

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

運用連線固相萃取搭配液相層析串聯質譜儀於尿液中 8-oxodGuo/8-oxoGua 分析(第 2 年)  
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2314-B-040-036-MY2  
執行期間：96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日  
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

計畫主持人：胡瓊文  
共同主持人：張惠華、翁瑞宏

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 24 日

運用連線固相萃取搭配液相層析串聯質譜儀於尿液中  
8-oxodGuo/8-oxoGua 分析

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2314-B-040 - 036 - MY2

執行期間：95 年 08 月 01 日 至 97 年 07 月 31 日

計畫主持人：胡瓊文

共同主持人：翁瑞宏、張惠華

計畫參與人員：李怡樺、陳怡如

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 97 年 09 月 15 日

## 分析

胡瓊文、張惠華、翁瑞宏

許多研究已證實生物體內反應性含氧物質(Reactive oxygen species, ROS)可能是造成老化、慢性疾病、癌症的原因之一。當生物體內無法適當移除 ROS 則會造成氧化壓力進而攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、脂肪，最後導致細胞或組織在結構及功能上產生改變。8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)，為主要的基因氧化性傷害產物。它是遭受最具反應性之氫氧自由基(OH·)攻擊 guanine C-8 位置時的產物。由於在水相此物質主要以 6,8-diketo 異構型式存在，所以亦可稱為 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)。在基因複製時，此種基因氧化傷害會導致 G → T 之反轉突變。一般認為體內 8-oxodGuo 可經由鹼基移除修復路徑(BER pathway)及核酸切除修復(NER pathway)而排出至尿液。然而過去的動物實驗發現尿液中來自 BER 的修復產物(8-oxoguanine, 8-oxoGua)會嚴重受到飲食的影響且 RNA 因有共同的鹼基為另一干擾因子。而相較 NER 的修復產物 8-oxodGuo 則沒有這些問題，因此過去的研究大都以 8-oxodGuo 為主。同時由於尿液取得容易且不具侵入性，所以尿液 8-oxodGuo 的含量已被廣泛用作體內基因氧化傷害的生物指標。然而最新的人體實驗發現到尿液中不論是 8-oxoGua 或 8-oxodGuo，皆不會受到飲食所影響、而來自細胞死亡的可能性很低，並認為尿液 8-oxoGua 及 8-oxodGuo 主要是來自體內 DNA 修復結果。同時由於尿液中 8-oxoGua 含量是 8-oxodGuo 的三倍以上，所以建議尿液 8-oxoGua 似乎是更適合用於監測體內氧化傷害的生物指標。

過去十年，文獻中對於尿液中 8-oxoGua 的相關描述不多及其分析方法更是少之又少。已建立的分析方法大都以定量尿液 8-oxodGuo 為主，包括高效液相層析儀配合電化學偵測(HPLC-ECD)，氣相層析質譜儀(GC-MS)，液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)及酵素連結免疫吸附分析(enzyme-link immunosorbent assay, 簡稱 ELISA)。其中以近年來大量被發展的 LC-MS/MS 分析方法，由於其特異性及敏感性高、樣品前處理簡單加上可配合使用同位素稀釋法(isotope dilution)，此方法可說是當前最精準的定量方法。

因此，本研究將建立連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法以期能同時分析尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua，並進一步將此分析方法應用於人體樣本的分析以探討尿液中 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 之相關性及其變異性，研究時程為兩年，簡述如下：

第一年: 建立「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)配合同位素稀釋法」之分析技術能夠同時準確分析生物樣本之 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 含量。

第二年: 運用建立的「連線固相萃取法」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」，分析人體樣本，以

- (1) 探討尿液 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 之相關性，
- (2) 比較抽煙者與非抽煙者尿液 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 的含量，何者為一較好的非侵入性基因氧化傷害指標，可有效反映體內的氧化傷害程度。

關鍵字: 基因氧化傷害、液相層析串聯質譜儀、尿液、連線固相萃取

# High-throughput direct quantification of urinary 8-oxodGuo/8-oxoGua by isotope-dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction

Chiung-Wen Hu, Louis W Chang and Ruey-Hong Wong

Reactive oxygen species (ROS) in living cells have been suggested to be associated with the development of aging, cancer and some degenerative diseases since they cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG or so called 8-oxodGuo) is one of the most abundant DNA lesion formed by the addition of the hydroxyl radical to the C8 position of guanine in DNA. The presence of 8-oxodGuo residues in DNA can lead to GC to TA transversion unless repaired before DNA replication. It was shown that part of the lesion could be repaired by nucleotide excision repair (NER) pathway, and the resulting repair product 8-oxodGuo in urine are not affected by diet and cell turnover. Since urine is easy and non-invasive to collect, urinary 8-oxodGuo has been widely used as a biomarker of oxidative stress. However, it has been shown very recently that the urinary level of 8-oxoguanine(8-oxoGua), repair product from base excision repair (BER) pathway(the major repair pathway), is more suitable for biomonitoring purpose since it is also not affected by diet and is more abundant than 8-oxodGuo in urine. It is noted that little information on this repair product 8-oxoGua in human urine, and its relationship with the level of 8-oxodGuo in DNA (steady-state oxidatively damaged DNA). It would be interesting to know that whether urinary 8-oxodGuo or 8-oxoGua alone or combination of this two biomarker will be more effective to reflect the oxidative DNA damage in vivo.

In the past decade, most analytical methods were established to measure urinary 8-oxodGuo rather than urinary 8-oxoGua. Several methods have been successfully applied for analysis of urinary 8-oxodGuo, such as high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography with tandem mass (LC-MS/MS), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Among these methods, LC-MS/MS has a high sensitivity and selectivity, and can be applied with the isotope-dilution method, such analytical technique is the most accurate and reliable analytical method. Therefore, the aims of this work are,

1<sup>st</sup> year: To develop an isotope dilution LC-MS/MS with on-line SPE method for simultaneous determining 8-oxodGuo and 8-oxoGua in urine.

2<sup>nd</sup> year: To study the relationship between urinary 8-oxodGuo and 8-oxoGua using this newly developed method.

