

卤代烃毒性的化学评价法:鸟嘌呤卤代烃加合物 FTIR、UV 光谱表征

徐维井¹, 佟柏龄², 黄芹¹ (1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. 中国地质科学院测试所, 北京 100037)

摘要: 研究鸟嘌呤与一系列卤代烃反应的加合产物, 利用 HPLC 二极管阵列检测器得到的特征紫外光谱 (UV) 对加合产物样品进行了鉴定, 然后加合产物经薄层 (TLC) 分离, 再进一步做红外 (FTIR) 鉴定, 从而得到鸟嘌呤-卤代烃氧位和氮位加合物的红外光谱表征。研究表明, 鸟嘌呤卤代烃的氮位加合物异构体的紫外光谱吸收峰的波长在 240 ~ 250 nm 之间, 氧位加合物 UV 波长在 260 ~ 270 nm 附近。鸟嘌呤与本文涉及的各卤代烃的加合物的红外光谱之间差别不大: 其氮位加合物在 1700cm^{-1} 处, 均有 C=O 的特征吸收峰; 其氧位加合物的红外光谱亦相近。

关键词: 鸟嘌呤; 加合物; 异构体; FTIR

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2001)01-04-0067

Chemical Assessment of Mutagenicity of Halohydrocarbons: FTIR、UV Spectrum Characteristics of Guanine-Halohydrocarbon Adducts

Xu Weibing¹, Tong Bailing², Huang Qin¹ (1. Research Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Institute of Rock & Mineral Analysis, CAGS, Beijing 100037)

Abstract: Determination and identification of guanine-halohydrocarbon adduct isomers were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The experimental results showed that the UV spectral overlay of O⁶-guanine adducts retrieved after HPLC at 260 ~ 270 nm. The UV spectra of N-side adducts are similarly between 240 ~ 250 nm. After thin layer chromatographic separation (silica gel GF₂₅₄), the all IR spectra of the N-side adducts of guanine with different halohydrocarbons showed a absorption near 1700cm^{-1} assigned the characteristic peak of C=O. The IR spectra among the adducts of O⁶-guanine with different halohydrocarbons are quite similar.

Key words: guanine; adduct; isomer; FTIR

DNA 加合物是包括卤代烃在内的亲电性烷化剂与 DNA 碱基形成的共价键相连的化合物。在化学致癌过程中鸟嘌呤是 DNA 主要受到损伤而被修饰的碱基之一, 因此对鸟嘌呤加合物的研究受到普遍的关注。鸟嘌呤是通过 O⁶ 原子处, 以及其外环上的氨基共价结合的多个亲核部位, 成为加合中心而形成多种加合物的。文献报道过用紫外光谱^[1]、拉曼光谱^[2]、HPLC^[3]等对鸟嘌呤的甲基、乙基等加合物的研究, 但尚未见鸟嘌呤加合物的红外光谱研究,

且对其烷化剂系列化的加合物研究也较少。本文研究了鸟嘌呤与一系列卤代烃类烷化剂反应的加合产物, 利用 HPLC 二极管阵列检测器得到的特征紫外光谱对加合产物样品进行鉴定, 然后加合产物经薄层分离, 再进一步做红外鉴定, 从而得到鸟嘌呤-卤代烃氧位和氮位加合物

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29777024)

作者简介: 徐维井 (1948 ~), 女, 副研究员, 主要研究方向为环境化学和生态毒性毒理学。

收稿日期: 2000-02-21

的红外光谱表征.

研究表明,鸟嘌呤卤代烃的氮位加合物异构体的紫外光谱(UV)吸收峰的波长在 240 ~ 250 nm 之间,氧位加合物 UV 波长在 260 nm 处.鸟嘌呤与本文涉及的各卤代烃的加合物的红外光谱之间差别不大:与各卤代烃的氮位加合物在 1700cm^{-1} 处,均有 C—O 的特征吸收峰;而其氧位加合物的红外光谱亦相近.本工作为进一步分子水平研究鸟嘌呤卤代烃加合物提供了依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:美国 BIO-RAD 公司 FTS-20 型红外光谱仪和 WinIR 数据系统;美国惠普 1090A 液相色谱仪,包括二极管阵列检测器,自动进样系统,HP-85 计算机,绘图仪及 3390A 积分仪.

试剂:鸟嘌呤(Sigma)、氯乙缩醛、碘甲烷、溴乙烷、溴丙烷、异碘丙烷、 ω -溴苯乙酮、氯化苄、硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、无水 K_2CO_3 、NaH、N,N-二甲基甲酰胺(DMF),均为分析纯,实验用水为超纯水.

