

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定 尿液中的 4 种巯基尿酸

侯宏卫^{1*}, 熊 巍¹, 郜 娜², 宋东奎³, 唐纲岭¹, 胡清源^{1*}

(1. 国家烟草质量监督检验中心, 河南 郑州 450001 ; 2. 郑州大学基础医学院临床药理研究室, 郑州大学国家药品临床研究基地, 河南 郑州 450052 ; 3. 郑州大学第一附属医院泌尿外科, 河南 郑州 450052)

摘要 :建立了固相萃取-高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)同时检测人体尿液中 *N*-乙酰基-*S*-(3-*β*-二羟基丁基)-*L*-半胱氨酸(DHBMA)、*N*-乙酰基-*S*-(3-羟基丙基)半胱氨酸(3-HPMA)、*N*-乙酰基-*S*-(2-羧乙基)-*L*-2-氨基-3-巯基羧酸(CEMA)和苯巯基尿酸(SPMA)的检测方法。冰冻的人体 24 h 尿液在室温下解冻,混合均匀后离心过滤,经 C18 固相萃取小柱净化富集后在多反应监测模式下采用 HPLC-MS/MS 进行定量分析。在 3 个添加水平下,尿液中 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的加标回收率分别为 105.6% ~ 124.4%、102.7% ~ 106.5%、103.2% ~ 103.9% 和 101.7% ~ 104.3%,相对标准偏差为 2.6% ~ 7.7%。以不低于 3 倍的信噪比估算 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的检出限分别为 0.062、0.031、0.020 和 0.003 μg/L。应用该方法检测了 37 例吸烟和非吸烟者的 24 h 尿液样本,结果发现吸烟者尿液中 3-HPMA、SPMA 和 CEMA 的平均含量比非吸烟者高 3 到 6 倍。

关键词 :液相色谱-串联质谱;固相萃取;巯基尿酸;尿液

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2011)01-0031-05

Simultaneous determination of four mercapturic acids in human urine using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HOU Hongwei^{1*}, XIONG Wei¹, GAO Na², SONG Dongkui³,
TANG Gangling¹, HU Qingyuan^{1*}

(1. China National Tobacco Quality Supervision & Test Centre, Zhengzhou 450001, China ;
2. National Clinical Research Base, Institute of Clinical Pharmacology, School of Medical,
Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China ; 3. Department of Urology, the
First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract : A method was developed for the simultaneous extraction and determination of four mercapturic acids (MAs), *N*-acetyl-*S*-(3-*β*-dihydroxybutyl)-*L*-cysteine (DHBMA), *N*-acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cysteine (3-HPMA), *N*-acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cysteine (CEMA) and *S*-phenylmercapturic acid (SPMA), in human urine using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Frozen urine samples were thawed at room temperature, and centrifuged to remove any settled precipitate. The supernatant was then purified and concentrated by a C18 solid phase extraction column, and analyzed by HPLC-MS/MS in the multiple reaction monitoring (MRM) mode for the quantitative analysis. The ranges of recovery for DHBMA, 3-HPMA, CEMA and SPMA spiked in human urine matrix at three concentration levels were 105.6% - 124.4%, 102.7% - 106.5%, 103.2% - 103.9% and 101.7% - 104.3%, respectively, with the relative standard deviations of 2.6% - 7.7%. The limits of detection (LOD, $S/N \geq 3$) were 0.062, 0.031, 0.020 and 0.003

* 通讯联系人 :侯宏卫, 博士, 高级工程师, 研究方向为烟草化学分析。Tel : (0371) 67672727, E-mail : hou_hongwei@yahoo.com.cn.
胡清源, 博士, 研究员, 研究方向为烟草化学分析。Tel : (0371) 67672601, E-mail : huqy@ztri.com.cn.

基金项目 : 云南中烟工业公司科技项目(No. 2010JC11)

收稿日期 : 2010-09-03

$\mu\text{g/L}$ for DHBMA, 3-HPMA, CEMA and SPMA, respectively. The method was successfully used to detect 4 MAs in 37 human urine samples from smokers and non-smokers. It was found that the contents of 3-HPMA, CEMA and SPMA in the urines from cigarette smokers were about three to six-fold more than those in the urines from the non-smokers.