To compare the urinary 8-oxodGuo and 8-oxoGua levels in nonsmokers and smokers.

Key words: 8-oxodGuo; 8-oxoGua; Urine; LC-MS/MS; On-line SPE

## 一、研究計畫背景

### 氧化壓力與基因氧化傷害

許多研究已證實生物體內反應性含氧物質(Reactive oxygen species, ROS)可能是造成老化、慢性疾病、癌症的原因之一。生物體內的 ROS 本身可為自由基或非自由基的物質。若生物體內無法適當移除 ROS 則會造成氧化壓力進而攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、脂肪，最後導致細胞或組織在結構及功能上產生改變(Dizdaroglu et al., 2002)。8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)，為主要的基因氧化性傷害產物其含量佔了所有 DNA 鹼基氧化變異產物的 40%。它是遭受最具反應性之氫氧自由基(OH·)攻擊 guanine C-8 位置時的產物。在基因複製時，此種基因氧化傷害會導致 G → T 之反轉突變(Kasai, 1997)。由於在水相此物質主要以 6,8-diketo 異構型式存在，所以又稱為 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)。通常針對 8-oxodGuo 的定量可以從細胞 DNA 中或是尿液樣本進行分析。DNA 中的 8-oxodGuo 含量反映出的是體內穩定態(steady-state)的基因氧化傷害程度而尿液中 8-oxodGuo 含量則是體內遭受氧化傷害後經修復的結果。由於收集尿液對人體不具侵入性，樣品取得容易，適合連續及長時間的採樣。所以過去十年，尿液中 8-oxodGuo 的含量經常被用來當做體內氧化壓力的指標並用於探討某些疾病與氧化壓力間的相關性(Wu et al., 2004)。

### 尿液 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 來源

體內的基因氧化傷害可被體內適時的修復進而排出至尿液。而尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) 的出現即是來自體內不同修復機制的結果(圖 1)。尿液 8-oxoGua，主要是經由鹼基移除修復路徑所產生的修復產物(Base Excision Repair pathway, BER pathway)。首先，DNA glycosylase 會辨認錯誤的鹼基並將其移除，形成 AP site (apurine site)。接著 AP endonuclease 及 phosphodiesterase 會進一步水解移除五碳糖及磷酸鍵。最後由 DNA polymerase I 填補正確的鹼基，而 DNA ligase 將隙縫填補完成修復。另一方面，尿液中 8-oxodGuo，其形成機制尚未完整確立，然而學界認為尿液中 8-oxodGuo 主要是來自核酸切除修復(Nucleotide Excision Repair pathway, NER pathway)的結果 (Reardon et al., 1997)。NER 的程序首先由 excinuclease 在 DNA 錯誤部份的左右各切下數個 nucleotides；再經由 DNA helicase 移除已切下的 DNA 離去。DNA polymerase 及 DNA ligase 把缺少的 nucleotides 補上並將其隙縫填補完成。除了 NER 的作用外，尿液 8-oxodGuo 也有可能來自 nucleotide pool 中 8-oxodGTPase 水解作用而產生(Cooke et al., 2005)。

體外實驗發現到對於 8-oxodGuo 小型態的鹼基損壞修復主要是以 BER 路徑為主負責 75% 的修復，而 NER 路徑則是負責修復剩下的 25% 鹼基損壞(Dianov et al., 1998)。這樣的修復機制最近也在人體實驗中發現到，Gackowski et al., (2003)同時分析尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 發現到尿液中 8-oxoGua 的含量幾乎是 8-oxodGuo 的三倍。然而有趣的是，過去大部份研究仍以分析尿液中 8-oxodGuo 濃度為基因氧化傷害的主要指標而不是分析 8-oxoGua。其主要的原因是早期動物實驗發現到尿液中 8-oxoGua 含量會嚴重受到(含有核酸的)飲食影響。當老鼠餵以”含有核酸的飼料”其尿液中 8-oxoGua 的含量是餵以”不含核酸的飼料”老鼠的 10 倍 (Fraga et al., 1990; Park et al., 1992)。另外尿液中還有其他可能的 8-oxoGua 供獻源包括來自 RNA(相同的鹼基)及細胞死亡等(Cooke et al., 2002)。然而 Cooke et al., (2005)最新的研究已去除這些疑慮，在人體實驗發現若人直接服用以 <sup>15</sup>N<sub>5</sub> 標示的高度氧化 DNA，在服用後連續 14 天的尿液樣本皆無法測量到 <sup>15</sup>N<sub>5</sub> 標示 8-oxoGua 及 8-oxodGuo。而來自 RNA 的供獻也被認定其可能性很小，由於至今尚未找出任何酵素可辨識及釋出 RNA 上的 8-oxoGua。另外因 N-glycosylic bond 鍵結穩定所以 RNA 要自發性的釋出 (depurination)

8-oxoGua 亦不太容易發生(Rozalski et al., 2005)。至於另一可能供獻源 ”細胞死亡”，許多研究認為若尿液中的 8-oxoGua 及 8-oxodGua 是來自細胞死亡的話，則尿液中正常的及損壞(被氧化的)去氧核苷或鹼基的比例 (8-oxodGua/dG 或 8-oxoGua/G) 應與細胞中的比例相同。然而尿液分析發現不論是 8-oxodGua/dG 或 8-oxoGua/G 的比值與細胞中的比值相差甚遠，故推測尿液中的 8-oxodG 及 8-oxoGua 並非來自細胞凋亡(Cooke et al., 2005)。同時人體研究也發現細胞死亡所產生的 oligonucleotides 會排出至尿液，但 oligonucleotides 中無法測得任何的 8-oxodGua，且尿液中的 8-oxodGua 是以單一 mononucleoside 存在的，所以證實尿液中 8-oxodGua 生成與細胞死亡的路徑是相互獨立的(Weimann et al., 2004)。總合上述，尿液中不論 8-oxodG 或 8-oxoGua 皆是來自體內修復的結果 (Cooke et al., 2005)。故若能同時定量尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGua，應能更有效反映體內基因氧化傷害的修復情形。然而目前對於能同時準確定量尿液中的 8-oxoGua 及 8-oxodGua 的文獻甚少。而尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGua (repair products)與細胞中 8-oxodGua(steady-state)的相關性亦急待了解。

