主要化学毒剂体内生物标志物检测技术研究进展

宋婷婷, 郭 磊, 陈 佳, 谢剑炜*
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 化学武器核查工作是履行《禁止化学武器公约》的重要内容,对各类化学毒剂及其降解产物的检测是保证化学武器核查正确实施的前提。相对于环境样品的检测,分析检测生物样品中半衰期较长的化学毒剂生物标志物具有较强的溯源性,并且能够为确证人员是否染毒提供直接证据,这也是化学武器核查研究工作的近期热点。本文即对生物样品中 5 类主要化学战剂的生物标志物的分析检测技术进行了系统评述,着重介绍近 10 年相关检测技术的研究进展及其发展趋势。

关键词: 化学毒剂; 生物标志物; 化学分析; 生物监测
中图分类号: R991 **文献标识码**: A **文章编号**: 1674-0440(2008)03-0198-07

Progress on determination of biomarkers of chemical warfare agents

SONG Ting-ting, GUO Lei, CHEN Jia, XIE Jian-wei
(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850, *China*)

Abstract: Verification of chemical warfare agents (CWA) as well as their degradation products is an important issue in the compliance with the Chemical Weapons Convention. In comparison with environmental samples, determination of their biomarkers with longer lifetimes in biological samples can provide a more reliable retrospective verification and direct evidence of exposure, so it attracts more attention on the research field of compliance with the Chemical Weapons Convention. This review summarizes the analytical strategies on five kinds of CWA and their biomarkers in biological samples. Development of related detection methods in last decade is particularly highlighted, and trends of biomarker analysis on CWA are also addressed.

Key words: chemical warfare agents; biomarker; chemistry analysis; biological monitoring

1 前言

日本东京地铁“沙林毒气事件”和齐齐哈尔“8.4 事件”等化学毒剂伤人事件的发生,引起了全世界对禁用化学战剂武器的广泛关注。对于化学毒剂的检测,以往的工作重点集中在对环境样品中的化学毒剂原形及其降解产物的检测,而化学毒剂在自然环境中通常会迅速降解,因而不利于进行溯源性分析。化学毒剂在生物体内以不同的代谢途径降解,与生物体内的蛋白质(酶)、核酸等大分子结合后可形成特异的生物标志物,生物标志物的半衰期较长,这就为化学武器核查工作提供了新思路。对生物样品中化学毒剂生物标志物的检测在化学恐怖袭击的确证、中毒程度的快速诊断、中毒机制和体内代谢的研究、低剂量水平暴露下人员的身体健康评估等方面均具有重要的理论和现实意义。

本文从毒剂分类、结构特点及其在生物体内的转化途径着手,系统综述了近 10 年来生物样品中神经性毒剂、糜烂性毒剂、失能性毒剂、血液性毒剂及窒息性毒剂的原形及降解产物,特别是毒剂生物标志物的分析检测技术及其研究进展。

2 神经性毒剂

神经性毒剂按其结构及化学性质分为 G 类和 V

收稿日期:2007-12-12

作者简介:宋婷婷,女,在读硕士研究生,研究方向:药物分析,Tel:010-66930621,E-mail:thinthin9@yahoo.com.cn

*通讯作者:谢剑炜,男,研究员,博士生导师,研究方向:毒物分析,分子识别与手性分离分析,E-mail:xiejw@bmi.ac.cn,Tel:010-66931649

类两大类。G 类毒剂的主要中毒途径是呼吸道吸入,以沙林(GB)、梭曼(GD)和塔崩(GA)等为代表;V 类毒剂以皮肤吸收为主要中毒途径,以维埃克斯(VX)和俄罗斯维埃克斯(RVX)等为代表[1]。神经性毒剂进入体内先与丁酰胆碱酯酶、乙酰胆碱酯酶(AChE)、羧酸酯酶或其他蛋白质结合,形成毒剂-蛋白质加合物,然后主要通过 2 种途径进行代谢:一种是自发或在药物作用下的脱磷酰基重活化过程,中毒酶恢复活力,生成与其对应的一级降解产物烷基甲基膦酸(AMPA)和二级降解产物甲基膦酸(MPA)等;另一种是脱烷基老化过程,生成相应的老化产物,即磷酰化酶[2,3]。分析染毒生物样品中的毒剂生物标志物不仅可确定是否曾经染毒,还可推知毒剂暴露的剂量。

