

doi: 10.12452/j.fxcxb.26010801

# 尿液游离DNA加合物定量测定揭示3种氮芥暴露损伤及其特点

刘晓慧<sup>1,2#</sup>, 刘玉龙<sup>2#</sup>, 王朝霞<sup>2</sup>, 王勇<sup>2</sup>, 陈佳<sup>2</sup>, 薛晋娟<sup>2</sup>, 刘艳芹<sup>2</sup>,  
陈爱兵<sup>1\*</sup>, 徐华<sup>2\*</sup>, 谢剑炜<sup>2</sup>

(1. 河北科技大学 化学与制药工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 军事医学研究院, 北京 100850)

**摘要:** 通过检测动物暴露于氮芥(HN)后形成的HN-DNA加合物, 实现HN暴露溯源确证分析。6周龄、约200 g重的Sprague-Dawley(SD)大鼠经腹腔分别注射氮芥1(HN1)、氮芥2(HN2)和氮芥3(HN3)溶液构建毒剂暴露模型, 设置氮芥暴露组(0.3 LD<sub>50</sub>、0.5 LD<sub>50</sub>和LD<sub>50</sub>组)和空白溶剂对照组。采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)多反应监测(MRM)模式, 定量分析大鼠尿液中的HN-DNA加合物类型与含量。结果显示, 12种HN-DNA加合物标准品在0.02~500 ng/mL范围内线性关系良好, 检出限(LOD)为0.01~0.02 ng/mL, 定量下限(LOQ)为0.02~0.05 ng/mL, 批内与批间精密度的相对标准偏差(RSD)均小于15%。暴露12 h后, 大鼠尿液中检出HN-AN3、HN-GN7、HN-GO6及HN-Bis-GN7加合物, 含量为HN-GN7>HN-Bis-GN7>HN-AN3>HN-GO6。4种加合物浓度与暴露剂量呈正相关, 并随时间延长逐渐降低。应用HPLC-MS/MS检测HN暴露后动物尿液中的DNA加合物, 实现了HN暴露的无创早期检测、准确溯源和损伤评价, 可为探究HN的DNA损伤修复过程和机制提供依据。

**关键词:** 氮芥; DNA加合物; 生物标志物; 溯源分析; 高效液相色谱-串联质谱

**中图分类号:** O657.7; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-0960-10

## Quantitative Analysis of Urinary Free DNA Adducts Reveals Three Types of Nitrogen Mustard Exposure Damage and Their Characteristics

LIU Xiao-hui<sup>1,2#</sup>, LIU Yu-long<sup>2#</sup>, WANG Zhao-xia<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, CHEN Jia<sup>2</sup>, XUE Jin-juan<sup>2</sup>,  
LIU Yan-qin<sup>2</sup>, CHEN Ai-bing<sup>1\*</sup>, XU Hua<sup>2\*</sup>, XIE Jian-wei<sup>2</sup>

(1. College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** The identification of HN-DNA adducts formed in animals after exposure to nitrogen mustards (NMs, codenamed HN) enables the traceability and confirmatory analysis of HN exposure. Six-week-old Sprague-Dawley (SD) rats, with a mean weight of approximately 200 g, were given intraperitoneal injections of HN1, HN2, and HN3, respectively, to establish an exposure animal model. The nitrogen mustard exposure groups (0.3 LD<sub>50</sub>, 0.5 LD<sub>50</sub>, or LD<sub>50</sub> exposure dose) as well as a blank solvent control group were set up. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method employing multiple reaction monitoring (MRM) mode was established to quantitatively analyze the types and concentrations of HN-DNA adducts in rat urine samples. The results demonstrated a good linearity for the 12 HN-DNA adduct standards within the concentration range of 0.02–500 ng/mL, with limits of detection (LODs) of 0.01–0.02 ng/mL and limits of quantification (LOQs) of 0.02–0.05 ng/mL. The relative standard deviations (RSDs) of intra-assay and inter-assay precision were less than 15%. Urine analysis of HN-exposed SD rats at 12 hours post-exposure revealed the presence of HN-AN3, HN-GN7, HN-GO6, and HN-Bis-GN7 adducts,

收稿日期: 2026-01-08; 修回日期: 2026-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21974151)

\* 通讯作者: 徐华, 博士, 副研究员, 研究方向: 药物毒物分析, E-mail: huarxu@163.com  
陈爱兵, 博士, 教授, 研究方向: 能源材料, E-mail: chen\_ab@163.com

# 共同第一作者

网络首发日期: 2026-03-20

with concentrations decreasing in the order of HN-GN7>HN-Bis-GN7>HN-AN3>HN-GO6. The concentrations of the four DNA adducts demonstrated a dose-dependent positive correlation and a gradual decrease over time. The application of HPLC-MS/MS technique to detect these urinary DNA adducts allows for the non-invasive early detection, accurate traceability, and damage assessment of HN exposure. These findings provide an experimental basis for further study of HN-induced DNA damage repair processes and mechanisms.

**Key words:** nitrogen mustard; DNA adducts; biomarker; traceability analysis; high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