Key words : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); solid phase extraction (SPE); mercapturic acids ; urine

巯基尿酸(mercapturic acid, MA)是外源性亲电子(潜在亲电子)化合物与谷胱甘肽(GSH)结合后的分解产物。由于尿中内源性的巯基尿酸本底值低,又能较为准确地反映原型化合物的特性,因此巯基尿酸作为生物监测指标已广泛用于遗传毒物的生物监测^[1,2]。据报道,尿液中的 *N*-乙酰基-*S*-(3,4-二羟基丁基)-*L*-半胱氨酸(*N*-acetyl-*S*-(3,4-dihydroxybutyl)-*L*-cysteine, DHBMA), *N*-乙酰基-*S*-(3-羟基丙基)-半胱氨酸(*N*-acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cysteine, 3-HPMA), *N*-乙酰基-*S*-(2-氰乙基)-*L*-2-氨基-3-巯基羧酸(*N*-acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cysteine, CEMA)和苯巯基尿酸(*S*-phenylmercapturic acid, SPMA)等 4 种巯基尿酸类化合物与吸烟水平有较强的相关性,能够用于评价烟气中有害成分 1,3-丁二烯、丙烯醛、丙烯腈和苯的接触水平^[3-5]。

目前,关于尿液中巯基尿酸类化合物的分析检测方法的报道较多^[6-12],但是同步提取和同时检测尿液基质中多种目标物的高通量分析方法尚不完善。本实验通过优化前处理及检测条件,建立了同步提取和同时检测尿液中 4 种巯基尿酸 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法(SPE-HPLC-MS/MS),在 12 min 内就可完成 4 种巯基尿酸的分离检测。该方法灵敏、快速,选择性好,适合于分析吸烟与非吸烟者尿液。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

安捷伦 1200 液相色谱仪,配有 G1329A 自动进样器、G1311A 四元混合泵和 G1316A 柱温箱(美国安捷伦公司);API 4000 三重四极杆串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)和 Analyst 1.5 软件数据处理系统(美国应用生物系统公司);吉尔森 ASPEC XL4 自动固相萃取仪(法国 Gilson 公司);Roche/Hitachi MODULAR PRE-ANALYTICS PLUS 系统(日本日立集团)。

氨水、盐酸为分析纯,甲酸、乙酸和甲醇均为色谱纯(美国 TEDIA 公司);CEMA、3-HPMA、SPMA、

DHBMA(化学纯度为 98%) 和 D_3 -CEMA、 D_7 -DHBMA、 D_3 -3-HPMA 和 D_5 -SPMA(纯度为 99%) 标准品(加拿大多伦多研究化学试剂公司)。Supelclean ENVI-18 固相萃取柱(3 mL, 500 mg;美国 SIGMA-ALDRICH 公司), ISOLUTE ENV⁺ 固相萃取小柱(50 mg, 1 mL, 瑞典 Biotage 公司), Oasis[®] MAX 阴离子交换柱(6 mL, 美国 Waters 公司), Strata-X-C 阳离子交换柱(1 mL, 美国 Phenomenex 公司)。肌酐检测试剂盒(日本日立集团)。

1.2 标准溶液的配制

储备液及工作液:用甲醇准确配制 CEMA(0.5 g/L)、3-HPMA(1 g/L)、SPMA(1 g/L)、DHBMA(1 g/L) 的一级单标储备液,储存于棕色玻璃瓶中,于 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。分别准确量取一级单标储备液 CEMA(2 mL)、3-HPMA(1 mL)、SPMA(1 mL) 和 DHBMA(1 mL) 于 4 个 10 mL 棕色容量瓶,用甲醇定容到刻度得到二级单标储备液(100 mg/L)。用甲醇准确配制 D_3 -CEMA(1 g/L)、 D_7 -DHBMA(0.1 g/L)、 D_3 -3-HPMA(1 g/L)、 D_5 -SPMA(1 g/L) 的一级单标储备液。分别准确移取一定量的一级单标储备液于 4 个 10 mL 容量瓶,用甲醇定容到刻度得到二级单标储备液(100 mg/L)。用二级单标储备液配制混合标准溶液,得到两个浓度梯度的混合标准溶液(一级混合标准溶液:DHBMA 1 mg/L、3-HPMA 10 mg/L、CEMA 0.5 mg/L、SPMA 0.1 mg/L;二级混合标准溶液:DHBMA 0.1 mg/L、3-HPMA 1 mg/L、CEMA 0.05 mg/L、SPMA 0.01 mg/L) 和混合内标溶液(D_7 -DHBMA 0.5 mg/L、 D_3 -3-HPMA 5 mg/L、 D_3 -CEMA 0.25 mg/L、 D_5 -SPMA 0.05 mg/L)。

