论文

芥子气暴露的确证: 家兔皮肤染毒后血红蛋白 N 端缬氨酸加合物的同位素稀释-NCI-GC/MS 溯源性检测

聂志勇, 张雅娇, 董媛, 吴弼东, 刘勤, 冯建林, 谢剑炜*

军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

* 联系人, E-mail: xiejw@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-20; 接受日期: 2011-08-15

国家科技部重大专项基金(批准号: 2009ZX09301-002)资助项目

doi: 10.1360/052011-604

摘要 素有“毒剂之王”之称的芥子气(HD)是目前危害最大的化学战剂之一, 染毒后在体内可产生不同类型的特征性生物标志物, 其对中毒诊断、溯源性分析以及毒理机制等研究有着重要的意义. 本文首先采用同位素稀释-NCI-GC/MS 分析方法监测和鉴定了 HD 体外全血染毒后产生的血红蛋白 N 端缬氨酸加合物(HETE-Val); 其次, 研究了不同剂量 HD(0.02~0.15 LD₅₀)经皮肤染毒家兔体内 HETE-Val 的时效、量效关系. 结果表明, HETE-Val 与家兔中毒剂量间有良好的量效关系, 而时效关系表明染毒后 15 min 内即可产生并检测到 HETE-Val, 一周内达到最大, 随后逐渐下降, 但至染毒后第 103 天仍可监测到该加合物. 与血红蛋白 N 端缬氨酸加合反应的 HD 仅占 HD 染毒总量的~0.15%, 与家兔血液反应的 HD 约占 HD 染毒总量的~1%. 表明 HETE-Val 是一种重要的生物标志物, 并可应用于 HD 暴露的确证和化学武器核查的溯源性检测.

关键词芥子气
生物标志物
N 端缬氨酸加合物
同位素稀释
NCI-GC/MS

芥子气(HD)是一种糜烂性化学战剂, 学名为二氯二乙硫醚, 能够引起眼睛、皮肤及呼吸道的严重损伤, 是已知危害最大的化学战剂之一. 第一次世界大战及中东战争中曾被大量使用^[1,2], 二战期间, 日本对中国军民使用了包括芥子气在内的大量化学战剂, 而战败后为了掩盖其罪行, 又将大量的化学战剂掩埋遗弃在中国境内, 至今已导致多起中毒事件^[3~5].

芥子气中毒机理虽早有研究, 但迄今尚未完全阐明^[6,7]. 目前认为, 在生理条件下, 芥子气的两个亲电碳原子可与体内多种亲核性基团如氨基、巯基、羟

基、羧基、磷酸基及咪唑基等反应, 产生广泛复杂的生物学作用; 而反应产物通过烃化、水解、氧化、裂解等步骤, 产生一系列 HD 中毒特有的代谢产物, 研究这些代谢产物对芥子气中毒诊断, 毒理机制等的研究有着重要的意义. 血液及尿液中的游离代谢产物可以作为芥子气损伤的特异性生物标志物, 但由于其短期内就被快速排出体外, 其检测的溯源性不强; 而芥子气与大分子蛋白质、核酸等的加合产物在体内稳定性好、存留时间长, 可作为芥子气染毒确证的长效生物标志物进行溯源性分析及毒理机制研究,

英文引用格式: Nie Z Y, Zhang Y J, Dong Y, et al. Determination of the N-terminal valine adduct in rabbit hemoglobin after skin exposure to sulfur mustard. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 965-970, doi: 10.1360/052011-558

其中血红蛋白 N 端缬氨酸加合物(HETE-Val)是最重要的体内生物标志物之一^[8]。

本文以芥子气染毒后的 HETE-Val 为研究对象, 采用改进的 Edman 降解方式^[8], 基于高灵敏的同位素稀释 NCI-GC/MS 方法^[9], 系统地研究了 HETE-Val 在 HD 染毒家兔体内的时效、量效关系, 为芥子气损伤机理研究提供了技术支持, 同时也为芥子气中毒人员的损伤程度评估提供了重要的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大耳白家兔(雄性、军事医学科学院实验动物中心提供, 2.2~2.8kg), 人全血由解放军第 307 医院提供, 芥子气(>96%)由解放军防化指挥工程学院提供; 氘代 1, 2-二氯乙烷购自剑桥同位素实验室(美国); L-缬氨酸、异硫氰酸基五氟苯(PFPITC)购自 Sigma 公司(美国); Florisil 硅土(60-100 目)购自 Alletch 公司(美国); 七氟丁酰咪唑(HFBI)购自 TIC 公司(日本); 甲苯、乙腈、二氯甲烷购自 J. T. Baker 公司(色谱纯, 美国); 乙酸乙酯购自 J. T. Baker 公司(农残级, 美国); 其他试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