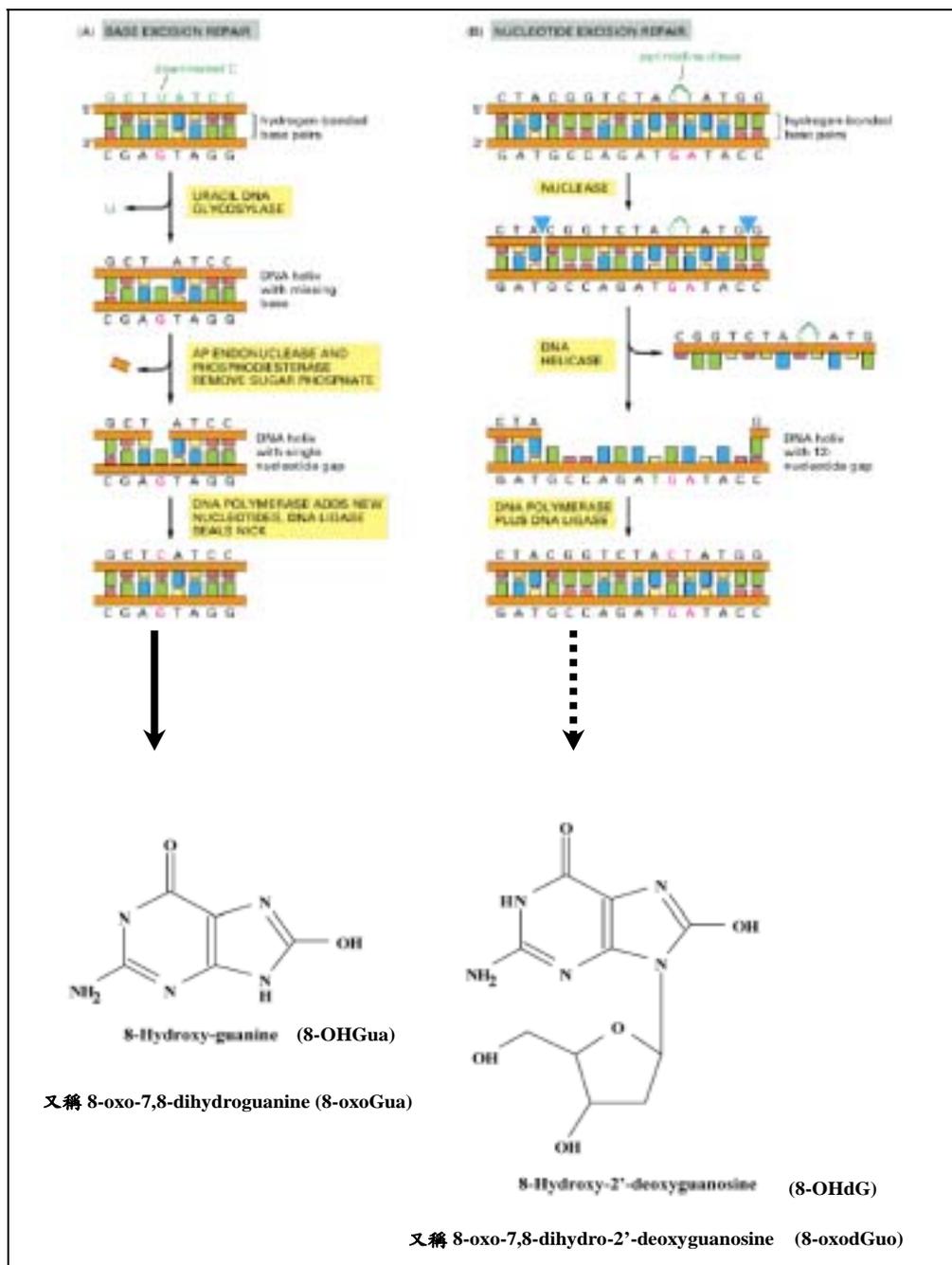


圖 1: 尿液 8-oxoGua 與 8-oxodGua 之可能來源路徑

## 尿液 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 之定量分析

在過去，已有許多分析方法發展以定量生物樣本中的 8-oxodGuo 含量，包括高效液相層析儀配合電化學偵測(HPLC-ECD)，氣相層析質譜儀(GC-MS)及酵素連結免疫吸附分析(Enzyme-link immunosorbent assay, 簡稱 ELISA) (Cadet et al., 1997)。雖然上述分析方法能成功定量 8-oxodGuo，然而這些分析法都有缺點無法應用在大量樣本或每天例行的分析。例如: HPLC-ECD 此方法最普遍，然而此方法的準確度經常受到生物樣品中所含之生物基質影響(尤以尿液最為嚴重)，因此需要冗長的前處理、非常耗時 (Pilger et al., 2002)。至於 GC-MS 而言，此種分析方法需要衍生生化反應進而造成樣品的人為氧化而高估含量 (Dizdaroglu et al., 2002)。ELISA kit 是目前最為簡易的分析法，但 ELISA 分析方法亦遭到與 HPLC-ECD 相同的問題，亦即特异性較低，易受生物基質影響而導致誤判。已有文獻建議當利用 ELISA kit 定量尿液 8-oxodGuo 時，是需要預先以 HPLC 法純化尿液以提高分析的準確度 (Shimoi et al., 2002)。

最近由於質譜儀的快速發展，學者開始運用 LC-MS/MS 在 8-oxodGuo 及類似之基因氧化傷害分析上。由於此分析方法其特异性及敏感性高、樣品前處理簡單加上可配合使用同位素稀釋法(isotope dilution)，所以此方法可說是當前最精準的定量方法(Koc and Swenberg, 2002)。在我們最近的研究中，比較 isotope dilution LC-MS/MS 與 ELISA kit 兩種方法，同時分析遭受 PAHs 暴露工人之尿液樣本。我們發現到唯有 isotope dilution LC-MS/MS 方法能精確的偵測樣品中的 8-oxodGuo，進而有效評估基因氧化傷害。而利用 ELISA 則無法有效分析出 PAHs 暴露工人與非暴露工人間尿液中 8-oxodGuo 含量的差異(Hu et al., 2004)。

