

基于液相色谱-质谱技术的芦西丁-DNA 加合物快速筛查研究

杨静^{1,2}, 王慎兴^{2,3}, 王丹^{1,2}, 吴春勇³, 黄青^{2*}, 袁耀佐^{2*} (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019; 3. 中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要:目的 建立基于液相色谱-三重四级杆质谱(LC-QQQ-MS)及液相色谱-高分辨质谱(LC-HRMS)技术的 DNA 加合物通用型“发现-确证”分析策略,研究茜草中潜在遗传毒性物质芦西丁(lucidin, Luc)与 3 种 2'-脱氧核苷的直接反应性和代谢反应性,筛查和确证可能的 Luc 特异性 DNA 加合物。方法 采用与 DNA 加合物具有相同质谱碎裂模式的 3 种 2'-脱氧核苷,建立和优化三重四级杆质谱中性丢失和伪中性丢失扫描模式下未知 DNA 加合物的非靶向筛查方法,以及高分辨数据依赖性扫描模式下的加合物靶向确证方法。将 Luc 与 2'-脱氧核苷在 I 相代谢激活和未激活条件下分别孵育,筛查生成的特异性 DNA 加合物,再通过特征性质谱碎裂离子进行结构验证。结果 优化后的伪中性丢失扫描对脱氧核苷脱糖基的检测灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 级别。在 Luc 与脱氧核苷体外孵育模型中,发现并确证了 6 种 Luc-DNA 加合物,包含 2 种 2'-脱氧胞苷(dC)加合物、2 种 2'-脱氧腺苷(dA)加合物、2 种 2'-脱氧鸟苷(dG)加合物,并对其结构进行了表征。Luc-DNA 加合物的生成随着 Luc 暴露量、暴露时间的增加而升高,存在显著的剂量-反应、时间-反应关系,且该种结合无需代谢激活即可发生。结论 所建立的 DNA 加合物“发现-确证”策略灵敏度高、准确性好,能够提供分子水平上加合物的结构信息,适用于评估 Luc 暴露所致的 DNA 损伤,为其毒性机理研究和再评价提供了有力数据支持,也为中草药中潜在遗传毒性成分快速筛查提供了重要的方法参考。

关键词: DNA 加合物; 遗传毒性; 茜草; 芦西丁; 筛查

doi: 10.11669/cpj.2024.04.007 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)04-0338-08

Rapid Screening of Lucidin-DNA Adducts Based on LC-MS/MS

YANG Jing^{1,2}, WANG Shenxing^{2,3}, WANG Dan^{1,2}, WU Chunyong³, HUANG Qing^{2*}, YUAN Yaozuo^{2*} (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 3. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a generalized “discovery-confirmation” strategy for DNA adducts based on liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (LC-QQQ-MS) and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), study the direct and metabolic reactivity of the potentially genotoxic substance lucidin (Luc) with three 2'-deoxynucleosides in *Rubia cordifolia* L., and screen and confirm possible Luc-specific DNA adducts. **METHODS** Three 2'-deoxynucleosides with the same fragmentation pathways with DNA adducts in mass spectrometry were used to develop and optimize a non-targeted screening method for unknown DNA adducts in QQQ-MS neutral loss and pseudo-neutral loss scanning modes, as well as a confirmatory method for adduct targeting in HRMS data-dependent scanning mode. Luc was incubated with 2'-deoxynucleoside under phase I metabolically activated and inactivated conditions, respectively, and the resulting specific DNA adducts were screened and then structurally verified by characteristic MS spectra of fragmentations. **RESULTS** The optimized pseudo-neutral loss scanning is sensitive to the detection of deoxyribonucleoside deglycosylation at the $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ level. Six Luc-DNA adducts, containing two 2'-deoxycytidine (dC) adducts, two 2'-deoxyadenosine (dA) adducts, and two 2'-deoxyguanosine (dG) adducts, were identified and confirmed *in vitro* incubation model of Luc and 2'-deoxynucleoside, and their structures were characterized. Luc-DNA adduct production increased with increasing Luc exposure and exposure time, and there were significant dose-response and time-response relationships, and the binding did not require metabolic activation to occur. **CONCLUSION** The established discovery-confirmation strategy for DNA adducts is highly sensitive and accurate. It can provide structural information of the adducts at the molecular level. This is suitable for the assessment of DNA damage caused by the presence of Luc and provides strong data support for the study and re-evaluation of its toxicity mechanism. It also offers an important methodological reference for the rapid screening of potential genotoxic components in Chinese herbal medicines.

KEY WORDS: DNA adduct; genetic toxicity; *Rubia cordifolia* L.; lucidin; screening

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目资助 (KJ21125050, KJ207558)

作者简介: 杨静, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物分析与质量控制 * 通讯作者: 黄青, 女, 博士, 主任药师 研究方向: 药物分析与药物质量控制 Tel: (025) 86251121; 袁耀佐, 男, 博士, 主任药师 研究方向: 药物分析与药物质量控制 Tel: (025) 86251120

茜草为茜草科植物茜草 (*Rubia cordifolia* L.) 的干燥根及根茎,其药效活性成分主要为蒽醌类化合物,临床使用广泛,常用于外伤出血、关节痹痛、经闭瘀阻等^[1]。除药用外,茜草也是文献报道中最早使用的染料之一^[2],由于染色能力出众,颜色鲜艳,这一类蒽醌化合物长期以来也被作为天然食用色素用于食品中^[3]。

然而,近年来对茜草色素的一些安全性研究表明,其中某些蒽醌化合物具有潜在的毒副作用和安全隐患,如芦西丁 (lucidin, Luc)、茜根定 (rubiadin)、羟基茜草素 (pupurin) 等 (图 1),在 Ames 试验^[4] 和转基因动物试验^[5] 中均产生了阳性结果,表现出潜在的遗传毒性。天然产物中组分繁多、含量不一,现有的遗传毒性评价方法如 Ames 试验在应用于中草药时,易因基质干扰出现假阴性或假阳性,难以识别具体的潜在遗传毒性成分,无法从分子水平上的信息溯源具体的遗传毒物。因此,开发一种准确、高效、通用性强的遗传毒性物质快速筛查方法是一个亟待解决的问题。

