

研究报告

人肝细胞中砷代谢产物分析表征研究

曹 煊^{* 1} 余晶晶² 高 扬¹ 孙继昌¹ 刘 岩¹
徐苑苑³ 孙贵范³ 王小如²¹(山东省科学院海洋仪器仪表研究所, 山东省海洋环境监测技术重点实验室, 青岛 266001)²(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266061) ³(中国医科大学公共卫生学院, 沈阳 110001)

摘 要 采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS) 联用技术对染砷后 Chang 肝细胞中的砷代谢产物进行分析。通过参考文献及相关实验推测出两种未知砷代谢产物, 并采用标准合成加入法证明其中一种未知砷代谢产物为一甲基亚胂酸(MMA III)。定量分析结果显示, 随着染砷浓度的增大, 细胞中的一甲基砷、二甲基砷以及无机砷含量均呈现增大趋势, 而甲基化率却呈现减小趋势, 这说明高浓度砷对细胞甲基化能力有抑制作用。

关键词 高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱; 飞行时间质谱; Chang 肝细胞; 砷形态; 一甲基亚胂酸

1 引 言

砷是人体中最丰富的 12 种元素之一, 同时砷也是确认的致癌毒物^[1, 2]。长期接触砷会对人体多种组织、器官造成危害, 严重损害人类健康和劳动能力^[3]。随着人们对健康程度的重视, 砷在人体内代谢过程的研究也备受关注。无机砷进入机体后, 主要在肝脏中发生生物甲基化, 产生一系列甲基化砷代谢产物^[4~6], 而这些产物的种类和毒性决定了砷的各种生物效应, 因而准确分析和表征砷代谢产物是砷生物代谢研究的基础。然而, 由于砷代谢产物的含量极低且种类众多, 而与之相应的商业化的砷形态标准物质种类较少, 这为砷代谢产物的表征带来了很大的难度。

此前, 本研究组建立了人肝细胞中的砷总量及砷代谢产物形态分析的方法, 并对染砷后 Chang 肝细胞中的总砷含量进行了分析, 初步考察了染砷后 Chang 肝细胞中的砷代谢产物^[7]。在此基础上, 本研究采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS) 技术考察在不同染砷浓度下的 Chang 肝细胞中砷代谢产物的种类和含量。对于无法用商业化标准表征的砷代谢产物, 本研究采用人工合成标准加标的方法, 依据保留时间一致性对未知的砷代谢产物进行定性分析^[8~10]。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

7500a 型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, 美国 Agilent 公司), 配 Babington 高盐雾化器, 双通路雾化室; 1100 型高效液相色谱(HPLC, 美国 Agilent 公司), 配二元泵及手动进样器; Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱(250 mm × 4.1 mm i. d., 瑞士 Hamilton Reno 公司); Shodex Asahipak GS-220 HQ 凝胶过滤色谱柱(300 mm × 7.6 mm i. d., 日本 Showa Denko 公司); G1969A 飞行时间质谱(TOF-MS, 美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司); AL104 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

(NH_4)₂CO₃, NH₄NO₃, Na₂SO₃, KI, HCl, Na₂S, CH₃OH(优级纯, 德国 Sigma-Aldrich 公司), AsI₃ 和 As₂O₅(美国 Alfa Aesar 公司); 二甲基胂酸(DMA, 美国 Acros Organics 公司); 一甲基胂酸(MMA, 清华大

2010-06-21 收稿; 2010-08-29 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20675021), 山东省科学院博士基金(No. Y09-3) 资助项目

* E-mail: cx@sdioi.com

学惠赠) ,所有形态分析标准溶液均在 4 ℃ 条件下避光保存。实验用水均由超声脱气后的 18.2 MΩ cm 超纯水(由 Milli-Q 超纯水系统制得) 配制。

2.2 细胞染砷及收集

染砷细胞样品是与沈阳中国医科大学合作培养获得。以 NaAsO₂ 溶液进行染砷 ,染砷浓度为 1.0 , 5.0 ,10 和 20 μmol/L ,培养及收集方法参见文献 [7]。

