

同位素稀释-高效液相色谱-质谱联用技术检测 大鼠血浆中的芥子气水解产物

李春正 陈佳 钟玉环 钟玉绪 谢剑炜 李桦*

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘 要 应用同位素稀释-高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)建立了同时定量检测血浆中芥子气水解代谢产物硫二甘醇(TDG)和二羟乙基亚砷(TDGO)的方法。应用甲醇和乙腈混合溶剂沉淀染毒大鼠血浆中蛋白 采用 ZORBAX-C₁₈ 色谱柱(100 mm × 3.0 mm , 3.5 μm) ,以 5 mmol/L 甲酸铵-甲醇梯度洗脱分离待测物。以 d₈-TDG 为内标 在正离子多反应监测模式下定性和定量分析 TDG 和 TDGO。方法学验证结果表明 , TDG 在 5 ~ 800 μg/L 和 TDGO 在 0.5 ~ 80.0 μg/L 范围内均呈良好的线性关系($r^2 > 0.991$) ,定量限分别为 5 和 0.5 μg/L 加标回收率在 101% ~ 118% 之间 ,方法的日内和日间精密度(RSD) 均小于 10%。对 SD 大鼠($n = 6$) 采用皮下注射方式进行染毒后采样测定 ,代谢动力学参数计算结果显示 ,TDG 和 TDGO 的达峰时间(t_{max}) 分别为 30 和 60 min 峰值浓度(c_{max}) 为(1724 ± 227) μg/L 和(301 ± 115) μg/L 血浆浓度-时间曲线下面积(AUC) 为(3286 ± 249) μg · h/L 和(1010 ± 363) μg · h/L。

关键词 芥子气; 硫二甘醇; 二羟乙基亚砷; 液质联用; 血浆; 毒代动力学

1 引 言

芥子气是一种强效的糜烂性毒剂 ,它在第一次世界大战中被迅速武器化 ,并在 1917 年应用于实战 ,随即被纳入了多国的化学武器储备。尽管芥子气进入战争时间较晚 ,但中毒造成的伤亡人数超过了其它所有类型毒剂的总和 ,最近一次确证使用发生在 20 世纪 80 代的两伊战争^[1]。为制止化学武器对人类的危害 ,1997 年正式生效的《化学武器公约》对化学武器的生产、使用、贮备及销毁作出了详细规定 ,并针对已有的化学战剂、前体及有毒化学品进行了分类清单管理 ,芥子气作为最重要的化学战剂之一被列入清单一(Schedule 1)^[2]。二战结束后 ,侵华日军在我国领土上遗留了大量化学武器 ,芥子气是其中主要的填充战剂。这些遗留化学武器多被日军掩埋和藏匿 ,弹体和容器腐蚀严重 ,毒剂泄漏已对我国环境和人民生命健康造成很大威胁 ,近年来因遗留化学武器引起的人员伤亡时有报道。芥子气暴露引起的损伤通常存在 1 ~ 12 h 的无症状潜伏期 ,导致芥子气中毒诊断和治疗的延误 ,并由此产生严重后果 ,特别是对芥子气意外事故中的中毒人员。因此 ,建立准确、灵敏、快速的生物样品中芥子气及相关物质的分析方法 ,实现早期中毒诊断是芥子气医学防治研究的重要内容。

芥子气进入体内后可迅速发生水解/氧化反应 ,生成硫二甘醇(TDG)和二羟乙基亚砷(TDGO)等代谢产物(结构见图 1)。在芥子气损伤人员的血液、尿、组织液及皮下组织中都可检测到 TDG ,尿样中的 TDG 和 TDGO 的浓度较高 ,且可以持续数日至一周^[3]。美军《化学防护手册》^[4]已将 TDG 作为芥子气

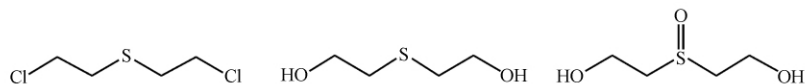


图 1 芥子气及 TDG 和 TDGO 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of sulfur mustard and its hydrolysis/oxidation products

中毒的临床诊断指标之一。目前报道 TDG 和 TDGO 的生物医学检测样本主要以尿样为主 ,检测技术以气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[4~7]为主。但 GC-MS 方法需先用 TiCl₃ 将 TDGO 还原为 TDG ,通过固相