另外，LC-MS/MS 可搭配連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction, on-line SPE)。原理主要是利用在高效液相層析儀的分析管柱前加裝另一支固相萃管柱(SPE column)與一轉換閥(switching valve)，樣本注入後可自動萃取且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析。我們最近也成功建立一 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法用於尿液 N7-methylguanine/N7-ethylguanine 的定量，此分析方法具有高敏感度及特异性，同時因連線固相萃取可大大節省分析之時間與耗材，能快速連續處理大量樣本。未來甚至可以運用在臨床檢驗分析上(Chao et al., 2005; Chao et al., 2006)。

由於過去幾年非侵入性的基因氧化傷害生物指標大多是以尿液 8-oxodGuo 為主要分析標的物，所以文獻中對於尿液 8-oxoGua 分析技術描述不多。對於又能同時分析尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 更是少見。其中主要分析法是先利用 HPLC 分離兩物質再以 GC-MS 分別定量，分析程序繁瑣、耗時 (Gackowski et al., 2001)。另外，Chiou et al., (2003)曾利用 ELISA 方法同時分析尿液中所有 8-oxodGuo 及 8-oxoGua，然而此法所利用的抗體無法分辨來自 RNA 的氧化產物 (8-oxoguanosine)而造成誤判。因此對於可準確、快速且能同時定量尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 的分析方法急待建立。

## 二、研究目的

本研究將建立連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法以期能同時分析尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua，並進一步將此分析方法應用於人體樣本以探討；(1)尿液 8-oxoGua/8-oxodGuo 之相關性、(2) 針對抽煙者，尿液 8-oxoGua、8-oxodGuo 何者為一較好的非侵入性基因氧化傷害指標，可有效反映出抽煙所造成體內氧化傷害的修復情形。研究時程為兩年，研究目的詳述如下：

## 第一年

建立「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)配合同位素稀釋法」之分析技術能夠同時準確分析生物樣本之 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 含量。

1. 合成 8-oxoGua 之同位素內標準品  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua。(因無商業產品，需重新合成)
2. 建立 LC-MS/MS 配合同位素稀釋法之分析方法可同時分析 8-oxodGuo 及 8-oxoGua。
3. 開發 8-oxodGuo & 8-oxoGua 連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction)，樣本經自動萃取後連線直接注入 LC-MS/MS 進行分析。未來尿樣加入同位素內標後，不需經前處理可直接上機分析，大大節省分析之時間與耗材，同時可快速連續分析大量樣本。

## 第二年

運用建立的「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)配合同位素稀釋法」，分析 8-oxoGua/8-oxodGuo 於人體樣本

4. 人體樣本：此部份將與計畫共同主持人翁瑞宏博士合作收集人體尿液樣本，共分為兩個族群：抽煙者與不抽煙者。由尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 分析，以探討(1) 尿液 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 之相關性 (2) 針對抽煙者，尿液 8-oxoGua、8-oxodGuo 何者為一較好的非侵入性基因氧化傷害指標，可有效反映出抽煙所造成體內氧化傷害的修復情形。

## 參考文獻

- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997;131:1-87.
- Chao MR, Wang CJ, Yang HH, Chang LW, Hu CW. Rapid and sensitive quantification of urinary N7-methylguanine by isotope-dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:2427-32.
- Chao MR, Wang CJ, Chang LW, Hu CW. Quantitative determination of urinary N7-ethylguanine in smokers and nonsmokers using an isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line analyte enrichment. *Carcinogenesis* 2006;27:146-51.
- Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* 2003;334:87-94.
- Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1601-14.
- Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res* 2005;574:58-66.

- Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr VA. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J Biol Chem* 1998;273:33811-6.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1102-15.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4533-7.
- Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, et al. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63:4899-902.
- Gackowski D, Rozalski R, Roszkowski K, Jawien A, Foksinski M, Olinski R. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet. *Free Radic Res* 2001;35:825-32.
- Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, et al. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using isotope-dilution liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:505-10.
- Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63.
- Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:215-22.
- Koc H, Swenberg JA. Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J Chromatogr B* 2002;778:323-43.
- Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3375-9.
- Pilger A, Ivancsits S, Germadnik D, Rudiger HW. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;778:393-401.
- Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9463-8.

- Rozalski R, Siomek A, Gackowski D, Foksinski M, Gran C, Klungland A, et al. Substantial decrease of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine, a product of the base excision repair pathway, in DNA glycosylase defective mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1331-6.
- Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinoshita N. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:767-70.
- Siomek A, Rytarowska A, Szaflarska-Poplawska A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Czerwionka-Szaflarska M, Olinski R. Helicobacter pylori infection is associated with oxidatively damaged DNA in human leukocytes and decreased level of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Carcinogenesis* 2006;27:405-8.
- Weimann A, Riis B, Poulsen HE. Oligonucleotides in human urine do not contain 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1378-82.
- Weimann A, Belling D, Poulsen HE. Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2002;30:E7.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-oxodGuo: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.

### 三、研究方法

#### 1. 合成同位素內標準品 $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo & $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua

本研究欲開發的液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法(isotope dilution LC-MS/MS method)。此方法首重於以同位素  $^{15}\text{N}_5$  標示之 8-oxodGuo 與 8-oxoGua (內標準品) 之合成，以利於運用同位素稀釋法精準分析樣本中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua。其中  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 最近已有商業產品無需自行合成。而  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 尚無商業產品需自行合成。其合成方法主要是將  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 以加酸加熱的方式斷其糖鍵 (1 M -HCl、95°C、60 min)即可。