2.3 一甲基亚胂酸(MMAⅢ) 的制备

一甲基亚胂酸的制备参照文献 [11]的方法 ,通过 SO₂ 还原一甲基胂酸制备而成。其合成步骤如下: 在具有双孔胶塞的锥形瓶内加入含有 100 mg/L 一甲基胂酸(MMA V) ,0.5 mol/L H₂SO₄ 及 0.3 g KI 的混合液 ,适当加热后向该混合液中通入过量的由 Na₂SO₃ 与 HCl 反应生成的 SO₂ 气体 ,该过程持续 20 min ,至溶液充分饱和 ,随后迅速冷却至 4 ℃。此时在锥形瓶底部可以见到黄色针状的固体(一甲基胂酸的二碘化物(MMAI₂)) ,过滤后将该固体溶解于脱气后的超纯水中 ,此时 MMAI₂ 在水中水解为 MMAⅢ。在 MMAⅢ的溶液中加入适量 Na₂CO₃ ,平衡阴阳离子 ,随后将 MMAⅢ萃取至苯中 ,N₂ 吹干苯后即可得到有刺激性气味的白色固体 ,即为一甲基亚胂酸的氧化物。将该固体再次溶于脱气后的超纯水中配制成高浓度的 MMAⅢ储备液 ,而后用离子色谱按照色谱方法 A(表 1) 连续 7 次分离纯化该标准 ,收集纯化后的组分 ,于 4 ℃ 避光保存 ,此标准可保存 48 h。

2.4 HPLC-ICP-MS 及 HPLC-TOF-MS 分析染砷肝细胞中砷化学形态

样品处理: 为保证砷在样品中所存在形态不发生变化 ,细胞样品从 -70 ℃ 超低温冰箱取出后吹入高纯 N₂ ,置于 4 ℃ 解冻 ,再经超声混匀 ,过 0.45 μm 醋酸纤维膜后直接进样测定。

HPLC-ICP-MS 工作条件: 采用高效液相色谱(HPLC) 与电感耦合等离子体(ICP-MS) 联用技术对细胞样品中的砷形态及合成的砷标准进行表征。色谱条件及仪器操作参数见表 1。由于³⁵Cl 和仪器所用的高纯载气(Ar) 易形成⁷⁵ClAr⁺ ,干扰⁷⁵As ,因此 ,在砷的形态分析中 ,采用了时间分辨分析模式 ,仪器同时监测⁷⁵As ,⁷²Ge ,³⁵Cl ,⁷⁷Se ,⁸³Kr 的信号 ,用以排除⁷⁵ClAr⁺ 干扰峰^[3]。此外考虑到生物样品中往往含有大量的硫化物及磷化物 ,故在测定过程中³⁴S 和³¹P 的信号也同时采集。

表 1 砷总量测定和形态分析过程中采用的仪器参数
Table 1 Instrumental parameters for total As determination and As speciation analysis

参数 Parameters	色谱方法 A Chromatography A			色谱方法 B Chromatography B
HPLC	Agilent 1100 Series			Agilent 1100 Series
色谱柱 Column	Hamilton PRP-X100			Shodex Asahipak GS-220 HQ
流速 Flow rate	1.8 mL/min			0.6 mL/min
进样量 Injection volumn	20 μL			20 μL
流动相 A Mobile phase A	H ₂ O			50 mmol/L ammonium acetate (pH 6.5 at 25 ℃)
流动相 B Mobile phase B	50 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ (pH = 7.4 adjusted by acetic acid) and 2% (V/V) MeOH			
洗脱梯度 Gradient program	Time(min)	A(%)	B(%)	
	0	100	0	
	15	0	100	
	30	100	0	
ICP-MS 仪器参数 Instrumental Parameters of ICP-MS				
功率 RF power	1350 W	蠕动泵转速 Peristaltic pump flow rate		30 r/min
RF matching	1.6 V	检测同位素 Monitored signals		⁷⁵ As , ⁷² Ge , ³⁵ Cl , ⁷⁷ Se , ⁸³ Kr , ³⁴ S
载气流 Carrier gas flow rate	1.10 L/min			

ESI-TOF-MS 工作条件: 采用电喷雾高分辨飞行时间质谱(ESI-TOF-MS) 联用技术对合成的砷化物标准进行表征 ,进入高分辨飞行时间质谱的流动相流速分流至 0.4 mL/min。电喷雾质谱为负离子模式 ,扫描范围 m/z 75 ~ 500; 毛细管电压: 4000 V; 喷雾气压: 3.447 kPa; 干燥气流速(N₂) : 11.0 L/min; 气体温度: 330 ℃; 裂解电压: 100 V; 参比溶液 m/z 121.0509 ,922.0098; 分辨率: 9500 ± 500(922.0098) 。