糜烂性化学毒剂氮芥(HN)属于双功能烷化剂,包含3种典型的化合物即双(2-氯乙基)乙胺(HN1)、双(2-氯乙基)甲胺(HN2)和三(2-氯乙基)胺(HN3),其经皮肤、眼睛或呼吸道进入体内,均可在数小时至数天内引发多系统渐进性损伤<sup>[1-2]</sup>。HN由于强毒性被列入国际《禁止化学武器公约》(CWC)附表1清单,同时也是世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)公布的2A类致癌物。其分子结构中的高亲电性氯乙基氨基侧链能与体内多种生物分子(DNA、RNA、蛋白质和谷胱甘肽等)的亲核位点发生烷基化反应形成加合物,并由此导致基因突变或细胞周期阻滞等<sup>[3]</sup>。HN的生物标志物主要包括水解/氧化代谢产物<sup>[4-5]</sup>、蛋白加合物<sup>[6-7]</sup>、DNA加合物及DNA-蛋白交联加合物<sup>[8-10]</sup>4类。尽管HN的毒理机制尚未完全阐明,但DNA损伤被认为是其诱导毒性的核心机制<sup>[11]</sup>。临床上亦正是利用该类烷基化试剂对DNA的不可逆交联损伤,通过选择性杀死快速增殖的肿瘤细胞来发挥抗肿瘤作用。HN2及其衍生物(例如美法仑、苯丁酸氮芥、环磷酰胺以及雌莫司汀等)在癌症治疗领域的应用十分广泛<sup>[12]</sup>。受立体位阻效应与反应性化学基团活性的影响,HN在DNA上的烷基化靶点主要为鸟嘌呤的N7位(GN7)和O6位(GO6)及腺嘌呤的N3位(AN3),进而形成单加合物和双加合物。这些加合物会引发链内/链间交联(ICL)、单链或双链断裂等DNA损伤,阻碍DNA复制与转录,并导致碱基错配及染色体畸变。若未及时修复,此类损伤可触发细胞周期停滞与凋亡信号级联反应<sup>[13]</sup>。因此,DNA加合物是表征HN暴露的理想生物标志物。

HN-DNA加合物的检测已有多种方法报道,主要包括<sup>32</sup>P后标记法、免疫分析法、气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)及高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术。<sup>32</sup>P后标记法虽有较高灵敏度,但存在放射性同位素带来的潜在健康风险,且无法提供结构信息<sup>[14]</sup>。免疫分析法易受交叉反应干扰,特异性受限,难以区分立体异构体与结构类似物<sup>[15]</sup>。近年来,随着质谱联用技术的快速发展,痕量DNA加合物的精准定性与定量分析得以实现。其中,GC-MS/MS技术具有较好的灵敏度与选择性,但依赖衍生生化前处理,步骤繁琐、操作要求较高<sup>[16]</sup>。相比之下,HPLC-MS/MS技术凭借高灵敏度、高特异性及多组分同步分析能力,可获取详细的加合物结构信息,已成为主流检测方法<sup>[17]</sup>。

DNA烷基化损伤可通过碱基切除修复(BER)和核苷酸切除修复(NER)通路进行修复,被切除的修饰碱基会以游离DNA加合物形式经尿液排出<sup>[18-19]</sup>。虽然尿液DNA加合物可能受个体间DNA修复能力差异的影响,但可在一定程度上反映体内的总DNA加合物负荷<sup>[20]</sup>。尿液样本因非侵入性采集、便于储运、生物安全风险低等特点,在暴露生物标志物检测中具有重要研究价值<sup>[21-22]</sup>。例如,尿液中8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-oxodG)在-20℃下可稳定储存超过15年,且浓度无明显衰减<sup>[23]</sup>。本课题组前期研究表明,硫芥(HD)暴露后动物尿液中存在4种特征性DNA加合物,其中GN7位点单加合物含量最高、GO6位点单加合物含量最低,且各加合物水平均呈现明显的剂量与时间依赖性<sup>[24-25]</sup>。目前,针对3种HN暴露后尿液中HN-DNA加合物的系统研究尚未见报道。本研究旨在建立一种高灵敏HPLC-MS/MS方法,用于定量分析SD大鼠尿液中12种HN-DNA加合物,并系统评估HN暴露后的时间-效应、剂量-效应关系及加合物累积水平。3种氮芥结构式及大鼠暴露实验尿液样本处理流程图见图1。

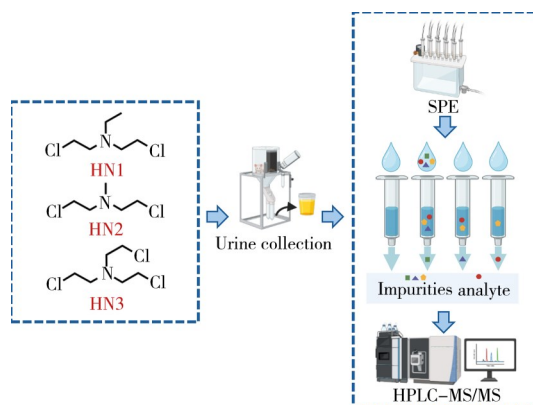


图1 3种氮芥结构式及大鼠暴露实验尿液样本处理流程图

Fig. 1 Structure of three NMs and processing flow-chart for urine samples from exposed rats

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY HPLC I-Class PLUS 高效液相色谱(美国 Waters 公司); Q-Trap 5500 三重四极杆质谱(美国 AB Sciex 公司); KQ-250E 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); Centrivap 离心浓缩仪(美国 Labconco 公司); H17.5R 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); BCA-224i-10CN 电子天平(德国赛多利斯公司); 800 台式离心机(金坛市鸿科仪器厂); MX-S 涡旋振荡仪(中国 Scilogex 公司); 固相萃取仪(北京普利泰科仪器有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Mega BE-C<sub>18</sub> 固相萃取小柱(1 g/6 mL, 美国 Agilent 公司)。

HN1、HN2 和 HN3 由实验室微量合成(盐酸盐形式, 纯度>96%); HN1-AN3、HN1-GN7、HN1-GO6、HN1-Bis-GN7、HN2-AN3、HN2-GN7、HN2-GO6、HN2-Bis-GN7、HN3-AN3、HN3-GN7、HN3-GO6、HN3-Bis-GN7 加合物标准品, 纯度>95%, 购自天津阿尔塔科技有限公司; 甲醇、乙腈和异丙醇购自北京百灵威科技有限公司; 甲酸(FA)购自赛默飞科技有限公司; 所用溶剂纯度均为色谱级或质谱级。

