

液相色谱-电感耦合等离子质谱和电喷雾电离质谱研究 乙二胺二氯化钯与鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸反应产物

刘德晔 朱峰* 马永建 吉文亮 刘华良

(江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘 要 建立了基于 HPLC-ICP-MS 分离乙二胺二氯化钯 $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ 与鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸 5'-dGMP 反应产物的方法。方法得到两种能够随色谱流出的产物, 产物在 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 作为流动相时, 得到的分离峰型良好。主产物保留时间为 2.8 min, 另一产物保留时间为 3.2 min。主产物经富集后由 ESI-MS (MS/MS) 鉴定得到 m/z 为 510, 511, 512, 514 和 516 的 $[\text{M} + 1]^+$ 分子离子峰且丰度比与 Pd 同位素元素一致, 再通过碎片推断结构为 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$, 另一种产物经 HPLC-DAD 解析发现紫外吸收光谱与 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 完全相同, HPLC-ICP-MS 发现产物含 Pd 量也与 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 相同, 结合文献推断另一产物为 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 的多聚物。研究表明, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 易在酸性条件下生成, 其多聚物易在碱性条件下生成, 在反应体系 pH = 6.0 时, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 在 12 h 内生成且稳定存在。HPLC-ICP-MS 图谱显示随着反应 pH 的增加两种产物的总量逐步减少。

关键词 电感耦合等离子质谱; 液相色谱; 鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸; 钯化合物

1 引 言

与 Pt(II)配合物相同, Pd(II)配合物也有杀伤肿瘤细胞作用^[1-4], Pt(II)和 Pd(II)性质相近, 采用 dsp² 杂化形成平面四边形配合物, 具有高度相似的结构特征。Pt(II)配合物杀伤肿瘤细胞的机理是: 其与 DNA 中的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸 5'-dGMP 形成分子键, 使核酸变性细胞死亡^[5, 6]; 同样, Pd(II)配合物也能使核酸变性^[7-10]的细胞死亡。核酸由单核苷酸组成, 而 5'-dGMP 和 5'-GMP (鸟嘌呤核糖核苷酸) 是核酸的重要组成, 研究 Pd(II)与 5'-dGMP 和 5'-GMP 发生分子键合原理和方式对 Pd(II)损伤 DNA 以及细胞凋亡机理有理论和现实意义, 对开发 Pd(II)抗癌药物有指导作用。Zhu 等^[11]用电位滴定法和 ¹H NMR 研究了乙二胺二水合 Pd $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与鸟嘌呤核苷酸 5'-GMP 相互作用, 认为在 pH 5.0 时 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与 5'-GMP 的 N1 位氮形成化合物 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-GMP})(\text{H}_2\text{O})]$; 在 pH > 8.0 时 4 分子 5'-GMP 上 N1 和 N7 位氮会与 4 分子 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 形成四元环状化合物 $[\text{Pd}(\text{en})(\mu\text{-N1, N7-5'-GMP})_4]$ 。Zhang 等^[12]通过计算确定了 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与鸟嘌呤形成的四元环状化合物结构。Wirth 等^[13]研究了 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 与 5'-GMP 相互作用, 认为溶液中除了形成化合物单体和环状四聚体外还有二聚体。文献 [11, 13] 均在混合体系中研究产物组成而未对其进行分离检测具有一定局限性, 且文献所采用的滴定分析法不能直观定性, 产物具有潜在不确定性。色谱和质谱是对复杂体系分离和定性的有力工具, 近年来, 基于 HPLC-ICP-MS 研究食品保健品、水质、生物样本中元素的形态得到巨大的发展^[14-17], 在铂类抗癌药物的研究中得到广泛应用^[18-20], 但未见用于 Pd 类抗癌药物的研究。本研究采用 HPLC-ICP-MS 联用分离 $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ (结构式见图 1b) 与 5'-dGMP (结构式见图 1a) 反应产物, HPLC-DAD 对产物初步定性, 并用 ESI-MS 得出主产物分子结构。研究发现, $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ 与 5'-dGMP 反应产物中有两种能够在给定色谱条件下流出, 且具有相同的紫外吸收光谱, 其中主产物经 ESI-MS (MS/MS) 定性为 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$, 而另一种产物为它的多聚物, 其中 $[\text{Pd}(\text{en})(\text{N1-5'-dGMP})]$ 可大量存在于碱性体系中。研究还发现, 在反应体系 pH 6.0 时, $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ 与 5'-dGMP 反应在 12 h 内完成。本研究建立的基于 HPLC-ICP-MS 分离乙二胺二氯化 Pd $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ 与 5'-dGMP 反应产物的

