

高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱法检测芥子气 经皮肤染毒 SD 大鼠肺中的 DNA 加合物

岳丽君, 魏玉霞, 陈佳, 林妮妮, 王瑞, 杨茜, 张雅姣, 谢剑炜*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 运用高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)技术,建立了快速、简单、灵敏的 SD 大鼠肺中 N^7 -(2-羟乙基硫代乙基)鸟嘌呤(N^7 -HETEG)的检测方法。以 N^7 -苯甲基鸟嘌呤为内标,用甲醇和水为流动相进行梯度洗脱,正离子模式检测,方法的检出限(信噪比(S/N) ≥ 10)为 300 pg/mL,定量限($S/N \geq 20$)为 850 pg/mL。在 300 pg/mL ~ 1.28 μ g/mL 的质量浓度范围内, N^7 -HETEG 浓度与 N^7 -HETEG 和内标的峰面积比呈良好的线性关系(线性相关系数为 0.992 9)。高、中、低 3 个添加水平的日内测定精密性(以相对标准偏差(RSD)计)和日间测定精密性均小于 10% ($n = 7$),回收率为 100% ~ 132%。对 SD 大鼠背部皮肤染芥子气,剂量分别为 5.5、11、22 和 45 mg/kg,染毒 4 d 后检测大鼠肺脏中 N^7 -HETEG 的含量。各个不同染毒剂量下,每克组织中分别检测到(0.56 ± 0.16), (0.67 ± 0.12), (1.36 ± 0.68)和(5.14 ± 0.92) ng N^7 -HETEG, N^7 -HETEG 的含量随着染毒剂量的增大而增大,表明 N^7 -HETEG 可用作芥子气暴露的体内生物标志物。

关键词 高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱; N^7 -(2-羟乙基硫代乙基)鸟嘌呤;芥子气;皮肤染毒;肺;SD 大鼠
中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)04-0325-05

Biomonitoring method of dermal exposure to sulfur mustard based on DNA adduct in lung of SD rats by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

YUE Lijun, WEI Yuxia, CHEN Jia, LIN Nini, WANG Rui,
YANG Xi, ZHANG Yajiao, XIE Jianwei*

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract : The analysis of biological samples can provide qualitative and quantitative evidence of exposure to sulfur mustard (SM). N^7 -(2-hydroxyethylthioethyl)guanine (N^7 -HETEG) is the most abundant DNA adduct and one of the biomarkers of SM exposure. For the detection and validation of SM exposure, a sensitive high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) method for the determination of N^7 -HETEG in a biomedical sample was developed, using N^7 -benzylguanine as the internal standard. The method was validated and showed the limit of detection of 300 pg/mL ($S/N \geq 10$) and limit of quantitation of 850 pg/mL ($S/N \geq 20$). The linear range was 300 pg/mL - 1.28 μ g/mL, with both the values of intraday and interday relative standard deviations of less than 10% ($n = 7$) over the calibration range. The recoveries varied from 100% to 132%. The method was applied for the determination of N^7 -HETEG in the lung of SD rats caused by dermal exposure to SM *in vivo*. Under the exposure to SM of 5.5, 11, 22 and 45 mg/kg, respectively, (0.56 ± 0.16), (0.67 ± 0.12), (1.36 ± 0.68) and (5.14 ± 0.92) ng of N^7 -HETEG per gram of SD rat lung tissue were found after four days of exposure. The amount of N^7 -HETEG increased with the exposed doses, and it can act as a biomarker of sulfur mustard exposure.

* 通讯联系人: 谢剑炜, 博士, 研究员, 博士生导师. Tel : (010) 68225893, E-mail : xiejw@bmi.ac.cn.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项平台项目(No. 2009ZX09301-002)和第 45 批博士后科学基金(No. 20090450198).