### 1.2 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 每只重量约 200 g。所有动物实验过程均遵循《动物管理条例》进行。

### 1.3 安全规范

HN 属于糜烂性化学毒剂, 操作人员需全程佩戴防毒面罩及耐化学腐蚀橡胶手套, 所有操作均在通风橱内完成。实验结束后, 接触毒剂的试剂与器皿等均需进行彻底的洗消处理, 推荐采用饱和氢氧化钠-乙醇水溶液作为洗消液。

### 1.4 HN 暴露动物模型建立

将 50 只雄性 SD 大鼠适应性饲养一周后, 随机分为 10 组。分别为空白对照组、HN1 低暴露剂量组(5.7 mg/kg, 0.3 LD<sub>50</sub>)、HN1 中暴露剂量组(9.5 mg/kg, 0.5 LD<sub>50</sub>)、HN1 高暴露剂量组(19 mg/kg, LD<sub>50</sub>)、HN2 低暴露剂量组(6 mg/kg, 0.3 LD<sub>50</sub>)、HN2 中暴露剂量组(10 mg/kg, 0.5 LD<sub>50</sub>)、HN2 高暴露剂量组(20 mg/kg, LD<sub>50</sub>)、HN3 低暴露剂量组(4.2 mg/kg, 0.3 LD<sub>50</sub>)、HN3 中暴露剂量组(7 mg/kg, 0.5 LD<sub>50</sub>)、HN3 高暴露剂量组(14 mg/kg, LD<sub>50</sub>)。空白对照组腹腔注射生理盐水, 实验组腹腔注射 HN 溶液。

### 1.5 样品采集和前处理

动物暴露后每隔 12 h 取尿样 1 次, 每次取样体积约为 10 mL, 连续取样 7 d。将尿样分装在 15 mL 离心管中并于 -80 °C 冰箱保存。尿液成分复杂, 其中高浓度的极性小分子、蛋白质及无机盐不仅会严重干扰检测, 还可能损害分析仪器<sup>[26]</sup>, 故需对尿样进行固相萃取(SPE)前处理<sup>[24]</sup>。操作步骤为: 将 6 mL 规格的 C<sub>18</sub> SPE 小柱经 2 mL 甲醇和 4 mL 水依次活化; 加入 1 mL 尿样或标准溶液; 随后分别加入 3 mL 水、2 mL 淋洗液(20% 甲醇水溶液)淋洗杂质, 并真空抽至略干; 最后依次加入 2 mL 洗脱液 1(20% 甲醇水溶液, 含 5% FA)、1.5 mL 洗脱液 2(50% 甲醇水溶液, 含 5% FA); 将两者合并后离心蒸发浓缩至干, 50 μL 0.1% 甲醇水溶液复溶。4 °C 下以 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行检测。

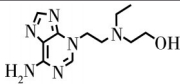
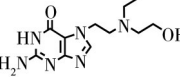
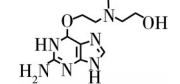
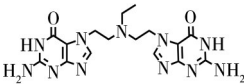
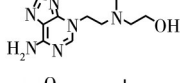
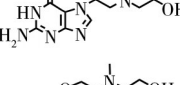
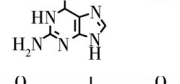
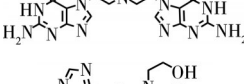
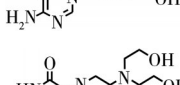
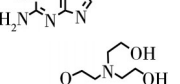
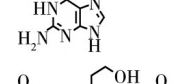
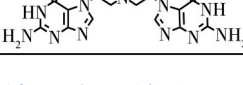
### 1.6 色谱-质谱条件

使用 Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm), 柱温 40 °C, 流速 0.25 mL/min, 进样量为 10 μL; 流动相 A 相为 0.1% FA-水溶液, B 相为 0.1% FA-甲醇溶液; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 1% B; 3~7 min, 1%~20% B; 7~10 min, 20%~99% B; 10~13 min, 99% B; 13~13.5 min, 99%~1% B, 保持 1.5 min。

电喷雾离子源, 正离子、多反应监测(MRM)模式; 离子源温度(TEM): 500 °C; 雾化气压力(GS1): 241 kPa; 气帘气压力(CUR): 207 kPa; 辅助气压力(GS2): 379 kPa; 碰撞气压力(CAD): 69 kPa; 离子化电压(IS): 5 500 V。12 种 HN-DNA 加合物的分子式、结构式、保留时间、检测离子及其他质谱

参数见表1。

表1 12种HN-DNA加合物的MRM质谱参数  
Table 1 MRM mass spectrometry parameters of 12 types of HN-DNA adducts

HN-DNA adduct	Formula	Structural formula	Retention time/ min	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Daughter ion ( <i>m/z</i> )	CE/eV
HN1-AN3	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O		1.38	251.1	116.0	22
HN1-GN7	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		2.16	267.1	116.0	23
HN1-GO6	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		3.72	267.1	116.0	23
HN1-Bis-GN7	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub>		4.63	400.2	249.0	22
HN2-AN3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O		1.33	237.1	102.0	17
HN2-GN7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		1.85	253.1	102.0	21
HN2-GO6	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		2.55	253.1	102.0	21
HN2-Bis-GN7	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub>		2.97	386.2	235.0	24
HN3-AN3	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		1.35	267.1	132.0	20
HN3-GN7	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		1.85	283.1	132.0	17
HN3-GO6	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		2.55	283.1	132.0	17
HN3-Bis-GN7	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>3</sub>		5.67	416.2	265.0	23

## 1.7 尿液中HN-DNA加合物检测方法的验证

参考国际协调会(ICH)发布并被美国食品药品监督管理局(FDA)采纳的《生物分析方法验证及样品分析指导原则》(ICH M10, 2022年正式版)<sup>[27]</sup>, 对所建方法的专属性、线性范围、检出限(LOD)、定量下限(LOQ)、回收率、准确度与精密度进行验证。