GC(6890N)/MS(5975)联用仪, HP-5MS(25 m×200 μm×0.33 μm)毛细管柱(美国 Agilent 公司); 固相萃取仪(美国 Waters 公司); 高速冷冻离心机(3K30)(德国 Sigma 公司); 台式离心机(800B)(上海安亭科学仪器厂); 氮气吹干仪(BF-2000)(北京八方世纪公司); 涡旋振荡器(QL-901)(海门市其林贝尔公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 GC/MS 分析条件。

GC 条件: 色谱柱起始温度 120℃, 保持 2 min, 以 20℃/min 升温速率升至 280℃, 保持 5 min; 载气为氦气(0.8 mL/min), 不分流进样, 进样体积为 1 μL, 进样口温度 260℃, 传输线温度 280℃。MS 参数: 离子源和四极杆温度均为 150℃, NCI 模式, 反应气为甲烷, 溶剂延迟 5 min, SIM 方式监测离子为 m/z 564 ($M^+ - 3 HF$, 目标离子)和 568($M^+ - 3 HF$, 内标)。

1.2.2 合成参考品和氘代芥子气

合成方法参见文献[9]。

1.2.3 氘代内标的制备

取空白家兔新鲜血液 6 mL, 加入 30 μL 0.01 mol/L 氘代芥子气的乙腈溶液, 涡旋后置于 37℃ 孵育 2 h, 提取珠蛋白^[9,10], 将珠蛋白溶于甲酰胺中(10 mg/mL)做为内标。

1.2.4 HETE-Val 的鉴定

(i) 人全血体外染毒。取 5 mL 血液, 加入 50 μL 1.0 mol/L 芥子气的乙腈溶液, 使血液芥子气染毒浓度为 0.01 mol/L, 涡旋震荡后置于 37℃ 孵育 2 h。

(ii) 鉴定 HETE-Val^[9]。取上述染毒血液提取珠蛋白后, 取 20 mg 溶于 2 mL 甲酰胺、加入 8 μL 吡啶和 8 μL PFPITC, 60℃ 反应 2 h, 冷却至室温后用甲苯萃取(1 mL × 3), 萃取液依次用水(0.5 mL × 2)、Na₂CO₃(0.1 mol/L, 0.5 mL)、水(0.5 mL)洗涤后无水硫酸镁干燥, 氮气吹干并用 100 μL 甲苯复溶; 取自制 Florisil 固相萃取小柱(500 mg/3 mL), 依次用乙酸乙酯/二氯甲烷(1:9, v/v; 4 mL)、二氯甲烷活化平衡柱子, 上样后依次用二氯甲烷(2 mL)、乙酸乙酯/二氯甲烷(1:9, v/v; 1 mL)淋洗, 乙酸乙酯/二氯甲烷(1:9, v/v, 2 mL)洗脱, 洗脱液吹干后溶解至 200 μL 甲苯中, 加入 70 μL HFBI 的甲苯溶液(200 mg/mL), 60℃ 反应 30 min, 冷却至室温, 依次用水 (200 μL × 2)、Na₂CO₃(0.1 mol/L, 200 μL)、水(200 μL)洗涤, 无水硫酸镁干燥, 氮气吹干并复溶于 50 μL 甲苯; 用 NCI-GC/MS Scan 方式检测, 与 HETE-Val 经过相同步骤得到的参考品 HETE-Val-P-P^[9]比对色谱保留时间和质谱碎片。

1.2.5 动物染毒及样品采集

(i) 将 12 只家兔随机分成 4 组, 每组 3 只; 即: 低剂量组 2mg/kg (0.02 LD₅₀^[10,12])、中剂量组 5 mg/kg(0.05 LD₅₀)、高剂量组 15 mg/kg(0.15 LD₅₀)、空白对照组, 将各组家兔背部用剪刀去毛、8% Na₂S 溶液脱毛, 使裸露面积约为 6 cm×6 cm, 24 h 后用 25% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 在裸露的背部皮肤中选取 6 个区域标记后均匀涂抹 HD, 随即用保鲜膜覆盖, 6 h 后去除保鲜膜, 并对家兔皮肤洗消。

(ii) 样品采集及储存。家兔染毒后耳静脉取血

0.5 mL, 15 min 取第一个点, 6 h 第二个点, 接着前 5 日内每天取血, 然后每两日取一次血, 逐渐延长取血时间, 2 个月后每两周取一次血. 取血后, 提取珠蛋白于 -20℃ 储存, 待检测.