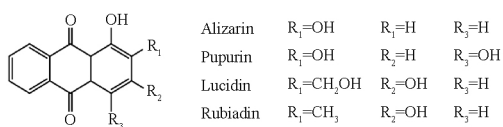
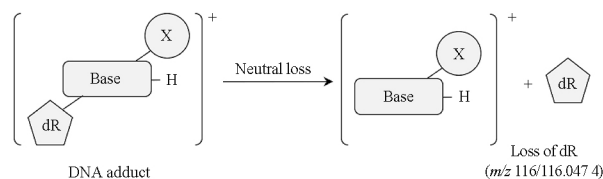


图 1 茜草素型蒽醌化合物的结构
Fig. 1 Structure of alizarin-type anthraquinone

DNA 加合物是内、外源性化学物质或其亲电代谢产物与 DNA 碱基上的亲核位点共价结合形成的化合物,是 DNA 化学损伤最重要也是最普遍的形式^[6]。DNA 加合物的形成是癌症发展的早期起始事件,是化学致癌物遗传毒性的新型生物标志物靶标。从技术原理而言,对 DNA 加合物的检测可能是一种适于中草药中遗传毒性成分快速筛查的有效手段。目前在中草药中发现了多种可引起 DNA 加合物的遗传毒性成分,如马兜铃属药材中的马兜铃酸^[7]、千里光属药材中的吡咯里西啶类生物碱^[8]、肉豆蔻中的苯烯基类化合物^[9]等。

³²P 后标记法^[10]、免疫学检测方法^[11] 是 DNA 加合物检测的经典方法。但这两种方法无法提供 DNA 加合物的结构信息,在检测的特异性、定量准确性和操作风险上存在不足。近些年来,随着色谱分离技术的进步和质谱的发展,色谱-质谱联用法已逐渐成为分析 DNA 加合物最重要的技术手段^[12]。DNA 加合物在质谱中,极易由于脱氧核苷部分 β -糖苷键断裂,产生的 m/z 116.0 (m/z 116.047 4, 高分

辨质谱)的脱糖基中性丢失,这种特殊的中性丢失碎裂模式可作为 DNA 加合物快速扫描策略的主要特征信号^[13] (图 2)。通过该技术对加合物进行检测,可提供关于化合物潜在遗传毒性机制的重要信息。



dR - 2'-脱氧核糖; Base - 核碱基; X - 化学修饰。
dR - 2'-deoxyribose; Base - nucleobase; X - chemical modification.

图 2 DNA 加合物在质谱中的特征碎裂模式

Fig. 2 The fragmentation pathways of DNA adducts analyzed by mass spectrometry

本研究以茜草色素中可能具有遗传毒性的蒽醌类化合物 Luc 为研究对象,基于串联四级杆质谱和高分辨质谱两类质谱平台,以具有加合物亲核性反应位点的脱氧核糖核苷 (DNA 的基本单位脱氧核糖核苷酸去磷酸化的产物) 构建快速孵育体系,建立了 DNA 加合物“发现-确证”快速筛查新策略。尝试对 Luc 与脱氧核苷特异性-DNA 加合物进行快速筛查和确证,探讨 Luc 与脱氧核苷的体外直接反应性和代谢反应性,以期为此类蒽醌类茜草色素的安全性研究提供参考依据。

1 仪器与试剂

ExionLCTM 型超高效液相色谱系统串联 Qtrap 6500 + 型三重四极杆质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); UltiMate 3000 型超高效液相色谱系统 (美国 Dionex 公司) 串联 Q-ExactiveTM 组合型四极杆 OrbitrapTM 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); XSE205 型电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q 型纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

Luc (上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号: ST05450120, 纯度 $\geq 98\%$); 2'-脱氧腺苷·一水合物 (dA, 批号: D7400, 纯度 $\geq 99\%$); 2'-脱氧鸟苷·一水合物 (dG, 批号: D7145, 纯度 $\geq 99\%$); 2'-脱氧胞苷 (dC, 批号: D3897, 纯度 $\geq 99\%$) (美国 Sigma 公司); 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH, 瑞士 Roche 公司, 批号: 10107824001); 混合性别人源肝微粒体 (瑞德肝脏疾病研究有限公司, 批号: X008061); 甲酸铵、甲酸 (质谱纯); 甲醇、二甲基亚砜 (色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 溶液配制

2.1.1 脱氧核苷贮备液及工作液 精密称取 dA、dG、dC 对照品适量,分别用甲醇溶液溶解并定容,得到 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 dA、dG、dC 贮备液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。临用前,用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液逐级稀释至相应浓度,即得脱氧核苷工作液。

2.1.2 Luc 贮备液及工作液 精密称取 Luc 对照品适量,用 DMSO 溶解并定容,得 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的芦西丁贮备液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。临用前,用甲醇逐级稀释至相应浓度,即得 Luc 系列工作液。

2.2 Luc 与脱氧核苷的孵育

代谢激活组:孵育体系总体积 $250 \text{ } \mu\text{L}$, 包含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4)、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人源肝微粒体、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dA、dG、dC, Luc 浓度分别为 5 、 10 、 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。涡旋振荡 1 min , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 预孵育 5 min , 加入 NADPH 溶液 (终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 启动反应,于 1.5 h 加入同等体积的甲醇-乙腈 (1:1) 混合溶液终止反应,剧烈振荡 15 min ,离心 (转速 $22\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 时间 15 min , 下同),上清液过 $0.2 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜,进样分析。不同孵育时间下 Luc 与脱氧核苷反应时,体系中 Luc 浓度 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别暴露 0 、 0.5 、 1.5 、 3.5 h 。每个样品平行制备 3 份。