## 1.8 HN暴露SD大鼠尿液中的HN-DNA加合物检测

采用建立的方法对HN暴露SD大鼠尿样中的HN-DNA加合物进行分析, 考察加合物在动物体内的含量变化趋势, 研究加合物浓度与暴露剂量和暴露时间的量效、时效关系, 并确定其检测时间窗。计算12种HN-DNA加合物的总排出量及HN-DNA加合物之间的含量关系, 以分析HN对DNA分子不同碱基位点的烷基化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件优化

鉴于12种HN-DNA加合物均呈弱碱性且易于质子化, 本研究在正离子模式下进行质谱分析, 以提

高离子化效率、检测灵敏度及前体离子信号稳定性。在方法建立阶段, 首先分别配制 100 ng/mL 的 HN-DNA 单标水溶液, 采用注射泵直接进样方式进行参数优化: 使用 1 mL 进样针装载各溶液, 以 10  $\mu$ L/min 的恒定流速直接注入质谱离子源。在该条件下, 依次对 12 种 HN-DNA 加合物进行母离子扫描(Q1 full scan), 选取响应最高的加合离子(如[M+H]<sup>+</sup>)作为前体离子; 再通过子离子扫描(Product ion scan)确定特征碎片离子, 并优化碰撞能量(CE)以获得最强碎片信号强度。此外, 还对离子源温度(TEM)、离子化电压(IS)等关键电离参数进行优化, 确保各化合物具有较高响应值和良好的峰形与重现性。

## 2.2 色谱条件优化

本研究比较了 10、15、30 min 3 种梯度洗脱程序对 HN1-DNA 加合物标准品分离行为的影响。由图 2 可知, 10 min 梯度条件下目标物在色谱柱上保留较弱, 且 HN1-GO6 与 HN1-Bis-GN7 加合物的色谱峰分离不充分, 分离度( $R$ )仅为 0.34(远低于基线分离阈值  $R \geq 1.5$ ), 可能影响后续质谱定量的准确性。而 15 min 与 30 min 梯度均能实现良好分离, 两者分离度均大于 1.5, 且峰形与分离效果相近。鉴于 15 min 梯度在确保分离充分的前提下, 可节省单针分析时间, 显著提升样本通量并降低溶剂消耗。因此, 本研究确定 15 min 梯度程序为最佳洗脱条件。

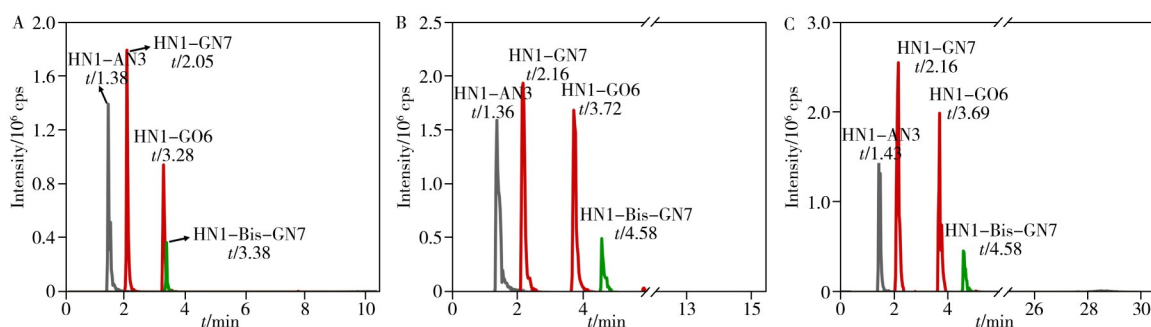


图 2 不同洗脱时间下 HN1-DNA 加合物的提取离子色谱图

Fig. 2 The extraction ion chromatograms of HN1-DNA adducts under different elution time

A: 10 min; B: 15 min; C: 30 min

## 2.3 专属性验证

将空白大鼠尿样经 SPE 处理后作为空白基质与高剂量 HN 暴露 12 h 后采集的大鼠尿样分别进行 HPLC-MS/MS 分析, 采集色谱图。如图 3 所示, 部分加合物在梯度洗脱早期出峰, 这与加合物的化学极性及色谱柱固定相有关。对比空白基质和阳性样品的峰形图谱, 空白基质在目标分析物的保留时间处不出峰, 或出现小干扰信号, 但该干扰峰的响应值小于待测物 LOQ 响应值的 20%, 符合生物医学样品分析要求, 表明空白基质对分析物的检测无显著干扰, 本方法专属性良好。

## 2.4 线性范围、LOD 和 LOQ

采用  $1/x^2$  加权回归法进行线性回归分析, 12 种 HN-DNA 加合物混合标准品溶液在 0.02~500 ng/mL 范围内线性关系均良好,  $r^2$  均大于 0.9; 以 3 倍信噪比 ( $S/N > 3$ ) 响应值对应的质量浓度作为 LOD, 5 倍信噪比 ( $S/N > 5$ ) 响应值对应的质量浓度作为 LOQ。低浓度质控 (LQC) 取值为 1~3 倍 LOQ, 中浓度质控 (MQC) 取值为线性范围的中间值, 高浓度质控 (HQC) 取值为线性上限的 80%。其中, HN2-AN3、HN2-GN7、HN2-GO6、HN2-Bis-GN7、HN3-GN7 和 HN3-Bis-GN7 的 LOD、LOQ、LQC、MQC 和 HQC 值分别为 0.02、0.05、0.1、200、400 ng/mL, 其余 HN-DNA 加合物的 LOD、LOQ、LQC、MQC 和 HQC 值分别为 0.01、0.02、0.05、200、400 ng/mL。

## 2.5 回收率、准确度和精密度

考察方法批内 ( $n=6$ ) 及批间 ( $d=3, n=6$ ) 的准确度及精密度: 在空白尿液中配制 12 种 HN-DNA 加合物低、中、高 3 个浓度梯度的质控样品, 按“1.5”步骤处理并在“1.6”条件下检测, 通过计算各待测物的平均回收率评价准确度; 以平行样的相对标准偏差 (RSD) 评价精密度, 其中同一天 6 次平行实验的 RSD 为批内精密度, 连续 3 d 测定结果的 RSD 为批间精密度。由表 2 可知, 12 种 HN-DNA 加合物的回收率为 77%~119%; 批内 RSD 为 0.56%~14%, 准确度为 82%~118%; 批间 RSD 为 0.13%~14%, 准确

