃取富集性能和良好通透性的 Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 固载硅胶整体柱,对溶胶制备过程的 pH、CuSO₄ 和 Zn(AC)₂ 用量、降解壳聚糖溶液体积等操作条件进行系统优化.由图 1(a)可知,溶胶-凝胶过程中反应体系的 pH 值对整体柱的萃取性能有一定影响.当 pH>7.0 或 pH<3.0 时,溶胶体系会迅速凝固,甚至无法形成凝胶.因此实验探究了反应体系 pH=3.0、5.0 和 7.0 时整体柱萃取性能.当 pH=7.0 时,所制备硅胶整体柱对 8-OHdG 萃取性能最佳.实验对 CuSO₄、Zn(AC)₂ 和降解壳聚糖溶液体积添加量进行系列优化,结果见图 1(b,c),所制备整体柱的萃取性能随 CuSO₄、Zn(AC)₂ 和降解壳聚糖溶液的递增,呈现出先增大后减小的趋势.说明随着金属离子和降解壳聚糖的引入,硅胶整体柱材料对 8-OHdG 有效作用活性位点增多,因此,随着反应物用量的增加,整体柱的萃取效果得到有效提升.但是过量引入 CuSO₄、Zn(AC)₂ 和降解壳聚糖,强化了溶胶凝胶过程,使得整体柱更加紧实,通透性降低,对 8-OHdG 的萃取性能就随之减小.因此,本实验制备 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 固载硅胶整体柱的最佳反应条件是采用 pH 为 7 的溶胶反应体系、分别加入 0.020 g CuSO₄ 和 0.023 g Zn(AC)₂,以及加入 4.0 mL 降解壳聚糖溶液.

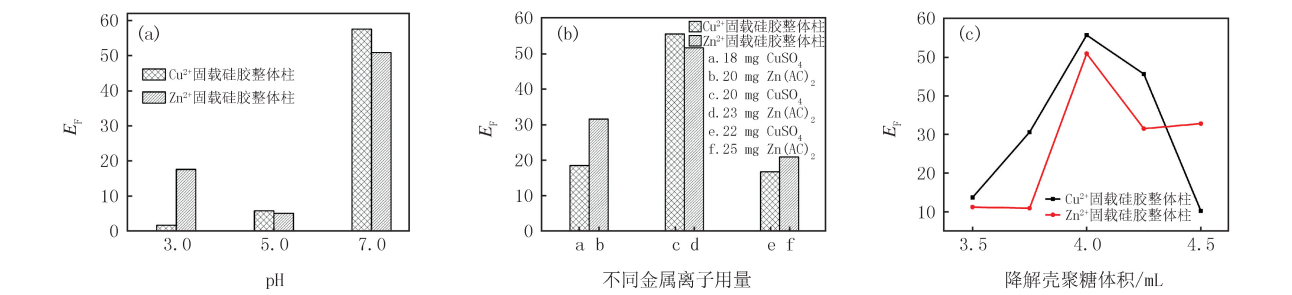


图1 制备条件对富集倍数的影响

Fig.1 Effect of the preparation conditions on enrichment factor

2.1.2 整体柱结构和形貌表征

利用傅里叶红外光谱(FTIR)、扫描电镜(SEM)和 X 射线能谱(EDS)等表征分析手段分别研究所制备的 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 固载硅胶整体柱的结构和形貌特征.图 2(a)为 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱和降解壳聚糖的红外光谱图.降解壳聚糖在 2 972~3 496cm⁻¹出现较宽的强吸收峰,主要为 O—H 与 N—H 的伸缩振动吸收峰,同时分别在 1 578 cm⁻¹和 1 374 cm⁻¹存在 N—H 和 O—H 弯曲振动吸收峰;这 3 处强吸收峰在 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱材料的红外光谱图中明显减弱,说明在整体柱制备过程中,引入的 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 与壳聚

糖分子中的—OH 和—NH₂ 形成了配位键;其次在 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱的红外谱图中,可以看出 948 cm⁻¹ 和 1 034 cm⁻¹ 分别为 Si—O—H 和 Si—O—Si 振动吸收峰,表明硅胶被成功引入至整体柱材料.图 2(b)为整体柱的 SEM 电镜照片,Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱主要由颗粒堆集而成.图 2(c)对材料的 EDS 分析结果表明该材料主要由 C、N、O、Si 和 Cu 或 Zn 组成.上述结果表明,本实验已分别成功制备 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱.