代谢非激活组:孵育体系中人源肝微粒体经高温灭活,不加入 NADPH 启动子,用磷酸盐缓冲溶液补足体积至 $250 \text{ } \mu\text{L}$, 同法操作。每个样品平行制备 3 份。

2.3 检测条件

2.3.1 色谱条件 采用 ACE EXECL C_{18} -PFP 色谱柱 ($3 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2 \text{ } \mu\text{m}$), 以均含体积分数 0.1% 甲酸的水溶液 (A)-甲醇 (B) 为流动相进行梯度洗脱,洗脱梯度程序如下: $0 \sim 16 \text{ min}$, $5\% \sim 12\% \text{ B}$; $16 \sim 31 \text{ min}$, $12\% \sim 98\% \text{ B}$; $31 \sim 41 \text{ min}$, $98\% \text{ B}$; $41 \sim 46 \text{ min}$, $5\% \text{ B}$ 。柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.3.2 用于 DNA 加合物发现的质谱中性丢失扫描条件 质谱源区参数设置为,电喷雾离子源 (ESI), 离子喷雾电压 (IS) 5.5 kV , 离子源温度 (TEM) $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 去簇电压 (DP) 20 V , 碰撞能量 (CE) 20 V , 气帘气压力 (CUR) 241 kPa , 雾化气 (GS1) 和辅助气 (GS2) 压力均为 310 kPa , 碰撞气 (CAD) 为 Medium。在中性丢失扫描模式下,采集正离子谱图。对于正常核苷,扫描范围设为 $m/z 150 \sim 350$; 对于 Luc-DNA 加合物,扫描范

围设为 $m/z 400 \sim 600$; 中性丢失均设置为 116.0 。

2.3.3 用于 DNA 加合物发现的质谱伪中性丢失扫描条件 质谱源区参数设置同“2.3.2”项。在 MRM 扫描模式下,采集正离子谱图,驻留时间 10 ms , 设置 101 个 MRM 离子对。对于正常核苷,扫描范围为从离子对 $m/z 200.0 \rightarrow 84.0$ 至离子对 $m/z 300.0 \rightarrow 184.0$ 的 101 个离子对,每个离子对质荷比递增 1 ,母离子与子离子均相差 116.0 。对于 Luc-DNA 加合物,扫描范围为从离子对 $m/z 450.0 \rightarrow 334.0$ 至离子对 $m/z 549.0 \rightarrow 433.0$ 的 101 个离子对,每个离子对质荷比递增 1 ,母离子与子离子均相差 116.0 。

2.3.4 用于 DNA 加合物确证的高分辨质谱数据依赖性扫描条件 质谱源区参数设置为,ESI 离子源,离子喷雾电压 3.5 kV , 离子源温度 $325 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 鞘气 (N_2) 流速 40 , 辅助气 (N_2) 流速 10 , 吹扫气 (N_2) 流速 1 , 辅助气温度 $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 扫描方式采用数据依赖性扫描 (DDA) 的 Full MS/ddMS² (TopN), 正离子模式下采样,一级全扫描的分辨率为 $70\ 000$, 扫描范围 $m/z 100 \sim 600$; 数据依赖的二级扫描分辨率为 $17\ 500$, 碰撞能量为 $20 \sim 40 \text{ V}$ 混合能量。

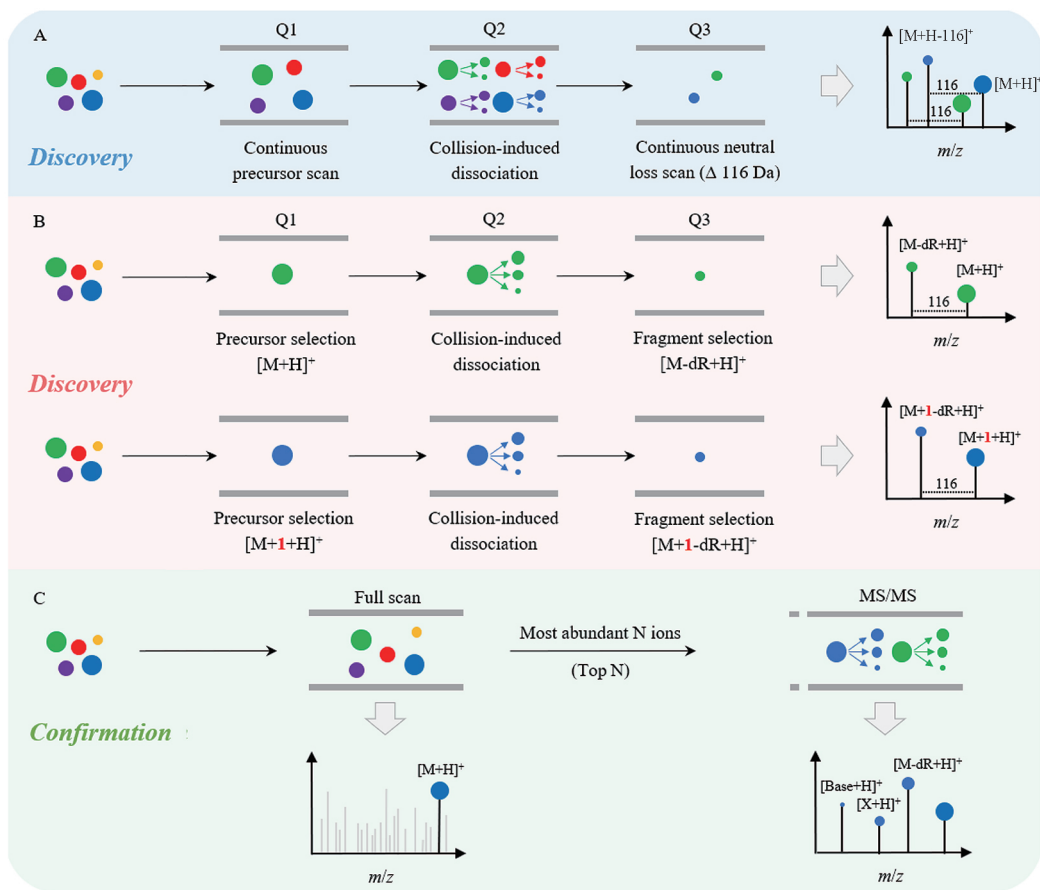
2.4 数据处理与分析

串联四级杆质谱上的原始数据由 Analyst 1.7 软件采集并处理,高分辨质谱的原始数据由 Xcalibur 4.3 软件采集并处理。使用 Origin 2021 对数据进行统计分析和作图,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果与分析