1.3 尿液样本的收集与处理

吸烟和非吸烟志愿者尿液样本由郑州大学国家药品临床研究基地提供。在参加实验前,所有志愿者均须签署一份知情同意书。志愿者为年龄在 21 至 60 岁之间身体健康的吸烟和非吸烟者,收集其 24 h 尿液,储存于 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

尿液在室温状态下解冻并混合均匀。取 10 mL 尿液,用 1 mol/L HCl 溶液调节 pH 到 2 左右。然后

取 200 μL 该尿液置于 2 mL 自动固相萃取仪上的样管中, 加入 50 μL 混合内标及 750 μL 0.1% 甲酸水溶液, 混合均匀, 转入 5 mL 自动固相萃取仪上的样管中。

固相萃取用 Supelclean ENVI-18 固相萃取柱, 预先用 5 mL 甲醇、5 mL 水与 5 mL 0.1% 甲酸溶液活化, 上样量为 500 μL 。用 2 mL 0.1% 甲酸溶液淋洗, 然后用 4 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液并于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至干, 然后用 1 mL 0.05% 乙酸水溶液溶解, 待测。

留取 2 mL 尿液样本, 用酶解分光光度法检测尿液中的肌酐。

1.4 色谱-质谱条件

色谱条件: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 0.05% 乙酸水溶液, 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序 0 ~ 2 min, 95% A ~ 50% A; 2 ~ 4 min, 50% A ~ 40% A; 4 ~ 8 min, 40% A ~ 10% A; 8 ~ 8.1 min, 10% A ~ 95% A; 8.1 ~ 12 min, 95% A。流速为 0.25 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL 。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 负离子扫描方式; 喷雾 (IS) 电压为 -4 400 V; 雾化气 (Gas1) 压力为 344.5 kPa (50 psi); 气帘气 (CUR) 压力为 206.7 kPa (30 psi); 辅助雾化气 (Gas2) 压力为 310.0 kPa (45 psi); 离子源温度 (TEM) 为 500 $^{\circ}\text{C}$; 进口电压 (EP) 为 -10 V; 出口电压 (CXP) 为 -10 V; 驻留时间为 100 ms。监测离子对、相应的碰撞能量 (CE) 及去簇电压 (DP) 见表 1。

表 1 多反应监测模式下 4 种巯基尿酸及其
内标部分质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for DHBMA, 3-HPMA, CEMA, SPMA and the internal standards in multiple reaction monitoring mode

Compound	Parent ion/ product ion (m/z)	Collision energy/ eV	Declustering potential/ V
DHBMA	249.8/120.7*	-22	-38
	249.8/127.7	-16	-38
D ₇ -DHBMA	182.2/152.1	-20	-40
3-HPMA	219.8/90.8*	-15	-26
	219.8/84.4	-15	-26
D ₃ -3-HPMA	222.9/90.8	-18	-36
CEMA	214.8/161.7*	-7	-34
	214.8/85.8	-7	-34
D ₃ -CEMA	217.8/164.7	-10	-30
SPMA	237.8/108.7*	-18	-42
D ₅ -SPMA	196.1/166.1	-12	-30

* quantification ion pairs.

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

对于三重四极杆质谱, 其 DP 和 CE 对 4 种巯基尿酸的裂解有重要的影响。采用针泵注射 (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) 对目标物单独进样, 对 4 种巯基尿酸 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的标准溶液进行全扫描, 得到最大响应值的母离子; 在子离子扫描 (PI) 模式下, 调整 CE 找到该母离子对应的子离子。固定 CE, 得到响应最大的 DP, 然后固定 DP, 优化得到响应最高时的 CE, 结果见表 1。为了得到较好的离子化效率, 采用流动注射分析法对目标化合物进行进样, 得到响应最高时的 IS 电压、Gas1 压力、CUR 压力、Gas2 压力和 TEM, 结果见 1.4 节。