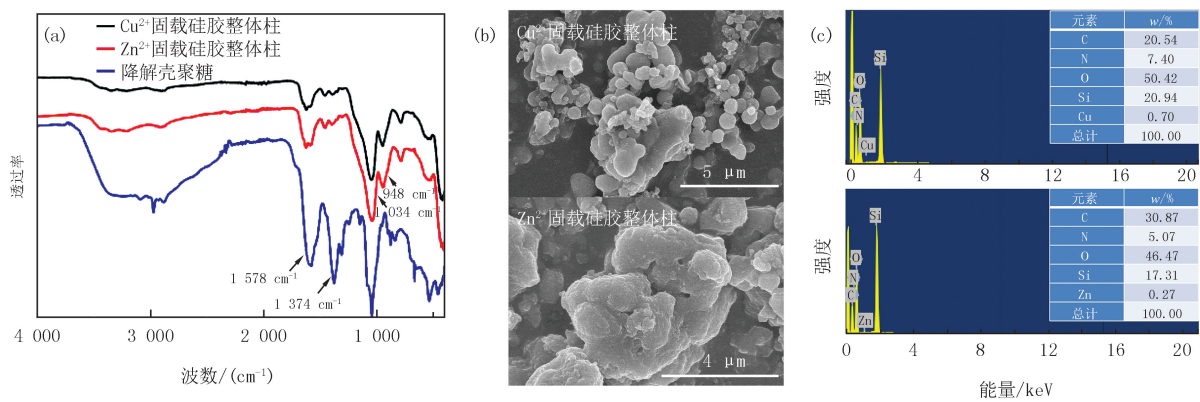


图2 整体柱FTIR(a)、SEM(b)和EDS(c)

Fig.2 FTIR(a),SEM image(b) and EDS(c) analysis of monoliths

2.2 整体柱固相微萃取(SPME)条件优化

本研究分别选取丙酮、乙酸乙酯、乙腈、乙腈/水(9/1,V/V)、甲醇作为溶剂稀释得到相同浓度的系列 8-OHdG 标准溶液,探究不同种类萃取溶剂对整体柱富集 8-OHdG 的影响,如图 3(a)所示.结果表明,随着溶剂极性增大,溶剂与 8-OHdG 分子间作用力增加,从而使 8-OHdG 在溶剂中的分配比例增加,降低了萃取整体柱对 8-OHdG 的富集效率.当选择乙腈作为萃取溶剂时,整体柱对 8-OHdG 的富集倍数最大,萃取效率也最高,因此本实验选取乙腈作为萃取溶剂.对萃取速率的优化结果见图 3(b),当萃取速率大于 50 μL·min⁻¹ 时,所制备 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 的萃取效果呈现明显下降趋势,因此选择 50 μL·min⁻¹ 为最佳萃取速率.选择合适的解吸溶剂对有效提高材料的萃取效果具有重要影响,对解吸溶剂优化结果见图 3(c).当解吸溶剂选择甲醇/氨水(9/1,V/V)时,8-OHdG 的回收率最高,整体柱对其富集倍数最大,分析原因可能是 8-OHdG 分子中含有一NH—、—OH 等极性基团,适当地增加氨水的量,有利于增大解吸剂的极性,从而使得 8-OHdG 更易被洗脱,同时,8-OHdG 分子咪唑环上一OH 表现为弱酸性.在一定的碱性条件下,有利于将吸附在萃取材料上的 8-OHdG 洗脱.因此本实验选取甲醇/氨水(9/1,V/V)作为解吸溶剂.萃取过程的解吸速率和解吸体积优化结果如图 3(d,e),当选择 30 μL·min⁻¹ 的解吸速率和 37.50 μL 洗脱溶液,可以得到最佳的萃取效果.

综上当选择 2.5 mL 乙腈稀释的 0.018 μmol·L⁻¹ 8-OHdG 溶液,在 50 μL·min⁻¹ 流速下进行萃取时,以甲醇/氨水(9/1,V/V)的混合溶液为洗脱剂,在 30 μL·min⁻¹ 的速率下,取 37.50 μL 洗脱溶液,所制备的 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 的富集倍数分别达到 61.64 和 51.20.