3.1 DNA 加合物筛查策略的建立

3.1.1 中性丢失扫描方法的考察与优化 Luc-DNA 加合物的发现采用了三重四极杆质谱仪的中性丢失和伪中性丢失两种扫描策略。由于 DNA 加合物中糖苷键的能量相对较低,在低碰撞能下易发生断裂。因此,可通过串联四级杆质谱的中性丢失扫描模式检测 $[\text{M} + \text{H}]^+ \rightarrow [\text{M} + \text{H} - 116]^+$ 来发现可能的 DNA 加合物。在中性丢失扫描模式下, Q1 和 Q3 以恒定 116.0 的差值进行同步扫描,在 Q2 中施加电压,引发母离子碎裂,只有具有脱氧核糖特征中性丢失特征的碎片离子才会通过 Q3 并被记录为信号^[14], 见图 3。正常脱氧核苷结构中,脱氧核糖中性丢失的质谱碎裂模式与 DNA 加合物一致,因此可作替代,用于优化方法条件,提高加合物发现的检测灵敏度。



A - 串联四极杆质谱中性丢失扫描发现策略; B - 串联四极杆质谱伪中性丢失扫描发现策略; C - 高分辨质谱数据依赖性扫描确认策略。
A - neutral loss scanning in QQQ-MS for discovery; B - pseudo-neutral loss scanning in QQQ-MS for discovery; C - data-dependent scanning in HRMS for confirmation.

图3 DNA 加合物的质谱扫描策略

Fig. 3 MS scan strategy of DNA adducts

在“2.3.2”项下质谱条件中,对主要质谱参数 DP 电压、CE 电压、离子源温度分别进行了考察。在 DP 电压、CE 电压均为 20 V,离子源温度 500 °C 时各脱氧核苷的响应最强。以优化的质谱参数对系列浓度的脱氧核苷供试溶液进行测定,结果显示,中性丢失扫描模式下,在 3 种 2'-脱氧核苷一级质谱图中,丰度最高的离子分别为 m/z 228.07 (2'-脱氧胞苷, dC)、252.13 (2'-脱氧腺苷, dA) 和 268.16 (2'-脱氧鸟苷, dG),该值与各脱氧核苷理论值一致,质谱识别准确性良好。dC、dA、dG 的检测灵敏度分别为 $1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3.7$)、 $156.25 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3.9$)、 $1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3.3$),所建立的串联四级杆质谱中性丢失扫描策略可较高灵敏地用于 DNA 加合物的发现。

3.1.2 伪中性丢失扫描方法的考察与优化 “伪”中性丢失扫描策略是中性丢失扫描策略的一种变化形式,如图 3B 所示,它是在整个 m/z 范围内对整数增量(如每次 m/z 增加 1)的多个 $[M + H]^+ \rightarrow$

$[M + H - 116]^+$ 离子对进行跃迁扫描^[15],在一针分析中,可以对 100 个甚至更多的离子对进行扫描。

伪中性丢失扫描中质谱源区参数与“3.1.1”项下优化的条件一致。由于该模式需在一针分析时间中同时扫描所需质量范围内 100 ~ 200 个离子对,因此进一步对不同驻留时间(10、20、50 ms)下各脱氧核苷的响应进行了考察,发现在同时扫描 100 个离子对时,不同驻留时间下,各脱氧核苷的响应差异不明显。考虑到一针可同时检测的 MRM 离子对越多,对未知 m/z 的 DNA 加合物筛查愈有利,最终优选 10 ms 驻留时间。以上述优化的质谱参数对系列浓度的脱氧核苷供试溶液测定,结果显示,伪中性丢失扫描模式下,3 种脱氧核苷均在理论中性丢失对应的 MRM 对处(dC、dA、dG 分别对应 m/z 228.0 → 112.0、 m/z 252.0 → 136.0、 m/z 268.0 → 152.0)表现出了最高的响应峰,质谱识别准确性良好。dA 的检测灵敏度为 $1.22 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 4.9$),dG 的检测灵敏度为 $9.77 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3.9$),dC 的检测灵

敏度为 $19.53 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N=3.6$), 建立的串联四级杆质谱伪中性丢失扫描策略可高灵敏地用于 DNA 加合物的发现。

3.1.3 方法比较 对两种用于 DNA 加合物发现的扫描策略进行比较, 伪中性丢失扫描对正常脱氧核苷的检测灵敏度明显优于中性丢失扫描, 两者相差约 64 ~ 128 倍(表 1)。这是由于伪中性丢失扫描下, 在 Q1 中对前体离子先进行了筛选, 排除了大量干扰离子, 使质谱的化学背景降低, 待测化合物的信噪比显著提高, 从而极大提升了 DNA 加合物发现的灵敏度。

在目标质量范围的宽度设置上, 伪中性丢失扫描受到扫描速度限制, 无法在保证高灵敏度同时达到中性丢失扫描的质量范围宽度, 因此对未知 DNA 加合物的筛查, 需要多针分析以覆盖更宽泛的质量范围, 这增加了分析时间, 且对样品量有一定要求, 在对少量珍贵样品(如细胞提取样品)检测时应尤为注意。此外, 由于四极杆分辨隔离能力有限, 在伪中性丢失扫描下, 响应最强的 MRM ± 2 通道中均出现了假阳性峰(± 1 通道中假阳性峰的响应约为主通道的 36%, ± 2 通道约为 17%), 在对未知加合物进行识别和结构确证时, 应注意区分。鉴于灵敏度上的优势, 后续以伪中性丢失扫描策略用于发现 Luc-DNA 加合物。

表 1 不同扫描模式对脱氧核苷的检测灵敏度比较

Tab. 1 Comparison of sensitivity of 2'-deoxynucleosides in different scanning modes

Compound	Sensitivity		Fold change
	Neutral loss scanning	Pseudo-neutral loss scanning/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
dC	$1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	19.53	64
dA	$156.25 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.22	128
dG	$1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	9.77	128

注: dC - 脱氧胞苷; dA - 脱氧腺苷; dG - 脱氧鸟苷。

Note: dC - 2'-Deoxycytidine; dA - 2'-Deoxyadenosine; dG - 2'-Deoxyguanosine.