对染毒生物样品进行前处理可以起到净化样品、富集目标化合物的作用。神经性毒剂染毒血样的前处理步骤一般是沉淀蛋白质,然后可以通过 2 条途径分析毒剂-蛋白质加合物,一是用氟化物置换法,从中毒酶中置换出毒剂原形或烷基氟膦酸酯。除老化速度极快的 GD 外,其他神经性毒剂老化的酶都可用氟化物置换法重活化;另一种方法是用酶对毒剂-蛋白质加合物进行酶解然后分离富集相应肽段进行分析。与血样相比,染毒尿样的背景干净,气相色谱(GC)分析前仅需要进行酸化处理[4~6]。分析染毒尿样中的毒剂生物标志物,不足之处在于生物体内存在变异性。另外,肾脏对毒剂的代谢速度非常快,约 90% 的毒剂在暴露后 48 ~72 h 经尿排出体外[7]。

依据生物样品中所检测目标分子的种类,将神经性毒剂中毒的检测方法分为 3 类。最早发展起来的方法是测定血中 AChE 活性,但该法灵敏度低无法区分毒剂种类,目前仅用于神经性毒剂的初步快速筛查。目前普遍采用的分析方法是使用 GC[8,9]、气相色谱-质谱(GC-MS)[10~13]、液相色谱-质谱(LC-MS)[14,15]、毛细管电泳(CE)[16]以及离子色谱-间接光度检测(IC-IPD)[17]等技术直接检测神经性毒剂的水解产物,如 MPA、异丙基甲基膦酸(IMPA)、噻哪基甲基膦酸(PMPA)、乙基甲基膦酸(EMPA)等。由于生物体对此类水解产物的清除速率较快,可在几天内基本清除,这就限制了该方法在溯源性检测方面的应用。第 3 类方法是基于神经性毒剂-酶加合物的特异性检测。神经性毒剂-胆碱酯酶加合物在生物体内半衰期较长(5 ~16 d)、浓度较高,被认为是检测神经性毒剂暴露的持久、丰富的特异生物标志物。蛋白酶可将其降解,毒剂以烷基膦酸酯或膦酰化肽段的形式释放,再使用 GC-MS[18,19]或 LC-MS 等技术[20,21]分析,该法的特异性高、分析流程简便,是目前最广泛应用的溯源性检测分析方法。表 1 按基质种类的不同,对生物样品中神经性毒剂的检测情况进行了归纳。

3 糜烂性毒剂

糜烂性毒剂主要包括 2 类,一类为“芥子气类”,其分子结构中至少包括一个 2-氯乙基基团,该基团与硫醚基团上的硫原子直接相连的化合物称为硫芥〔二(2-氯乙基)硫醚〕,即通常所说的芥子气(HD 或 MG);该基团与胺基基团上的氮原子直接相连的化合物称为氮芥(HN),包括 *N*,*N*-二(2-氯乙基)乙胺(HN1)、*N*,*N*-二(2-氯乙基)甲胺(HN2)、三(2-氯乙基)胺(HN3)等同系物;另一类为三氯化砷的衍生物,以路易氏剂(Lewisite)为代表。

3.1 芥子气

芥子气的杀伤力强、制备方便,是最常用的化学毒剂,在生物体内主要有 4 种转化途径:(1)水解、氧化成硫二甘醇(TDG)和芥子砜或芥子亚砜[22];(2)与 DNA 结合,主要存在形式为 7-(2-羟基乙硫代乙基)鸟嘌呤(HETE-G),另外还有少量毒剂以鸟嘌呤衍生物的形式存在[23];(3)与蛋白质结合成为芥子气-蛋白质加合物,最终代谢产物为大量的 *S*-[2-[(巯乙基)硫]乙基]半胱氨酸-脯氨酸-苯丙苷酸(*S*-HETE)和少量天冬氨酸、谷氨酸、N1/N3 组胺酸、N 端缬氨酸加合物[24];(4)芥子气-蛋白质加合物经肾脏代谢形成的谷胱甘肽加合物,在 β 裂解酶作用下继续分解,产物主要以 1,1′-磺酰基-二(2-甲基磺酰基)乙烷(SBMTE)形式存在,少量产物以 1,1′-磺酰基-二〔2-*S*-(*N*-乙酰半胱氨酸)〕乙烷(SBSANE)、1,1′-磺酰基-二(2-甲硫基)乙烷(SBMSE)和 1-甲基亚磺酰基-2-(2-甲硫基乙基磺酰基)乙烷(MSBMTE)的形式存在[25]。