3 结果与讨论

3.1 Chang 肝细胞中砷形态分析

采用表1中的色谱条件A对1.0 $\mu\text{mol/L}$ 染砷浓度的染砷细胞液进行分析,结果见图1a。当采用HPLC-ICP-MS分析1.0 $\mu\text{mol/L}$ 染砷浓度的染砷细胞液时,发现细胞液中存在6种不同砷化物,通过与商业化砷形态标准物质的保留时间对比发现,其中的4种砷化物可以被表征: As(III) ($t_r = 3.135 \text{ min}$), DMA V ($t_r = 4.73 \text{ min}$), MMA V ($t_r = 9.257 \text{ min}$) 和 As(V) ($t_r = 11.20 \text{ min}$)。尽管 As(III) 是培养底物,但实验结果显示 As(V) 的含量远远高于 As(III) ,这可能是由于细胞培养过程在5% CO_2 /95% 空气的条件下进行,在此期间,大部分 As(III) 被氧化为 As(V) ,被细胞摄入,从而致使细胞内大部分的砷以 As(V) 的形态存在。此外, MMA V 和 DMA V 的出现证明细胞对外源无机砷进行了生物甲基化代谢。根据砷代谢模式^[12,13], DMA V 的存在证明了在人肝细胞中至少发生了两次砷甲基化的代谢反应,这与文献[11]的研究结果吻合。

除了以上4种可表征的砷代谢产物外,Chang 肝细胞中还存在两种未知代谢产物(UN_1 和 UN_2 , 对应保留时间分别为3.895和14.00 min)无法用已有的商业化的砷标准物质进行表征。采用HPLC-ESI-TOF-MS对这两种未知代谢产物进行分析,但由于细胞中砷代谢产物的含量过低,TOF-MS无法在线给出这两种砷化物的分子量数据。Li等^[14]报道,在Chang 肝细胞代谢外源无机砷时会产生一甲基亚砷酸(Methylarsonous acid, MMA III),它是外源无机砷在第一次甲基化代谢和第二次甲基化代谢之间的中间代谢产物。这说明两种未知砷化物中至少有一种是甲基亚砷酸类物质;其次,样品分析过程中对细胞液中的 ^{34}S 进行了实时同步的监测,发现在未知砷化物 UN_2 出峰位置同时监测到了 ^{75}As 和 ^{34}S 的信号,这说明 UN_2 砷化物中至少有一个含硫官能团,从而间接证明 UN_1 是 MMA III ;此外, H_2O_2 可以使砷化物脱掉巯基而不影响砷化物上其它官能团^[15]。本实验中,当在细胞样品中加入适量 H_2O_2 反应4 h后,细胞样品中的砷形态大大简化(图1b)。由于 H_2O_2 的氧化作用, As(III) 全部转变为 As(V) 。此外,图1a中显示的两个未知峰全部消失,与此对应的是一甲基砷酸(MMA V)的含量成比例增加,这说明两种未知砷化物均为 MMA V 的类似物。

基于以上的信息,推测未知砷化物 UN_1 为(MMA III), UN_2 推测为一种含S的一甲基砷化物。基于目前信息尚无法准确推断 UN_2 的种类和结构,故本研究仅对 UN_1 进行定性表征。

3.2 一甲基亚砷酸(MMA III) 的表征

利用ESI-TOF-MS对合成出 MMA III 进行表征,经过色谱柱纯化的 MMA III 溶于50 mmol/L (NH_4)₂CO₃ 和5% 甲醇混合液中,以乙酸调至pH 7.4,以0.4 mL/min的流速直接泵入ESI-TOF-MS中检测。图2a显示了 MMA III 的ESI-TOF-MS表征结果,在合成的 MMA III 样品中,产生了一个 m/z 122.9420 [M]⁻ 的分子离子峰,该分子量与理论计算得到的 MMA III 的理论减氢峰分子量(m/z 122.9427 [M]⁻)的质量偏差 Δm 为-5.7 ppm。满足定性分析要求。