2014-08-14 收稿; 2014-10-30 接受

本文系江苏省预防医学学科课题 (No. Y20130053), 江苏省医学领军人才项目 (No. LJ201130), 江苏省“十二·五”科教兴卫工程 (No. ZX201109) 项目资助

* E-mail: 22929904@qq.com

方法未见报道,本方法经改进,可用于其它 Pd(II)抗癌药物的形态分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ESI-MS 为 TSQ QUANTUM ACCESS MAX 串联质谱仪、X-7 电感耦合等离子体质谱及其工作站(美国 Thermal 公司);色谱与 ICP-MS 用 Peek 管相连,电子触发采集数据;OriginPro 7.0 绘图软件;LC-20AB 液相色谱仪(日本岛津公司),配备二极管阵列检测器(DAD),色谱柱为 Acclaim PA2 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 μm, 美国戴安公司)。

99% 乙二胺二氯化 Pd 和鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸二钠盐(美国 Sigma-Aldrich 公司);Na₂HPO₄、KH₂PO₄、HCl、NaOH(分析纯,南京化学试剂二厂);娃哈哈纯净水(电阻率大于 18 MΩ·cm),1000 mg/L Lu 和 Pd 单标溶液(美国 Spex 公司);HNO₃(德国默克公司)。

2.2 [Pd(en)Cl₂]与 5'-dGMP 反应条件

分别称取 4.7 mg(0.02 mmol) [Pd(en)Cl₂]和 7.8 mg 5'-dGMP 二钠盐(0.021 mmol),混合,用水溶解并定容至 10 mL,其中 5'-dGMP 略过量,用磷酸盐缓冲液和 NaOH 分别调节至 pH 6.0,8.0,9.0 和 10.0,在 37 °C 水浴中恒温反应 48 h,得到产物的浓溶液,色谱进样前适当稀释。

2.3 ICP-MS 和 ESI-MS 优化的工作参数

本研究选用丰度最高的 106Pd(27.33%) 作为测定同位素,HPLC-ICP-MS 联用时基线离子强度小于 50 个计数。同心雾化器,雾化室为撞球式雾化室,表 1 电感耦合等离子体质谱条件主要参数经优化后如表 1 所示。

利用 ESI-MS(MS/MS) 研究含 Pd 色谱峰的化学结构,需富集色谱流出物至 10 mg/L(以 Pd 计)以上有较好的响应,且随着离子源挥发气温度和毛细管温度提高信号响应也对应提高,经优化 ESI-MS 的主要参数为:正离子模式,喷雾电压 3000 V,挥发气温度 450 °C,毛细管温度 400 °C,鞘气 12 L/min,辅助气 3 L/min。

2.4 色谱流出物总 Pd 与进入色谱柱总 Pd 比例的测定

因没有 Pd(en)-5'-dGMP1 和 Pd(en)-5'-dGMP2 标准物质,无法通过峰面积积分对反应产物进行定量分析,但可通过收集色谱流出物,然后消解得到流出物中总 Pd 含量,并与进样前总 Pd 含量进行对比。

将 2.2 节中的反应液稀释至含 Pd 4.0 mg/L,色谱进样 50 μL,收集保留时间 2.0 ~ 4.0 min 的色谱流出物共 1.6 mL,加入 1 mL HNO₃-HCl(1:3, V/V),密封水浴,100 °C 消解 30 min 后冷却,定容至 10 mL,ICP-MS 测定。ICP-MS 使用 10 μg/L Lu 作为在线内标。