3.1.1 染毒血样的检测 芥子气发挥细胞毒性被认为从 DNA 的烷基化开始,因此分析芥子气-DNA 加合物在溯源性检测中具有重要意义;芥子气-蛋白质加合物可在体内存留约 120 d,因此对芥子气-蛋白质加合物的分析可对染毒后较长时间的样品进行溯源性检测。检测芥子气-人血清白蛋白加合物的目的一是定量测定与蛋白质结合的芥子气,二是证实蛋白质的烷基化位点。与毒剂形成的加合物都可

表 1　神经性毒剂生物标志物的检测方法

基质种类	目标化合物	分析方法	检测结果	参考文献
脑组织	MPA, IMPA	GC-MS	检出 MPA, 未检出 IMPA	[10]
血液	VX, EMPA	GC-CI-MS	80 μg·L^{-1}, 3 μg·L^{-1}	[11]
	IPMA, MPA	GC-EI-MS(SIM)	受害者血样检出目标物;尸检未检出目标物	[12]
	AMPA, MPA	GC-MS	22 μg·L^{-1}	[13]
	IMPA	LC-ESI-MS	2 ~ 135 μg·L^{-1}	[14]
	PMPA, EMPA, MIP	CE	100 μg·L^{-1}	[16]
	MPA, EMPA, IPMPA	IC-IPD	40 μg·L^{-1}	[17]
	PMPA	IC-IPD	80 μg·L^{-1}	[17]
尿液	MPA	GC-FID	10 μg·L^{-1}	[8]
	IPMA	micro LC-MS-MS	30 ng·L^{-1}	[15]
	MPA	GC-FPD	0.625 μmol·L^{-1},约 6 μg·L^{-1}	[18]
	GA	ID GC-MS-MS	20 μg·L^{-1}	[19]
	GB, GD, GF, RVX	ID GC-MS-MS	1 μg·L^{-1}	[20]
	EMPA	GC-NCI-MS-MS(MRM)	0.5 μg·L^{-1}	[21]
	IMPA, PMPA, CHMPA, i-BuMPA	GC-NCI-MS-MS(MRM)	0.1 μg·L^{-1}	[21]

注:EI:电子碰撞离子化;ESI:电喷雾离子化;SIM:选择离子监测;FID:火焰离子化检测器;FPD:火焰光度检测器; GF:环己烷沙林;ID GC-MS-MS:同位素稀释气相色谱-串级质谱;MRM:多反应监测模式;micro LC-MS-MS :微柱液相色谱-串级质谱;NCI:负化学离子化

以用免疫化学分析、酶联免疫分析(ELISA)方法直接检测,两种方法在检测人皮肤的"芥子气-角蛋白加合物"时灵敏度相当,可检出芥子气染毒的最低剂量为 50 nmol·L^{-1}[26],该法有望用于开发基于皮肤的现场检毒装置、完成事故现场的快速检验[27]。

基于色谱的定性定量分析相对于免疫方法具有检测限低、灵敏度与专一性好、溯源性更强的优点。GC-MS 可检测芥子气原形及降解产物的衍生物,GC-NCI-MS 在全扫描模式下可检出芥子气衍生化产物的检测限(LOD)为 100 μg·L^{-1}[22]。HPLC 在检测芥子气和研究芥子气降解途径方面具有不可取代的优势。HPLC-荧光检测分析用荧光基团标记的芥子气-DNA 加合物,LOD 为 10 pmol·L^{-1}[23]。micro LC-MS-MS 可在 Edman 降解后的染毒人白蛋白中检出 10 nmol·L^{-1}的 S-HETE [24]。目前软电离质谱技术如基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)技术已成功用于定量检测 S-HETE 和评价芥子气烷基化反应的程度,但因仪器昂贵,仅在少数实验室使用。