1.2.6 家兔皮肤染毒血液中 HETE-Val 的监测

(i) 工作曲线. 准确称取 HETE-Val 参考品, 溶于甲酰胺, 配制 0, 6, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 nmol/L 的 HETE-Val 标准溶液. 取 HETE-Val 标准溶液各 50 μ L, 加 2 mL 甲酰胺、50 μ L 内标、8 μ L 吡啶和 8 μ L PFPITC, 其余步骤同 1.2.4-(ii), 用 NCI-GC/MS SIM 方式检测, 得出 HETE-Val-P-P 与 HETE-Val-P-P-d₄ 的峰面积比, 绘制工作曲线.

(ii) 家兔皮肤染毒血液中 HETE-Val 的监测. 取 1.2.5-(ii) 得到的珠蛋白各 20 mg, 溶于 2 mL 甲酰胺, 然后加 50 μ L 内标、8 μ L 吡啶和 8 μ L PFPITC, 60℃ 反应 2 h, 其余步骤同 1.2.4-(ii), 用 NCI-GC/MS SIM 方式检测, 得出 HETE-Val-P-P 与 HETE-Val-P-P-d₄ 的峰面积比, 并计算.

2 结果

2.1 HETE-Val 的鉴定

将实际染毒样品按上述方法处理后, 并与参考

品 HETE-Val-P-P 的色谱保留时间及质谱图比对^[9], 验证了血红蛋白 N 端缬氨酸加合物的存在(图 1).

2.2 工作曲线

以 HETE-Val 浓度 (0-800 nmol/L) 为横坐标, HETE-Val-P-P 与 HETE-Val-P-P-d₄ 的峰面积比为纵坐标, 绘制工作曲线, $y = 0.024x - 0.0615$, $R^2 = 0.9999$, 线性良好, 符合要求. 灵敏度、精密度等其他分析参数参见文献^[9].

2.3 家兔皮肤 HD 染毒后 HETE-Val 的时效与量效关系

将 1.2.6 所得数据代入工作曲线中可计算得出 HETE-Val (用 X 表示) 的浓度 (nmol/L), 并计算出珠蛋白中 HETE-Val 的摩尔数. 由于文中定量称取珠蛋白 20 mg, 则通过换算可得出每克珠蛋白中的 HETE-Val 的摩尔数 (用 A 表示), 见公式 1. 由此即可得出家兔 HD 染毒的量效和时效关系(图 2).

$$A \text{ (pmol/g)} = X \text{ (nmol/L)} \times 0.00005 \text{ (L)} \div 0.02 \text{ (g)} \times 1000 \quad (1)$$

由图 2 可以看出, 3 个剂量 HD 皮肤染毒组中各动物体内均检出加合物 HETE-Val, 并与染毒剂量有很好的量效关系和时效曲线. 各染毒剂量组在染毒 15 min 后即有 HETE-Val 产生, 一周内达到最大, 随

图 1 HETE-Val-P-P 与合成参考品的比对图谱

(实线: 人全血样品; 虚线: 参考品. 插图为 HETE-Val-P-P 的质谱图)

图2 家兔皮肤 HD 染毒后 HETE-Val 的时效与量效关系 (n=3)

后逐渐减少, 2 mg/kg 剂量组在 2 个月 HETE-Val 降至定量限以下(高于检测限, LOD 为 2.5 pmol/g (S/N> 3)), 5 mg/kg 剂量组在 75 日后 HETE-Val 降至定量限(高于检测限)以下, 但 3 个剂量组均于第 103 天仍可监测到 HETE-Val。

2.4 HETE-Val 与染毒 HD 总量的关系

因为 HD 与 N 端缬氨酸的反应计量比为 1:1, 由 HETE-Val 的量(A pmol/g globin)即可得出与 N 端缬氨酸反应的 HD 的量, 而在本实验中最多可从 1 mL 血液中提取 140 mg 珠蛋白, 与人血液相当^[13-15], 此数值也符合家兔珠蛋白含量范围^[15], 由 A 值可求出每毫升血液中 HETE-Val 的量(B, 公式 2)。

$$B \text{ (pmol/mL)} = A \text{ (pmol/g)} \times 0.14 \text{ (g/mL)} \quad (2)$$