3 结果与讨论

3.1 HPLC-ICP-MS 及 HPLC-DAD 条件优化

HPLC-ICP-MS 形态分析中常用的流动相缓冲盐中碳酸盐和醋酸盐可能会导致 ICP-MS 锥口积碳,所以不采用;而铵盐可能会与 Pd 盐络合,也不采用。因此,流动相用磷酸盐缓冲液配制,高浓度缓冲液可使峰型对称,但易导致 ICP-MS 锥口沉积盐分。实验表明,最佳条件为:25 mmol/L 磷酸盐缓冲液作为流动相,流速 0.8 mL/min。流动相 pH 值影响 [Pd(en)Cl₂]与 5'-dGMP 反应产物的色谱行为,2.2 节中反应产物(pH 6.0)稀释后,以 HPLC-ICP-MS 研究其在不同流动相中行为,结果见图 2。

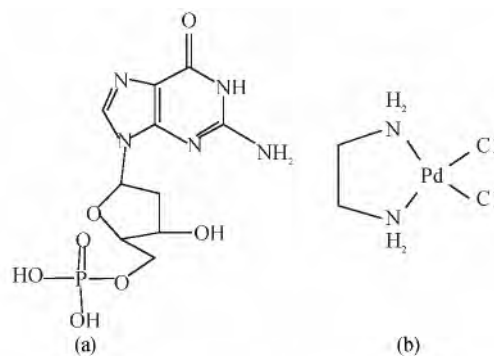


图 1 5'-dGMP (a) 和 [Pd(en)Cl₂] (b) 的结构图

Fig. 1 Structure of 5'-deoxyguanylic acid (5'-dGMP) (a) and [Pd(en)Cl₂] (b)

Table 1 ICP-MS experimental conditions

参数	Parameter
冷却气流速 Plasma gas flow rate (L/min)	13.2
辅助气流速 Auxiliary gas flow rate (L/min)	0.7
雾化器流速 Nebulizer gas flow rate (L/min)	0.92
雾化器温度 Nebulizer temperature (°C)	3
功率 Forward power (W)	1300
停留时间 Dwell time (ms)	100

由图2a可见,主产物Pd(en)-5'-dGMP1峰拖尾覆盖了另一产物Pd(en)-5'-dGMP2,因此纯水不适合作为流动相。由图2b~2e可见,随着流动相pH值增大,主产物Pd(en)-5'-dGMP1的拖尾现象消失;pH 8.0时,主产物保留时间为2.8 min,且Pd(en)-5'-dGMP2保留时间为3.2 min,峰型良好;虽然pH 9.0时Pd(en)-5'-dGMP2峰型更好,但碱性过强,柱压升高,易损坏色谱柱。因此,本实验选用25 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.0)作为流动相,[S3]色谱进样定量环为50 μ L。 $[\text{Pd(en)Cl}_2]$ 在此色谱条件下不出峰。

作对应研究的HPLC-DAD所采用色谱条件与HPLC-ICP-MS条件相同。DAD检测器波长为200~350 nm,分辨率1 nm。

3.2 $[\text{Pd(en)Cl}_2]$ 与5'-dGMP在不同pH值下反应产物

按照2.2节的方法控制体系pH 6.0、8.0、9.0、10.0,反应48 h后,将溶液稀释使总Pd含量为40 μ g/L进HPLC-ICP-MS分析,结果如图3所示。同时,将2.2节得到的反应液稀释至含Pd 4.0 mg/L,按照2.4节方法测定色谱流出的总Pd和进样前样品的总Pd,得出比值。