3.1.2　染毒尿样的检测　尿样取样简单、量大、背景干净,因此对尿样中芥子气生物标志物的研究较多。由于正常人尿液含有少量来源不明的 TDG 和芥子亚砜(小于 10 ng),因此在对尿样进行溯源性检测时,常选用毒剂-谷胱甘肽加合物和 β 裂解产物作特异的生物标志物。染毒尿样的前处理方式可以采用直接从尿样中萃取出代谢产物,用 LC-MS 进行分析[28];亦可采用在尿样中加入三氯化钛,在酸性条件下将芥子气的代谢化合物还原成同一物质(SBMTE),衍生化后用 GC-MS 分析。后者的缺点是样品浓度在分析方法(SIM 模式)的 LOD 附近时,显示有其他化合物干扰,从而降低了方法的灵敏度和专一性。选择串级质谱则可以克服上述不足[24]。表 2 总结了芥子气生物标志物的检测方法。

3.2　氮芥

氮芥在生物体内主要降解成甲基-*N*-二乙醇胺(MDEA)、乙基-*N*-二乙醇胺(EDEA)、*N*-三乙胺(TEA)。HN2 是双功能烷基化试剂,可以与 DNA 形成 *N*-〔2-羟基-*N*-(2-(7-鸟嘌呤)乙基〕甲胺(N7G)和 *N*-〔2-羟基-*N*-(2-(3-腺嘌呤)乙基〕甲胺(N3G)复合物,形成的两种加合物的质量比为 86∶14,从而发挥其细胞毒性作用,因此 HN2 还可作为抗癌药物使用;体外实验提示 HN2 还可与半胱氨酸、组氨酸、血红蛋白中的 N 端缬氨酸残基发生烷基化反应。

表 2 芥子气生物标志物的检测方法

基质种类	目标化合物	分析方法	检测结果	参考文献
渗透液	TDG	GC-PFPD	24.4 μg · L^{-1}	[29]
血液	TDG	GC-NCI-MS	绝对检出量 0.5 fmol,约 60 fg	[22]
	N 端缬氨酸加合物	LC-ESI-MS	染毒后 21 ~45 d 可检出目标化合物	[22]
	S-HETE	GC-MS-MS	10 ng · L^{-1}	[24]
	HETEG	LC-MC	绝对检出量 4 pg	[26]
皮肤	HETEG	GC-MS	10 pmol · L^{-1},约 2.5 ng · L^{-1}	[23]
	谷氨酸和天冬氨酸加合物	免疫荧光法,ELISA	50 nmol · L^{-1},约 7.5 μg · L^{-1}	[27]
尿液	SBSANE	LC-ESI-MS-MS	0.5 μg · L^{-1}	[25]
	SBSANE,MSBMTE	LC-ESI-MS-MS	LOQ 为 0.1 μg · L^{-1}	[28]
	SBMTE	ID-GC-MS-MS	0.038 μg · L^{-1}	[30]
	TDG	ID-GC-MS-MS	0.5 μg · L^{-1}	[30]

注:PFPD:脉冲火焰光度检测器;LOQ:定量限

对氮芥的分析检测工作主要用色谱方法完成,2000 年以来取得了一定的进展(表 3)。采用 GC-EI-MS 分析染毒血样中 EDEA,MDEA 和 TEA 的衍生化产物,LOD 可达到 2.5 μg·L^{-1}水平[31]。LC-MS 对尿样中 EDEA 和 MDEA 的定量限(LOQ)分别为 0.41 和 0.96 μg·L^{-1}[32],在动物模型染毒后第 48 小时的尿样中仍可检出以上化合物。反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析 N7G 时 LOD 为 20 μg· L^{-1}[33],适用于 DNA-HN2 剂量效应分析。

3.3 路易氏剂

路易氏剂是 1918 年由美国 Lewis 等合成的一类含砷糜烂性毒剂的统称,以含量大于 90% 的 2-氯乙烯二氯胂(L-1)为主。生物样品中大部分路易氏剂与含有巯基的蛋白质或氨基酸结合,形成链状或环状加合物,从而使蛋白质和氨基酸丧失其生理功能和活性。少量路易氏剂水解成 2-氯乙烯砷酸(CVAA)[1],同样具有较大毒性。

路易氏剂极性较大且难挥发,用 GC 直接分析会引起较严重的柱流失现象,降低柱效,而 LC 分析灵敏度与选择性均较低。衍生化技术的引入使 GC 分析路易氏剂成为可能,As(Ⅲ)-S 键的稳定性大于 As(Ⅲ)-O 键和 As(Ⅲ)-N 键的稳定性,因此多选用硫醇作衍生化试剂与蛋白质、氨基酸竞争性结合路易氏剂,同时衍生化 CVAA 和游离路易氏剂,生成易挥发、适用于 GC 分析的链状或环状产物。