收稿日期: 2010-12-25

Key words : high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) ; N^7 -(2-hydroxyethylthioethyl) guanine (N^7 -HETEG) ; dermal exposure ; sulfur mustard (SM) ; lung ; SD rat

芥子气(sulfur mustard , SM)是一种糜烂性化学毒剂,具有合成简单、性质稳定、渗透性强、中毒途径多、作用持久、防护困难等特点,是战争及恐怖袭击中常用的毒剂之一,也是《国际禁止化学武器公约》附表 1 中的化合物之一。芥子气进入体内后极易与生物大分子(如脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、蛋白质等)发生烷基化反应,共价结合形成不可逆的烷基化产物,直接损伤肺、脾等组织细胞,引起局部皮肤、眼、呼吸道黏膜炎症、坏死,高剂量暴露后还可导致全身中毒^[1-5]。但到目前为止,芥子气损伤的毒理机制尚不十分清楚,导致芥子气中毒后无法进行准确及时的甄别、诊断和治疗。因此有必要对芥子气暴露及损伤后的生物标志物进行进一步的研究。

芥子气原型在生物体内的留存时间较短,主要通过以下 4 种途径进行代谢(见图 1):水解氧化为硫二甘醇(TDG)、二羟乙基亚砷(TDGO);与谷胱甘肽加合形成 1,1'-磺酰基-双[2-S-(N -乙酰半胱氨酸基)]乙烷(SBSANE),该化合物在 β 裂解酶的作用

下裂解为 1,1'-磺酰基二(2-甲硫基)乙烷(SBMTE),SBMTE 进一步氧化形成 1-甲基亚磺酰基-2-(2-甲硫基乙基磺酰基)乙烷(MSMTESE)和 1,1'-磺酰基二(2-甲亚磺酰基)乙烷(SBMSE)^[6];与组氨酸的 N^1/N^3 位、缬氨酸的氮端等蛋白质位点加合;与 DNA 的鸟嘌呤 N^7 、 O^6 位和腺嘌呤 N^3 位加合。其中芥子气与生物大分子加合形成的烷基化产物因在体内存留时间长、没有内源性干扰等特点,可作为芥子气暴露和损伤后特异的生物标志物。

芥子气-DNA 加合物是细胞毒性和基因毒性的物质基础,也是引起机体广泛损伤的生物学基础^[7]。目前报道的芥子气-DNA 加合物有 N^7 -(2-羟乙基硫代乙基)鸟嘌呤(N^7 -HETEG)、双(鸟嘌呤-7)衍生物、 N^3 -(2-羟乙基硫代乙基)腺嘌呤(N^3 -HETEA)和 O^6 -(2-羟乙基硫代乙基)鸟嘌呤(O^6 -HETEG)。研究表明,芥子气无论是与小牛胸腺 DNA 还是与人血白细胞 DNA 反应,丰度最高的加合物均为 N^7 -HETEG,约占 DNA 烷基化产物的 60% ~ 70%^[8-10](见图 1)。

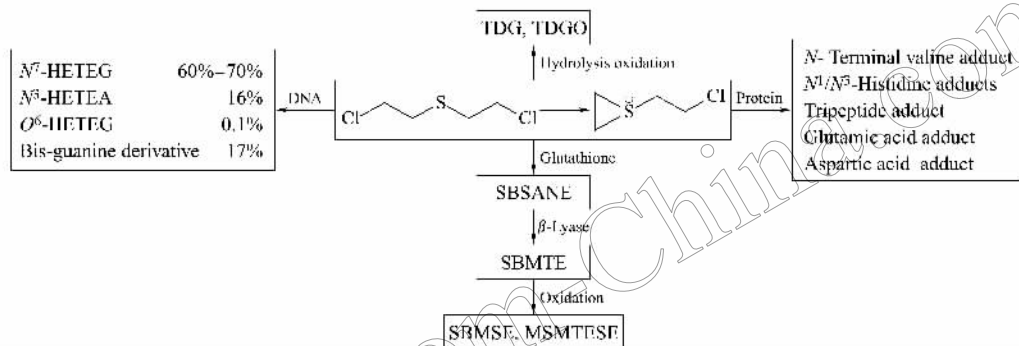


图 1 芥子气在生物体内的 4 种主要代谢途径
Fig. 1 Metabolic routes of sulfur mustard in vivo

目前检测 N^7 -HETEG 的方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)^[11]、放射性标记法^[12]、免疫荧光法^[13-15]等。但这些方法存在衍生化效率低、样品制备太过繁琐以及放射性物质的使用限制等样品处理和灵敏度方面的问题。采用高效液相色谱法(HPLC)、HPLC-MS 分析 N^7 -HETEG,不需衍生化即可直接检测^[9,11,16-18]。Ludlum 等^[11]采用荧光检测 N^7 -HETEG,检出限可达 10 pmol。Fidder 等^[9]采用紫外检测可检测到芥子气浓度为 1 mmol/L 时与 DNA 反应生成的加合物,并采用 HPLC-热喷雾质谱技术验证了 N^7 -HETEG 的存在。但芥子气毒