2.3 整体柱萃取性能研究

选择茈、双酚 A、莱克多巴胺和 8-OHdG 为分析对象,通过研究 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对其萃取性能的区别,考察所制备整体柱对 8-OHdG 的萃取效果,结果如图 4 所示.茈、双酚 A、莱克多巴胺和 8-OHdG 分子结构中所含—OH、—NH₂ 逐渐增多,萃取实验显示,其在 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱上的富集倍数也有逐步增大的趋势.说明整体柱对分析对象的富集倍数随着 Cu²⁺、Zn²⁺ 与分析对象中—OH、—NH₂ 之间作用力的增大而升高.结果表明,Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 有一定的萃取选择优势.

新制备 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 的最大富集量分别为 756 μg·g⁻¹ 和 689 μg·g⁻¹.不同批次的 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱的重现性,标准偏差(RSD)分别为 5.12%、5.56%,可见整体柱制备的重现性良好;同一批次所得整体柱的萃取重现性,日间 RSD 分别为 3.85%、3.69%,日内 RSD 分别为 1.13%、

1.61%，表明整体柱的萃取稳定性较好。

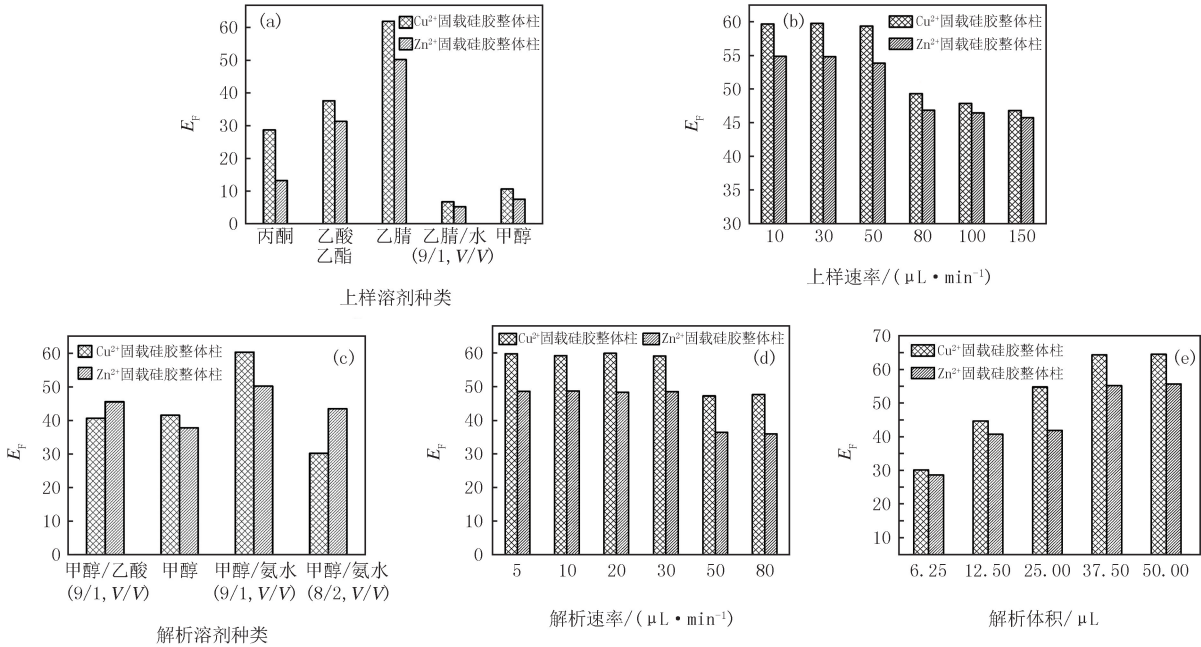


图3 整体柱对8-OHdG的萃取条件优化

Fig.3 Optimizing extraction conditions of the monolith for 8-OHdG

2.4 分析方法评价

以 8-OHdG 标准溶液为分析对象,结合制备的 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱,构建 SPME-HPLC-UV 分析检测方法,见表 1.8-OHdG 在较宽的浓度范围(0.91~100 nmol·L⁻¹ 和 1.22~100 nmol·L⁻¹)内线性良好(R²>0.99).方法的最低检出限分别达到 0.31 和 0.42 nmol·L⁻¹.依据文献报道^[23],健康人群尿样中 8-OHdG浓度为 12.0 ~ 23.0 nmol·L⁻¹,本研究所建立的方法适用于检测实际尿样中 8-OHdG.