2012-03-12 收稿; 2012-05-15 接受

本工作系国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZXJ09006-001 2010ZXJ0900X-003-002) 资助

* E-mail: amms_hli@126.com

萃取等技术手段实现样品净化,再经过衍生化后,才可检测分析。该方法中样品前处理过程复杂繁琐,耗时较长^[8,9]。相对于尿样,血浆样品则能够反映毒剂及其相关物质在血循环中的实时暴露水平,以及对严重中毒伤员具有采样及时方便等优点,因此,能够在芥子气暴露确证中提供更直接的证据。

本研究基于高效液相色谱-串联四极杆质谱联用技术,应用稳定性同位素化合物为内标,实现了对TDGO的直接检测,建立并验证了同时测定血浆样品中TDG和TDGO的定量分析方法。本方法灵敏快速、操作简便、重现性好,可实时监测染毒大鼠血浆中芥子气暴露标志物TDG和TDGO的浓度,并成功应用于大鼠皮下染毒芥子气的毒物代谢动力学研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ACQUITY™型超高效液相色谱仪(UPLC,美国Waters公司);QTrap5500型三重四极杆线性离子阱串联质谱仪(美国AB Sciex公司);ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈反相色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 3.5 μm, 美国Agilent公司);RVC 2-33 CD plus型冷阱-隔膜泵-离心蒸发浓缩仪(德国Christ公司);Eppendorf Centrifuge 5418型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

甲酸铵(Fisher公司);甲醇、乙腈(色谱纯, Sigma Aldrich公司);硫二甘醇(TDG)及d₈-TDG参考品(Sigma Aldrich公司);二羟乙基亚砷(纯度>99%,本实验室合成,结构及纯度由IR、NMR、MS技术确证);芥子气(纯度>96%,解放军防化指挥工程学院提供);丙二醇(北京化学试剂公司);实验用水由Milli-Q纯水机(美国Millipore公司)制备。

清洁级SD大鼠(雄性,体重(270 ± 15) g),由军事医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK-军-2007-004,SD大鼠血液自行采集。

2.2 样品前处理

2.2.1 安全措施 涉及到芥子气的操作,如取用、配制和染毒过程均在通风良好状况下进行;以Ca(ClO)₂-NaOH(3:2, n/n)配制固液比在1:8~1:9的混合液的上清液作为洗消剂,各种直接接触芥子气的实验器材在使用后立即洗消。

2.2.2 标准溶液配制 用50%(V/V)甲醇-水配制TDG和TDGO混合标准液浓度为1 mg/L,储备液在3个月内保持稳定。内标化合物配制为600 μg/L的甲醇储备液,使用前稀释至30 μg/L。以上储备液密封后于-20℃保存。

2.2.3 样品处理 50 μL大鼠血浆,加入200 μL含有d₈-TDG内标的乙腈-甲醇(4:1, V/V)混合液沉淀蛋白,涡旋30 s,以14000 r/min离心15 min,移取上清液,50℃离心浓缩至干,以100 μL 10%(V/V)乙腈-水溶液复溶,静置10 min后涡旋30 s,以14000 r/min离心5 min,移取上清液,进样2 μL。

2.3 液相色谱-质谱分析条件

液相色谱条件: A相为1%(V/V)甲醇-水溶液(含5 mmol/L甲酸铵), B相为95%(V/V)甲醇-水溶液(含5 mmol/L甲酸铵)。梯度洗脱程序: 0~1.0 min 0% B; 1.0~1.5 min 0%~5% B; 1.5~3.4 min, 5%~17% B; 3.4~5.0 min, 17% B; 5.0~8.5 min, 17%~44% B; 柱温40℃, 流速0.3 mL/min, 进样2 μL。

质谱条件: 离子源: 热喷雾离子源; 模式: 正离子模式; 扫描方式: 多反应监测(MRM); 帘气: 241 kPa; 源温: 550℃, 雾化气(GS1)和辅助加热干燥气(GS2): 379 kPa。其它质谱分析参数见表1。

2.4 SD大鼠染毒血浆样品分析

染毒实验前,新配制芥子气染毒制剂,以13 mg/kg剂量,对大鼠皮下注射染毒,分别在染毒前和染毒后5, 15和30 min,及1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36和72 h采血,分离血浆,供分析检测。