性大,而 DNA 加合物在生物体内的含量很低,为了研究芥子气中毒和损伤机制,更好地进行溯源性检测,需要建立更加灵敏、简单、快捷的分析方法。HPLC-电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)因其在结构鉴定及准确定量方面具有很高的灵敏度和选择性,已成为复杂基质中痕量检测的重要工具^[19]。本文对芥子气经皮肤染毒 SD 大鼠进行解剖,病理检查显示肺脏有明显的损伤,且损伤程度随着染毒剂量的增大而更为严重,因此选择肺脏作为主要研究对象。本文采用 HPLC-ESI-MS/MS 技术,在多反应监测模式(MRM)下,建立了更加灵敏、快速检测生物

体内芥子气-DNA加合物的方法,并对经皮肤染毒SD大鼠肺脏中 N^7 -HETEG进行检测,结果表明 N^7 -HETEG含量与芥子气染毒剂量存在量效关系。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HPLC-MS/MS系统(美国Agilent公司):1200 HPLC系统,配真空脱气机,自动进样器,离子阱6330质谱仪;Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司);T18型组织匀浆器(德国IKA公司);5418型离心机(德国Eppendorf公司)。

芥子气由防化指挥工程学院提供;甲醇(色谱纯,Fisher公司); N^7 -HETEG及 N^7 -苯甲基鸟嘌呤标准品由本实验室合成、纯化并确证;乌拉坦(上海市化学试剂公司,Dan mark分装);生理盐水(石家庄四药有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS,Amresco分装);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(北京舒伯伟化工仪器有限公司进口分装)。

DNA消化缓冲液的配制:取50 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0)2 mL、0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)2 mL、7.5% SDS 1 mL,用超纯水定容10 mL即得。

蛋白酶K(Merck公司)溶液的配制(20 mg/mL):取50 mmol/L Tris·HCl(pH 8.3)2 mL、0.5 mol/L EDTA 20 μ L于10 mL容量瓶中,用超纯水定容,配制成蛋白酶K的溶剂。准确称取蛋白酶K 20 mg,用1 mL蛋白酶K溶剂溶解即得。

RNA酶(Sigma公司)溶液的配制(1 mg/mL):取50 mmol/L Tris·HCl(pH 7.5)2 mL、2.5 mol/L NaCl 60 μ L于10 mL容量瓶中,用超纯水定容,配制成RNA酶的溶剂。准确称取RNA酶10 mg,取10 mL RNA酶溶剂溶解即得。

其余试剂均为分析纯。

1.2 实验动物

成年雄性SD大鼠25只,由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.3 HPLC-MS/MS条件

HPLC条件 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈柱(30 mm×2.1 mm,3.5 μ m;美国Agilent公司);流动相A:水;流动相B:甲醇;流速0.2 mL/min。梯度洗脱程序:0~2 min,5% B~75% B;2~4.5 min,75% B;4.5~5 min,75% B~5% B;5~5.5 min,5% B,保持3 min;进样量5 μ L。

质谱条件 离子源:ESI,正离子模式;雾化气压1.38×10⁵ Pa(20 psi);干燥气流量8 L/min;离

子源温度350℃;化合物稳定性:100%;阱深:100%;碎裂电压(Ampl):1;MRM模式3.00~4.15 min, m/z 256→105;4.15~5.50 min, m/z 242→91。

1.4 动物实验及组织样品处理

1.4.1 动物实验

体重为(152±6)g雄性大鼠25只,随机分组,每组5只。适应性饲养1周,大鼠体重为(208±8)g,背部剃毛约2 cm²,剃毛后近24 h内分别将0、26、52、104、212 mg/mL的芥子气/1,2-丙二醇溶液42 μ L涂于脱毛区域中心约1 cm²处。染毒后4 d,按照600 μ L/100 g体重比例腹腔注射20%乌拉坦水溶液,待动物麻醉后,解剖取其肺脏,于-70℃下冷冻保存备用。