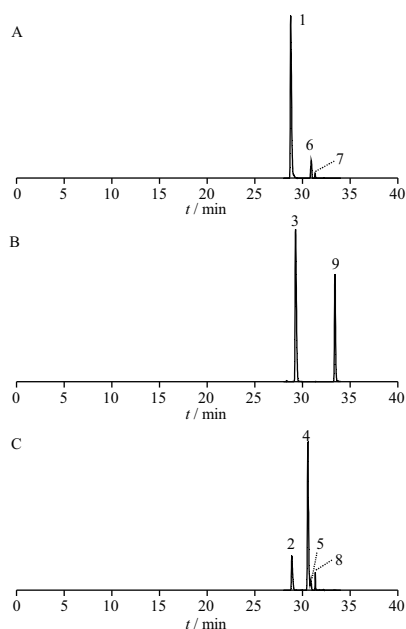
3.2 DNA 加合物确证策略的建立

采用高分辨轨道阱质谱的 Full MS/ddMS²扫描模式对发现的 DNA 加合物进行结构确证(图 3C)。该模式下, 首先在设定的 m/z 范围内进行完整的 MS 扫描, 并对强度前 5 (Top5) 的离子以及伪中性丢失模式下发现的潜在加合物母离子强制触发 MS² 分析。在一针分析中, 基于高质量精度 MS¹ 和 MS² 数据, 对未知 DNA 加合物进行结构鉴定, 并通过提取 MS¹ 精确

分子量的峰面积进行定量。以“2.3.4”项下条件对脱氧核苷供试溶液进行检测, 结果显示, 3 种 2'-脱氧核苷一级全扫描的 $[M+H]^+$ 离子分别为 m/z 228.0977 (dC)、 m/z 252.1088 (dA)、 m/z 268.1039 (dG), 在触发的二级扫描模式中, dC、dA、dG 在二级质谱图中产生的主要特征碎片离子分别为 m/z 112.0509 (胞嘧啶)、 m/z 136.0619 (腺嘌呤) 和 m/z 152.0568 (鸟嘌呤), 3 者均为脱氧核苷结构中的糖苷键断裂得到的特征碱基碎片, 母离子、特征碎片离子的质量与理论值相比, 精密度误差均小于 5×10^{-6} , 满足对可能的 DNA 加合物进一步结构确证的要求。

3.3 Luc-DNA 加合物的发现

对 Luc 与脱氧核苷孵育样品, 按伪中性丢失扫描的条件进行检测, 提取离子流色谱图(EIC)见图 4, 伪中性丢失扫描模式下, 共发现了 9 个未知中性丢失化合物峰。对于上述串联四级杆质谱上发现的可能 DNA 加合物, 进一步在高分辨质谱的数据依赖采集模式下对其结构进行确证。



A - m/z 480.1 \rightarrow 364.1; B - m/z 504.1 \rightarrow 388.1; C - m/z 520.1 \rightarrow 404.1。

A - m/z 480.1 \rightarrow 364.1; B - m/z 504.1 \rightarrow 388.1; C - m/z 520.1 \rightarrow 404.1。

图 4 伪中性丢失扫描模式下芦西丁与脱氧核苷孵育样品(Luc-DNA)的 EIC 图

Fig. 4 EIC spectra of the sample incubated with Luc and 2'-deoxynucleoside(Luc-DNA) in the pseudo-neutral loss scanning mode