3 结果与讨论

3.1 内标和蛋白沉淀剂的选择

本研究选用d₈-TDG作为TDG的同位素稀释内标,并同时作为TDGO的类似物内标。

采用乙腈-甲醇(4: 1, V/V) 一步蛋白沉淀法处理血浆样品, 样品的回收率较高, 方法的精密度和准确度较好。

3.2 仪器分析条件的优化

针对 TDG 和 TDGO 的色谱保留能力和离子化效率对仪器分析条件进行优化, 各优化参数如表 1 所示; TDG 和 TDGO 在 ESI⁺ 源中的质谱图见图 2。

表 1 TDG, TDGO 和内标的质谱优化参数及液相色谱保留时间

Table 1 MS parameters and LC retention times of thioglycol (TDG), thioglycol sulfoxide (TDGO) and internal standard

分析物 Analyte	离子对 Ion pairs (<i>m/z</i>)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞电压 Collision pressure (V)	喷雾电压 Spray voltage (V)	碰撞气 Collision gas (kPa)	保留时间 Retention time (min)
d ₈ -TDG	131.0/113.0	50	9	1750	41	4.1
TDG	123.0/87.0, 123.0/105.0*	50	9	1750	41	4.1
TDGO	139.0/63.0, 139.0/77.0*	50	22, 18	1450	62	1.9

* 定量离子(Quantitative Ion)。

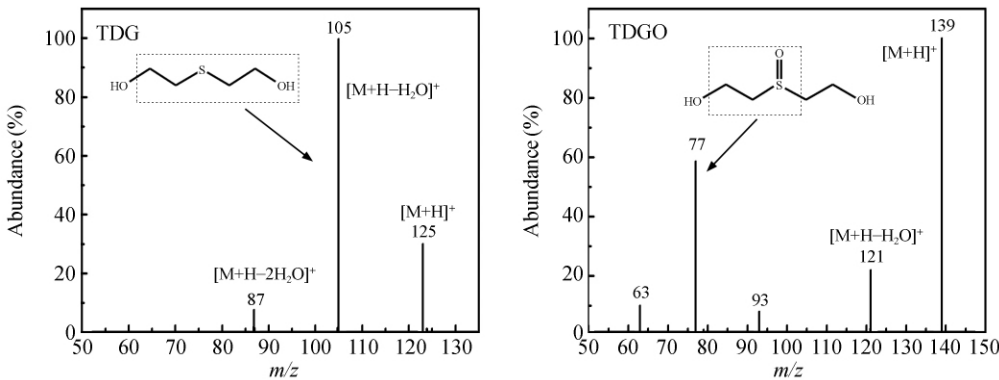


图 2 ESI⁺ 源中的 TDG 和 TDGO 质谱图

Fig. 2 Mass spectra of TDG and TDGO in ESI⁺ source

3.3 方法学验证^[10]

3.3.1 选择性 考察了 TDG 和 TDGO 在大鼠血浆中的自然本底。选择 30 只无芥子气接触史的 SD 大鼠, 采集空白血浆, 应用本方法进行检测。结果表明, 大鼠血浆中普遍存在 TDGO, 浓度在 0.2 ~ 0.8 μg/L 范围内; 而 TDG 仅在部分大鼠血浆中检出。本研究选择 TDG 阴性, 0.2 μg/L TDGO 水平的空白大鼠血浆作为方法学考察的空白基质。加标血浆样品与空白血浆样品的 MRM 色谱图(图 3) 的比较结果显示, 除低水平的 TDGO 本底外, 无其它干扰物。

3.3.2 线性范围、方法检出限及定量限 TDG 和 TDGO 质量浓度分别在 5 ~ 800 μg/L 和 0.5 ~ 80.0 μg/L 范围内, 其质谱响应与浓度之间呈现良好的线性关系($r^2 > 0.991$)。TDG 和 TDGO 的线性回