3.3 加标法分析 Chang 肝细胞中的 MMA III

由于Chang 肝细胞中未知峰的含量非常低,无法用有机质谱直接测定其准确分子量,因此,本研究采用加标法对未知砷化物进行表征。将合成后的 MMA III 加入细胞样品中,采用HPLC-ICP-MS测定细胞中加标后的砷形态,通过保留时间的一致性对未知化合物进行表征。结果见图2。

图2b显示了采用色谱条件A,即阴离子色谱与ICP-MS联用测定加标前后细胞样品中砷形态的谱图。

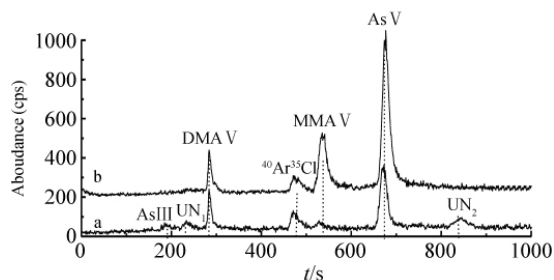


图1 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 染砷浓度下 Chang 肝细胞中砷形态 HPLC-ICP-MS 谱图

Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatograms of Chang liver cells at 1.0 $\mu\text{mol/L}$ incubation concentration

a. H_2O_2 处理前 (Directly injected hepatocytes solution); b. H_2O_2 处理后 (Hepatocytes solution treated by hydrogen peroxide); UN_1 : Presents an unknown arsenic peak; As(III) : Arsenite; As(V) : Arsenate; MMA V : Monomethylarsonous acid; DMA V : Dimethylarsinic acid.

对比这两个谱图发现,当加入 MMAⅢ后,未知峰 UN₁ 的峰面积显著增大。通过连续测定样品考察其保留时间发现,未知峰 UN₁ 的保留时间与合成的 MMAⅢ 标准的保留时间的 RSD 仅为 2.2% ($n=5$)。

考虑到加标法表征未知化合物时,本方法无法区分一些性质相近的物质,尤其是在色谱柱上保留时间一致或相近的物质。为了排除这种影响,本研究采用小分子凝胶色谱建立了第二种色谱分离法(色谱条件 B,表 1)对样品进行重复分析,结果见图 2c。研究显示,当采用凝胶色谱分析加标前后细胞样品时得到了与离子色谱相似的结果。加标后,(2)号谱图中的未知峰 UN₁ 的峰面积显著增大,UN₁ 的保留时间与 MMAⅢ 的保留时间的 RSD 为 3.5% ($n=5$)。因而可以确认,未知砷化物 UN₁ 为一甲基亚胂酸(MMAⅢ)。

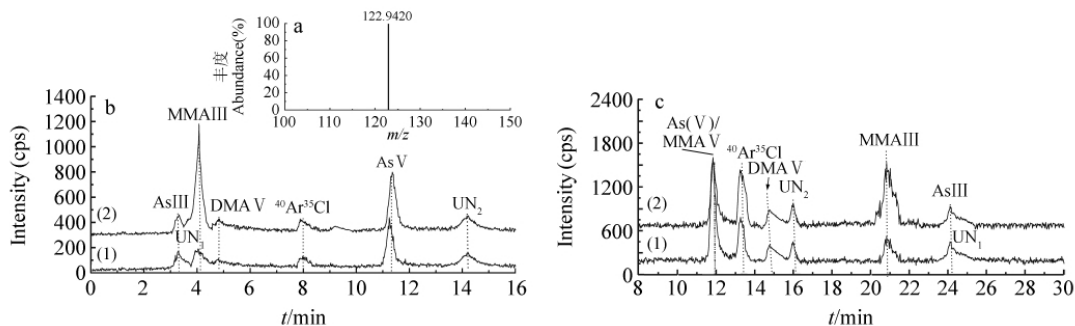


图2 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 染砷组细胞中 MMAⅢ 的 ESI-TOF-MS 表征质谱图及 HPLC-ICP-MS 加标谱图