由图3可见,随着反应体系pH值的增加,Pd(en)-5'-dGMP1浓度降低,Pd(en)-5'-dGMP2在pH 6.0~9.0之间浓度上升,但在pH 10.0时却降低,说明Pd(en)-5'-dGMP1易在酸性条件下生成,而Pd(en)-5'-dGMP2易在碱性条件下生成,与文献[11,13]的研究结果不同, $[\text{Pd(en)Cl}_2]$ 与5'-dGMP在碱性条件下反应产物中始终存在Pd(en)-5'-dGMP1,这是5'-dGMP比5'-GMP少一个羟基导致。

由图3计算得出,随着pH值增大,Pd(en)-5'-dGMP1与Pd(en)-5'-dGMP2色谱峰面积之和降低,说明色谱流出的Pd含量降低。为了定量研究这一过程,用2.4节方法以ICP-MS直接测定色谱流出物总Pd和进样前总Pd含量,得出比值分别96%(pH 6.0)、92%(pH 8.0)、81%(pH 9.0)、43%(pH 10.0)。说明随着pH值升高,导致体系生成这两种产物的比例降低。

3.3 反应体系pH 6.0 Pd(en)-5'-dGMP1生成速度研究

由图4a和3.1节得出,在pH 6.0时, $[\text{Pd(en)Cl}_2]$ 与5'-dGMP反应产物多为Pd(en)-5'-dGMP1,因此,在此条件下研究Pd(en)-5'-dGMP1的反应速度较易行,通过测定反应时间和Pd(en)-5'-dGMP1峰高的关系得出反应完成度(图4)。由图4可见,pH 6.0条件下反应生成的Pd(en)-5'-dGMP1在12 h后即稳定。

3.4 Pd(en)-5'-dGMP1和Pd(en)-5'-dGMP2定性研究

取pH 9.0的反应液稀释至总Pd含量6.0 mg/L,进HPLC-DAD研究色谱行为和紫外吸收。

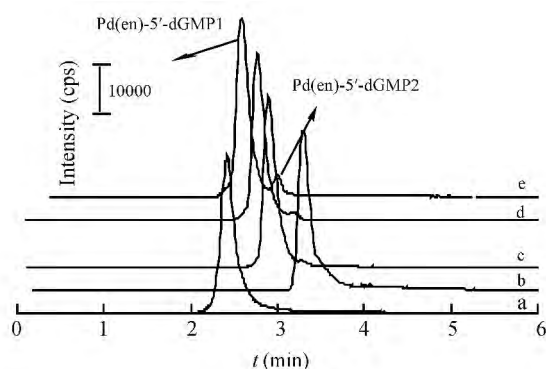


图2 反应稀释液,以Pd计含量60 μ g/L的HPLC-ICP-MS图谱

Fig. 2 HPLC-ICP-MS chromatogram of reaction diluent (containing 60 μ g/L Pd)

流动相分别为:(a) 纯水,(b) 25 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.0),(c) 25 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0),(d) 25 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.0)(e) 25 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 9.0)。

Eluent phase: (a) water, (b) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 6.0); (c) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0); (d) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 8.0); (e) 25 mmol/L phosphate buffer (pH 9.0) .

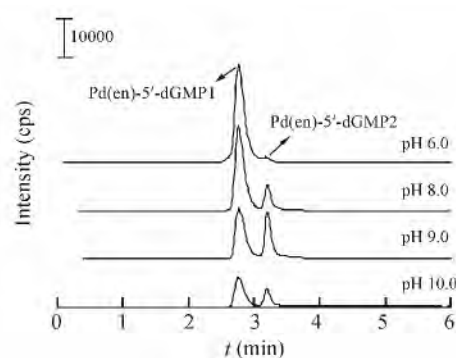


图3 不同pH值反应稀释液中的HPLC-ICP-MS图谱(以Pd计含量40 μ g/L)

Fig. 3 HPLC-ICP-MS chromatogram of reaction diluent with different pH value (containing 40 μ g/L Pd)