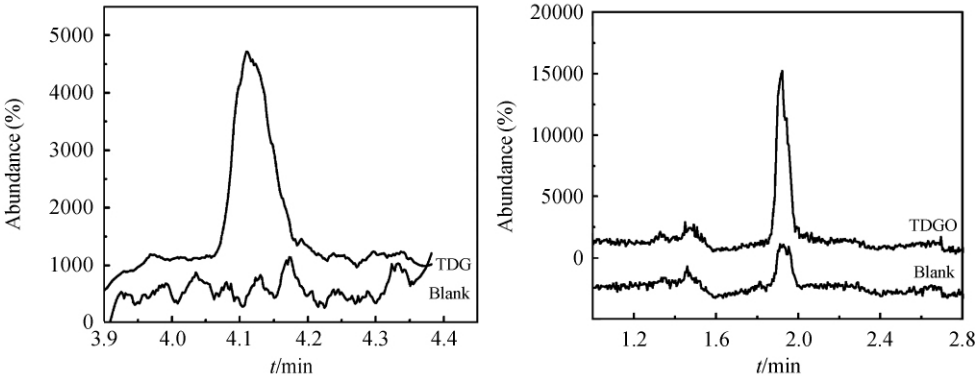


图 3 TDG 和 TDGO 与空白大鼠血浆的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of TDG and TDGO with blank plasma of rats

归方程、检出限($S/N > 3$) 及定量限($S/N > 10$) 见表 2。

表 2 大鼠血浆中 TDG 和 TDGO 的线性方程、检出限和定量限

Table 2 TDG and TDGO calibration curves , limit of detection (LOD) and low limit of quantification (LOQ)

分析物 Analytes	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	拟合方程 Linear equation	相关系数 r^2	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/L}$)
TDG	5 ~ 800	$y = 0.0178x + 0.003$	0.9936	0.5	5
TDGO	0.5 ~ 80.0	$y = 0.1572x + 0.0327$	0.9912	NA*	0.5

* not applicable

3.3.3 精密度和准确度 通过考察待测化合物与内标物响应比值的相对标准偏差(RSD) 研究了方法的精密度。日内精密度通过一日内分别平行制备 6 份低、中、高浓度的质控样品进行测定; 日间精密度则在连续 6 日内制备低中高浓度质控样品, 每个浓度点平行制备 3 份进行测定; 测定结果以相对标准偏差表示, 日内精密度和日间精密度分别在 3.3% ~ 6.3% 和 3.7% ~ 9.7% 范围内(表 3) , 表明此方法具有良好的可重复性, 符合生物样品定量检测要求。

表 3 TDG 和 TDGO 血浆样品定量方法的日内和日间精密度

Table 3 Precision and accuracy of method

分析物 Analyte	添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	日内 Intra-day ($n = 6$)		日间 Inter-day ($n = 6$)		分析物 Analyte	添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	日内 Intra-day ($n = 6$)		日间 Inter-day ($n = 6$)	
		测定浓度 Found ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	测定浓度 Found ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)			测定浓度 Found ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	测定浓度 Found ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
TDG	15	16 $\pm$ 1	6.3	16 $\pm$ 1	6.3	TDGO	1.5	1.6 $\pm$ 0.1	6.3	1.7 $\pm$ 0.1	5.9
	100	106 $\pm$ 6	5.7	103 $\pm$ 10	9.7		10.0	9.6 $\pm$ 0.4	4.2	9.5 $\pm$ 0.7	7.4
	500	483 $\pm$ 22	4.6	491 $\pm$ 18	3.7		50.0	48.7 $\pm$ 1.6	3.3	50.3 $\pm$ 2.1	4.2

3.4.4 回收率和基质效应 取空白大鼠血浆, 进行 3 个质控浓度的添加回收实验, 将 TDG 和 TDGO 在血浆质控样品的响应值与同浓度的标准品溶液响应值相比较, 得回收率; 同时采用经蛋白沉淀处理后的空白血浆基质配制质控样品, 将测定的响应值与同浓度的标准品溶液响应值相比较, 计算基质效应。结果表明, TDG 和 TDGO 的加样回收率在 101% ~ 118% 之间; TDG 和 TDGO 的相对基质效应分别在 $\pm 10\%$ 和 $\pm 15\%$ 范围内。

表 4 不同条件下的稳定性

Table 4 Stability of samples under various storage conditions

分析物 Analyte	添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	冻融稳定性 freeze-thaw cycles (RSD , % , $n = 3$)	样品处理后稳定性 Post-preparation (RSD , % , $n = 6$)	长期稳定性 long-time stability (RSD , % , $n = 6$)
TDG	15	9.4	8.88	4.9 (10 d)
	100	6.6	7.34	13.3 (35 d)
	500	8.3	3.19	5.3 (35 d)
TDGO	1.5	8.86	7.53	5.5 (10 d)
	10.0	6.05	5.93	10.9 (35 d)
	50.0	3.3	3.63	8.9 (35 d)