如表 2 所示,本实验所制备 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 的富集倍数分别是 61.64和 51.20,而氧化石墨烯/有机聚合物整体柱离线的富集倍数是 5^[24],可见,Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱对 8-OHdG 具有显著的萃取富集性能.基于 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱构建的 SPME 方法,结合普通 HPLC-UV 装置,所建立的 8-OHdG分析检测方法的检出限(S/N=3)分别为 0.31 nmol·L⁻¹和 0.42 nmol·L⁻¹,其灵敏度接近于高灵敏的 HPLC-MS 和 HPLC-ECD 分析方法,可见所制备的 Cu²⁺、Zn²⁺ 固载硅胶整体柱具有较高的萃取富集性能,建立的 SPME-HPLC-UV 有效提高了普通 UV 检测器的分析灵敏度。

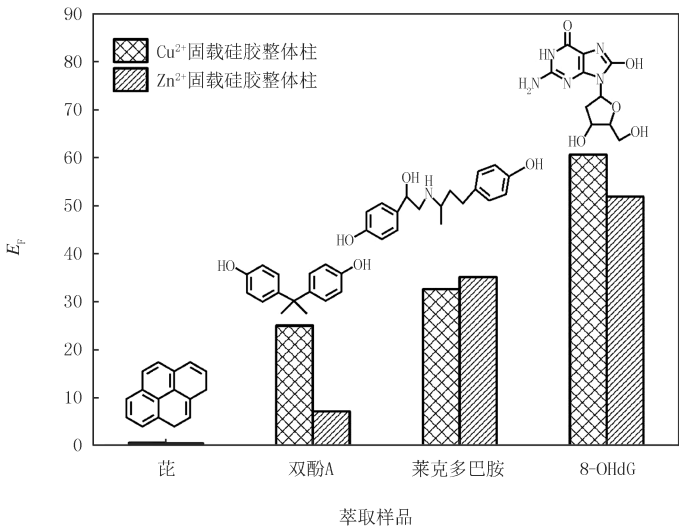


图4 Cu²⁺、Zn²⁺固载硅胶整体柱对芘、双酚A、莱克多巴胺和8-OHdG的萃取性能

Fig.4 The extraction properties of Cu²⁺、Zn²⁺ grafted silica monolith for pyrene,bisphenol A, ractopamine and 8-OHdG

表 1 8-OHdG 的线性回归方程和检出限
Tab.1 Calibration curves and LODs of 8-OHdG

整体柱	线性范围/(nmol·L ⁻¹)	回归方程	R ²	LODs/(nmol·L ⁻¹)
Cu ²⁺ 固载硅胶整体柱	0.91~100	y=19.8x+0.126	0.998	0.31
Zn ²⁺ 固载硅胶整体柱	1.22~100	y=37.5x-0.248	0.997	0.42

表 2 采用不同分析方法检测 8-OHdG 的检出限
Tab.2 LODs of 8-OHdG by different analysis methods

方法	萃取材料	样品	E _F	LODs/(nmol·L ⁻¹)
SPME-HPLC-MS ^[24]	GO/PEDOT/PPy ^a	尿液	5	0.14
SPE-LC-MS-MS ^[25]	C18-硅胶	尿液	—	0.04
MSPE ^b -HPLC-MS ^[26]	Fe ₃ O ₄ @PDA-适配体	尿液	—	0.12
PFSPE ^c -HPLC-ECD ^[27]	PS/PPY ^d	尿液	—	0.21
SPME-HPLC-UV[本文]	Cu ²⁺ 固载硅胶整体柱	尿液	61.64	0.31
	Zn ²⁺ 固载硅胶整体柱		51.20	0.42

注:a.氧化石墨烯/聚(3,4-乙烯二氧噻吩)/聚吡咯;b.磁固相萃取;c.纤维固相萃取;d.聚苯乙烯/聚吡咯。

2.5 实际样品分析

将建立的 Cu²⁺ 固载硅胶整体柱 SPME-HPLC-UV 方法检测实际尿样中 8-OHdG,来验证方法的实用性.通过在已知 8-OHdG 含量的尿液中分别加入 5.0、25.0 和 50.0 nmol·L⁻¹ 浓度的 8-OHdG 标准溶液,按照 1.2.3 操作步骤进行,并通过 SPME-HPLC-UV 检测,所得加标回收率和精密度见表 3,加标回收率在 91.5%~102.0%之间,日内相对标准偏差(RSD)在 2.7%~4.7%之间,日间相对标准偏差(RSD)在 5.9%~9.7%之间.结果表明,本研究所建立的 SPME-HPLC-UV 方法检出限较低,灵敏且可靠,能够准确检测出实际尿样中的 8-OHdG,满足定量分析的要求.