生物样品中路易氏剂的检测方法相对成熟,即用液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)或固相微萃取(SPME)从基质中提取出目标化合物,硫醇衍生化以后以 GC 分离和使用多种检测方式定性定量。常用的检测器为原子发射检测器(AED),FPD 和 MS,GC-MS 可在染毒人全血和尿样中检出低至40 pmol·L^{-1}[34]和 7.4 ng·L^{-1}[35]的路易氏剂(表 3)。

4 失能性毒剂

二苯羟乙酸-3-奎宁环酯(BZ)、麦角酰二乙胺(LSD 或 LSD-25)属于失能性毒剂,能引起精神失能症状[1]。BZ 的结构及药理学性质与阿托品相似,在体内主要水解成二苯乙醇酸和 3-奎宁醇,经尿排出体外。生物样品中 BZ 的检测常用 HPLC,LOD 可达 200 μg · L^{-1}[36],GC-MS 可用以检测 BZ 的衍生化反应产物;LSD 是 5-羟色胺受体激动剂,通过刺激释放 5-羟色胺引起精神和躯体症状,主要经肝代谢,*N*-demethyl-LSD(nor-LSD)是目前唯一证实的人体内 LSD 代谢物[37]。LSD 生物活性高,较低浓度即可损伤人体机能,因此需要灵敏度较高的检测方法,如免疫分析及色谱分离分析方法(表 3)。

对 LSD 进行免疫检测采用的方法包括放射性同位素免疫法(RIA)和非放射性同位素免疫法(non RIA)两类。后者的优点是花费低,无需特殊的样品前处理,设备具有便携性;RIA 法的灵敏度更高,但放射性物质难以处理。两法用于检测血样时 LOD 都达 0.5 μg · L^{-1},分析尿样时 LOD 为 0.39 μg·L^{-1}[38]。免疫测定法专一性差,常受基质干扰,阳性的免疫测定分析结果往往需要另一种方法进行验证。

LSD 难挥发且热不稳定,易与 GC 柱的固定相发生不可逆吸附,限制了 GC 在检测 LSD 中的应用,

通过样品硅烷化、选择固定相为熔融硅的气相色谱柱等可改善 GC-MS 的分析结果。目前多采用 LC 法进行检测。100 mg 头发样品经免疫亲合柱前处理后，LC-荧光检测法可检出 < 50 pg（S/N = 3）的 LSD[39]，MS 对 LSD 的 LOQ 更低至 0.01 μg·L^{-1}[40,41]。毛细管电泳-激光诱导荧光检测法（CE-LIF）分析染毒血样中 LSD 的 LOD 为 0.1 ~ 0.2 μg·L^{-1}，LOQ 约为 0.4 ~ 0.5 μg·L^{-1}，检出 nor-LSD 的 LOD 为 0.1 μg·L^{-1}[42]。

5　血液性毒剂和窒息性毒剂

氰化氢属于血液性毒剂，是无色伴有轻微苦杏仁气味的液体；光气亦称为碳酰氯，是窒息性毒剂的一种，8℃以下是发烟液体。氰化氢和光气以化学工业的中间体形式广泛存在[1]，因此人体中该类目标物浓度水平的监测应受到重视（表 3）。