Fig. 2 Chromatograms for identification of methylarsonous acid (MMAⅢ) standard and fortification of MMAⅢ and in 5 $\mu\text{mol/L}$ incubation concentration hepatocytes solution using chromatogram A and B

a. MMAⅢ 的 ESI-TOF-MS 表征质谱 (Identification of MMAⅢ standard using ESI-TOF-MS); b. 采用色谱条件 A 的 HPLC-ICP-MS 加标谱图 (Chromatography A, (1) arsenic species in hepatocytes sample; (2) fortification of MMAⅢ and MMA in hepatocytes sample using chromatogram A); c. 采用色谱条件 B 的加标谱图 (Chromatogram B), (1) 加标前 (Arsenic species in hepatocytes sample); (2) 加标后 (Fortification of MMAⅢ and MMA in hepatocytes sample using chromatogram B)。

3.4 不同染砷浓度下 Chang 肝细胞中砷形态分析

本研究对不同染砷浓度条件下肝细胞中的砷形态进行了分析,结果见图 3 和表 2。随着染砷浓度增加,无机砷的浓度也增大,这说明细胞对砷的摄入与染砷浓度成正比。此外在谱图中还发现, MMAⅢ 的浓度也随染砷浓度的升高而增大,这说明随着进入细胞内砷浓度的增大,细胞对外源砷的甲基化量呈现增大趋势。有趣的是,与这些有规律的变化相比,细胞内的 DMA V 和 MMA V 的含量呈现出不规律变化。由砷代谢模式可知^[13],生物体代谢外源无机砷是在酶和还原性谷胱甘肽参与下由无机形态砷逐步转化为有机形态砷,这是个动态过程,最终产物是自由态存在的五价甲基砷化物。基于此,本研究推测 DMA V 和 MMA V 含量的不规律现象可能是由于细胞对砷的甲基化尚未达到终点造成的,即在本次测定进行时,细胞中的砷尚处于由无机砷向甲基砷转化的动态过程中,此时大部分的砷处于还原态的三价甲基砷形态而未向五价甲基砷转化。因而造成了 DMA V 和 MMA V 出现了含量上的不规律变化。

由于样品中的各种砷代谢产物含量分布规律较难把握,为了简化实验结果,本研究用 H_2O_2 氧化处理细胞样品,将还原态的砷代谢产物转化为氧化态,结果见表 2。随着染砷浓度的增大,无机砷、一甲基砷、二甲基砷(分别以 As(V)、MMA V 和 DMA V 计)的含量呈现增大趋势。这说明随着染砷浓度的增高,细胞吸收砷的量呈现增大趋势。此外,本研究对 Chang 肝细胞的甲基化率进行了研究。所谓甲基化率是生物体砷代谢生成甲基化产物与总摄入砷的比

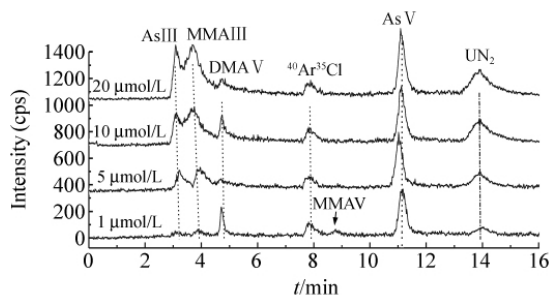


图3 不同染砷浓度下肝细胞中砷形态谱图

Fig. 3 HPLC-ICP-MS chromatograms of arsenic species in different incubation hepatocytes

值,它是反应生物体对砷代谢能力的参数,甲基化率高说明该生物代谢砷的能力强,对外源砷不敏感;甲基化率低说明该生物代谢能力弱,对外源砷敏感。研究显示,尽管随着染砷浓度的增加,Chang 肝细胞摄入的砷呈现增加趋势,但其甲基化率却呈现降低趋势,说明高染砷浓度会对细胞生物甲基化产生抑制作用。此外,甲基化率 23.6% ~ 35.4% 也说明 Chang 肝细胞的甲基化能力较弱。

3.5 形态分析方法评价

本研究采用质量平衡法考察砷形态分析方法的准确性,见表 2 中酸消解总砷含量和 3 种砷形态之和两列。对比发现,这两组数据非常接近,说明本研究所采用的形态分析方法准确性较高。

表 2 Chang 肝细胞中砷形态的质量平衡分析($n = 3$)