表 3 实际尿样中 8-OHdG 加标回收率
Tab.3 The recovery of 8-OHdG in the urine samples

实际样品	样品浓度/ (nmol·L ⁻¹)	添加浓度/ (nmol·L ⁻¹)	检测浓度/ (nmol·L ⁻¹)	回收率/%	日内 RSD/% (n=3)	日间 RSD/% (n=3)
1st 志愿者	11.0	5.0	14.9	93.1	3.9	8.4
	11.0	25.0	36.8	102.0	4.3	9.7
	11.0	50.0	59.0	96.7	2.9	5.9
2nd 志愿者	21.0	5.0	24.3	93.5	2.7	7.6
	21.0	25.0	42.1	91.5	3.1	7.9
	21.0	50.0	71.8	101.1	4.7	8.2

随机收集本地 15 名健康志愿者(20~40 岁)晨尿,实际尿样检测色谱图见图 5.利用所建立的分析方法测定尿样中 8-OHdG 的含量,结果显示,20 岁左右年轻人和不吸烟人群尿样中 8-OHdG 含量在 11~16 nmol·L⁻¹,吸烟人群尿样中 8-OHdG 含量有所增加,在 23~30 nmol·L⁻¹之间.香烟中含有大量自由基和致癌物,吸入人体后可直接导致 DNA 氧化损伤,因而 8-OHdG 含量明显升高.

3 结 论

通过溶胶-凝胶法,利用自组装技术制备 Cu²⁺、Zn²⁺ 离子固载硅胶整体柱,经过 FT-IR、

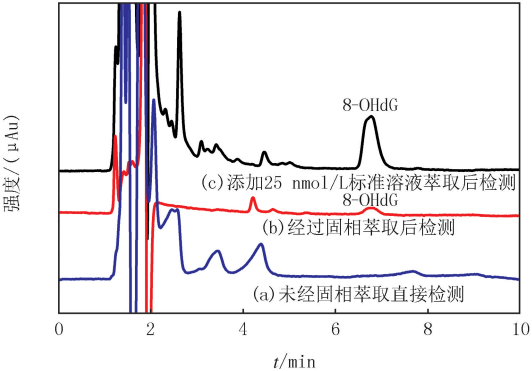


图5 实际样品中8-OHdG HPLC-UV检测色谱图
Fig.5 The HPLC chromatograms for the determination of 8-OHdG

SEM和EDS分析对整体柱材料的结构和形貌进行表征.通过壳聚糖分子结构中的—OH和—NH₂提供的配位作用,Cu²⁺、Zn²⁺被成功修饰至硅胶整体柱.以8-OHdG标准溶液为萃取对象,优化了Cu²⁺、Zn²⁺离子固载硅胶整体柱SPME条件,结合HPLC-UV建立了8-OHdG定量分析方法.该方法在0.91~100和1.22~100 nmol·L⁻¹拟合的相关系数均>0.99,LODs分别为0.31和0.42 nmol·L⁻¹,表明本研究所制备的Cu²⁺、Zn²⁺固载硅胶整体柱对8-OHdG有良好的富集性能,所建立的SPME-HPLC-UV分析方法具有灵敏度高、操作简单、实用性强等特点,为实际样品中8-OHdG的检测提供了实用的分析方法.