1.4.2 大鼠肺脏中DNA的提取

1 g组织中加入10 mL生理盐水,匀浆,取2 mL匀浆液进行DNA提取。于3 000 g力下离心10 min,弃去上清液,沉淀中加入DNA消化缓冲液700 μ L、20 mg/mL蛋白酶K 7 μ L、1 mg/mL RNA酶溶液14 μ L,混匀,于37℃下孵育过夜;于12 000 g力下离心20 min,取上清液置于1.2 mL无水乙醇中,混匀,于-20℃过夜沉淀DNA;于12 000 g力下离心20 min,弃去上清液,沉淀用70%乙醇洗涤两次,于12 000 g力下离心10 min,弃去上清液,沉淀在空气中自然挥干,加入150 μ L水溶解。

1.4.3 DNA水解

加入10%磷酸调节DNA水溶液的pH至3.5,沸水浴中水解60 min。加入内标至终浓度为117.8 ng/mL,混匀,高速离心,取上清液进行HPLC-ESI-MS/MS分析。

1.5 校准曲线样品的配制

精确称取 N^7 -HETEG标准品,用甲酸溶解后超纯水定容,得到7.05 mg/mL的标准储备液,置于4℃冰箱中备用。以空白SD大鼠肺中提取的DNA水解液为基质,配制 N^7 -HETEG的质量浓度依次为0.00、0.30、0.85、2.14、2.99、6.20、8.54、13.9、21.4、62.0、106.8、139.1、170.9、213.6、320.5、534.1、854.5、1 022.7、1 281.8 ng/mL的系列标准溶液,其中内标的质量浓度均为117.8 ng/mL,高速离心后,取上清液进行HPLC-ESI-MS/MS检测。

2 结果与讨论

2.1 方法优化

为了提高检测结果的准确性和可靠性,选择内标法进行定量分析。以结构类似物 N^9 -(2-羟乙氧基甲基)鸟嘌呤为内标时,发现二者的色谱行为及质谱裂解方式相差较大,说明取代位置比取代基结

构对化合物性质影响更大。基于此实验结果,最终选用了 N^7 -苯甲基鸟嘌呤作内标。

用标准品优化质谱参数。化合物稳定性及阱深均为 100% 时, N^7 -HETEG 及内标的 $[M+H]^+$ 质谱信号强度及提取离子流色谱(EIC)峰面积均为最大(m/z 分别为 256、242)。MRM 模式下 N^7 -HETEG 及内标的主要子离子分别为 105、91。Ampl 为 1 时,子离子的质谱信号强度及 EIC 峰面积最大,且无内源性干扰,从而可以达到较高的检测灵敏度。最终确定了 1.3.2 节的质谱参数。 N^7 -HETEG 和内标的二级质谱图及裂解方式分别见图 2 和图 3。

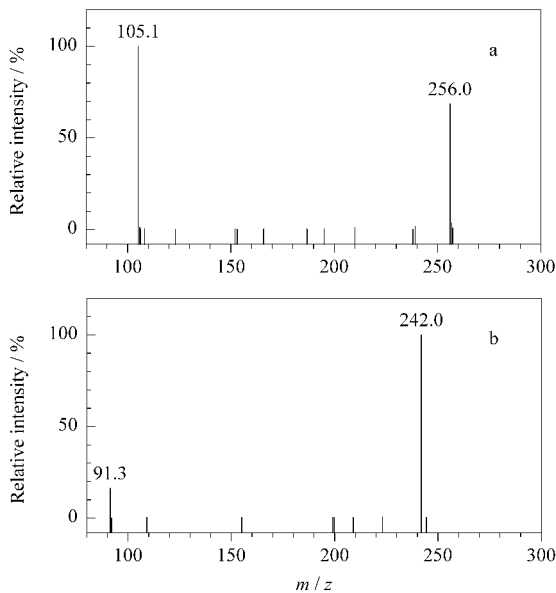


图 2 (a) N^7 -HETEG 及 (b) 内标 N^7 -苯甲基鸟嘌呤的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectra of (a) N^7 -HETEG and (b) N^7 -benzylguanine

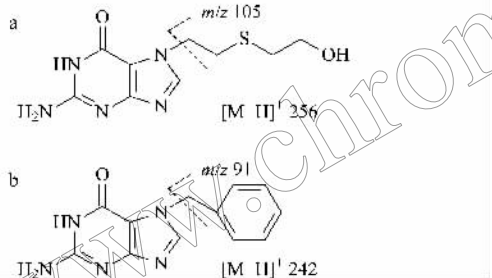


图 3 (a) N^7 -HETEG 及 (b) 内标 N^7 -苯甲基鸟嘌呤的质谱裂解方式

Fig. 3 Fragmentation mechanisms of (a) N^7 -HETEG and (b) N^7 -benzylguanine

对 HPLC 条件也进行了优化。最初使用 Xbridge C_{18} 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m)也可以达到很好的分离效果,但每个样品的分析时间需要 20 min,检测通量低,因此选用 ZORBAX SB C_{18}