#### 2. 建立 on-line SPE LC-MS/MS 於尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 分析

本研究將開發連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀 (on-line SPE-LC-MS/MS) 的分析方法，以期能直接同時定量尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 的含量。如圖 2 所示，連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction, on-line SPE)的原理主要是利用在高效液相層析儀的分析管柱前加裝另一支固相萃尿管柱(SPE column)與一轉換閥(switching valve)，樣本注入後可自動萃取且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析。尿樣添加同位素內標後直接置於自動注射系統(autosampler)上，樣本在注射進入系統後，先被 Eluent B 帶至固相萃尿管柱(SPE column)進行吸附與淨化。接著藉由轉換閥轉位，利用 Eluent A 將待測物反沖提而出並進入 LC-MS/MS 系統分析。我們已經成功建立尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua on-line SPE LC-MS/MS 的分析方法，其分析條件及層析圖譜分別詳述於結果與討論。

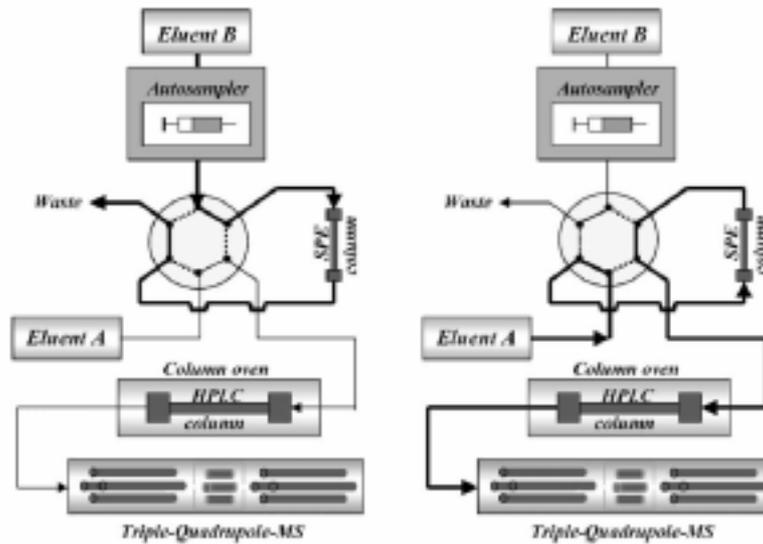


圖 2: On-line SPE LC-MS/MS 系統示意圖 (Koal et al., 2004)

### 3. 人體樣本收集

本研究的尿液樣本共分為控制組(不抽煙的健康成人)與抽煙組共約 60 人，以探討香煙所造成的基因氧化傷害。並配合問卷調查，以幫助了解研究族群的基本特徵。

問卷調查

1. 年齡、身高、體重、性別
2. 吸煙習慣和其他：
  - 包括每天吸煙支數、菸的廠牌、其他包括吃檳榔、飲酒的習慣(或是戒掉以前之習慣)。
3. 工作狀況：
  - 包括現在所在單位、職稱、工作時環境的情形等資料。
4. 其他
  - 過去吃保健藥品、維他命的情形、上班交通工具以及家離公司的距離等資料。

## 四、結果與討論

### 1. 成功合成 8-oxoGua 之同位素內標準品 $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua

$^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 的製作主要是將  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 以加酸加熱的方式斷其醣鍵 (1 M -HCl、 $95^\circ\text{C}$ 、60 min)。水解後所得之產物先以子離子掃描(Product Ion Scan)確定是否為  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua。結果發現本研究自行合成之  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 之主要斷片包括有 m/z 145 及 117。此斷片型式與標準品 8-oxoGua 之主要斷片型式一致 (如圖 3 所示 m/z 140、112)，主要斷片形成是來自 Guanine 經撞擊後開環失去 1 個或 2 個 -CO 所致。本研究之斷片型式亦與 Weimann 等人(2002)推測 8-oxoGua 標準品之主要斷片型式一致。進一步將 8-oxoGua 標準品添加自行合成之  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 內標準品以 LC-MS/MS 分析之，結果如圖 4 所示。圖 4-A 及 4-B 為 8-oxoGua 標準品層析圖而圖 4-C 及 4-D 為本研究自行合成之  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 同位素內標準品層析圖。結果發現自行合成的  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 除斷片型式與 8-oxoGua 標準品一致外其 LC 滯留時間(retention time)也完全相同。綜合以上結果，本研究已成功自行合成出  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua，合成率估計約 98%。