表 3　路易氏剂及其他毒剂生物标志物的检测方法总结

毒剂	基质种类	目标化合物	分析方法	检测结果	参考文献
氮芥	血样	EDEA，MDEA，TEA	GC-MS	2.5，2.5，10 μg·L^{-1}	[31]
		N7G	RP-HPLC-UV	20 μg·L^{-1}	[33]
	尿样	EDEA，MDEA	LC-MS	0.41，0.96 μg·L^{-1}	[32]
路易氏剂	血样	L-1	GC-AED，GC-MS	40 pmol·L^{-1}，约 10 ng·L^{-1}	[34]
	尿样	L-1	GC-MS	7.4 ng·L^{-1}	[35]
BZ	血样	BZ	HPLC-UV	200 μg·L^{-1}	[36]
LSD	头发	nor-LSD	LC-MS	绝对检出量 50 pg	[39,40]
	血样	nor-LSD	RIA，non RIA	0.5 μg·L^{-1}	[38]
			CE-LIF	0.1 μg·L^{-1}	[42]
	尿样	nor-LSD	RIA，non RIA	0.39 μg·L^{-1}	[38]
氰化氢	尿样	硫氰酸盐	GC-MS	0.3 μmol·L^{-1}，约 15 μg·L^{-1}	[44]
			HPLC	8.9 μmol·L^{-1}，约 440 μg·L^{-1}	[46]
			分光光度法	7.5 μmol·L^{-1}，约 370 μg·L^{-1}	[46]
光气	血样	光气-白蛋白加合物	micro LC- MS-MS（MRM）	1 μmol·L^{-1}，约 100 μg·L^{-1}	[47]

氰化氢在体内主要通过氰离子结合细胞色素氧化酶中的三价铁，使细胞不能利用氧而导致内窒息，从而发挥毒性作用。硫氰酸生成酶可从血中快速清除大部分氰化物，形成的硫氰酸盐经尿排出体外；约 15% 的氰化氢可在胱氨酸、维生素 B_{12} 介导下转化成 2-亚氨四氢噻唑-4-羧酸和氰钴胺。因此，常通过检测尿中的硫氰酸盐对氰化氢中毒进行鉴定。已报道的分析检测方法有 GC-MS[43,44]、电化学法[45]、HPLC[46] 和分光光度法[46]。同位素稀释 GC-MS 可对每升为微克 ~ 毫克浓度的氰化物进行快速、准确的定量。光气是亲电试剂，在人体内可与广泛的亲核试剂反应，其体内代谢途径不明确，体外实验提示光气可与两分子谷胱甘肽加合后形成二谷胱甘肽二硫代碳酸酯，与半胱氨酸加合后形成 2-氧代四氢噻唑-4-羧酸，另外还可与赖氨酸结合形成加合物。光气沸点低，易水解，容易使 GC 色谱柱的固定相流失，因此样品分析前需冷却，同时需要选择固定相含有衍生化试剂类型的色谱柱，比如 Tenax TA 柱或 XAD-2 柱。检测器可以选择 AED、电子捕获检测器（ECD）、FID。鉴于以上情况，HPLC 分析光气具有较大优势，micro LC-MS-MS 对染毒人血样溯源性分析，可检出的最低染毒剂量是 1μmol·L^{-1}[47]。

6　结语

建立针对化学毒剂生物标志物的灵敏、专一、可溯源的检测方法，一方面可为中毒人员的临床诊断、中毒程度评估以及救治方案的制定提供科学的检测依据，另一方面也可为阐明毒剂的中毒机制、研制解毒药物提供技术支持，因此是十分重要而有意义的工作。

针对各类毒剂生物标志物的性质，分析手段各异，但色谱-质谱联用技术在灵敏度、专一性、检出限

等方面具有突出优势,日益受到分析工作者的青睐。除发展新的分析仪器以外,样品的前处理步骤成为改善分析结果的关键。围绕这一目标,新的萃取技术、选用含氟硫醇和可在水溶液中直接衍生化极性化合物的试剂、大体积进样等技术,都将是今后的研究重点。在现场筛检、临床快速诊断方面,便携式光谱法、电化学分析法、抗原-抗体免疫法等检测技术都将得到更广泛的应用。

参 考 文 献

[1] 黄培堂, 主译. 生物和化学武器的公共卫生应对措施 WHO 指南[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:136 - 162.

[2] Tsuge K, Seto Y. Detection of human butyrylcholinesterase-nerve gas adducts by liquid chromatography-mass spectrometric analysis after in gel chymotryptic digestion[J]. *J Chromatogr B*, 2006, 838(1):21 - 30.

[3] Bajgar J, Hajek P, Slizova D, *et al*. Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: biochemical and histochemical study[J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 165(1):14 - 21.

[4] Spruit HE, Trap HC, Langenberg JP, *et al*. Bioanalysis of the enantiomers of(+/-)-sarin using automated thermal cold-trap injection combined with two-dimensional gas chromatography[J]. *J Anal Toxicol*, 2001, 25(1):57 - 61.

[5] Adams TK, Capacio BR, Smith JR, *et al*. The application of the fluoride reactivation process to the detection of sarin and soman nerve agent exposures in biological samples[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2004, 27(1): 77 - 91.