3.3.5 稳定性 如表 4 所示, 经处理后的质控样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 内重复进样, 测得各质控样品的相对标准偏差 $< 8.9\%$; 配制血浆质控样品, 经 -80°C 反复冻融 3 次后测定, 相对标准偏差 $< 9.4\%$; 此外, -80°C 条件下冻存 35 d 考察质控样品的长期稳定性, 结果表明, 中、

高浓度的 TDG 和 TDGO 在大鼠血浆中可保持稳定, 而低浓度的 TDG 和 TDGO 血浆样品应在冻存 10 d 内测定。

3.4 大鼠染毒血浆样品的分析

将本方法应用于芥子气皮下染毒大鼠血浆样品的测定, 研究 TDG 和 TDGO 在芥子气染毒大鼠体内的毒物代谢动力学过程, 采用 WinNonlin 软件(Version 5.2.1, 美国) 的非房室模型进行拟合, 并得到相应动力学参数。

雄性 SD 大鼠($n = 6$) 经芥子气皮下染毒 13 mg/kg 后, 血浆中 TDG 和 TDGO 的浓度呈迅速上升的趋势(图 4) , 分别在 30 和 60 min 达到(1724 ± 227) $\mu\text{g/L}$ 和(301 ± 115) $\mu\text{g/L}$ 的峰值浓度, 随后逐渐降低; 染毒 72 h 后, TDG 和 TDGO 的浓度分别下降至定量限附近, 二者的血浆消除半衰期分别为 14.2 和 13.7 h; TDG 和 TDGO 的血浆浓度-时间曲线峰面积(AUC) 分别为(3286 ± 249) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ 和(1010 ± 363) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ 。

L. 实验表明 在芥子气染毒后数小时内能同时测得血浆中显著高于本底水平的 TDG 和 TDGO , 这为芥子气染毒的诊断提供一个可靠的指标 , 尽管芥子气皮下染毒后 TDGO 在大鼠血浆的峰值浓度和整体暴露水平均低于 TDG , 但 TDGO 更高的灵敏度和更好的色谱行为使其更适宜作为在芥子气低剂量暴露下的诊断标志物。

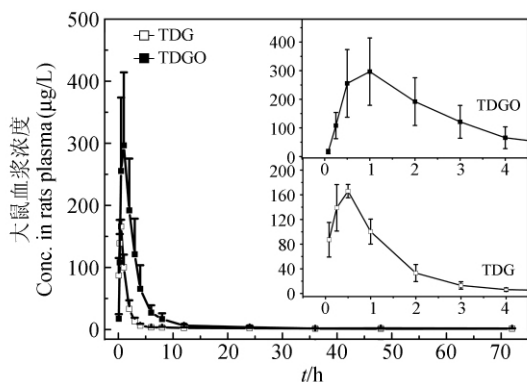


图 4 芥子气皮下染毒 (13 mg/kg) 大鼠血浆中 TDG 和 TDGO 随时间变化的动力学曲线 (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

Fig. 4 Toxicokinetics of TDG and TDGO in SD rats after a subcutaneous dose of sulfur mustard at 13 mg/kg. (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

References

- 1 Takafuji E T, Franz D R. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, Office of The Surgeon General, Washington D. C., TMM Publications, 1997: 198 ~ 200
- 2 Conference on Disarmament. *The Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction*, United Nations Document CD/ 1170, Geneva, Switzerland, 1992
- 3 Black R M, Read R W. *J. Chromatogr. B*, 1995, 665(1): 97 ~ 105
- 4 US Army Medical Research Institute of Chemical Defense (USAMRICD). *Medical Management of Chemical Casualties Handbook*. 4th Ed., Aberdeen Proving Ground, MD, USA, 2007: 83
- 5 Mesilaakso, M. *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation and Analytical Methods*; 1st Ed.; Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 409 ~ 416
- 6 Capacio B R, Smith J R, DeLion M T, Anderson D R, Graham J S, Platoff G E, Korte W D. *J. Anal. Toxicol.*, 2004, 28(5): 306 ~ 310
- 7 Jakubowski E M, Sidell F R, Evans R A, Carter M A, Keeler J R, Evans R A, McMonagle J D. *Toxicol Mechanism Methods*, 2000, 10(2): 143 ~ 150
- 8 Noort D, Fidler A, Benschop H P, de Jong L P A, Smith J R J. *Anal. Toxicol.*, 2004, 28(5): 311 ~ 315
- 9 Smith J R, Capacio B R, Korte W D J. *Anal. Toxicol.*, 2008, 32(1): 17 ~ 24
- 10 U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001