度为94%~112%，方法准确度和精密度均较满意。

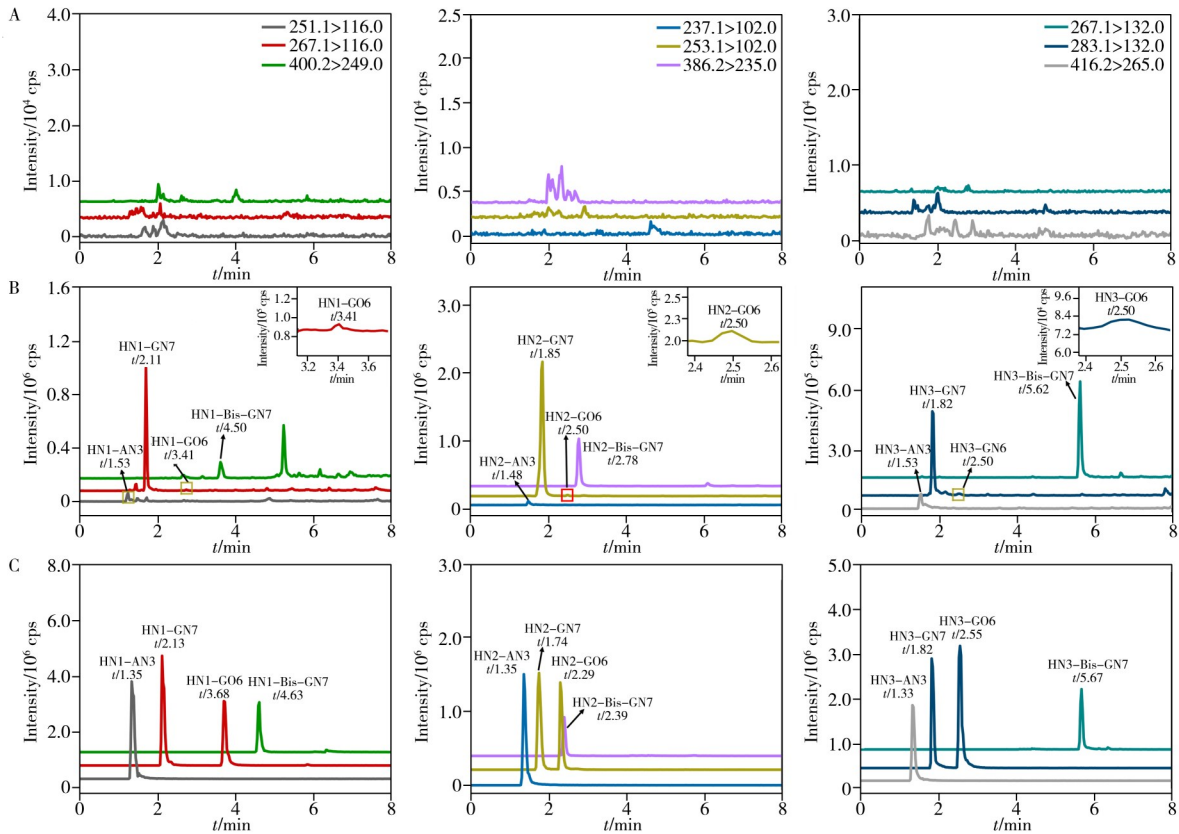


图3 不同样本中HN-DNA加合物的提取离子色谱图

Fig. 3 The extraction ion chromatograms of HN-DNA adducts in different samples

A: blank urine; B: NM-exposed urine; C: standard solutions

表2 方法的回收率、精密度与准确度(n=6)

Table 2 Recoveries, precision and accuracy of the method(n=6)

HN-DNA	Concentration (/ng·mL <sup>-1</sup> )	Recovery/%	Intra-assay		Inter-assay	
			RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%
HN1-AN3	0.05	85±8	10	107	10	100
	200	97±8	8.1	96	6.7	105
	400	91±2	4.4	98	12	102
HN1-GN7	0.05	113±6	5.9	103	14	108
	200	112±5	7.3	118	11	97
	400	85±2	3.9	103	6.8	94
HN1-GO6	0.05	87±6	12	96	10	103
	200	88±6	11	114	11	101
	400	84±1	10	99	13	100
HN1-Bis-GN7	0.1	90±3	8.4	90	9.8	100
	200	93±2	8.0	92	9.5	104
	400	99±11	8.0	117	13	102
HN2-AN3	0.1	113±5	6.1	87	7.6	102
	200	98±6	6.3	111	0.13	99
	400	86±6	3.2	108	4.3	108
HN2-GN7	0.1	92±10	10	107	13	100
	200	94±12	7.3	102	13	100
	400	108±6	9.1	91	8.2	98
HN2-GO6	0.05	97±10	14	103	13	99
	200	96±14	12	101	8.5	98
	400	115±2	0.56	92	4.1	104
HN2-Bis-GN7	0.1	96±9	7.4	82	9.5	96
	200	99±8	14	103	14	107
	400	110±9	8.4	102	9.2	110

(续表 2)

HN-DNA	Concentration (/ng·mL <sup>-1</sup> )	Recovery/%	Intra-assay		Inter-assay	
			RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%
HN3-AN3	0.05	94±1	2.1	107	9.5	101
	200	90±9	9.8	109	11	99
	400	95±7	7.2	89	9.2	98
HN3-GN7	0.1	96±16	9.5	106	14	112
	200	113±6	11	117	10	103
	400	101±11	9.2	112	12	103
HN3-GO6	0.05	114±4	12	94	12	96
	200	107±7	7.0	104	9.4	106
	400	95±16	1.9	92	5.6	101
HN3-Bis-GN7	0.1	106±3	9.6	110	8.5	104
	200	87±6	7.8	100	10	105
	400	104±11	8.9	102	12	99