1.2 色谱条件

薄层板 取硅胶 GF₂₅₄ 20g,加含 0.2% 羧甲基纤维素钠的溶液 60 ml,搅拌均匀后铺板,经 105℃ 活化 1h,置干燥箱内备用.推进剂:二甲氧甲烷-甲醇(9:1).

液相色谱 流动相:MeOH: H_2O = 85:15,流速:1 ml/min,压力 150 Pa,温度 20℃,检测波长 254 nm,色谱柱:HyperSil-ODS 5μ , 200 mm $\times$ 4.6 mm i.d. 不锈钢柱.

1.3 样品制备 按照摩尔比 1:1,称取鸟嘌呤、卤代烃标样.无水 K_2CO_3 (或 NaH),加入 5 ml N,N-二甲基甲酰胺,密封后室温搅拌 24h;产物离心分离,将上清液转移至 CH_2Cl_2 体系,分别进行 HPLC 测定和薄层板展开后 FTIR 鉴定.

2 结果和讨论

2.1 加合物的鉴定

烷化剂通常在 DNA 亲核性较弱的部位

(特别是鸟嘌呤 O-6 原子,亲核常数 $n=1.2$) 发生反应,但产率极低;鸟嘌呤中最亲核的是 N-7 原子(亲核常数 $n=3.5$)^[4],产率比较高.水溶液中鸟嘌呤存在烯醇式和酮式互变异构,其分子可能有 2 类 8 种定向,鸟嘌呤的理论分子面积为 0.58nm^2 ^[5].核酸重要组成部分鸟嘌呤与 ω -溴苯乙酮加合反应产物的液相色谱分离图如图 1 所示,图 1 中峰 2、4、5 和 6 为氮位(N)加合产物,它们的 UV 光谱见图 2;峰 1 亦为氮位加合产物,其 UV 光谱见图 3(4);而峰 3 为氧位(O)加合产物,其 UV 光谱见图 4(2).

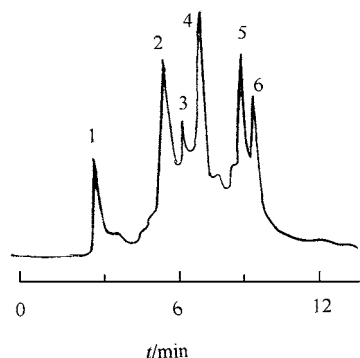


图 1 ω -溴苯乙酮与鸟嘌呤加合物的液相色谱分离图

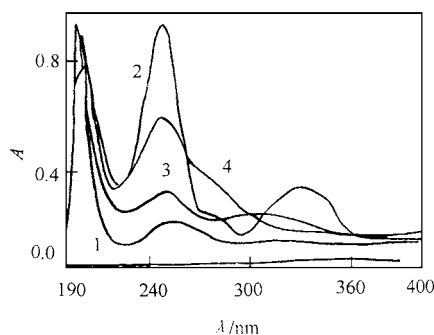


图 2 ω -溴苯乙酮与鸟嘌呤氮位加合产物的紫外光谱

由图 2 可知鸟嘌呤溴苯乙酮氮位加合物的 UV 光谱比较一致,均位于 245 ~ 250 nm (最强峰均为对 230 ~ 400 nm 而言),此前已采用 GC-FTIR 和 GC-MS 手段对吡啶酮与 ω -溴苯乙酮加合物进行了确证,在 FTIR 光谱图中,氮位加合物在 1690cm^{-1} 处有一个强羰基吸收峰,说明此为氮位加合物,并且其产率高于氧位加合物产率^[6].