由图 5 可见, Pd(en)-5'-dGMP1 和 Pd(en)-5'-dGMP2 紫外吸收光谱相同, 说明这两种物质由有高度的相似性, 再由图 5a 与图 2c 两种物质峰高比对应说明这两种产物分子中 Pd 百分比相同, 进一步印证两者相似。综合文献 [11, 13] 及图 3 和图 5, 可推断 Pd(en)-5'-dGMP1 为 5'-dGMP 的 N1 位氮与 $[\text{Pd(en)Cl}_2]$ 按照摩尔比 1: 1 反应生成的单体 $[\text{Pd(en)(N1-5'-dGMP)}]$, 而 Pd(en)-5'-dGMP2 为 Pd(en)-5'-dGMP1 的多聚物。

Pd(en)-5'-dGMP1 分子用 ESI-MS (MS/MS) 确定。Pd 有 5 个同位素, 丰度为 ^{104}Pd (10.97%)、 ^{105}Pd (22.23%)、 ^{106}Pd (27.33%)、 ^{108}Pd (26.71%) 和 ^{110}Pd (11.81%)。因此, 在质谱图中, 母离子有特征同位素指纹, 如图 6 所示。

图 6 中 m/z 510, 511, 512, 514 和 516 对应 Pd(en)-5'-dGMP1 的 $[\text{M}+1]^+$ 碎片, 质谱图丰度比

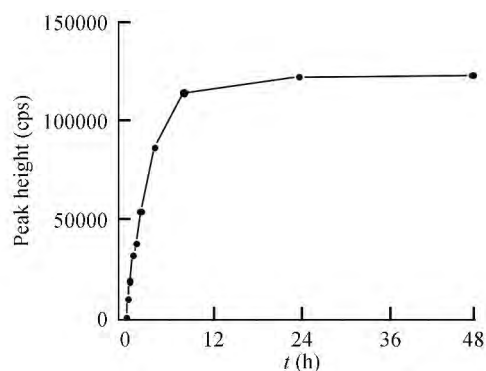


图 4 pH 6.0 反应液稀释后经 HPLC-ICP-MS 测得的 Pd(en)-5'-dGMP1 时间-峰高图, 稀释液中总 Pd 200 $\mu\text{g/L}$

Fig. 4 Peak height-time curve of Pd(en)-5'-dGMP1 under reaction pH 6.0, acquired by HPLC-ICP-MS diluent containing 200 $\mu\text{g/L}$ Pd

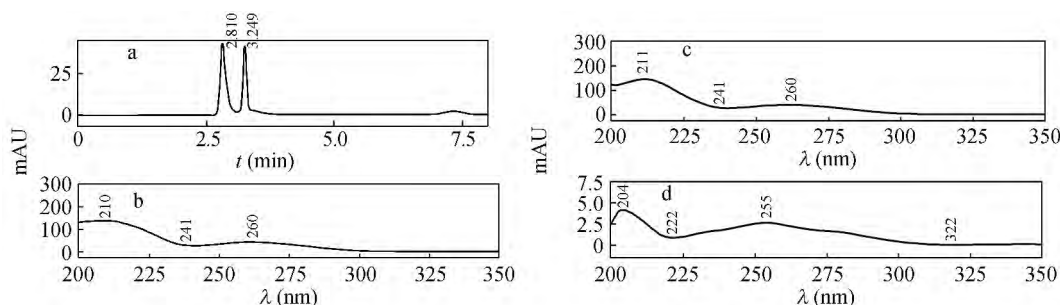


图 5 pH 9.0 反应稀释液以 Pd 计含量 6 mg/L 的 HPLC-DAD 图谱及 Pd(en)-5'-dGMP1 、 Pd(en)-5'-dGMP2 的紫外吸收光谱 (a) HPLC 图谱, (b) $t=2.8$ min Pd(en)-5'-dGMP1 紫外吸收光谱, (c) $t=3.2$ min Pd(en)-5'-dGMP2 紫外吸收光谱, (d) $t=7.3$ min 游离的 5'-dGMP 紫外吸收光谱