[6] van der Schans MJ, Polhuijs M, van Dirjk C, *et al*. Retrospective detection of exposure to nerve agents: analysis of phosphofluoridates originating from fluoride-induced reactivation of phosphylated BuChE[J]. *Arch Toxicol*, 2004, 78(9):508 - 524.

[7] Polhuijs M, Langenberg JP, Benschop HP. New method for retrospective detection of exposure to organophosphorus anticholinesterases: application to alleged sarin victims of Japanese terrorists[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 146(1):156 - 161.

[8] Hui DM, Minami M. Monitoring of fluorine in urine samples of patients involved in the Tokyo sarin disaster, in connection with the detection of other decomposition products of sarin and the by-products generated during sarin synthesis[J]. *Clin Chim Acta*, 2000, 302(1/2):171 - 188.

[9] Jakubowski EM, Heykamp LS, Durst HD, *et al*. Preliminary studies in the formation of ethyl methylphosphonofluoridate from rat and human serum exposed to VX and treated with fluoride ion[J]. *Anal Lett*, 2001, 34(5):727 - 737.

[10] Matsuda Y, Nagao M, Takatori T, *et al*. Detection of the sarin hydrolysis product in Formalin-fixed brain tissues of victims of the Tokyo subway terrorist attack[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 150(2):310 - 320.

[11] Katagi M, Nishikawa M, Tatsuno M, *et al*. Determination of the main hydrolysis product of *O*-ethyl-S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethyl methylphosphonic acid, in human serum[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 689(2): 327 - 333.

[12] Nagao M, Takatori T, Matsuda Y, *et al*. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 144(1):198 - 203.

[13] Wang QQ, Xie JW, Gu MS, *et al*. Gas chromatographic-mass spectrometric method for quantitation of trimethylsilyl derivatives of nerve agent degradation products in human plasma, using strong anion-exchange solid-phase extraction[J]. *J Chromatogr*, 2005, 62(3/4):167 - 173.

[14] Noort D, Hulst AG, Platenburg DH, *et al*. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage[J]. *Arch Toxicol*, 1998, 72(10):671 - 675.

[15] Mawhinney DB, Hamelin EI, Fraser R, *et al*. The determination of organophosphonate nerve agent metabolites in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1/2):235 - 243.

[16] Meng ZH, Liu Q. Determination of degradation products of nerve agents in human serum by solid phase extraction using molecularly imprinted polymer[J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 435(1): 121 - 127.

[17] Katagi M, Nishikawa M, Tatsuno M, *et al*. Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 1997, 698(1/2):81 - 88.

[18] Minami M, Hui DM, Katsumata M, *et al*. Method for the analysis of the methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster[J]. *J Chromatogr B* (*Biomed Sci Appl*), 1997, 695(2):237 - 244.

[19] Driskell WJ, Shih M, Needham LL, *et al*. Quantitation of organophosphorus nerve agent metabolites in human urine using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Anal Toxicol*, 2002, 26(1):6 - 10.

[20] Barr JR, Driskell WJ, Aston LS, *et al*. Quantitation of metabolites of the nerve agents sarin, soman, cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Anal Toxicol*, 2004, 28(5):372 - 378.

[21] Riches J, Morton I, Black RM, *et al*. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 816(1/2):251 - 258.

[22] Pardasani D, Palit M, Gupta AK, *et al*. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of trifluoroacetyl derivatives of precur-

sors of nitrogen and sulfur mustards for verification of chemical weapons convention[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1059(1/2): 157 – 164.

[23] Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, *et al*. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications[J]. *Chem Biol Interact*, 1994, 91(1): 39 – 49.

[24] Oostdijk JP, Degenhardt CE, Trap HC, *et al*. Selective and sensitive trace analysis of sulfur mustard with thermal desorption and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1150(1/2):62 – 69.

[25] Sawyer TW, Vair C, Nelson P, *et al*. pH-Dependent toxicity of sulfur mustard *in vitro*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 221(3):363 – 371.

[26] van der Schans GP, Mars-Groenendijk R, de Jong LP, *et al*. Standard operating procedure for immunublot assay for analysis of DNA/sulfur mustard adducts in human blood and skin[J]. *J Anal Toxicol*, 2004, 28 (5):316 – 319.