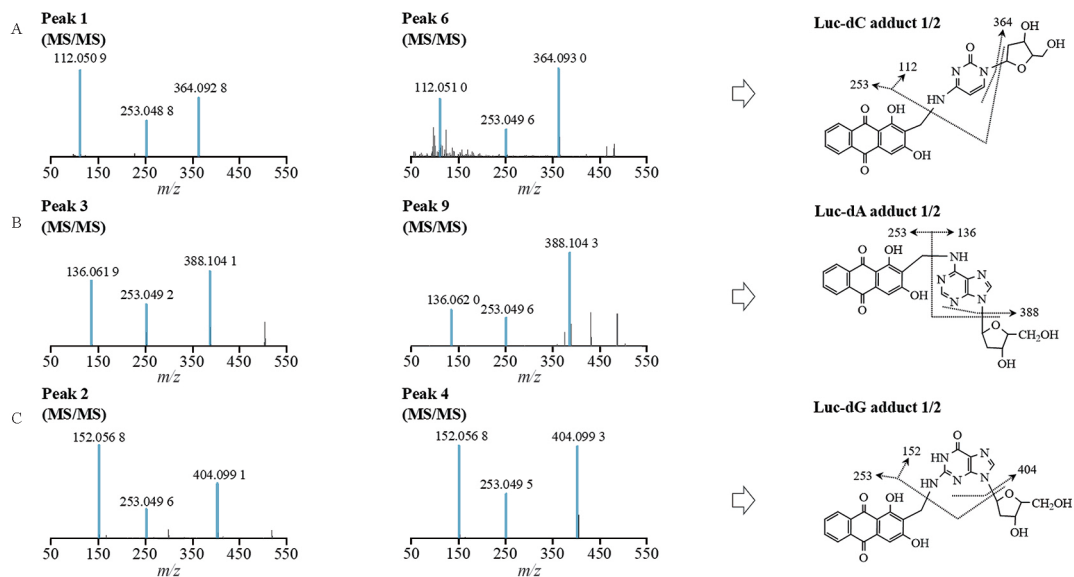
3.4 Luc-DNA 加合物的初步确证

按“2.2”项下制备 Luc 与脱氧核苷反应性样品, 按“2.3.4”项下条件进行检测, 根据文献[16]报道和

加合物的结构特点对上述发现的中性丢失化合物进一步结构确证。理论上, DNA 加合物的二级质谱图中可观测到加合物离子 $[M + H]^+$ 及其碎裂产生的脱糖基特征离子 $[M - dR + H]^+$ 、化合物自身的特征离子 $[X + H]^+$ 和对应碱基的特征离子 $[Base + H]^+$ (图3C)。

峰1和峰6(图4A)在正离子模式下的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 480.1408和480.1400,计

算其分子式为 $C_{24}H_{21}N_3O_8$;两者的主要二级碎片离子均相似(图5): m/z 364.0928对应 $[M + H - dR]^+$,分子式 $C_{19}H_{14}N_3O_5$,为母离子脱去1分子脱氧核糖所得,该碎片离子可进一步碎裂形成胞嘧啶碱基(m/z 112.0509)和Luc 蒽醌母核(m/z 253.0488);一级二级离子的质量误差均小于 5×10^{-6} ,两者鉴定为Luc-dC 1和Luc-dC 2加合物。



A - Luc-dC 1/2 加合物鉴定; B - Luc-dA 1/2 加合物鉴定; C - Luc-dG 1/2 加合物鉴定。

A - identification of Luc-dC adduct 1/2; B - identification of Luc-dA adduct 1/2; C - identification of Luc-dG adduct 1/2.

图5 Luc-DNA 加合物的二级质谱图及结构鉴定

Fig. 5 MS/MS spectra and identification of Luc-DNA adducts

峰3和峰9(图4B)的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 504.1518和504.1516,计算其分子式为 $C_{25}H_{21}N_5O_7$;两者的主要二级碎片离子均相似(图5): m/z 388.1041对应 $[M + H - dR]^+$,分子式为 $C_{20}H_{14}N_5O_4$,为母离子脱去1分子脱氧核糖所得,该碎片离子可进一步碎裂形成腺嘌呤碱基(m/z 136.0619)和Luc 的蒽醌母核(m/z 253.0492);一级二级离子的质量误差均小于 5×10^{-6} ,两者鉴定为Luc-dA 1和Luc-dA 2加合物。

峰2和峰4(图4C)的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 520.1468和520.1463,计算其分子式为 $C_{25}H_{21}N_5O_8$;两者的主要二级碎片离子均相似(图5): m/z 404.0991对应 $[M + H - dR]^+$,分子式 $C_{20}H_{14}N_5O_5$,为母离子脱去1分子脱氧核糖所得,该碎片离子可进一步碎裂形成鸟嘌呤碱基(m/z 152.0568)和Luc 蒽醌母核(m/z 253.0496);一级二级离子的质量误差均小于 5×10^{-6} ,两者鉴定为Luc-dG 1和Luc-dG 2加合物。

在Luc与脱氧核苷的反应性样品中,共识别并鉴定了6种Luc特异性的DNA加合物,包含Luc-dC加合物2种、Luc-dA加合物2种、Luc-dG加合物2种(表2)。据推测,相同相对分子质量的3对加合物可能为Luc与脱氧核苷共价结合时所产生的不同手性的同分异构体^[17],有关其具体构型,有待进一步确认。

3.5 Luc与脱氧核苷的反应性

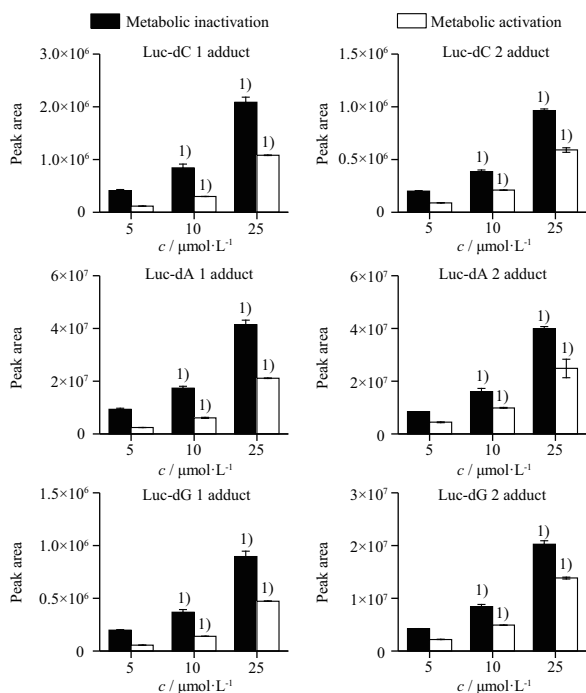
3.5.1 Luc与脱氧核苷反应的底物浓度依赖性

I相代谢反应体系中,不同浓度Luc与脱氧核苷孵育1.5h后,6种Luc-DNA加合物在体外肝微粒体孵育模型中均有检出,且无论I相CYP酶介导的代谢过程是否被激活,加合物生成量与Luc浓度间均表现出了明显的浓度依赖性关系(图6)。相较于低底物浓度点(Luc浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),高底物孵育浓度点($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)样品中dA和dC加合物的生成量增加了5~9倍,dG加合物的生成量增加了5~8倍。从上述的实验结果可知,Luc可以不通过代谢激活,直接与脱氧核苷反应生成DNA加合物。