Fig. 5 HPLC-DAD study of Pd(en)-5'-dGMP1 and Pd(en)-5'-dGMP2 under reaction pH 9.0, (a) HPLC chromatography, (b) $t=2.8$ min Pd(en)-5'-dGMP1 UV spectrum, (c) $t=3.2$ min Pd(en)-5'-dGMP2 UV spectrum, (d) $t=7.3$ min 5'-dGMP UV spectrum

近似对应 Pd 同位素丰度比, 说明 Pd(en)-5'-dGMP1 中只含有 1 个 Pd 原子, 证明该分子是单体, 验证了图 4 的推论。对 m/z 511, 512, 514 进行 MS/MS 分析, 分别得到 m/z (315 和 152)、(316 和 152)、(318 和 152) 的主要碎片。解析 Pd(en)-5'-dGMP1 结构, m/z 315, 316, 318 $[\text{M}+1]^+$ 碎片及 m/z 152 $[\text{M}+1]^+$ 碎片如图 7 所示。

由图 7a 可见, Pd(en)-5'-dGMP1 分子结构为 $[\text{Pd(en)(N1-5'-dGMP)}]$, 其中 PO_4^{3-} 的负电荷和 Pd 原子的正电荷使分子呈电中性, 而原与 Pd 连接的 Cl (或者水解生成的 H_2O) 在质谱高能过程中丢失。MS/MS 分析时磷酸脱氧核糖从 $[\text{Pd(en)(N1-5'-dGMP)}]$ 分子上解离得到 m/z 315, 316 和 318 的 $[\text{M}+1]^+$ 同位素碎片, 同位素碎片进一步解离得到鸟嘌呤。图 7b 和图 7c 两个碎片印证了图 7a 分子结构的正确性。本实验尝试对 Pd(en)-5'-dGMP2 进行结

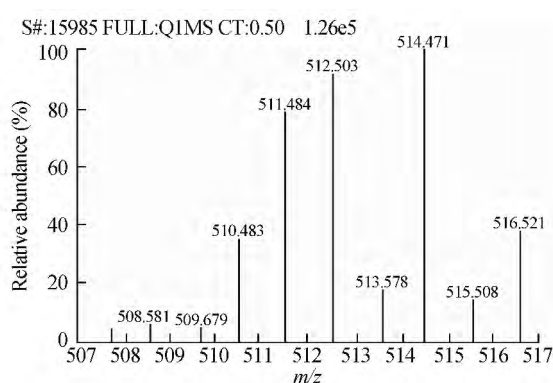


图 6 Pd(en)-5'-dGMP1 的 ESI-MS 质谱图

Fig. 6 ESI-MS spectrum of Pd(en)-5'-dGMP1

构定性,但即使富集到 150 mg/L 总 Pd,也无明显质谱信号,这可能是由于形成聚合物后所需的离子源挥发气温度和毛细管温度超出仪器允许范围。

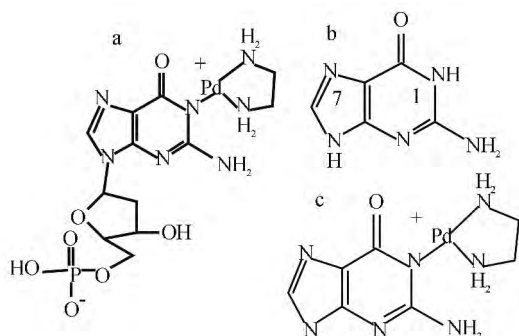


图7 ESI-MS 得出的 Pd(en)-5'-dGMP1 分子结构及其碎片
Fig.7 Structure of Pd(en)-5'-dGMP1 and its fragments derived by ESI-MS