参 考 文 献

- [1] JIRJEES DHULKEFL A, ATACAN K, BAS S Z, et al. An Ag-TiO₂-reduced graphene oxide hybrid film for electrochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as an oxidative DNA damage biomarker[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(4): 499-506.
- [2] GONG Y C, HU C L, JIA L P, et al. Lead-free double perovskite Cs₂AgInCl₆ nanocrystals supported on graphene for photoelectrochemical biosensing of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2024, 7(7): 7269-7276.
- [3] WANG J H, ZHOU Q, LI Z C, et al. An ultrasensitive aptasensor for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of human urine detection based on COFTAPB-DMTP@MWCNT-COOH nanocomposites and CeFeO_x-C@Au@Apt nanoprobe[J]. *Microchemical Journal*, 2024, 203: 110907.
- [4] CHIORCEA-PAQUIM A M, OLIVEIRA-BRETT A M. Nanostructured material-based electrochemical sensing of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine: a comprehensive review[J]. *Mikrochimica Acta*, 2021, 188(2): 58.
- [5] MRDJANOVIC J, SUDJI J, SRDJENOVIC B, et al. Accidental use of milk with an increased concentration of aflatoxins causes significant DNA damage in hospital workers exposed to ionizing radiation[J]. *Frontiers in Public Health*, 2020, 8: 323.
- [6] KOIDE S, KINOSHITA Y, ITO N, et al. Determination of human serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) by HPLC-ECD combined with solid phase extraction(SPE)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(23): 2163-2167.
- [7] KATO D, KOMORIYA M, NAKAMOTO K, et al. Electrochemical determination of oxidative damaged DNA with high sensitivity and stability using a nanocarbon film[J]. *Analytical Sciences*, 2011, 27(7): 703-707.
- [8] 吴萍萍,肖慧琳,宋晓丹,等.分子印迹聚合物结合高效液相色谱法测定人体尿液中的8-羟基脱氧鸟苷和1-甲基鸟苷[J]. *分析科学学报*, 2022, 38(4): 441-447.
WU P P, XIAO H L, SONG X D, et al. Molecularly imprinted polymers based dispersive solid phase extraction coupled with HPLC for the determination of 8-hydroxy-deoxyguanosine and 1-methylguanosine in human urine[J]. *Journal of Analytical Science*, 2022, 38(4): 441-447.
- [9] WU H J, ZHANG Y J, XU H, et al. Urinary profile of alkylated DNA adducts and DNA oxidative damage in sulfur mustard-exposed rats revealed by mass spectrometry quantification[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2023, 36(9): 1495-1502.
- [10] SHI Y M, ZHU H K, WANG F, et al. Daily variability in urinary artificial sweeteners and its association with oxidative stress biomarkers[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(44): 14264-14271.
- [11] HE L C, LIU X, ZHANG J F. Simultaneous quantification of urinary 6-sulfatoxymelatonin and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1095: 119-126.
- [12] 杨世敏,段雨琪,蒋永光.活性炭、过氧化氢和次氯酸钠去除拟柱孢藻毒素的比较研究[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 51(5): 107-114.
YANG S M, DUAN Y Q, JIANG Y G. Comparing the removal efficiency of cylindrospermopsin by activated carbon, H₂O₂ and NaClO[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition)*, 2023, 51(5): 107-114.
- [13] 杨波,范顺利,秦歌,等.环境样品中敌百虫的流动注射化学发光法测定及反应机理探讨[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(5): 61-67.
YANG B, FAN S L, QIN G, et al. Flow injection chemiluminescence determination and reaction mechanism of trichlorfon in environmental samples[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition)*, 2018, 46(5): 61-67.
- [14] KUANG H X, LI Y H, JIANG W H, et al. Simultaneous determination of urinary 31 metabolites of VOCs, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, and trans-3'-hydroxycotinine by UPLC-MS/MS: (13)C-and(15)N-labeled isotoped internal standards are more effective on reduction of matrix effect[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(29): 7841-7855.
- [15] ZHANG S W, SUN X P, WANG W H, et al. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a combination of on-line molecularly imprinted monolithic solid phase microextraction with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(4): 752-757.
- [16] SAEED A, MAYA F, XIAO D J, et al. Growth of a highly porous coordination polymer on a macroporous polymer monolith support for enhanced immobilized metal ion affinity chromatographic enrichment of phosphopeptides[J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(37): 5790-5797.
- [17] JI W H, DING H, GENG Y L, et al. Monodisperse cobalt(II) based metal-organic coordination polymer beads as a sorbent for solid-phase extraction of chlorophenoxy acid herbicides prior to their quantitation by HPLC[J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(12): 761.
- [18] BENTZ K C, COHEN S M. Supramolecular metallopolymers: from linear materials to infinite networks[J]. *Angewandte Chemie(Interna-*

tional Ed in English),2018,57(46):14992-15001.