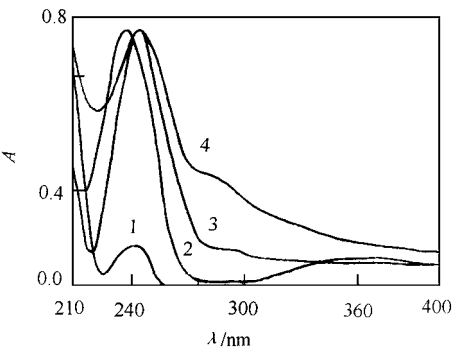


图 3 鸟嘌呤卤代烃氮位加合产物的紫外光谱

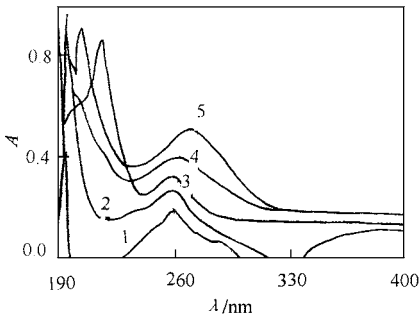


图 4 鸟嘌呤卤代烃氧位加合产物的紫外光谱

图 3 显示鸟嘌呤以及吡啶酮的烷化剂 N-加合物 UV 光谱:峰 1 为鸟嘌呤-硫酸二甲酯,峰 2 为鸟嘌呤-氯代苄,峰 3 为吡啶酮-溴苯乙酮,峰 4 为鸟嘌呤-溴苯乙酮.图中加合物 3 与 4 光谱吸收位置一致, $\lambda_{\max}$ 均为 250nm,只是后者吸收峰的峰形较宽;同时看出,N-加合物的 UV 吸收波长在 240 ~ 250nm 间,与 Weiling X 等人有关研究结果,N-7-苄基鸟嘌呤 $\lambda_{\max}$ 为 242nm、284nm 是相吻合的^[1].

图 4 给出 O-加合物的 UV 光谱:峰 1 为鸟嘌呤-溴乙烷,峰 2 为鸟嘌呤-溴苯乙酮,峰 3 为鸟嘌呤-氯代苄,峰 4 为吡啶酮-溴苯乙酮,以上 4 个卤代烃加合产物的 $\lambda_{\max}$ 均为 260nm,峰 5 为鸟嘌呤-硫酸二甲酯, $\lambda_{\max}$ 为 270nm.

鸟嘌呤的红外光谱具有羰基吸收特征,1697cm⁻¹的 C—O 伸缩振动及 1674cm⁻¹ C—N 伸缩振动的吸收是整个光谱中最强的.通过鸟嘌呤与 ω -溴苯乙酮等 mol 加合物的红外光谱研究,可以明显看到约在 1700cm⁻¹ 范围有一

混合物特有的宽谱带出现,而在它们各自的光谱图中均未见到.1700 ~ 1500cm⁻¹ 范围属于核酸碱基鸟嘌呤中 C—O、C—C 及 C—N 的特征吸收峰,由于卤代烃的作用发生了变化,一些峰变弱了(图 5).实验表明, ω -溴苯乙酮

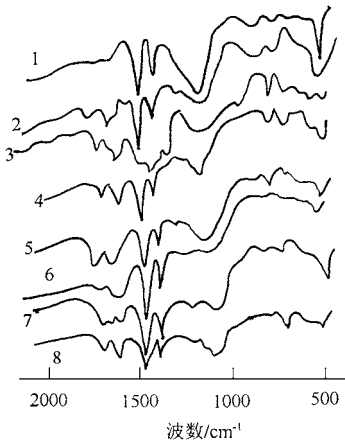


图 5 鸟嘌呤卤代烃氮位加合物红外光谱

1698cm⁻¹ 的 C—O 伸缩振动低移至 1688cm⁻¹,并且峰形变宽,说明卤代烃攻击了 DNA 结构起作用的鸟嘌呤中的氮原子位置 ($R_{f\max}$); R_f 高者先出,与 HPLC 中吡啶酮加合物 R_t (氮位) < R_t (氧位)一致.图中峰 1 为鸟嘌呤(Gua)-碘甲烷,峰 2 为 Gua-溴乙烷,峰 3 为 Gua-溴丙烷,峰 4 为 Gua-异碘丙烷,峰 5 为 Gua-硫酸二甲酯,峰 6 为 Gua-硫酸二乙酯,峰 7 为 Gua-氯乙缩醛,峰 8 为 Gua-溴苯乙酮.未经 TLC 分离时,原始反应液的羰基吸收峰最强,而经 TLC 分离后羰基峰随着减弱,此结果并不理想,有待于进一步改进方法.图 6 给出鸟嘌呤氧位加合物的 IR 谱($R_{f\min}$),加合反应物的顺序同图 5,其加合产物详细的波数见表 1.