表2 Luc-DNA 加合物的鉴定结果

Tab. 2 Identification of Luc-DNA adduct

Compound	Formula	t_R/min	m/z (Calculated)	m/z (Observed)	$\delta/\times 10^{-6}$	m/z (MS/MS fragments)
Luc-dC 1 adduct	$C_{24}H_{21}N_3O_8$	31.84	480.140 1	480.140 8	1.46	364.092 8 [M + H-116] ⁺ , 253.048 8 [X + H] ⁺ , 112.050 9 [Base + H] ⁺
Luc-dC 2 adduct	$C_{24}H_{21}N_3O_8$	33.96	480.140 1	480.140 0	-0.21	364.093 0 [M + H-116] ⁺ , 253.049 6 [X + H] ⁺ , 112.051 0 [Base + H] ⁺
Luc-dA 1 adduct	$C_{25}H_{21}N_3O_7$	32.34	504.151 4	504.151 8	0.79	388.104 1 [M + H-116] ⁺ , 253.049 2 [X + H] ⁺ , 136.061 9 [Base + H] ⁺
Luc-dA 2 adduct	$C_{25}H_{21}N_3O_7$	36.68	504.151 4	504.151 6	-0.13	388.104 3 [M + H-116] ⁺ , 253.049 6 [X + H] ⁺ , 136.062 0 [Base + H] ⁺
Luc-dG 1 adduct	$C_{25}H_{21}N_3O_8$	31.99	520.146 3	520.146 8	0.10	404.099 1 [M + H-116] ⁺ , 253.049 6 [X + H] ⁺ , 152.056 8 [Base + H] ⁺
Luc-dG 2 adduct	$C_{25}H_{21}N_3O_8$	33.74	520.146 3	520.146 3	0.00	404.099 3 [M + H-116] ⁺ , 253.049 5 [X + H] ⁺ , 152.056 8 [Base + H] ⁺



与 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Luc 浓度组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, compared with $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lucidin group.

图6 I相代谢反应体系下 Luc-DNA 加合物生成的底物浓度依赖性。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Substrate concentration dependence of Luc-DNA adduct generation in phase I metabolism. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.5.2 Luc 与脱氧核苷反应的孵育时间依赖性

Luc 浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, I相代谢反应体系中加合物含量随孵育时间变化的曲线见图 7, 在 0.5 ~ 3.5 h 不同孵育时间点的样品中均检出了 6 种 Luc-DNA 加合物。代谢非激活情况下, Luc-dA 2、dG 2 和 dC 2 加合物的含量随孵育时间增加; 而 Luc-dA 1、dG 1、dC 1 加合物则在 1.5 h 后, 含量趋于稳定或平缓下降。代谢激活情况下, 不同孵育时间下代谢激活组的各加合物生成量以及生成速率均低于代谢非激活组, 对于 Luc-dA 2、dG 2 和 dC 2 加合物, 其在 0.5 h 时增长速率就开始变缓, 而对于 dA 1、dG 1、dC 1 加合物, 加合物含量在 0.5 h 就开始了缓慢下降。按公式 1 计算代谢激活后加合物含量的减少程度 (%)。

结果发现, 与代谢非激活实验组相比, 代谢激活后加合物的生成速率明显减慢, 加合物生成量相对减少。

代谢激活后加合物含量的减少程度 (%) = (代谢激活组加合物含量 - 代谢非激活组加合物含量) / 代谢非激活组加合物含量 $\times 100\%$ 公式(1)

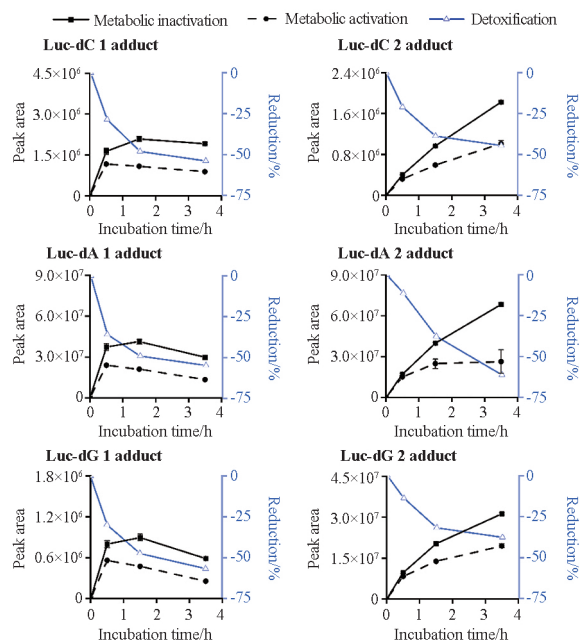


图7 I相代谢反应体系下 Luc-DNA 加合物生成的孵育时间依赖性。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Incubation time dependence of Luc-DNA adduct generation and in phase I metabolism. $n = 3, \bar{x} \pm s$

4 讨论

本实验基于串联四级杆质谱和高分辨质谱平台, 将两种平台的优劣势互补, 以同 DNA 加合物具有同质谱碎裂特征的正常脱氧核苷对照品为研究对象, 成功建立和优化了 DNA 加合物质谱分析的发现和确证策略。其中, 串联四级杆质谱由于灵敏度高, 剪性强, 该质谱平台下的伪中性丢失和中性丢失扫描策略, 尤其是伪中性丢失扫描, 十分适合对未知 DNA 加合物进行高精度的非靶向发现。对于高分辨质谱平

台,其精确质量测量的能力结合数据依赖性的扫描模式,能够精确地对 DNA 加合物进行鉴定,确定母离子和特征碎片离子的元素组成,提高鉴定结果的可信度,适合对发现的可能 DNA 加合物进行确证。

本研究成功将建立的两种加合物筛查策略和一种加合物确证策略,应用于 Luc 与脱氧核苷反应生成 DNA 加合物的发现、确证工作中。首次发现 Luc 与脱氧核苷可直接生成 DNA 加合物,识别并鉴定了 6 种 Luc-DNA 加合物,包含 2 种 Luc-dA 加合物、2 种 Luc-dG 加合物和 2 种 Luc-dC 加合物。对于 Luc 的 dA 和 dG 加合物,有文献^[18]使用³²P-后标记法对其进行了初步的研究,但该方法不能提供 DNA 加合物的结构信息,对此,本研究给出了有依据的结构推测;而 Luc 的 dC 加合物尚无相关报道,为本研究首次发现并对其结构进行确证。