References

- 1 Puthraya K H , Srivastava T S , Amonkar A J , Chitnis M P. *J. Inorg. Biochem.* , **1985** , 25: 207 – 212
- 2 Tusek-Bozic L , Furlani A , Scarcia V , Clercq E D. *J. Inorg. Biochem.* , **1998** , 72: 201 – 210
- 3 Kuduk-Jaworska J , Puszek A , Kubiak M , Pelczynska M. *J. Inorg. Biochem.* , **2004** , 98: 1447 – 1456
- 4 Hunter T M , Paisey S L , Park H , Cleghorn L , Parkin A , Parsons S , Sadler P J. *J. Inorg. Biochem.* , **2004** , 98: 713 – 719
- 5 Sar D G , Montes-Bayon M , Gonzalez E B , Sierra L M , Aguado L , Comendador M A , Koellensperger G , Hann S , Sanz-Medel A. *Anal. Chem.* , **2009** , 81(23) : 9553 – 9560
- 6 Chiavarino B , Crestoni M E , Fornarini S , Scuderi D , Salpin J. *J. Am. Chem. Soc.* , **2013** , 135: 1445 – 1455
- 7 Corduneanu O , Chiorcea-Paquim A , Garnett M , Oliveira-Brett A M. *Talanta* , **2009** , 77: 1843 – 1853
- 8 Vieites M , Smircich P , Pagano M , Otero L , Fischer F L , Terenzi H , Prieto M J , Moreno V , Garat B , Gambino D. *J. Inorg. Biochem.* , **2011** , 105: 1704 – 1711
- 9 Sonmez M , Celebi M , Yardim Y , Senturk Z. *Eur. J. Med. Chem.* , **2010** , 45: 4215 – 4220
- 10 Mukherjee T , Sen B , Zangrando E , Hundal G , Chattopadhyay B , Chattopadhyay P. *Inorg. Chim. Acta* , **2013** , 406: 176 – 183
- 11 Zhu S R , Matilla A , Tercero J M , Vijayaragavan V , Walmsley J A. *Inorg. Chim. Acta* , **2004** , 357: 411 – 420
- 12 Zhang D D , Zhou L X. *Comput. Theor. Chem.* , **2011** , 967: 102 – 112
- 13 Wirth W , Baltrons-Blotvogel , Kleinkes U , Sheldrick W S. *Inorg. Chim. Acta* , **2002** , 339: 14 – 26
- 14 LIU Li-Ping , LV Chao , WANG Ying. *Journal of Instrumental Analysis* , **2010** , 29(8) : 767 – 771
刘丽萍,吕超,王颖. 分析测试学报, **2010** , 29(8) : 767 – 771
- 15 Nam S H , Oh H J , Min H S , Lee J H. *Microchem. J.* , **2010** , 95: 20 – 24
- 16 JIN Peng-Fei , WU Xue-Jun , ZOU Ding , KUANG Yong-Mei , HU Xin , JIANG Wen-Qing , SUN Chun-Hua. *Spectroscopy and Spectral Analysis* , **2011** , 31(3) : 816 – 819
金鹏飞,吴学军,邹定,邝咏梅,胡欣,姜文清,孙春华. 光谱学与光谱分析, **2011** , 31(3) : 816 – 819
- 17 Jitaru P , Goenaga-Infante H , Vaslin-Reimann S , Fisicaro P. *Anal. Chim. Acta* , **2010** , 657: 100 – 107
- 18 ZHAO Lei-Chao , WANG Meng , ZHENG Ling-Na , GONG Xin , WANG Bing , FENG Wei-Yue , LIANG Jin-Sheng. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2012** , 40(8) : 1289 – 1292
赵磊超,王萌,郑令娜,宫锌,汪冰,丰伟悦,梁金生. 分析化学, **2012** , 40(8) : 1289 – 1292
- 19 LIU De-Ye , ZHU Chun , MA Yong-Jian , JI Wen-Liang , LIU Hua-Liang. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* , **2012** , 31(7) : 75 – 79
刘德晔,朱醇,马永建,吉文亮,刘华良. 分析实验室, **2013** , 31(7) : 75 – 79
- 20 LIU De-Ye , HAO Yuan-Bin , HAN Wen-Ru , LI Jian , HUO Zong-Li , LIU Hua-Liang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2014** , 42(11) : 1667 – 1672
刘德晔,郝元斌,韩文儒,李健,霍宗利,刘华良. 分析化学, **2014** , 42(11) : 1667 – 1672