Simultaneous Quantification of Thioglycol and Thioglycol Sulfoxide in Rat Plasma by Isotope Dilution-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LI Chun-Zheng, CHEN Jia, ZHONG Yu-Huan, ZHONG Yu-Xu, XIE Jian-Wei, LI Hua*
(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract A method based on isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed and validated to simultaneously quantify metabolites of sulfur mustard, thioglycol (TDG) and thioglycol sulfoxide (TDGO), in rat plasma. Plasma samples were pretreated with the mixed solvent of methanol and acetonitrile to precipitate proteins. The separation of TDG and TDGO was achieved on a ZORBAX-C₁₈ column (3.0 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μ m) by gradient elution with mobile phase consisting of

methanol and 5 mmol/L ammonium formate aqueous solution. The mass spectrometric identification and quantification were performed using positive electrospray ionization and multiple reactions monitoring mode. An isotopic labeled TDG (d_8 -TDG) was used as internal standard. The calibration curves for TDG and TDGO were linear ($R^2 > 0.991$) over the range from 5 – 800 $\mu\text{g/L}$, and 0.5 – 80 $\mu\text{g/L}$, with the lower limit of quantification at 5 and 0.5 $\mu\text{g/L}$. The recovery of the analytes ranged from 101% to 118%. The intra- and inter-day precisions (RSD) were all within 10%. The plasma was collected and analyzed from HD-exposure rats after subcutaneous administration, and the kinetics parameters of TDG and TDGO were calculated and demonstrated as follow: $t_{\max}$ 30 min and 60 min, $c_{\max}$ (1724 ± 227) $\mu\text{g/L}$ and (301 ± 115) $\mu\text{g/L}$, AUC (3286 ± 249) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ and (1010 ± 363) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, respectively.

Keywords Sulfur mustard; Thioglycol; Thioglycol sulfoxide; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Plasma; Toxicokinetics

(Received 12 March 2012; accepted 15 May 2012)

2013 年《色谱》征订启事

国内统一连续出版物号 CN 21 – 1185/O6

国际标准连续出版物号 ISSN 1000 – 8713

国外发行代号 DK21010

邮发代号 8 – 43

广告经营许可证号 2012003

CODEN 编码 SEPUER

《色谱》是中国唯一的色谱专业期刊,主要报道色谱学科的基础性研究成果,色谱及其交叉学科的重要应用科研成果及最新研究进展。适于科研院所及分析测试领域等从事色谱基础和应用技术研究的科研人员、色谱及其相关学科的硕士及博士研究生、色谱器件及仪器的开发人员阅读。

《色谱》已被美国《医学索引》(Medline)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、波兰《哥白尼索引》(IQ)、《日本科学技术文献数据库》(JICST)和英国皇家化学学会系列数据库中的《分析化学文摘》(AA)、《工业化学灾害》(CH)、《质谱学通报(增补)》(MSB-S)等收录。连续多年入选 CA 千刊表。

《色谱》在国内也具有较高的影响力。入选百种中国杰出学术期刊,是中国科学院优秀期刊、中国科协优秀期刊、中国科技核心期刊、中国科技精品期刊、中文核心期刊、中国科协精品科技期刊工程项目入选期刊。

《色谱》近几年在中国科学技术信息研究所的影响因子等评价指标一直名列化学学科期刊前茅。2011 年公布的影响因子为 1.926,名列全国 35 种化学类核心期刊第一名,在全国 1998 种科技核心期刊中名列第九。

《色谱》每月 28 日出版。单价 15 元,全年 180 元。请在全国各地邮局订阅,邮发代号 8 – 43;也可直接与《色谱》编辑部联系订购,联系人:卫晓鸾。

网址: www.chrom-China.com; 地址:大连市中山路 457 号;电话: (0411) 84379021; E-mail: sepu@dicp.ac.cn