由于哺乳类动物血液含量一般为体重(M)的 7%~8%, 则动物体内血液总量为 $M \times 8\%$ 左右(按体重的 8%计), 由此即可求出某一监测时间点家兔血液中

总的 HETE-Val 的值。由于红细胞的代谢周期为 120 天, 可知 HETE-Val 在动物体内一定时间段是相对稳定的, 所以取家兔 HD 染毒后 HETE-Val 的最大值(峰值)即可认为是与珠蛋白反应的 HD 的最大量(C, 公式 3)。

$$C \text{ (nmol)} = B \text{ (pmol/mL)}_{\text{峰值}} \times M \times 8\% \div 1000 \quad (3)$$

由 C 值再与家兔染毒的 HD 的总量比较, 即可得出与 N 端缬氨酸反应的 HD 占总染毒量的比例(D); 而由本实验室前期研究结果表明^[9], 与 N 端缬氨酸反应的 HD 占体外全血总染毒量的 1%~2%(此处按 1.6%计), 可以得出 HD 家兔皮肤染毒后与血液反应的 HD 占总染毒量的比例(表 1 中的 E)。

3 讨论

本文采用稳定、灵敏度高的同位素稀释-NCI-GC/MS 分析方法对 HD 皮肤染毒家兔血液中的 HETE-Val 进行了监测, 结果表明: 三个染毒剂量组的 HETE-Val 与染毒浓度有明显的量效关系, 说明监测 HETE-Val 可以用来评估芥子气损伤程度; 而家兔皮肤染毒后的时效关系曲线也表明 HETE-Val 达到峰值后可以维持一周左右, 然后开始下降, 但 HETE-Val 在染毒后第 103 日仍可监测到, 说明 HETE-Val 基本和红细胞的代谢周期相当, 同时也表明 HETE-Val 是一种长效生物标志物, 可用于 HD 暴露的确证和化学武器核查的溯源性检测。

家兔 HD 皮肤染毒模型中, 与珠蛋白 N 端缬氨酸加合反应的 HD 仅占 HD 染毒总量的 0.15%左右, 与家兔血液反应的 HD 约占 HD 染毒总量的 1%左右, 比

表 1 由 HETE-Val 得出的相关信息

HD (mg/kg)	M (kg)	HD (μmol)	A	B	C	D (%)	E (%)
2.0	2.68	33.7	189	26.5	5.7	0.17	1.1
5.0	2.52	79.1	428	59.9	12.1	0.15	1.0
15.0	2.32	218.6	1246	174.4	32.4	0.15	1.0

M: 动物的平均体重(kg)

A: 珠蛋白中 HETE-Val 的含量 (pmol/g globin);

B: 血液中 HETE-Val 的含量(pmol/mL blood), $A \times 0.14$;

C: 血液中 HETE-Val 的总量(nmol), $B \times M \times 8\% \div 1000$;

D: 与珠蛋白 N 端缬氨酸反应的 HD 占家兔染毒总量的比例;

E: 与家兔血液反应的 HD 占家兔染毒量的百分比, $D \div 1.6\%$ 。

例较小, 分析可能的主要原因有: (i) 芥子气一部分被皮肤吸收并发生反应; (ii) 透皮率可能不高, 即穿透皮肤进入血液循环的 HD 不多; (iii) 一部分 HD 进入家兔体内后由血液循环带入组织, 与其他组织反应; (iv) 体内外差异导致 HD 与 N 端缬氨酸反应的比例呈现差异. Hambrook 等人^[16]报道进入血液的 HD 约占大鼠皮肤总染毒量的 5%-8%, 较之本文结果偏高; 可能的原因有(i) Hambrook 等人采用的是特殊喷雾装置逐渐释放毒剂进行大鼠皮肤染毒, 使毒剂

透皮吸收效率高; (ii) 动物种属差异所致. 芥子气对人、家兔的 LD₅₀ 均为 100 mg/kg, 大鼠 LD₅₀ 只有 9 mg/kg^[11,12], 也正因为家兔与人皮肤 HD 中毒的 LD₅₀ 值一致, 选择家兔作为动物模型, 其皮肤染毒结果可能与人体中毒更为接近.

总之, HD 暴露后血红蛋白 N 端缬氨酸加合物的监测将为其长期低剂量暴露的健康监测、化学武器核查的溯源性检测以及芥子气中毒机制的阐明提供重要的技术支持.