Table 2 Mass balance approach for arsenic speciation in hepatocytes by HPLC-ICPMS(<i>n</i> = 3)							
细胞样品 Hepatocytes	酸消解总砷含量 ^a Total arsenic after acid digestion ($\mu\text{g/L}$)	H_2O_2 氧化前砷形态含量 Arsenic speciation before H_2O_2 treatment					
		As(III) ($\mu\text{g/L}$)	MMA III ($\mu\text{g/L}$)	DMA V ($\mu\text{g/L}$)	MMA V ($\mu\text{g/L}$)	As(V) ($\mu\text{g/L}$)	UN ₂ ($\mu\text{g/L}$)
1 $\mu\text{mol/L}$ group	18.1 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 1.1	1.2 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 1.8	—
5 $\mu\text{mol/L}$ group	48.2 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 2.1	5.2 $\pm$ 1.6	1.6 $\pm$ 0.6	—18.4 $\pm$ 4.3	—	
10 $\mu\text{mol/L}$ group	99.8 $\pm$ 2.7	22.5 $\pm$ 4.5	10.4 $\pm$ 3.2	4.2 $\pm$ 0.3	—30.5 $\pm$ 5.1	—	
20 $\mu\text{mol/L}$ group	154.0 $\pm$ 2.1	26.1 $\pm$ 6.4	18.2 $\pm$ 5.6	3.1 $\pm$ 1.3	—49.4 $\pm$ 4.2	—	
H_2O_2 氧化后砷形态含量							
细胞样品 Hepatocytes	Arsenic speciation after H_2O_2 treatment			砷形态含量之和 Sum of arsenic species ($\mu\text{g/L}$)	甲基化率 Methylation rate (%)		
	MMA V ($\mu\text{g/L}$)	DMA V ($\mu\text{g/L}$)	As(V) ($\mu\text{g/L}$)				
1 $\mu\text{mol/L}$ group	4.1 $\pm$ 0.9	17.8	35.4	17.8	35.4		
5 $\mu\text{mol/L}$ group	11.3 $\pm$ 1.1	47.6	29.9	47.6	29.9		
10 $\mu\text{mol/L}$ group	20.8 $\pm$ 3.6	98.2	25.5	98.2	25.5		
20 $\mu\text{mol/L}$ group	30.6 $\pm$ 3.1	150.3	23.6	150.3	23.6		

a: The precision is expressed as $\pm$ one standard deviation.

此外,形态分析方法的有效性通过加标回收率实验验证,在样品中加入约 100% 背景浓度的 5 种砷形态,测定加标后的砷形态含量并计算回收率,结果见表 3。结果显示,5 种砷形态的回收率介于 86% ~ 108% 之间,满足定量分析要求。此外,本研究采用逐级稀释法测定了色谱分析法的检出限,6 种砷形态的检出限介于 0.5 ~ 0.8 $\mu\text{g/L}$ 之间。

表 3 砷形态分析方法的加标回收率及检出限($n = 3$)

砷形态 Arsenic speices	背景值 Background ($\mu\text{g/L}$)	加入量 Added ($\mu\text{g/L}$)	Recovered spike ($\mu\text{g/L}$)				
			As(III)	MMA III	DMA V	MMA V	As(V)
As(III)	8.3 $\pm$ 2.1	10	17.7 $\pm$ 3.3	—	—	—	—
MMA III	5.2 $\pm$ 1.6	5	—	10.6 $\pm$ 3.1	—	—	—
DMA V	1.6 $\pm$ 0.6	2	—	—	3.4 $\pm$ 1.2	—	—
MMA V	—	5	—	—	—	4.3 $\pm$ 0.6	—
As(V)	18.4 $\pm$ 4.3	20	—	—	—	—	36.8 $\pm$ 6.4
回收率 Spike recovery (%)	—	—	94	108	90	86	92
检出限 Detection limit ($\mu\text{g/L}$)	—	—	0.5	0.8	0.5	0.5	0.5

4 结 论

本研究利用 HPLC-ICP-MS 联用技术对 Chang 肝细胞中的砷代谢产物进行分析。研究发现,Chang 肝细胞中存在两种无法用已有商业化的砷形态标准表征的砷形态,结合文献及本实验结果,推测其中一种为 MMA III,另一种为含硫的一甲基砷化物。通过合成标准加入法证明了未知峰 UN₁ 为 MMA III。定量分析发现,随着染砷浓度的增高,Chang 肝细胞对砷的吸收量增大,而其甲基化率降低,这说明高浓度外源砷对细胞代谢砷的能力有抑制作用。本方法具有较好的准确性,5 种砷形态加标回收率介于 86% ~ 108%,满足痕量分析要求。