## 2.6 HN暴露SD大鼠尿液中HN-DNA加合物的定量分析

采用所建方法对SD大鼠暴露后的尿样进行采集分析,以不同HN暴露剂量下的DNA加合物含量为 $y$ 轴,以采样时间为 $x$ 轴,绘制时效-量效关系曲线,结果如图4所示。对于3种HN的3个暴露剂量组,初始时间点(12 h)采集的尿样均能稳定检测到HN-AN3、HN-GN7、HN-GO6和HN-Bis-GN7 4种加合物。HN1暴露后,不同剂量组尿液中4种DNA加合物的时序变化特征存在差异。高剂量组中,HN1-GN7与HN1-Bis-GN7于24 h达峰,而HN1-AN3与HN1-GO6则在首个采样点达峰后下降。值得注意的是,HN1-GN7与HN1-Bis-GN7浓度在1.5~3 d内出现小幅回升,该现象在中、高剂量组中尤为明显,提示体内可能存在加合物的迟发性释放或修复动力学的波动。4种HN1-DNA加合物在尿样中的丰度顺序为HN1-GN7>HN1-Bis-GN7>HN1-AN3>HN1-GO6。HN2暴露后,不同剂量组尿液中4种DNA加合物均在12 h达峰后下降。与HN1组类似,HN2-GN7与HN2-Bis-GN7浓度在1.5 d和3 d时亦出现回升。4种HN2-DNA加合物在尿样中的丰度顺序为HN2-GN7>HN2-Bis-GN7>HN2-AN3>HN2-GO6。HN3暴露后,其加合物情况类似于HN1和HN2。

借鉴前期SM-DNA加合物测定的动物实验条件<sup>[25]</sup>,本研究设置0.3LD<sub>50</sub>、0.5LD<sub>50</sub>、LD<sub>50</sub> 3个染毒剂量,以探讨HN暴露后的剂量-效应关系。其中,LD<sub>50</sub>常用于急性毒性研究,采用该暴露剂量,可探究急性毒性剂量下的DNA损伤响应规律与动态变化特征;0.5 LD<sub>50</sub>剂量用于观察亚致死剂量下的效应特征;0.3 LD<sub>50</sub>剂量下大鼠存活率近100%,可动态观察中毒及损伤恢复全过程。通过分析7 d总排出量发现,HN-GN7和HN-Bis-GN7加合物均呈现明显的剂量-效应关系,但HN1-AN3和HN1-GO6由于单点检测浓度接近方法LOQ,其累计数据可能存在偏差。实验于HN暴露12 h后开始采集大鼠尿液,连续采样至暴露后第7 d。3个剂量组中HN-GN7和HN-Bis-GN7加合物在7 d内均稳定检出,各采样点浓度均高于LOQ。而HN-AN3和HN-GO6无法在观测期全程检出,其中HN-AN3在2.5~7 d采样点检出,HN-GO6在2~5 d检出,且二者在各时间点的检出值均较低,接近LOQ。以上结果表明,不同HN-DNA加合物在大鼠尿液中的留存与检出特征存在显著差异,HN-GN7和HN-Bis-GN7加合物具有更长的检测窗口期与更高的检出浓度,更适用于HN暴露后的生物监测,而HN-AN3与HN-GO6的检测窗口期较短且浓度偏低,对检测方法的灵敏度要求更高。

3种HN分别暴露大鼠后,HN3暴露尿液中可检出的DNA加合物含量最低。分析导致该现象的原因,一是由于HN3的毒性更强<sup>[28]</sup>,其含有3个氯乙基基团,具有更强的烷基化性能,能显著增加形成复杂DNA交联的概率<sup>[29]</sup>,导致DNA损伤更难修复,从而经尿液排出的游离碱基加合物更少;二是HN3的亲脂性更强,更易穿透生物膜(包括血脑屏障),从而在全身组织中实现更广泛的分布,一旦进入细胞,其高活性的氮丙啶离子中间体易与细胞核DNA等亲核物质反应,形成稳定的ICLs,进而引发持续的毒害效应,严重的DNA损伤会触发细胞凋亡或坏死<sup>[30]</sup>。随后,这些死亡细胞会被巨噬细胞等通过程序性清除机制高效吞噬,并在吞噬溶酶体内降解,其大分子内容物(包括DNA加合物)极少以完整形式释放到细胞外液<sup>[31]</sup>。相较于HN2,HN1暴露后形成的DNA加合物含量更高。这一现象可能源于二者化学基团(乙基vs甲基)的差异。HN1的乙基空间位阻略大,其活化速率相对温和,生成的氮丙啶离子稳

定性更高、半衰期更长，与胞内GSH等亲核物质的竞争结合减弱，从而以更高的概率扩散至细胞核，与DNA的GN7等位点结合，最终形成更多的DNA加合物<sup>[32]</sup>。表3列出了12种HN-DNA加合物在尿样中的检出量，占毒剂量百分比的计算公式为 $P=m_{\text{HN-DNA}}/(M_{\text{HN-DNA}} \times n_{\text{HN}})$ 。其中 $P$ 为占毒剂量百分比， $m_{\text{HN-DNA}}$ 为HN-DNA加合物的累计量， $M_{\text{HN-DNA}}$ 为HN-DNA加合物的摩尔质量， $n_{\text{HN}}$ 为HN的染毒毒剂摩尔数。