2.2 色谱条件的优化

以 Agilent Eclipse XDB C18 柱作为分析柱, 乙酸水溶液与甲醇为流动相进行优化。实验发现水相流动相中乙酸的体积分数为 0.05% 时最佳。增加乙酸的浓度会抑制质谱响应, 降低乙酸的浓度会使峰形展宽, 最终选择流动相 A 为 0.05% 乙酸水溶液。流动相 B 选用甲醇。选用适当的梯度洗脱程序 (如 1.4 节所述) 使得 4 种巯基尿酸得到完全分离, 一次梯度分析仅需 12 min (见图 1)。

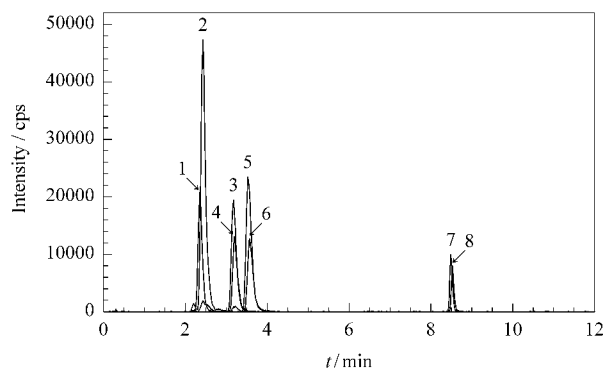


图 1 DHBMA、3-HPMA、CEMA、SPMA 及其
内标混合溶液的多反应监测色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of a mixture of 4 mercapturic acid standards and the internal standards

1. D₇-DHBMA; 2. DHBMA; 3. D₃-CEMA; 4. CEMA; 5. D₃-3-HPMA; 6. 3-HPMA; 7. D₅-SPMA; 8. SPMA.

2.3 固相萃取条件的选择

尿液基质复杂, 对 HPLC 检测的影响很大。本实验选用了较为通用的一种基于硅胶基质的 C18 固相萃取柱 (Supelclean ENVI-18) 和一种基于树脂基质的苯乙烯与二乙烯基苯共聚物柱 (ISOLUTE ENV⁺) 来净化样品。同时由于巯基尿酸类化合物具有两性, 既可以形成阴离子又可以形成阳离子, 因

此本实验还选取了一种阴离子交换柱(Oasis[®] MAX)和一种阳离子交换柱(Strata-X-C),考察它们对4种巯基尿酸的提取效率。

通过比较发现,阳离子交换柱 Strata-X-C 对4种巯基尿酸的保留很弱,在淋洗步骤就被完全冲洗下来,因此不适合于这4种化合物的净化;Oasis[®] MAX 柱对 DHBMA、3-HPMA 和 CEMA 有较好的回收率,但是对 SPMA 的回收率很低;ISOLUTE ENV⁺ 柱表面负载了羟基化基团,使得其可以省去活化的步骤直接上样,但是 ISOLUTE ENV⁺ 柱对 DHBMA 的回收率较低;Supelclean ENVI-18 柱对4种化合物都有较好的保留,洗脱过程也较为容易,4 mL 甲醇就可以将柱上保留的分析物全部洗脱下来,并且此柱除了对 DHBMA 的回收率稍微偏高外,对其他3种巯基尿酸的回收率都很好。故最终选用 Supelclean ENVI-18 柱净化样品。

2.4 标准曲线与检出限

表 2 4种巯基尿酸的回归方程、相关系数和检出限($S/N \geq 3$)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (r) and limits of detection ($S/N \geq 3$) of four mercapturic acids

Compound	Internal standard	Linear range/($\mu\text{g/L}$)	Regression equation [*]	r	LOD/($\mu\text{g/L}$)
DHBMA	D ₇ -DHBMA	1.0 - 200.0	$y = 0.0464x + 1.810$	0.9969	0.062
3-HPMA	D ₃ -3-HPMA	1.0 - 1000.0	$y = 0.00227x + 0.142$	0.9983	0.031
CEMA	D ₃ -CEMA	0.5 - 50.0	$y = 0.0417x + 0.0195$	0.9975	0.020
SPMA	D ₅ -SPMA	0.01 - 20.0	$y = 0.0162x + 0.0137$	0.9977	0.003

* y : the peak area ratio of quantification ions between the analyte and internal standard; x : mass concentration of the analyte, $\mu\text{g/L}$.