References

- 1 NRC: *National Research Council Report: Arsenic in the Drinking Water*. Washington , DC: National Academy Press , **1999**
- 2 Germolec D R , Spalding J , Yu H S , Chen G S , Simeonova P P , Humble M C , Bruccoleri A , Boorman G A , Fley J F , Yoshida T , Luster M I. *American Journal of Pathology*. **1998** , 153(6) : 1775 ~ 1785
- 3 Guifan Sun. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2004** , 198(3) : 268 ~ 271
- 4 Challenger F. *Chem. Rev.* , **1945** , 36: 315 ~ 361
- 5 Thomas D. J , Styblo M , Lin S. *Toxicology and Applied Pharmacology* , **2001** , 176(2) : 127 ~ 144
- 6 Schwerdtle T , Walter I , Mackiw I , Hartwig A. *Carcinogenesis* . , **2003** , 24(5) : 967 ~ 974
- 7 Cao Xuan , YU Jing-Jing , WANG Geng , YU Zheng-Hua , YANG Huang-Hao , XU Yuan-Yuan , SUN Gui-Fan , WANG Xiao-Ru(曹 煊 , 余晶晶 , 王 庚 , 于振花 , 杨黄浩 , 徐苑苑 , 孙贵范 , 王小如) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2009** , 37(1) : 19 ~ 24
- 8 Yathavakilla S K V , Fricke M. *Anal. Chem.* **2008** , 80(3) : 775 ~ 782
- 9 Suzuki K T , Mandal B K , Katagiri A. *Chemical Research and Toxicology* , **2004** , 17: 914 ~ 921
- 10 Naranmandura H , Suzuki N , Suzuki K T. *Chemical Research and Toxicology* , **2006** , 19(8) : 1010 ~ 1018
- 11 Cullen W R , McBride B C. *Appl. Org. Chem.* , **1989** , 3(1) : 71 ~ 78
- 12 Aposhian H V , Gurzau E S , Le X C , Gurzau A , Healy S M , Lu X , Ma M , Yi P L , Maiorino R M. *Chemical Research in Toxicology* , **2000** , 13(8) : 693 ~ 697
- 13 Hayakawa T , Kobayashi Y , Cui X. *Archives of Toxicology* , **2005** , 79(4) : 183 ~ 191
- 14 Le X C , Cullen W R , Aposhian H V , Ma M , Lu X , Zheng B. *Environmental Health Perspective* , **2000** , 108(11) : 1015 ~ 1018
- 15 Schmeisser E , Raml R , Francesconi K A , Kuehnelt D , Lindberg A , Goessler M. *Chem. Commun.* , **2004** , 16: 1824 ~ 1825

Characteristics of Arsenic Metabolites in Human Liver Hepatocytes

CAO Xuan^{* 1} , YU Jing-Jing² , GAO YANG¹ , SUN Ji-Chang¹ , LIU YAN¹ ,
XU Yuan-Yuan³ , SUN Gui-Fan³ , WANG Xiao-Ru^{* 2}

¹(*Institute of Oceanographic Instrumentation , Shandong Academy of Sciences ,
Shandong Ocean Environment Monitoring Technology Key Lab , Qingdao 266001*)

²(*First Institute Oceanography of State Oceanic Administration , Qingdao 266061*)

³(*College of Pubic Health , China Medical University , Shenyang 110001*)

Abstract Hyphenated technique of high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) was applied to the determination of arsenic metabolites in Chang liver cells after arsenic incubation. Two unknown arsenicals were found , one of which was speculated as methylarsonous acid (MMA III) , and further characterized using standard addition method using synthesized MMA III standard. Quantitative analysis results showed that monomethylarsenicals , dimethylarsenicals and inorganic arsenicals in hepatocytes after arsenic incubation were increasing with the increase of initial incubated arsenic concentration while the methylation rate decreasing with the increase of initial incubated arsenic concentration , which indicated that high concentration of arsenic has the inhibition to the ability of arsenic methylation of Chang liver cells.

Keywords High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry; High performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry; Chang liver cells; Arsenic metabolites; Methylarsonous acid

(Received 21 June 2010; accepted 29 August 2010)