在 I 相代谢非激活的情况下, Luc 与脱氧核苷直接孵育后, Luc-DNA 加合物的生成均表现出了与底物浓度的显著正相关和与孵育时间的相关性,这佐证了 Luc 与脱氧核苷直接结合生成 DNA 加合物的能力。本研究发现, Luc 与脱氧核苷可直接反应生成加合物,体外 I 相代谢反应对加合物的生成存在影响,代谢激活后 Luc 加合物的生成速率明显减慢,影响因素较多,如可能由于 Luc 被代谢底物含量减少或 Luc 代谢物与脱氧核苷结合,均能导致上述结果。考虑到 Luc-DNA 加合物孵育的实验模型为体外肝微粒体代谢模型,可能与体内真实代谢情况存在一定差异,因此在体内广泛而持久的代谢条件下, DNA 加合物的形成和清除情况、最终传递风险的程度,有待于进一步深入研究。后续将参考本课题组 Luc 的体外代谢稳定性实验结果^[19],选取与人具有相似代谢特征的实验动物模型,进行加合物和代谢的体内研究和体内外相关性研究。本研究可为中草药中潜在遗传毒性成分的快速筛查提供重要的方法参考。

REFERENCES

[1] CHEN Y L, FAN G, LIU Y, *et al.* Identification of traditional Chinese medicine *Rubiae Radix et* and its adulterants using DNA barcodes [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2015, 50 (15):1266-1272.

[2] HUANG L X, WANG X R. Dyeing performances of nylon fabric with madder pigment [J]. *China Dyeing Finish* (印染), 2021, 47(6):30-34.

[3] XIAO Z C, ZHANG G G. Development and utilization of edible plant pigments in China [J]. *Chin Wild Plant Resour*(中国野生植物资源), 2014, 33(1):45-54.

[4] VIJAY U, GUPTA S, MATHUR P, *et al.* Microbial mutagenicity assay: Ames test [J]. *Biol Protoc*, 2018, 8(6):e2763. DOI: 10.21769/BioProtoc.2763.

[5] ISHII Y, KIJIMA A, TAKASU S, *et al.* Effects of inhibition of hepatic sulfotransferase activity on renal genotoxicity induced by lucidin-3-O-primeveroside [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4):650-657.

[6] SEDGWICK B, BATES P A, PAIK J, *et al.* Repair of alkylated DNA: recent advances [J]. *DNA Repair*, 2007, 6(4):429-442.

[7] GUO L, WU H, YUE H, *et al.* A novel and specific method for the determination of aristolochic acid-derived DNA adducts in exfoliated urothelial cells by using ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(2):153-158.

[8] ZHAO Y, XIA Q, GAMBOA DA COSTA G, *et al.* Full structure assignments of pyrrolizidine alkaloid DNA adducts and mechanism of tumor initiation [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(9):1985-1996.

[9] YANG S, LIU J D H, DIEM M, *et al.* Molecular dynamics and *in vitro* quantification of safole DNA adducts reveal DNA Adduct persistence due to limited DNA distortion resulting in inefficient repair [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(9):2298-2309.

[10] CLERGÉ A, LE GOFF J, LOPEZ-PIFFET C, *et al.* Investigation by mass spectrometry and ³²P post-labelling of DNA adducts formation from 1, 2-naphthoquinone, an oxydated metabolite of naphthalene [J]. *Chemosphere*, 2021, 263:128079. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128079.

[11] SHAHAB U, HABIB S, ALSULIMANI A, *et al.* N-OH-AABP modifications in human DNA may lead to auto-antibodies in bladder cancer subjects [J]. *Diagnostics*, 2022, 12(2):337. DOI: 10.3390/diagnostics12020337.

[12] KLAENE J J, SHARMA V K, GLICK J, *et al.* The analysis of DNA adducts: the transition from ³²P-postlabeling to mass spectrometry [J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(1):10-19.

[13] BEHL T, RACHAMALLA M, NAJDA A, *et al.* Applications of adductomics in chemically induced adverse outcomes and major emphasis on DNA adductomics: a pathbreaking tool in biomedical research [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18):10141. DOI: 10.3390/ijms221810141.

[14] ESAKA Y, ARUGA H, KUNISHIMA S, *et al.* Preparation of N₂-ethyl-2'-deoxyguanosine-d₄ as an internal standard for the electrospray ionization-tandem mass spectrometric determination of DNA damage by acetaldehyde [J]. *Anal Sci*, 2020, 36(7):877-880.

[15] CHANG Y J, COOKE M S, HU C W, *et al.* Novel approach to integrated DNA adductomics for the assessment of *in vitro* and *in vivo* environmental exposures [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(8):2665-2680.

[16] ISHII Y, TAKASU S, KURODA K, *et al.* Combined application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of gpt delta rats given madder color or its constituents [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(9/10):2467-2475.

[17] WU Y, ZAKHAROVA V M, KASHEMIROV B A, *et al.* β , γ -CHF-and β , γ -CHCl-dGTP diastereomers: synthesis, discrete ³¹P-NMR signatures, and absolute configurations of new stereochemical probes for DNA polymerases [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(21):8734-8737.

[18] WESTENDORF J, PFAU W, SCHULTE A. Carcinogenicity and DNA adduct formation observed in ACI rats after long-term treatment with madder root, *Rubia tinctorum* L [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(12):2163-2168.

[19] MA Y X, ZHANG Y, YANG J, *et al.* Investigation of metabolic stability of phase I and II sulfation of lucidin in liver microsomes and liver S9 from different species [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2022, 28(21):113-120. (收稿日期:2023-01-16)