[19] JIN R R,JI F Q,LIN H Q,et al.The synthesis of Zr-metal-organic framework functionalized magnetic graphene nanocomposites as an adsorbent for fast determination of multi-pesticide residues in tobacco samples[J].Journal of Chromatography A,2018,1577:1-7.

[20] HAN Y M,WANG S,LIU Y J,et al.Preparation of poly(ionic liquid@MOF)composite monolithic column and its application in the online enrichment and purification of tectochrysin in medicinal plants[J].Analytical Methods,2022,14(4):401-409.

[21] ALHMAUNDE A,MASROURNIA M,JAVID A.Facile synthesis of new magnetic sorbent based on MOF-on-MOF for simultaneous extraction and determination of three benzodiazepines in various environmental water samples using dispersive micro solid-phase extraction and HPLC[J].Microchemical Journal,2022,181:107802.

[22] LI S,JIA M T,GUO H Q,et al.Development and application of metal organic framework/chitosan foams based on ultrasound-assisted solid-phase extraction coupling to UPLC-MS/MS for the determination of five parabens in water[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry,2018,410(25):6619-6632.

[23] 李栋,张芹,张圣虎,等.自制混合型小柱净化-高效液相色谱-串联质谱法同时测定尿液中有机磷酸酯代谢物和 8-羟基-2'-脱氧鸟苷[J].色谱,2020,38(6):647-654.

LI D,ZHANG Q,ZHANG S H,et al.Simultaneous determination of seven metabolites of organophosphate esters and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with homemade mixed column purification[J].Chinese Journal of Chromatography,2020,38(6):647-654.

[24] CHEN D,XU H.Simultaneous HPLC-MS determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 3-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene after online in-tube solid phase microextraction using a graphene oxide/poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polypyrrole composite[J].Microchimica Acta,2019,186(300):2-9.

[25] CHEN C Y,JHOU Y T,LEE H L,et al.Simultaneous,rapid,and sensitive quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cotinine in human urine by on-line solid-phase extraction LC-MS/MS:correlation with tobacco exposure biomarkers NNAL[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry,2016,408(23):6295-6306.

[26] GAN H J,XU H.A novel aptamer-based online magnetic solid phase extraction method for simultaneous determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons[J].Talanta,2019,201:271-279.

[27] SUN Y,XIE L,FENG F L,et al.Simultaneous analysis of two urinary biomarkers of oxidative damage to DNA and RNA based on packed-fiber solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography[J].Journal of Chromatography B,2020,1159:122358.

Solid phase micro-extraction properties of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine for Cu²⁺, Zn²⁺ grafted silica monolith

Peng Chuanyun, Yuan Mukun, Li Shuqi, Liu Hongyan, Zhang Shaowen, Wu Chunlai, Zhao Dan, Miao Yalei

(School of Environmental Engineering and Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG), as an typical biomarker, is commonly used to evaluate DNA damage. Cu²⁺ and Zn²⁺ were successfully grafted to silica using sol-gel method through self-assembly technique. The extraction properties of the prepared monoliths were investigated when they were applied in solid-phase micro-extraction(SPME) of trace 8-OHdG in complex samples. Under the optimized extraction conditions, the analytical method of 8-OHdG in urine was established coupling with high performance liquid chromatography-ultraviolet(HPLC-UV). As the results showed, the extraction factors of the Cu²⁺ and Zn²⁺ grafted silica monoliths for 8-OHdG were 61.64 and 51.20, respectively, which indicated an excellent extraction property. The linear ranges of established SPME-HPLC-UV analytical methods were within the rang of 0.91~100 and 1.22~100 nmol · L⁻¹ with R²>0.99, respectively. Satisfactory sensitivity were obtained with the LODs (S/N=3) of 0.31 and 0.42 nmol · L⁻¹. The spiking recoveries of 3 spiking level adding to real samples were from 91.5% to 102.0% based on the Cu²⁺ grafted silica proposed analysis method. The intra-day and inter-day RSDs were in the range of 2.7% and 9.7% (n=3). Successful applications illustrated the developed SPME-HPLC-UV analysis were sensitive, reliable, and accurate for detection of 8-OHdG in urinary sample.

Keywords: Cu²⁺ grafted silica monolith; Zn²⁺ grafted silica monolith; sol-gel; solid phase micro-extraction; 8-OHdG