[27] van der Schans GP, Scheffer AG, Mars-Groenendijk RH, *et al*. Immunochemical detection of adducts of sulfur mustard to DNA of calf thymus and human white blood cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 1994, 7(3):408 – 413.

[28] Daly JD, O′Hehir CM, Frame GM. A sensitive method for quantitation of β-lyase metabolites of sulfur mustard as 1,1′-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] (SBMTE) in human urine by isotope dilution liquid chromatography-positive ion-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 850(1/2):120 – 127.

[29] Karvaly G, Gachályi A, Fürész J. Quantitative analysis of the sulfur mustard hydrolysis product thiodiglycol (2,2′-sulfobisethanol) in *in vivo* microdialysates using gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detection[J]. *J Chromatogr Sci*, 2005, 43(6):319 – 323.

[30] Ohsawa I, Kanamori-Kataoka M, Tsuge K, *et al*. Determination of thiodiglycol, a mustard gas hydrolysis product by gas chromatography-mass sectrometry after tert-butyldimethylsilylation[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1061(2):235 – 241.

[31] Ohsawa I, Seto Y. Determination of nitrogen mustard hydrolysis products, ethanolamines by gas chromatography-mass spectrometry after tert-butyldimethylsilyl derivatization[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1122(1/2): 242 – 248.

[32] Reepmeyer JC. Analysis of the nitrogen mustard mechlorethamine in topical pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1085(2):262 – 269.

[33] Gresham GL, Groenewold GS, Olson JE. Identification of the nitrogen-based blister agents bis(2-chloroethyl)methylamine (HN-2) and tris(2-chloroethyl)amine (HN-3) and their hydrolysis products on soil using ion trap secondary ion mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrum*, 2000, 35(12):1460 – 1469.

[34] Fidder A, Noort D, Albert G, *et al*. Biomonitoring of exposure to lewisite based on adducts to haemoglobin[J]. *Arch Toxicol*, 2000, 74(4/5):207 – 214.

[35] Wooten JV, Ashley DL, Calafat AM. Quantitation of 2-chlorovinylarsonous acid in human urine by automated solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technal Biomed Life Sci*, 2002, 772(1):147 – 153.

[36] 张洪兰,周永新,娄艳红. 血浆中 BZ 类失能剂的高效液相二极管矩阵检测分析方法的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1999, 23(3):218 – 220.

[37] Dagauta P, Glarborgb P, Alzuetac MU. The oxidation of hydrogen cyanide and related chemistry[J]. *Prog Energ Combust Sci*, 2008, 34(1):1 – 46.

[38] Kerrigan S, Brooks DE. Immunochemical extraction and detection of LSD in whole blood[J]. *J Immunol Methods*, 1999, 224(1/2):11 – 18.

[39] Röhrich J, Zörntlein S, Becker J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying immunElute columns[J]. *Forensic Sci Int*, 2000, 107(1/3):181 – 190.

[40] Schneider S, Kuffer P, Wennig R. Determination of lysergide (LSD) and phencyclidine in biosamples[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 713(1):189 – 200.

[41] Johansen SS, Jensen JL. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of LSD, ISO-LSD, and the main metabolite 2-oxo-3-hydroxy-LSD in forensic samples and application in a forensic case[J]. *J Chromatogr B Analyt Technot Biomed Life Sci*, 2005, 825(1):21 – 28.

[42] Frost M, Köhler H, Blaschke G. Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 693(2): 313 – 319.

[43] Murphy KE, Schantz MM, Butler TA, *et al*. Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(3):458 – 467.

[44] Dumas P, Gingras G, LeBlanc A. Isotope dilution-mass spectrometry determination of blood cyanide by headspace gas chromatography[J]. *J Anal Toxicol*, 2005, 29(1):71 – 75.

[45] Lindsay AE, O′Hare D. The development of an electrochemical sensor for the determination of cyanide in physiological solutions[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 558(1/2):158 – 163.

[46] Lin CC, Wong BK, Burgey CS, *et al*. *In vitro* metabolism of a thrombin inhibitor and quantitation of metabolically generated cyanide[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(5):1014 – 1020.

[47] Noort D, Hulst AG, Fidder A, *et al*. *In vitro* adduct formation of phosgene with albumin and hemoglobin in human blood[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(8):719 – 726.