2.5 回收率

在非吸烟者的尿液样本中添加混合标准溶液,做低(添加 20 μL 二级混合标准溶液)、中(添加 20 μL 一级混合标准溶液)和高(添加 50 μL 一级混合标准溶液)3个加标水平的回收实验,每个加标水平做8个平行测定。结果表明,3个加标水平的平均回收率($n=8$)为 101.7% ~ 124.4%,相对标准偏差(RSD)在 2.6% ~ 7.7% 之间(见表3)。

表 3 非吸烟者尿液中4种巯基尿酸的回收率和相对标准偏差($n=8$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of 4 mercapturic acids spiked in human urine ($n=8$)

Compound	Added/($\mu\text{g/L}$)	Recovery/%	RSD/%
DHBMA	2	105.6	3.8
	20	119.9	4.4
	50	124.4	2.6
3-HPMA	20	102.7	4.5
	200	106.5	5.1
	500	103.6	3.8
CEMA	1	103.6	3.3
	10	103.2	4.9
	25	103.9	4.9
SPMA	0.4	101.7	7.5
	4	103.7	7.7
	10	104.3	3.7

用处理过的混合空白尿液配制标准曲线。空白尿液选取3份非吸烟者(两男一女)的24 h 尿液,混合均匀后按照实际样品的处理步骤处理空白尿液,得到处理过的空白混合尿液备用。

分别准确移取 0、5、10、20、50、100 μL 的二级混合标准溶液和 20、50、100、250 μL 的一级混合标准溶液于 10 个 1.8 mL 的旋盖样品瓶中,各加入 50 μL 混合内标溶液和 100 μL 混合空白尿液,然后用 0.05% 乙酸水溶液定容到 1 mL。以 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 与相应内标定量离子的峰面积比(y)为纵坐标,以萃取液中 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/L}$)进行回归运算,得到相应的线性回归方程。DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的线性相关系数在 0.9984 到 0.9998 之间,表明在测定的浓度范围内具有良好的线性关系。以信噪比(S/N)不低于 3 时的进样浓度为检出限(LOD),结果见表2。

2.6 吸烟和非吸烟者尿液样本的测定

选取 17 位吸烟者和 20 位非吸烟者的 24 h 尿液样本,测定其尿液中 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的含量,结果见图 2。同时采用酶解分光光

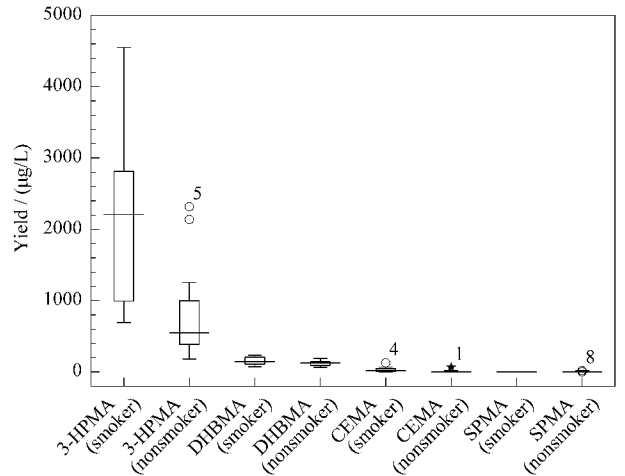


图 2 37 份尿液样品(17 位吸烟者和 20 位非吸烟者)中 4 种巯基尿酸含量的箱线图

Fig. 2 Boxplot of contents of 4 mercapturic acids in 37 human urine samples (17 from the smokers and 20 from non-smokers)

○: mild outliers; ★: extreme outliers; 1, 4, 5, 8: sample number.

度法测定尿液中的总肌酐,以巯基尿酸/肌酐值来校正尿液浓度引起的尿液中巯基尿酸含量的差异,测定结果见图 3。在吸烟者尿液中每摩尔肌酐中含有 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的含量范围分别为 9.90 ~ 76.66、66.46 ~ 1 008.05、4.25 ~ 19.41、0.01 ~ 0.58 mg;在非吸烟者尿液中每摩尔肌酐中含有 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 的含量范围分别为 6.89 ~ 51.34、26.65 ~ 250.94、0.11 ~ 3.92 和 0.00 ~ 2.24 mg。吸烟者尿液中 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 含量的平均值分别比非吸烟者高 1.12、3.06、5.68 和 2.50 倍。吸烟者尿液中 CEMA 的含量明显要高于非吸烟者,3-HPMA 和 SPMA 的含量也偏高,但 DHBMA 变化不明显,这可能是受食物以及空气中污染物的影响。但空气中丙烯腈的含量很低,这种干扰可以忽略^[13],因而 CEMA 可以作为潜在的与烟气相关的生物标志物。