柱(30 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m)进行快速分离。以甲醇为流动相的有机相,分别以超纯水、0.1% 甲酸水溶液、10 mmol/L 甲酸铵水溶液为水相,比较不同流动相条件下的检测灵敏度,结果表明流动相为甲醇和超纯水时,分析时间短,检测灵敏度高。

按照 1.3 节条件进行 HPLC-ESI-MS/MS 分析,空白基质中未检出 N^7 -HETEG,说明 N^7 -HETEG 在生物体内没有内源性干扰,可以作为芥子气暴露和损伤的生物标志物,该方法的特异性和选择性好。在此分析条件下 N^7 -HETEG 保留时间为 3.7 min, N^7 -苯甲基鸟嘌呤保留时间为 4.4 min,二者可以达到很好的基线分离(见图 4)。每个样品分析时间仅需 8.5 min。

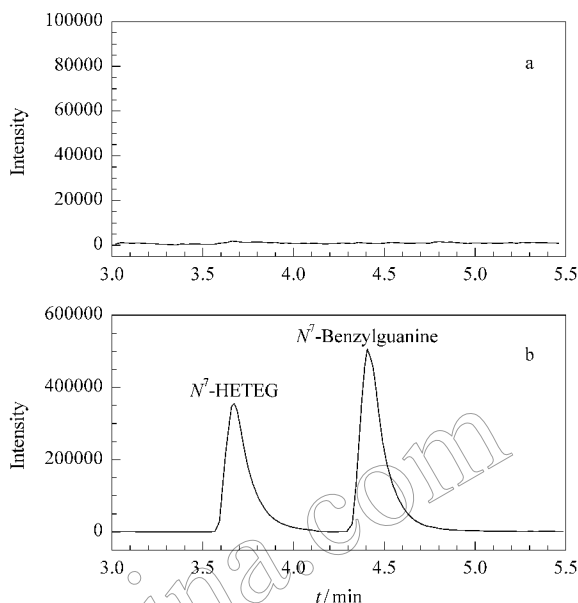


图 4 (a) 空白基质及 (b) 基质加标样品的提取离子流色谱图

Fig. 4 Extracted ion chromatograms of (a) a blank matrix (hydrolysate of DNA isolated from lung of SD rat) and (b) the matrix spiked with N^7 -HETEG and N^7 -benzylguanine

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围、检出限和定量限

按照 1.3 节的条件对 1.5 节中配制的基质加标系列标准样品进行检测。以 N^7 -HETEG 和内标的峰面积比值(y)为纵坐标、 N^7 -HETEG 质量浓度(x , ng/mL)为横坐标绘制工作曲线,回归方程为 $y = 0.011x + 0.424$, $r = 0.9929$,线性范围为 300 pg/mL $\sim$ 1.28 μ g/mL。 N^7 -HETEG 的检出限(信噪比 $(S/N) \geq 10$)为 300 pg/mL,定量限($S/N \geq 20$)为 850 pg/mL。

2.2.2 回收率

以空白 SD 大鼠肺中提取的 DNA 水溶液为基

质,配制 2.35、47.0、 1.12×10^3 ng/mL 的 N^7 -HETEG 溶液,内标质量浓度均为 117.8 ng/mL,用 10% 磷酸调节 pH 至 3.5,沸水浴中水解 1 h,高速离心后,取上清液进行 HPLC-ESI-MS/MS 检测, N^7 -HETEG 的加标回收率($n=3$)分别为(110 ± 10)%、(121 ± 8)%、(129 ± 3)%。

2.2.3 精密度

以空白 SD 大鼠肺中提取的 DNA 水解液为基质,配制 2.14、21.4、 1.02×10^3 ng/mL 的 N^7 -HETEG 溶液,其中内标质量浓度均为 117.8 ng/mL,高速离心后,取上清液进行 HPLC-ESI-MS/MS 检测,结果见表 1。