表 1 鸟嘌呤卤代烃加合物红外光谱的谱带位置/cm⁻¹

反应物	氮位加合产物	氧位加合产物	图中序号
碘甲烷	1731,1628	1621	(1)
溴乙烷	1722,1625	1633	(2)
溴丙烷	1708,1623	1632	(3)
异碘丙烷	1684,1635	1629	(4)
硫酸二甲酯	1737,1640	1637	(5)
硫酸二乙酯	1713,1637	1629	(6)
氯乙缩醛	1744,1628	1635	(7)
ω -溴苯乙酮	1688,1625	1636	(8)

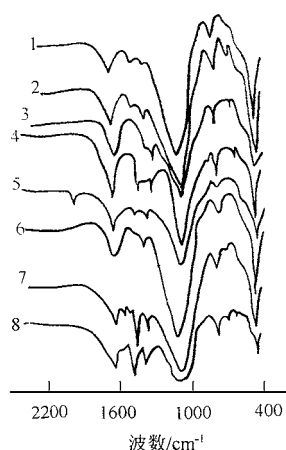


图 6 鸟嘌呤卤代烃氧位加合物红外光谱

2.2 流动相的选择

试验了 ① $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, ② $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$, ③ $\text{CH}_3\text{OH}/0.01 \text{ mol/L } \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ④ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$. 流动相 ① 的分离效果比 ④ 体系为差, 这可能是源于 CH_3CN 极性较 CH_3OH 弱, 导致 ① 流动体系极性亦弱之故.

2.3 柱温的影响

20 ~ 70 °C, 每隔 10 °C 测定一次鸟嘌呤溴苯乙酮加合产物, 结果见图 7. 柱温达到 50 °C 时氮位产率比有变化, 色谱峰 6 几乎消失; 柱温为 70 °C 时, 在色谱峰 1 后边, 增加一个 λ_{max} 为 211 nm 的未知物峰.

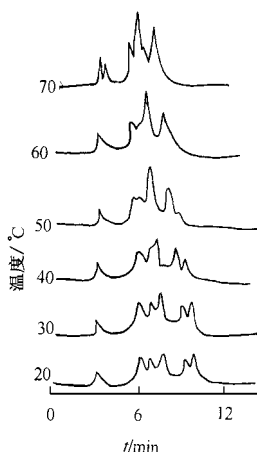


图 7 温度对色谱分离的影响

2.4 检测波长的选择

选用的波长为 210、230、254 和 260 nm. 由 DAD 检测得知, 加合产物最大的吸收峰在 210 nm, 但在此吸收峰附近的干扰较大, 选用 254 nm, 可以保证足够高的灵敏度 (见图 8). UV 谱可确认样品的吸收峰, 补充保留时间 (R_t) 定性的不足, 从而保证测定结果的可靠性.

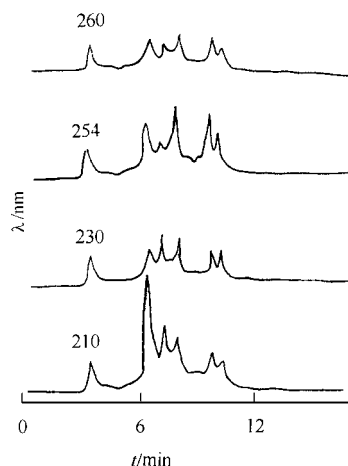


图 8 多光谱选择检测波长

2.5 反应条件

最初反应体系为二甲亚砜, TLC 分离效果不显著. 后改用 DMF 体系, 注意先使其生成钠盐, 然后再加等 mol 的卤代烃反应物.

致谢: 本工作得到中国医学科学院药物所王琳教授的热情帮助, 特此致谢.

参考文献:

- 1 Weiling X et al. The Identification and Quantitation of Alkylated Nucleobases by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *J. Chromatogr. Sci.*, 1990, **28**: 477 ~ 481.
- 2 龙耀庭等. 鸟嘌呤、鸟苷及其甲基化衍生物的近红外傅里叶变换表面增强拉曼光谱. *分析化学*, 1996, **24**(3): 258 ~ 263.
- 3 Tammy L Stefan et al. Simultaneous Determination of O⁶-benzylguanine and 8-oxo-O⁶-benzylguanine in Human Plasma by Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatography B*, 1997, **704**: 289 ~ 298.
- 4 王连生等. 致癌有机物. 北京: 中国环境科学出版社, 1993. 128 ~ 141.
- 5 朱世民等. 生物小分子的电分析化学研究. *化学学报*, 1993, **51**(6): 594 ~ 601.
- 6 徐维并等. 卤代烃毒性的化学评价法研究 I. 吡啶酮卤代烃加合物的 FTIR 光谱表征. *环境科学学报*, 1999, **19**(2): 180 ~ 185.