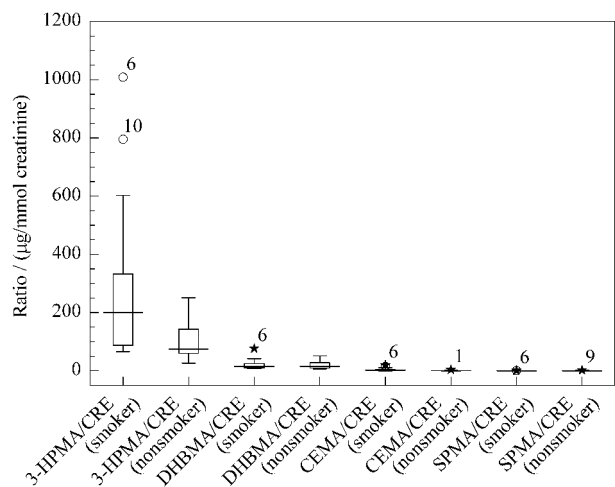


图 3 37 份尿液样品(17 位吸烟者和 20 位非吸烟者)中 DHBMA、3-HPMA、CEMA 和 SPMA 含量与肌酐的比率的箱线图

Fig. 3 Boxplot of ratios of DHBMA, 3-HPMA, CEMA and SPMA contents to creatinine (CRE) separately in 37 urine samples (17 from the smokers and 20 from non-smokers)

○ : mild outliers ; ★ : extreme outliers ; 1 , 6 , 9 , 10 : sample number.

3 结论

建立了同步提取和同时检测尿液中 4 种巯基尿酸 DHBMA、3-HPMA、CEMA、SPMA 的方法。方法的选择性好,灵敏度高,适合于分析吸烟与非吸烟者尿液中的 4 种巯基尿酸。通过检测吸烟和非吸烟者尿液中的 4 种巯基尿酸,发现 CEMA 受环境因素的影响较小,而吸烟对其影响较大,因此可以作为潜在的与烟气相关的丙烯腈接触的生物标志物。

参考文献:

- [1] Shen H Q, Gu Z W, Wu Y Q. Biological Monitoring and Biomarker: Basic Theory and Practice. 2nd ed. Peking University of Medical Publishing House (沈惠麒, 顾祖维, 吴宜群. 生物监测和生物标志物: 理论基础及应用. 2 版. 北京: 北京大学医学出版社), 2006
- [2] De Rooij B M, Commandeur J N M, Vermeulen N P E. Biomarkers, 1998, 3(4/5): 239
- [3] Carmella S G, Chen M L, Han S M, et al. Chem Res Toxicol, 2009, 22(4): 734
- [4] Mendes P, Liang Q W, Frost-Pineda K, et al. Regu Toxicol Pharm, 2009, 55(1): 17
- [5] Scherer G, Engl J, Urban M, et al. Regul Toxicol Pharm, 2007, 47(2): 171
- [6] Paci E, Pigni D, Cialdella A M. Biomarkers, 2007, 12(2): 111
- [7] Yang X, Xie J P, Xie F W, et al. Journal of Instrumental Analysis (杨雪, 谢剑平, 谢复炜, 等. 分析测试学报), 2009, 28(6): 649
- [8] Yang X, Zhao G, Xie F W, et al. Tobacco Science & Technology (杨雪, 赵阁, 谢复炜, 等. 烟草科技), 2009(9): 26
- [9] Ding Y S, Blount B C, Valentin-Blasini L, et al. Chem Res Toxicol, 2009, 22(6): 1018
- [10] Schettgen T, Musiol A, Alt A, et al. J Chromatogr B, 2008, 863(2): 283
- [11] Scherer G, Urban M, Hagedorn H W, et al. Hum Exp Toxicol, 2007, 26(1): 37
- [12] Mascher D J, Mascher H J, Scherer G, et al. J Chromatogr B, 2001, 750(1): 163
- [13] Leonard A, Gerber G B, Stecca C, et al. Mutat Res, 1999, 436(8): 263