表 1 空白 SD 大鼠肺中提取的 DNA 水解液中添加的 N^7 -HETEG 的日内及日间测定精密度(RSD)和准确度

Table 1 Intraday and interday assay precisions (RSD) and accuracies of N^7 -HETEG spiked in DNA solution isolated from lung of a blank SD rat

Added/ (ng/mL)	Intraday precision and accuracy ($n=7$)		Interday precision and accuracy ($n=7$)	
	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%
2.14	9.7	97.8	3.9	101.7
21.4	3.2	101.0	6.4	101.1
1.02×10^3	1.9	109.0	5.5	105.4

上述方法学考察结果显示,该方法简单、灵敏、快速、准确、可靠,可满足生物样品等复杂基质中低浓度 N^7 -HETEG 的检测。

2.3 生物体内染毒样品的测定

用芥子气对雄性 SD 成年大鼠进行背部皮肤染毒,染毒剂量分别为 5.5、11、22 和 45 mg/kg,染毒 4 d 后的大鼠肺脏样品按照 1.4.2 节及 1.4.3 节方法处理,HPLC-ESI-MS/MS 测定大鼠肺脏中的 N^7 -HETEG 含量,结果为不同染毒剂量条件下每克肺组织中分别检测到(0.56 ± 0.16)、(0.67 ± 0.12)、(1.36 ± 0.68)和(5.14 ± 0.92) ng($n=5$)的 N^7 -HETEG,芥子气-DNA 加合物的量随着芥子气染毒浓度的增大而升高。

3 结论

运用 HPLC-ESI-MS/MS 技术建立了生物样品中芥子气-DNA 加合物的检测方法,该方法灵敏度、

准确度、特异性和选择性好。运用该方法成功地测定了不同剂量芥子气经皮肤染毒 SD 大鼠肺中的芥子气-DNA 加合物,结果表明加合物含量与芥子气染毒剂量之间存在量效关系。因此,该方法有望进一步用于芥子气损伤机理的研究,DNA 损伤和修复等生物过程的有效监测,指导芥子气防护、治疗药物的研发和评价。

参考文献:

[1] Marrs T C, Maynard R L, Sidell M D F R. Chemical Warfare Agents Toxicology and Treatment. 2nd ed. S. 1: John Wiley and Sons Ltd, 2007

[2] Black R M. J Anal Toxicol, 2008, 32(1): 2

[3] Smith J R, Capacio B R, Korte W D. J Anal Toxicol, 2008, 32(1): 17

[4] Noort D, Fiddler A, Degenhardt-Langelaan C E A M, et al. J Anal Toxicol, 2008, 32(1): 25

[5] Benschop H P, Van der Schans G P, Noort D. J Anal Toxicol, 1997, 21(4): 249

[6] Boyer A E, Ash D, Borr D B, et al. J Anal Toxicol, 2004, 28(5): 327

[7] Tarantini A, Maitreb A, Lefebvre E, et al. Mutat Res, 2009, 671(1/2): 67

[8] Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, et al. Toxicology, 2009, 263(1): 12

[9] Fiddler A, Moes G W H, Schefer A Q. Chem Res Toxicol, 1994, 7(2): 199

[10] Boysen G, Pachkowski B F, Nakamura J, et al. Mutat Res, 2009, 678(1/2): 76

[11] Ludlum D B, Austin-Ritchie P, Hagopian M, et al. Chem Biol Interact, 1994, 91(1): 39

[12] Niu T, Matijasevic Z, Austin-Ritchie P, et al. Chem Biol Interact, 1996, 100(1): 77

[13] Van der Schans G P, Mars-Groenendijk R, De Jong L P A, et al. J Anal Toxicol, 2004, 28(5): 316

[14] Van der Schans G P, Scheffer A G, Mars-Groenendijk R H, et al. Chem Res Toxicol, 1994, 7(3): 408

[15] Wang H L, Zhang D P, Wang Z X, et al. Chinese Journal of Chromatography (汪海林, 章大鹏, 王智鑫, 等. 色谱), 2009, 27(5): 642

[16] Zhang F, Bartels M J, Pottenger L H, et al. J Chromatogr B, 2006, 833(2): 141

[17] Li H, Rose M J, Tran L, et al. J Pharm Toxicol Methods, 2009, 59(3): 171

[18] Mikeš P, Kořínek M, Linhart I, et al. Toxicol Lett, 2009, 184(1): 33

[19] Koc H, Swenberg J A. J Chromatogr B, 2002, 778(1/2): 323