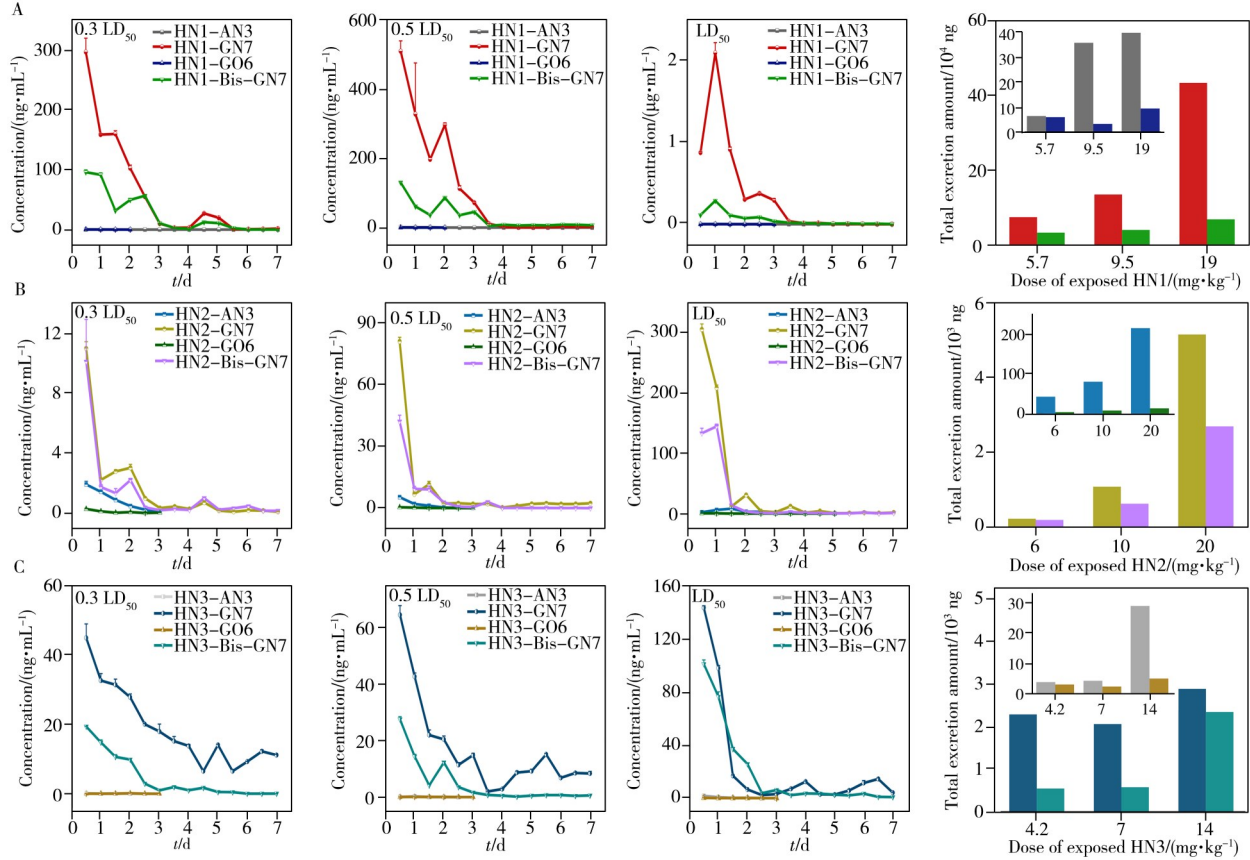


图4 HN不同暴露剂量下SD大鼠尿液中HN-DNA加合物的时效-量效关系曲线

Fig. 4 Time-dose-response curve of HN-DNA adducts in urine from SD rats exposed to different doses of HN

A: HN1; B: HN2; C: HN3

表3 HN-DNA加合物在尿样中的检出量

Table 3 Detection results of HN-DNA adducts in urine samples

HN-DNA	$M_{\text{HN-DNA}}$	Toxic dose / (mg·kg <sup>-1</sup> )	Toxic dose / (μmol·kg <sup>-1</sup> )	Adduct accumulation/ng	Percentage of toxic dose/%	Percentage of total adducts/%
HN1-AN3	250	5.7	33.53	6.63	0.0008	0.11
		9.5	55.88	36.00	0.0026	
		19	111.76	44.75	0.0016	
HN1-GN7	266	5.7	33.53	7368.58	0.8262	82.03
		9.5	55.88	13431.93	0.9036	
		19	111.76	43312.08	1.4569	
HN1-GO6	266	5.7	33.53	6.20	0.0007	0.02
		9.5	55.88	3.50	0.0002	
		19	111.76	9.66	0.0003	
HN1-Bis-GN7	399	5.7	33.53	3215.29	0.2403	17.84
		9.5	55.88	3944.92	0.1769	
		19	111.76	6779.53	0.1520	
HN2-AN3	236	6	38.46	43.85	0.0048	3.34
		10	64.10	81.43	0.0054	
		20	128.21	215.65	0.0071	
HN2-GN7	252	6	38.46	196.90	0.0203	62.67
		10	64.10	1055.01	0.0653	
		20	128.21	5135.89	0.1590	
HN2-GO6	252	6	38.46	5.05	0.0005	0.28
		10	64.10	9.05	0.0006	

(续表 3)

HN-DNA	$M_{\text{HN-DNA}}$	Toxic dose /( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Toxic dose /( $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Adduct accumulation/ng	Percentage of toxic dose/%	Percentage of total adducts/%
HN2-Bis-GN7	385	20	128.21	14.67	0.0005	33.70
		6	38.46	164.58	0.0111	
		10	64.10	598.45	0.0242	
HN3-AN3	266	20	128.21	2671.98	0.0541	0.34
		4.2	20.59	4.04	0.0007	
		7	34.31	4.47	0.0005	
HN3-GN7	282	14	68.63	28.82	0.0016	67.10
		4.2	20.59	2299.97	0.3961	
		7	34.31	2072.12	0.2141	
HN3-GO6	282	14	68.63	2898.72	0.1498	0.10
		4.2	20.59	3.25	0.0006	
		7	34.31	2.60	0.0003	
HN3-Bis-GN7	415	14	68.63	5.20	0.0003	32.45
		4.2	20.59	563.99	0.0660	
		7	34.31	594.28	0.0417	
		14	68.63	2358.44	0.0828	