圖 3: 8-oxoGua 標準品 product ion scan

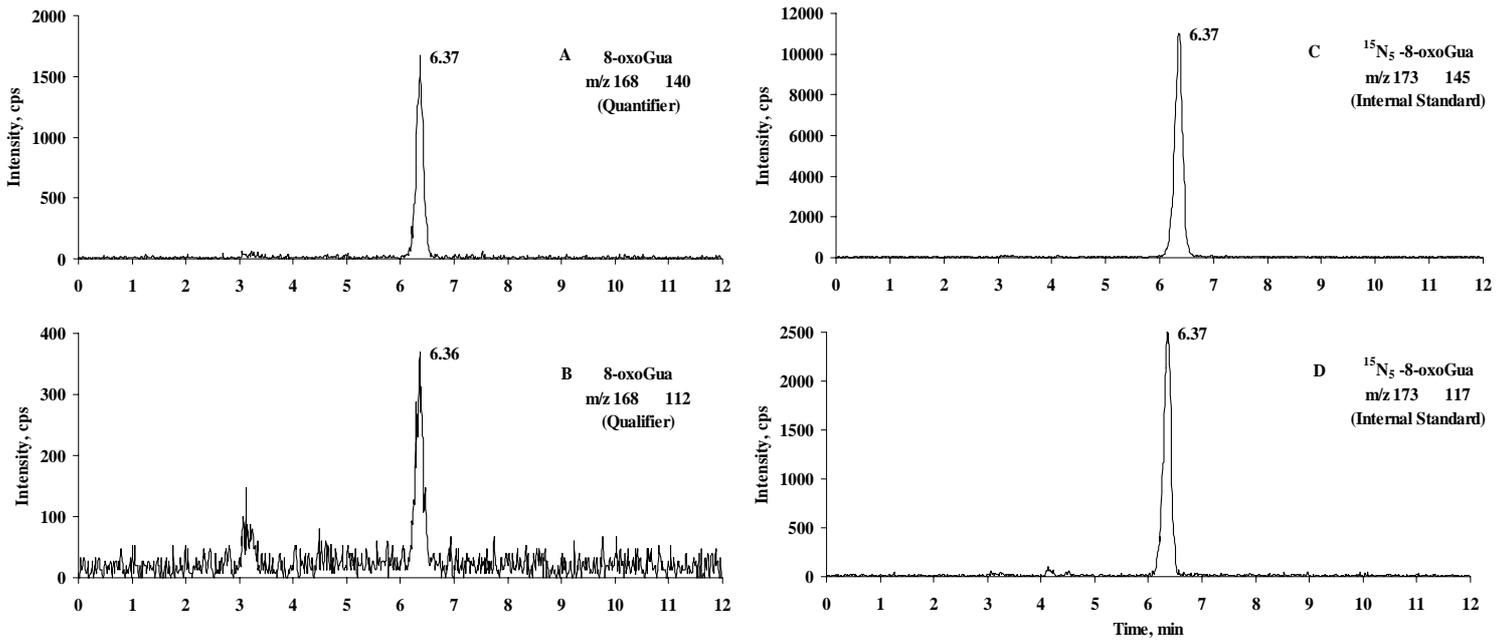


圖 4: 標準品 8-oxoGua &  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 層析圖譜

## 2. 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 配合同位素稀釋法同時分析尿液 8-oxodGuo 及 8-oxoGua

取尿液(100  $\mu$ l)添加  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 及  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 內標準品後，以 on-line SPE LC-MS/MS 分析，其層析圖譜如圖 5。

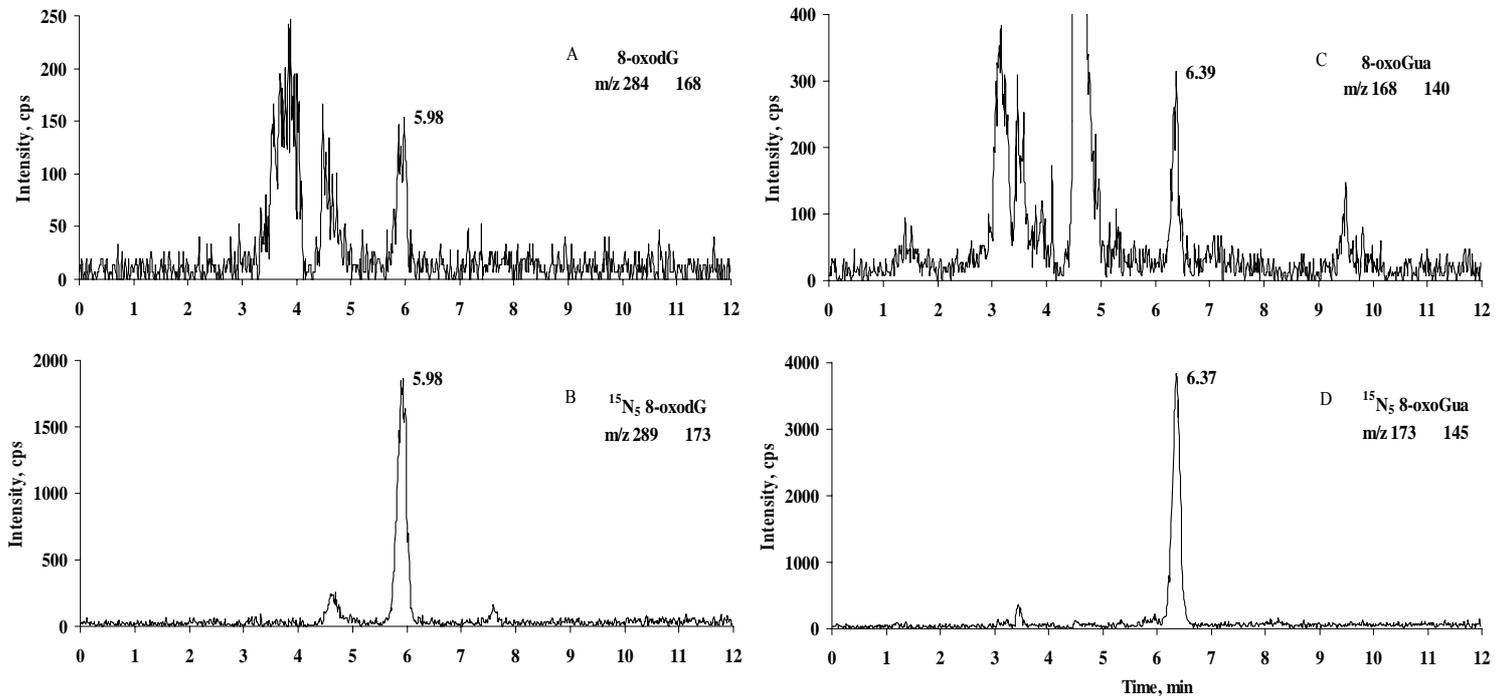


圖 5: 尿液 8-oxodGuo & 8-oxoGua 層析圖譜

對於 8-oxodGuo 我們選擇監測 m/z 284-168 ( $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 內標準品則為 m/z 289-173) 而 8-oxoGua 監測 m/z 168-140 ( $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 內標準品則為 m/z 173-145)。由圖 5 知，尿液 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 滯留時間分別在 5.98 min 及 6.39 min。樣品總分析時間為 12 min。綜合上述，我們已成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法能同時分析尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua。未來尿液不需任何前處理即可直接注入 on-line SPE LC-MS/MS 直接進行線上樣品純化及定量。

### 偵測極限 (Limit of Detection, LOD)及精準度

偵測極限為可測得之最低濃度，藉由雜訊比 (Signal-to-Noise Ratio) 為 3，可回推出 8-oxodGuo 的 LOD 為 0.0057 ng/ml (每 100  $\mu$ l 注射體積含 2.0 fmol)；8-oxoGua 的 LOD 為 0.35 ng/ml (每 100  $\mu$ l 注射體積含 200 fmol)。