参考文献

- 1 Barr J R, Pierce C L, Smith J R, et al. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure. *J Anal Toxicol*, 2008, 32:10-16
- 2 Nelson P, Burczyk A, Sawyer T W. Lack of a role for creatine phosphate kinase in sulphur mustard-induced cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26: 891-897
- 3 Zhou L, Ma L, Nie Z, et al. Progress in safety science and technology. Beijing: Science press and science press USA Inc, 2005, 2139-2142
- 4 Hanaoka S, Nomura K, Wada T. Determination of mustard and lewisite related compounds in abandoned chemical weapons (Yellow shells) from sources in China and Japan. *J Chromatogr A*, 2006, 1101: 268-277
- 5 Tang H, Cheng Z, Xu M, et al. A preliminary study on sorption, diffusion and degradation of mustard (HD) in cement. *J Hazard Mater*, 2006, 128: 227-232
- 6 Shakarjian M P, Heck D E, Gray J P, et al. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicol Sci*, 2010, 114: 5-19
- 7 Mol M A, van den Berg R M, Benschop H P. Proteomic assessment of sulfur mustard-induced protein adducts and other protein modifications in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230: 97-108
- 8 Noort D, Fidder A, Benschop H P, et al. Procedure for monitoring exposure to sulfur mustard based on modified edman degradation of globin. *J Anal Toxicol*, 2004, 28: 311-315
- 9 聂志勇. 芥子气染毒体内生物标志物—血红蛋白加合物及尿液中代谢产物的鉴定. 检测及应用研究. 北京: 军事医学科学院博士学位论文, 2011
- 10 Bailey E, Brooks A G, Dollery C T, et al. Hydroxyethylvaline adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake. *Arch Toxicol*, 1988, 62: 247-253
- 11 Robert L. Maynard. Chemical warfare agents toxicology and treatment. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2007, 375-407
- 12 Zemoria A, Rosemond, Dolores A. Beblo, Richard Amata. Toxicological Profile for Sulfur Mustard (update), U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003, 80
- 13 文体端, 喻友军, 卜珊珊. 实用临床检查正常值与结果分析速查手册. 北京: 科学技术文献出版社, 2009, 321-322
- 14 蔡淦, 赵善祥, 叶伟成, 等. 最新医学检验参考值手册. 上海: 上海辞书出版社, 2001, 1-2
- 15 邵军石. 动物实验指导手册. 北京: 军事医学科学院出版社, 2005, 90
- 16 Hambrook J L, Howells D J, Schock C, et al. Biological fate of sulphur mustard (1,1'-thiobis(2-chloroethane)): uptake, distribution and retention of ³⁵S in skin and in blood after cutaneous application of ³⁵S-sulphur mustard in rat and comparison with human blood *in vitro*. *Xenobiotica*, 1993, 23: 537-561

Determination of the N-terminal Valine Adduct in Rabbit Hemoglobin After Skin Exposure to Sulfur Mustard

NIE ZhiYong, ZHANG YaJiao, DONG Yuan, WU BiDong, LIU Qin, FENG JianLin
& XIE JianWei

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Sulfur mustard (HD) is one of the most hazardous chemical warfare agents. Various biomarkers will be generated in the body under exposure to HD, which have important practical significance in diagnosis, source tracing and basic research. The N-terminal valine adduct in hemoglobin (HETE-Val) was identified and validated after human blood exposure to sulfur mustard *in vitro*. Based on a rabbit model of skin exposure *in vivo* and the sensitive isotope-dilution-NCI-GC/MS (negative chemical ionization-gas chromatography/mass spectrometry) analysis, the metabolic behavior of HETE-Val was studied after the rabbits were exposed to HD. The results show that HETE-Val levels displayed an obvious dose-response relationships and time-response relationships after HD exposure. HETE-Val was generated as early as 15 min after HD exposure and was readily detectable. The contents of HETE-Val in blood were increased in the first two days after exposure and were stable from the 3rd to 9th day. Then it gradually decreased, but HETE-Val was still detectable at the 103rd day. The present data suggest that HETE-Val may be used as a sensitive biomarker of HD exposure in diagnosis of poisoning, retrospective analysis, and toxicological mechanism research.

sulfur mustard (HD), biomarker, N-terminal valine adduct, isotope-dilution-NCI-GC/MS

doi: 10.1360/052011-558