### 3 结 论

本研究建立了 SPE 结合 HPLC-MS/MS 的分析方法, 实现了尿样基质中 12 种 HN-DNA 加合物的同时定量分析, 方法灵敏度低至 0.01~0.02 ng/mL。大鼠经氮芥暴露后, 在不同剂量组的尿样中均可检出 4 种 DNA 加合物, 其丰度顺序为 HN-GN7>HN-Bis-GN7>HN-AN3>HN-GO6。加合物的单时间点检测浓度和累计排出含量均与暴露剂量呈正相关, 表明 HN-DNA 加合物作为特异性外源代谢物, 不仅可作为暴露标志物, 亦是生物效应标志物。研究结果为更好地理解 HN 对 DNA 的损伤及 DNA 加合物的修复和代谢过程提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Syngé A. *New Blackfriars*, **1969**, 50(585): 256-263.
- [2] Cheng J, Yu W P, Zhou W Z. *Int. Immunopharmacol.*, **2025**, 147: 113976.
- [3] Gilman A, Philips F S. *Science*, **1946**, 103(2675): 409-436.
- [4] Lemire S W, Barr J R, Ashley D L, Olson C T, Hayes T L. *J. Anal. Toxicol.*, **2004**, 28(5): 320-326.
- [5] Yang F C, Yang Y, Yan L, Wang F Y, Wu L, Xia M Z, Li X S. *RSC Adv.*, **2023**, 13(39): 27535-27548.
- [6] Thompson V R, DeCaprio A P. *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, 26(8): 1263-1271.
- [7] Pantazides B G, Quiñones-González J, Rivera N D M, Crow B S, Perez J W, Blake T A, Johnson R C. *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1121: 9-17.
- [8] Michaelson-Richie E D, Ming X, Codreanu S G, Loeber R L, Liebler D C, Campbell C, Tretyakova N Y. *J. Proteome Res.*, **2011**, 10(6): 2785-2796.
- [9] Groehler A, Villalta P W, Campbell C, Tretyakova N. *Chem. Res. Toxicol.*, **2016**, 29(2): 190-202.
- [10] Cheng J, Ye F, Dan G R, Zhao Y P, Wang B, Zhao J Q, Sai Y, Zou Z M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2016**, 305: 267-273.
- [11] Wang Z X, Liu Y L, Chen J, Liu Y Q, Xu H, Xie J W. *J. Instrum. Anal.* (王朝霞, 刘玉龙, 陈佳, 刘艳芹, 徐华, 谢剑炜. 分析测试学报), **2024**, 43(5): 690-702.
- [12] Singh R K, Kumar S, Prasad D N, Bhardwaj T R. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 151: 401-433.
- [13] Krassnig S C, Mäser M, Probst N A, Werner J, Schlett C, Schumann N, Scheven G V, Mangerich A, Bürkle A. *Toxicol. Rep.*, **2023**, 10: 171-189.
- [14] Randerath K, Reddy M V, Gupta R C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78(10): 6126-6129.
- [15] Frank A J, Proctor S J, Tilby M J. *Blood*, **1996**, 88(3): 977-984.
- [16] Chandra B, Roy K S, Shaik M, Waghmare C, Golime R, Palit M. *Anal. Methods*, **2020**, 12(36): 4447-4456.
- [17] Balbo S, Turesky R J, Villalta P W. *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, 27(3): 356-366.
- [18] Bauer N C, Corbett A H, Doetsch P W. *Nucleic Acids Res.*, **2015**, 43(21): 10083-10101.
- [19] Huang R X, Zhou P K. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2021**, 6(1): 254.
- [20] Cooke M S, Hu C W, Chang Y J, Chao M R. *Environ. Int.*, **2018**, 121: 1033-1038.
- [21] Lu T T, Qin P, Xue H M, Feng Z, Luo X P, Zheng M Z. *J. Instrum. Anal.* (鲁婷婷, 秦鹏, 薛慧铭, 冯真, 罗旭萍, 郑梅竹. 分析测试学报), **2024**, 43(8): 1294-1300.

- [22] Graille M, Wild P, Sauvain J J, Hemmendinger M, Canu I G, Hopf N B. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(11): 3743.
- [23] Loft S, Svoboda P, Kasai H, Tjønneland A, Vogel U, Møller P, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. *Carcinogenesis*, **2006**, 27(6): 1245-1250.
- [24] Zhang Y J, Yue L J, Nie Z Y, Chen J, Guo L, Wu B D, Feng J L, Liu Q, Xie J W. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 961: 29-35.
- [25] Wu H J, Zhang Y J, Xu H, Xu B, Chen J, Guo L, Liu Q, Xie J W. *Chem. Res. Toxicol.*, **2023**, 36(9): 1495-1502.
- [26] Michopoulos F, Gika H, Palachanis D, Theodoridis G, Wilson I D. *Electrophoresis*, **2015**, 36(18): 2170-2178.
- [27] ICH M10. Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (生物分析方法验证及样品分析指导原则. 国际人用药品注册技术要求协调会).
- [28] Sharma M, Vijayaraghavan R, Pathak U, Ganesan K. *Def. Sci. J.*, **2009**, 59(5): 512-516.
- [29] Sharma M, Vijayaraghavan R, Agrawal O P. *Int. J. Toxicol.*, **2010**, 29(4): 391-401.
- [30] Roos W P, Kaina B. *Trends Mol. Med.*, **2006**, 12(9): 440-450.
- [31] Elliott M R, Ravichandran K S. *J. Cell Biol.*, **2010**, 189(7): 1059-1070.
- [32] Guo J, Li Z, Wang J, Ma B, Zhang L, Wang H R, Wu J F, Xie J W. *Toxics*, **2025**, 13: 1016.

(责任编辑: 丁 岩)