方法精準度評估是從 50 個尿液樣本中隨機選取三個，每個樣本重複分析三次，結果列於表 1。8-oxoGua 組內 (intra-day) 測試之平均值 $\pm$ 標準差分別為 4.06 $\pm$ 0.06、14.3 $\pm$ 1.54、14.8 $\pm$ 0.70 ng/mg creatinine，其變異系數 (CV) 分別為 1.48、10.8、4.73%；8-oxodGuo 之平均值 $\pm$ 標準差分別為 8.11 $\pm$ 0.37、2.55 $\pm$ 0.27、8.49 $\pm$ 0.98 ng/mg creatinine，其 CV 值分別為 4.56、10.6、11.6%。兩個待測物的組內測試，CV 值皆未超過 15%。

表 1、方法精準度

| Intra-day variation                    | Urine 1             | Urine 2             | Urine 3             |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| 8-oxoGua (ng/mg creatinine)<br>(CV,%)  | 4.06±0.06<br>(1.48) | 14.3±1.54<br>(10.8) | 14.8±0.70<br>(4.73) |
| 8-oxodGuo (ng/mg creatinine)<br>(CV,%) | 8.11±0.37<br>(4.56) | 2.55±0.27<br>(10.6) | 8.49±0.98<br>(11.6) |

### 3. 人體尿液樣本分析結果

本研究進一步將建立好的「on-line SPE-LC-MS/MS」分析方法應用於實際人體樣本分析。本研究所收集之 50 位健康成年人的尿液樣本，受試者之人口學變項 (平均年齡和平均 BMI 值) 及尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGuo 之個別含量經 creatinine 值校正後詳列於表 2。初步結果發現，非吸煙者尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGuo 之含量分別為 13.9±7.36、4.3±1.49 (ng/mg creatinine)，且尿液中 8-oxoGua 之含量約為 8-oxodGuo 含量的三倍。先前文獻 Siomek et al., (2006) 以 LC-GC-MS，同時分析尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGuo，研究中健康成年人所測得的值為 8-oxoGua: 13.7±6.61; 8-oxodGuo: 3.80±1.29 ng/mg creatinine，8-oxoGua 之含量也約為 8-oxodGuo 含量的三倍，與本研究結果的非吸煙者相近。這些成人尿液分析結果似乎可驗證過去在體外實驗的研究結果；針對 8-oxodGuo 小型態的鹼基損壞修復主要是以 BER pathway 為主 (75%)，主要產物為 8-oxoGua；NER pathway 為輔 (25%) 主要產物為 8-oxodGuo (Dianov et al., 1998)。

另一方面，在比較吸煙與非吸煙的族群，吸煙者尿液 8-oxoGua 含量較非吸煙者低但 8-oxodGuo 卻較非吸煙者高。同時 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 的含量比例約為 1:1，與一般健康非吸煙者的尿液比例差異甚大。這樣的現象有可能是因為香煙中有許多的自由基一旦進入體內有可能加速體內基因氧化傷害的修復機制(例如，增加 NER 的修復)。然而另一重要的影響因子修復基因型的不同亦會影響到尿液中 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 的含量。由於本研究為 pilot study 收樣人數少，且未分析修復基因型(例如，hOGG1)，尚無法有效釐清香煙對於尿液中 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 的影響。未來將進一步增加收樣人數，同時增加修復基因型分析以幫助了解抽煙對尿液 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 的影響及人與人之間變異程度。

表 2、一般健康成人尿液中 8-oxoGua 及 8-oxodGuo 含量

|   | 非吸煙者 (n=35) | 吸煙者 (n=15)  |
|---|-------------|-------------|
| 平均年齡 (years)                            | 23.1±3.00   | 24±2.1      |
| 平均 BMI (kg/m <sup>2</sup> )             | 21.9±2.16   | 23.5±1.09   |
| 8-oxoGua (ng/mg creatinine)             | 13.9±7.36   | 8.82±3.95   |
| 8-oxodGuo (ng/mg creatinine)            | 4.3±1.49    | 7.71±2.67   |
| 8-oxoGua + 8-oxodGuo (ng/mg creatinine) | 18.2±8.85   | 16.54±11.63 |

## 五、成果自評

過去十年，”尿液 8-oxodGuo”含量分析，已被廣泛用作一非侵入性的體內氧化壓力生物指標。然而已有研究指出此種指標似乎敏感度不夠，由於它並非主要的 DNA 修復產物而是 8-oxoGua (from BER pathway)。最新的研究發現人體尿液 8-oxoGua 並不會受到飲食、細胞死亡、RNA 的影響且證明尿液中 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 皆主要來自體內 DNA 修復的結果。這樣的新發現促使學界必須重新檢視過去以單獨尿液 8-oxodGuo 含量作為指標時所作的相關研究，同時也暗示著尿液 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 同時定量的重要性。本研究已開發一”on-line SPE LC-MS/MS”的分析方法，能快速、準確的同時定量尿液 8-oxoGua 及 8-oxodGuo，不需任何前處理。這樣的分析方法未來可廣泛用於臨床分析與每天的例行檢查，可隨時提供體內基因氧化傷害的情形及幫助了解氧化壓力的致病機制。相關的研究成果已整理中準備投稿。

## 出席國際學術會議心得報告

|                   |  |
|-------------------|--|
| 計畫編號              | NSC 95-2314-B-040 - 036 - MY2  |
| 計畫名稱              | 運用連線固相萃取搭配液相層析串聯質譜儀於尿液中 8-oxodGuo/8-oxoGua 分析  |
| 出國人員姓名<br>服務機關及職稱 | 胡瓊文 中山醫學大學公衛系 副教授  |
| 會議時間地點            | 9-12 July 2007 Glasgow UK  |
| 會議名稱              | Life Science 2007  |
| 發表論文題目            | Determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human serum by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction |

### 一、與會心得

“Life Science” 是一含概生化、藥物及生理學等方面的一個國際重要會議。今年會議舉辦在英國蘇格蘭的第二大城 Glasgow。這是第一次來到蘇格蘭，雖然是 7 月的夏天但當地的氣溫只有 13-17 帶著涼意。今年會議主題包括有 cardiovascular bioscience, central nervous system, education, exercise, imaging, inflammation, ion channels, cancer, signaling 等。個人所投稿的領域是 cancer 方面。主要是開發利用 on-line SPE LC-MS/MS 分析血液中 8-oxodGuo 的快速分析法以幫助了解氧化壓力致癌機制。大會中亦邀請到這方面的大師 Dr. Barry Halliwell 來自於新加坡大學。其演講主題是”Biochemistry of oxidative stress”，內容包括說明何謂“antioxidant”，“oxidative stress”及”oxidative damage”，同時進一步說明氧化壓力是如何去影響細胞的生長及與人類疾病的相關。此外會議中也分享到來自美國 Rochester 大學 Dr. Rahman 針對氧化壓力在導致肺發炎所扮演的重要性。幾天會議進行下來，讓我有很大收穫，尤其對於氧化壓力致病的機致探討。也讓我更加相信開發相關基因氧化傷害指標分析方法的重要性。



the formation of DNA adducts. Interestingly, it has been recently suggested that there was an uncharacterized direct-acting ethylating agent present in cigarette smoke [1]. Since alkylation at the N-7 position of guanine in DNA is the predominant reaction site, N7-alkylguanine represents a good biomarker for determining exposure to alkylating agents. In our previous study, N7-ethylguanine (N7-EtG) has been detected in human urine and was found to be highly associated with cigarette intake of smokers [2]. But the source of this direct-acting ethylating agent in tobacco smoke is still unclear. In the present study, we aimed to investigate the characteristics of the direct-acting ethylating agent present in cigarette smoke by measuring the formation of N7-EtG following exposure of DNA to cigarette smoke *in vitro*. Cigarettes were smoked as specified under the Federal Trade Commission (FTC) standard conditions. Both the particulate and vapor phases of mainstream and sidestream smoke were collected. After sampling, the aqueous extracts of cigarette smoke were added to calf thymus DNA and the mixtures were incubated. The levels of N7-EtG formed were then quantitated by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) with on-line solid phase extraction [3]. Our results showed that N7-EtG was formed *in vitro* and was highly correlated with the number of cigarettes treated. Moreover, this uncharacterized direct-acting ethylating agent was found to be mainly present in the particulate phase of mainstream smoke, indicating it poses a greater health threat to smoker themselves than others.

Singh R et al. (2005). *Chem Res Toxicol* 18, 249-256.

Chao MR et al. (2006). *Carcinogenesis* 27, 146-151.

Chao MR et al. (2007). *Biochem J* 402, 483-490.

We acknowledge financial support from the National Science Council, Republic of China (Grant NSC 95-2314-B-040-037-MY2). We thank the Division of Environmental Health and Occupational Medicine core facility of the National Health Research Institutes for providing the LC-MS/MS and technical assistance.

*Authors have confirmed where relevant, that experiments on animals and man were conducted in accordance with national and/or local ethical requirements.*

---

#### PC322

### Determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human serum by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction

C. Hu<sup>1</sup>, S. Tsai<sup>1</sup>, B. Lu<sup>2</sup>, C. Wang<sup>3</sup> and M. Chao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taichung, 402, Taiwan, <sup>2</sup>Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taichung, 402, Taiwan and <sup>3</sup>Division of Environmental Health and Occupational Medicine, National Health Research Institutes, Miaoli, 350, Taiwan

Level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) in biological fluids has been widely used as a biomarker to assess oxidative lesions to DNA (1). Commercially available ELISA tests could provide a fast and simple method to measure 8-oxodGuo in human serum although the overestimations attributed to a lack of specificity of antibodies has been frequently observed (2).

Interestingly, there are little reports of mass spectrometry techniques attempting to measure 8-oxodGuo in serum. Herein we develop an isotope-dilution LC-MS/MS method coupled with an on-line solid-phase extraction (on-line SPE) to measure serum 8-oxodGuo. Serum sample of 200 µl was firstly added 15N5-8-oxodGuo as an internal standard, followed by the addition of acetonitrile (ACN) to remove the proteins from serum. After centrifugation, the supernatant was collected, dried and re-dissolved in 5%MeOH/0.1% FA for on-line SPE LC-MS/MS analysis.

This method allows for fast and high-throughput analysis of serum 8-oxodGuo because it does not use a column-based purification process; it is also relatively inexpensive by using common laboratory reagents. The results showed that the overall mean recovery of 8-oxodGuo in serum was ~97 % by our newly developed on-line SPE LC-MS/MS with protein precipitation method. This on-line SPE LC-MS/MS method is now ready for comparison tests with the commercial ELISA tests using healthy volunteer's serum samples.

Cooke MS et al. (2006). *Clin Chim Acta* 365, 30-49.

Breton J et al. (2003). *Anal Lett* 36, 123-134.

We acknowledge financial support from the National Science Council, Republic of China (Grant NSC 95-2314-B-040-036-MY2). We thank the Division of Environmental Health and Occupational Medicine core facility of the National Health Research Institutes for providing the LC-MS/MS and technical assistance.

*Authors have confirmed where relevant, that experiments on animals and man were conducted in accordance with national and/or local ethical requirements.*

---

#### PC323

### ADP Hunter™ Plus: an optimized assay format with minimized compound interference for kinase primary screening using ADP accumulation

A. Fowler<sup>1</sup>, N.W. Charter<sup>2</sup>, W. Feng<sup>2</sup>, R. Singh<sup>2</sup>, G. Perez<sup>2</sup>, K. Olson<sup>2</sup> and S. Kumar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Discoverx, Birmingham, UK and <sup>2</sup>Discoverx, Fremont, CA, USA

Commonly used methods for kinase screening either reply on antibody detection of a phospho-epitope, or monitoring ATP depletion as the result of kinase activity *in vivo*. We have developed an improved, generic kinase assay format that monitors the accumulation of ADP as the result of kinase activity. This approach was initially developed as a very rapid, kinetic application for assay development and compound profiling and characterization. However, the assay formulation has recently been optimized to provide features more suitable for primary screening applications. The benefits of this approach include gain-of-signal output, high DTT tolerance, high ATP tolerance and the ability to use whole protein substrates. The detection of ADP is based on an enzyme-coupled reaction converting ADP to a fluorescent signal. This has traditionally been challenging with issues such as compound interference and overall performance. We will present data demonstrating assay improvements and performance with respect to compound screening.